

APLICACIÓN

Para su uso en el método de tinción de Gram para la diferenciación rápida de bacterias grampositivas y gramnegativas en portaobjetos preparados a partir de muestras clínicas.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La tinción de Gram fue creada por Hans Christian Gram en 1884. El método estándar de tinción de Gram se utiliza para diferenciar bacterias intactas y morfológicamente similares en dos grupos: Grampositivas y gramnegativas.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Las bacterias grampositivas tienen una capa más gruesa de peptidoglicano en su pared celular, lo que retiene la tinción primaria, creando un color púrpura al final. Las bacterias gramnegativas permiten que la tinción primaria se elimine debido a una capa de peptidoglicano más fina, lo que hace que la tinción final produzca un colorante de contraste en las bacterias y les dé un aspecto rojo rosado cuando se observan al microscopio.

MATERIALES SUMINISTRADOS

Colorantes y diferenciadores listos para usar:

| | | |
|---------------|------------------------|---------|
| - PL.7000/100 | Violeta cristal | 100 ml |
| - PL.7000/25 | Violeta cristal | 250ml |
| - PL.7000 | Violeta cristal | 500 ml |
| - PL.7001 | Violeta cristal | 1000 ml |
| - PL.7002 | Violeta cristal | 2000 ml |
| - PL.7003/100 | Yodo de Gram | 100 ml |
| - PL.7003/25 | Yodo de Gram | 250 ml |
| - PL.7003 | Yodo de Gram | 500 ml |
| - PL.7004 | Yodo de Gram | 1000 ml |
| - PL.7005 | Yodo de Gram | 2000 ml |
| - PL.7006/100 | Diferenciador de Gram | 100ml |
| - PL.7006/25 | Diferenciador de Gram | 250ml |
| - PL.7006 | Diferenciador de Gram | 500ml |
| - PL.7007 | Diferenciador de Gram | 1000ml |
| - PL.7008 | Diferenciador de Gram | 2000ml |
| - PL.7009/100 | Rojo neutro | 100 ml |
| - PL.7009/25 | Rojo neutro | 250 ml |
| - PL.7009 | Rojo neutro | 500 ml |
| - PL.7010 | Rojo neutro | 1000 ml |
| - PL.7011 | Rojo neutro | 2000 ml |
| - PL.7012/100 | Safranina | 100 ml |
| - PL.7012/25 | Safranina | 250 ml |
| - PL.7012 | Safranina | 500 ml |
| - PL.7013 | Safranina | 1000 ml |
| - PL.7014 | Safranina | 2000 ml |
| - PL.7015/100 | Carbol fucsina diluida | 100 ml |
| - PL.7015/25 | Carbol fucsina diluida | 250 ml |
| - PL.7015 | Carbol fucsina diluida | 500 ml |
| - PL.7016 | Carbol fucsina diluida | 1000 ml |
| - PL.7017 | Carbol fucsina diluida | 2000 ml |
| - PL.7052 | Yodo de Lugols | 500 ml |
| - PL.7053 | Yodo de Lugols | 1000 ml |
| - PL.7053-2 | Yodo de Lugols | 2000ml |
| - PL.7056 | Acetona Yodo | 500 ml |
| - PL.7057 | Acetona Yodo | 1000 ml |
| - PL.7058 | Acetona Yodo | 2000 ml |

