

Laboratorio Nacional de Salud Pública

Código:	A1
Versión:	V1
Vigente desde:	1-8-2013
Próxima revisión:	1-8-2015
Páginas:	5
Firma de autorización:	

1. Tinción de Gram

2. Objeto y campo de aplicación

La técnica de tinción de Gram se utiliza para la tinción de bacterias, levaduras y actinomicetos aerobios.

Este procedimiento operativo estándar es aplicable a todo el personal técnico de la sección de microbiología que haya recibido capacitación en la realización de este procedimiento, que sea competente y que esté autorizado para llevar a cabo este procedimiento.

3. Abreviaturas y definiciones

Para las abreviaturas, definiciones y términos en general, consulte el capítulo 1 del manual de calidad.

- MC Manual de calidad
- POE Procedimiento operativo estándar

4. Tareas, responsabilidades y autorizaciones

Para las autorizaciones generales consulte la matriz de autorización.

Tarea	Autorizado	Responsable
Preparación de reactivos	PL	DL
Preparación del portaobjetos	TL	DL
Tinción del portaobjetos	TL	DL
interpretación de los resultados	TL	DL
Informe de los resultados	CD	DL

5. Principio

La composición de la pared celular de un microorganismo determina si retendrá el tinte cristal violeta (cloruro de metilrosanilina) o si se descolorará y será visible solo mediante la contratinción con safranina. Los organismos que retienen el tinte cristal violeta (cloruro de metilrosanilina) se teñirán de color azul, los que no, se teñirán de rojo con safranina. Los microorganismos azules son grampositivos. Los microorganismos rojos son gramnegativos.

6. Seguridad y entorno

Las normas de seguridad deben tenerse en consideración cuando se trabaje con materiales potencialmente infecciosos provenientes de pacientes. Para verificar las normas de seguridad generales, consulte el manual de bioseguridad.

Alicuote los hemocultivos y prepare frotis a partir de los hemocultivos en una cabina de bioseguridad.

Laboratorio Nacional de Salud Pública	Código:	A1
	Versión:	V1
	Vigente desde:	1-8-2013
	Próxima revisión:	1-8-2015
	Páginas:	5
	Firma de autorización:	

7. Muestra

Las tinciones de Gram se pueden generar a partir de hemocultivos y de cultivos en medio sólido. De ambos tipos de muestras se necesita solo una pequeña cantidad:

Tipo de muestra	Cantidad mínima	Condiciones y lugar de almacenamiento
Hemocultivo	1 gota	4 °C, Sala A2, Refrigerador 1
Cultivo en medio sólido:	1 colonia	4 °C, Sala A2, Refrigerador 1

Después de la incubación los cultivos se almacenan a 4 °C en un refrigerador.
Las tinciones se almacenan a temperatura ambiente.

8. Equipos e insumos

Insumos:

Lámina portaobjetos de vidrio
Jeringa con aguja
Pipetas Pasteur
Asa de siembra
Gradilla de tinción

Lugar de almacenamiento:

Sala A3, cabina 1
Sala A3, cabina 1
Sala A3, cabina 1
Sala A3, cabina 1
Sala A1, campana de seguridad

Equipos (código de equipos):

Placa calefactora (B001)
Microscopio óptico (B005)

Lugar de almacenamiento:

Sala A1, campana de seguridad
Sala A1, mesa

9. Reactivos y productos químicos

Artículo (según referencia del POE)	Lugar de almacenamiento	Condición de almacenamiento
Cristal violeta o cloruro de metilrosanilina (P23)	Sala A3, cabina de seguridad 3	Temperatura ambiente
Yodo (P23)	Sala A3, cabina de seguridad 3	Temperatura ambiente
Etanol al 95 %/acetona (P23)	Sala A3, cabina de seguridad 3	Temperatura ambiente
Safranina (P23)	Sala A3, cabina de seguridad 3	Temperatura ambiente
Aceite de inmersión	Sala A1, mesa	

10. Control de calidad

Realice el control de calidad una vez por semana. El control de calidad consiste en la lectura de las láminas portaobjetos preparadas con organismos grampositivos y gramnegativos. Para los grampositivos se usa como referencia el *Staphylococcus aureus*, para los gramnegativos se usa la *E. coli*.

Interpretación y límites aceptables:

- Los *S. aureus*, grampositivos, son visibles como cocos azules
- Los *E. coli*, gramnegativos, son visibles como bacilos rojos

Laboratorio Nacional de Salud Pública

Código:	A1
Versión:	V1
Vigente desde:	1-8-2013
Próxima revisión:	1-8-2015
Páginas:	5
Firma de autorización:	

Procesamiento de los resultados:

- Registre los resultados del control de calidad (CC) en el formulario de CC de tinción de Gram que se facilita en el anexo 1.
- Registre los resultados de CC inaceptables también en un formulario de no conformidad para iniciar un análisis de problema y su acción correctiva.
- Revise los resultados del CC mensualmente.

Acciones en caso de resultados que se encuentren fuera de los límites aceptables (a realizar por al técnico del laboratorio):

- Tiña nuevas láminas portaobjetos de control
- Si todavía fuesen inaceptables, compruebe la calidad del reactivo, compruebe si el procedimiento de tinción se ha seguido correctamente y compruebe si se usaron las cepas de referencia correctas.