| | | |
|--------------|---|---------|
| - PL.7073 | Violeta cristal, oxalato de amonio | 500ml |
| - PL.7074 | Violeta cristal, oxalato de amonio | 1000ml |
| - PL.7075 | Violeta cristal, oxalato de amonio | 2000ml |
| - PL.7100/CV | Violeta cristal 0,15 % | 500ml |
| - PL.7101/CV | Violeta cristal 0,15 % | 1000ml |
| - PL.7102/CV | Violeta cristal 0,15 % | 2000ml |
| - PL.7101 | Fucsina básica / Rojo neutro | 500ml |
| - PL.7102 | Fucsina básica / Rojo neutro | 1000ml |
| - PL.7103 | Fucsina básica / Rojo neutro | 2000ml |
| - PL.7106 | Diferenciador de Gram (Acetona/Propan-2-ol) | 500ml |
| - PL.7107 | Diferenciador de Gram (Acetona/Propan-2-ol) | 1000ml |
| - PL.7108 | Diferenciador de Gram (Acetona/Propan-2-ol) | 2000ml |
| - PL.7110 | Tinción de Sandifords | 500ml |
| - PL.7111 | Tinción de Sandifords | 1000ml |
| - PL.7112 | Tinción de Sandifords | 2000ml |
| - PL.7113 | Violeta de metilo | 500 ml |
| - PL.7114 | Violeta de metilo | 1000 ml |
| - PL.7115 | Violeta de metilo | 2000 ml |
| - PL.7116 | Safranina / Rojo neutro | 500ml |
| - PL.7117 | Safranina / Rojo neutro | 1000ml |
| - PL.7118 | Safranina / Rojo neutro | 2000ml |
| - PL.7206/25 | Diferenciador de Gram (acetona) | 250ml |
| - PL.7206 | Diferenciador de Gram (acetona) | 500ml |
| - PL.7207 | Diferenciador de Gram (acetona) | 1000ml |
| - PL.7208 | Diferenciador de Gram (acetona) | 2000ml |
| - PL.7306/25 | Diferenciador de Gram (IMS) | 250ml |
| - PL.7306 | Diferenciador de Gram (IMS) | 500ml |
| - PL.7307 | Diferenciador de Gram (IMS) | 1000ml |
| - PL.7308 | Diferenciador de Gram (IMS) | 2000ml |
| - PL.7406 | Diferenciador de Gram (IMS/acetona) | 500ml |
| - PL.7407 | Diferenciador de Gram (IMS/acetona) | 1000ml |
| - PL.7408 | Diferenciador de Gram (IMS/acetona) | 2000ml |

Por 100 ml de solución:

- La violeta cristal lista para usar contiene 0,5 g de violeta cristal en polvo.
- El yodo de Gram listo para usar contiene 0,38 g de yodo.
- El diferenciador de Gram contiene 50 ml de IMS y 50 ml de acetona.
- El rojo neutro listo para usar contiene 0,4 g de rojo neutro en polvo.
- La safranina lista para usar contiene 0,4 g de safranina O.
- El carbol fucsina diluido listo para usar contiene 0,15 g de fucsina básica en polvo.
- El yodo de Lugols listo para usar contiene 0,75 g de yodo.
- La acetona yodo contiene 0,35 g de yodo.
- La violeta cristal, oxalato de amonio contiene 1 g de violeta cristal y 0,4 gr de oxalato de amonio.
- La violeta cristal 0,15 % contiene 0,15 g de violeta cristal en polvo.
- La fucsina básica/rojo neutro contiene 0,1 g de rojo neutro y 0,0025 g de fucsina básica en polvo.
- El diferenciador de Gram (acetona/propan-2-ol) contiene 66,8 ml de P-2-ol y 33,2 ml de acetona.
- La tinción de Sandifords contiene 0,05 g de verde de malaquita en polvo y 0,15 g de pironina Y.
- La violeta de metilo lista para usar contiene 0,5 g de violeta cristal en polvo.
- La safranina/rojo neutro contiene 0,3 g de safranina O y 0,3 g de rojo neutro en polvo.
- El diferenciador de Gram (acetona) contiene 98 ml de acetona.
- El diferenciador de Gram (IMS/acetona) contiene 97 ml de IMS y 3 ml de acetona.

Kits de tinción (listos para usar):

- PL.8055/25 Kit de tinción de Gram (safranina)
1 x PL.7000/25, 1 x PL.7003/25, 1 x PL.7006/25, 1 x PL.7012/25
- PL.8056/25 Kit de tinción de Gram (rojo neutro)
1 x PL.7000/25, 1 x PL.7003/25, 1 x PL.7006/25, 1 x PL.7009/25
- PL.8057/25 Kit de tinción de Gram (carbol fucsina diluida)
1 x PL.7000/25, 1 x PL.7003/25, 1 x PL.7006/25, 1 x PL.7015/25

Colorantes concentrados (diluir 1 en 10 con agua desionizada o de ósmosis inversa antes de usar):

| | | |
|---------------|------------------------|--------|
| - PL.8000 | Violeta cristal | 100 ml |
| - PL.8000/4,0 | Violeta cristal | 400ml |
| - PL.8000/5,0 | Violeta cristal | 500ml |
| - PL.8001 | Yodo de Gram | 100 ml |
| - PL.8001/4,0 | Yodo de Gram | 400 ml |
| - PL.8001/5,0 | Yodo de Gram | 500 ml |
| - PL.8002 | Rojo neutro | 100ml |
| - PL.8002/4,0 | Rojo neutro | 400 ml |
| - PL.8002/5,0 | Rojo neutro | 500 ml |
| - PL.8003 | Safranina | 100 ml |
| - PL.8003/4,0 | Safranina | 400 ml |
| - PL.8003/5,0 | Safranina | 500 ml |
| - PL.8004 | Carbol fucsina diluida | 100 ml |
| - PL.8004/4,0 | Carbol fucsina diluida | 400 ml |
| - PL.8004/5,0 | Carbol fucsina diluida | 500 ml |
| - PL.8010 | Yodo de Lugols | 100 ml |
| - PL.8010/4,0 | Yodo de Lugols | 400ml |
| - PL.8010/5,0 | Yodo de Lugols | 500ml |
| - PL.8011 | Violeta de metilo | 100 ml |
| - PL.8011/4,0 | Violeta de metilo | 400ml |
| - PL.8011/5,0 | Violeta de metilo | 500ml |

Por 100 ml de solución:

- La violeta cristal concentrada contiene 5 g de violeta cristal en polvo.
- El yodo de Gram concentrado contiene 3,75 g de yodo.
- El rojo neutro concentrado contiene 4 g de rojo neutro en polvo.
- La safranina concentrada contiene 4 g de safranina O.
- El carbol fucsina diluido concentrado contiene 1,5 g de fucsina básica en polvo.
- El yodo de Lugols concentrado contiene 7,5 g de yodo.
- La violeta de metilo concentrada contiene 5 g de violeta cristal en polvo.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Portaobjetos de vidrio
- Asa de inoculación
- Microscopio
- Aceite de inmersión PL.396
- Pro-Slide™, control de tinción de Gram PL.4961

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los colorantes y los diferenciadores deben almacenarse a una temperatura de entre 15 y 25 °C en sus envases originales. El producto almacenado en estas condiciones será estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto.

PRECAUCIONES

- Solo para uso en diagnóstico *in vitro*.
- Solo para uso profesional. Lea las instrucciones detenidamente.
- No utilizar el producto transcurridas las fechas de caducidad indicadas.



- La contaminación microbiana podría reducir la precisión de la tinción.
- Deben tomarse precauciones de seguridad a la hora de manipular, procesar y desechar todas las muestras clínicas.
- Las muestras deben procesarse en las condiciones correctas de nivel de contención.
- Recicle todos los materiales de conformidad con la normativa local de residuos.
- Cualquier incidente grave que se presente en relación con el producto se debe notificar al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que se haya producido el suceso.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

1. Prepare un frotis en un portaobjetos de vidrio limpio y déjelo secar al aire. Fije con calor y deje enfriar.
2. Eche violeta cristal o violeta de metilo en el portaobjetos y déjelo reposar durante 1 minuto. Aclare con agua.
3. Eche yodo de Grams o yodo de Lugol en el portaobjetos y déjelo reposar durante 1 minuto. Aclare con agua.
4. Decolore suavemente con diferenciador durante unos 10 segundos o con acetona yodo durante 1 minuto. Aclare con agua.
5. Eche tinción de contraste en el portaobjetos y déjelo reposar unos 30 o 60 segundos.
6. Aclare con agua abundante; seque suavemente con un paño.
7. Examine con el microscopio.