11. Procedimiento

11.1 Preparación de frotis

A partir de hemocultivo:

1. Utilizando una pipeta Pasteur o un asa de siembra, saque una pequeña alícuota y coloque una gota o asa de siembra llena de sangre sobre una lámina portaobjetos de vidrio
2. Coloque el frotis en la placa calefactora para secarlo y fije el portaobjetos durante aproximadamente 30 minutos

A partir de colonias:

1. Coloque una gota de agua destilada y esterilizada o de una solución salina en una lámina portaobjetos de vidrio
2. Utilizando un asa de siembra de 1 µl, elimine una colonia y emulsione en la gota
3. Colóquelo en la placa calefactora para secarlo y fije el portaobjetos durante aproximadamente 30 minutos

11.2 Procedimiento de tinción

1. Cubra completamente el portaobjetos fijado con cristal violeta (cloruro de metilrosanilina) y déjelo reposar un minuto
2. Enjuáguelo con agua corriente y escurra el exceso de agua
3. Cubra completamente el portaobjetos con yodo de Gram (lugol) y déjelo reposar un minuto
4. Enjuáguelo con agua corriente y escurra el exceso de agua
5. Decolore con etanol al 95 %/acetona hasta que se elimine la mayor parte del cristal violeta (cloruro de metilrosanilina) de las zonas finas (el tiempo de detención dependerá del grosor de frotis)
6. Enjuáguelo con agua corriente y escurra el exceso de agua
7. Realice una contratinción con safranina durante 10 segundos
8. Enjuáguelo con agua corriente y escurra el exceso de agua
9. Coloque el portaobjetos en la placa calefactora hasta que esté seco o séquelo suavemente con una toallita de papel

11.3 Análisis

1. Coloque una gota de aceite de inmersión sobre la lámina portaobjetos
2. Examínela con el objetivo de inmersión (100X)

Laboratorio Nacional de Salud Pública	Código:	A1
	Versión:	V1
	Vigente desde:	1-8-2013
	Próxima revisión:	1-8-2015
	Páginas:	5
	Firma de autorización:	

- Enfoque usando el tornillo macrométrico y el tornillo micrométrico hasta que los objetos estén correctamente enfocados

11.4 Resultados

Interpretación de los resultados:

- Organismos azules: grampositivos
- Organismos rojos: gramnegativos
- La tinción de las levaduras es grampositiva
- El material de fondo (citoplasma celular) se tiñe de color rojo

11.5 Informe de los resultados

- Describe los organismos por su reacción de Gram (grampositivo: azul, gramnegativo: rojo) y su morfología microscópica y disposición (por ejemplo, cocos en pares, cadenas, grupos; bacilos, pequeños, grandes, filamentosos, levaduras). Por ejemplo: "Cocos grampositivos en cadenas"
- Registre los resultados en el registro de resultados
- Siga el proceso normal de notificación que se describe en el POE P4v2 "Informe de los resultados"

11.6 Limitaciones

- La duración del paso de decoloración (etanol/acetato) es fundamental. Los frotis finos requieren menos tiempo que los frotis gruesos. Demasiada decoloración hará que todo lo que contenga el portaobjetos se vuelva rojo; un tiempo insuficiente de decoloración hará que todo lo que contenga el portaobjetos se vuelva azul
- Los organismos grampositivos, especialmente los bacilos, a partir de cultivos que no estén frescos (>48 horas) puede que no retengan el cristal violeta (cloruro de metilrosanilina) y que se tiñan de rojo
- Algunas especies de bacterias se describen como "gramvariables" y se tiñen de azul o de rojo o de ambos colores (por ejemplo, *Gardnerella vaginalis*)

11.7 Limpieza

- El líquido de tinción utilizado debe desecharse en los contenedores para residuos químicos líquidos
- Los frotis de Gram se deben desechar en el contenedor para desechos autoclavable

13. Documentos relacionados

- MC1 "General"
- Manual de bioseguridad, presente en cada sala del laboratorio y en la oficina de administración
- POE P23 "Preparación de reactivos para tinción de Gram"
- POE E4 "Uso y mantenimiento del microscopio óptico"
- POE P4 "Informe de los resultados"

14. Formularios relacionados

- P4F1 "Informe de resultados"
- Registro de pacientes, Secretaría

Laboratorio Nacional de Salud Pública	Código:	A1
	Versión:	V1
	Vigente desde:	1-8-2013
	Próxima revisión:	1-8-2015
	Páginas:	5
	Firma de autorización:	

12. Referencias

- Manual de microbiología clínica, Chapin, KC, Lauderdale, T., ASM Press, 2003, Washington, DC. Capítulo: Reactivos, tinciones y medios.
- Portal de evaluación del seguimiento de la seguridad del paciente en laboratorios internacionales. Consultado el 20 de febrero de 2013. Disponible en: <http://resources.psmile.org/resources/process-control/section-specific-information/microbiology/bacteriology/Pro6.7-A-12%20Gram%20Stain%20%20.doc/view>

13. Anexos

- Anexo 1 “Formulario de control de calidad para tinción de Gram”

Código:	A1A1
Versión:	V1
Vigente desde:	1-8-2013
Próxima revisión:	1-8-2015
Páginas:	1
Firma de autorización:	