PROCEDIMIENTO DE CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad interno de los colorantes y diferenciadores debe llevarse a cabo ocasionalmente con material de referencia conocido.

Control de calidad recomendado:

Control positivo: *Staphylococcus aureus* NCTC® 12981/ATCC® 25923* (PLD13)

Control negativo: *Escherichia coli* NCTC® 12241/ATCC® 25922* (PLD02)

Pro-Slide™, control de tinción de Gram PL.4961

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Organismos grampositivos: de azul a violeta.

Organismos gramnegativos: de rosa a rojo.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Solo el personal cualificado debe interpretar los portaobjetos teñidos
- Interprete los portaobjetos preparados lo antes posible después de la tinción. No hacerlo podría afectar a los resultados.

REFERENCIAS

- Anderson, N.L. et al. Cumitech 3B; Quality Systems in the Clinical Microbiology Laboratory. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C.
- Balzevic, D.J. and Edrer, G.M. 1975. Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology. *John Wiley & sons*, New York, NY.
- Chapin, K. C., and T.-L. Lauderdale. (2003). Reagents, stains, and media: bacteriology. p. 354-383.
- Gurr, E. (1953) A Practical Manual of Medical and Biological Staining Technique.
- Isenberg HD. (1992). Ed. Clinical microbiology procedures handbook, Vol I Washington, DC: *ASM Press*.
- Jorgensen et al. (1974) Manual of Clinical Microbiology. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C.
- Public Health England. (May 2019). UK Standards for Microbiology Investigations: Staining Procedures. *Bacteriology – Test Procedures*. TP 39, Issue no.3.
- Lowrance, B.L., Reich, P. and Traub, W.H. (1969). *Journal of Applied Microbiology* 17:923-924.
- Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, M. A. and Tenover, R. H. (ed.). (2003). Manual of clinical microbiology, 8th edition. *ASM Press*, Washington, DC.
- Wacko, R. and Sherris, J.C. (1963). *American Journal of Clinical Pathology*. 39:429-432.

| | |
|--|---|
| | = Use by |
| | = Lot number |
| | = Catalogue number |
| | = Manufacturer |
| | = Authorized Representative in the European Community |
| | = Contains sufficient for <n> tests |
| | = In vitro diagnostic medical device |
| | = Temperature limitation |
| | = Consult instructions for use |



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2nd Floor, Tower Street, Swatar, BKR 4013, Malta.

*NCTC® y NCPF® son marcas registradas de Public Health England. Las cepas ATCC® se mencionan solo como referencia. ATCC® es una marca registrada de la American Type Culture Collection.




IDENTIFICACIÓN DE PELIGROS

Consulte el documento completo de las indicaciones de peligro y precaución en las fichas técnicas de seguridad.

| | | |
|--|--|--|
| | PL.8000 PL.8000/4.0 PL.8000/5.0 PL.8011 PL.8011/4.0 PL.8011/5.0 | H226, H318, H332, H350, H411 P201, P210, P273, P280, P305+P351+P338, P310, P370+P378, P391, P403+P235 |
| | PL.8004 PL.8004/4.0 PL.8004/5.0 | H302, H314, H332, H341, H410 P321, P260, P273, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310, P391 |

| | | |
|--|--|--|
| | PL.8001 PL.8001/4.0 PL.8001/5.0 | H226, H315, H319, H373 P210, P260, P264, P321, P370+P378, P403+P235 |
| | PL.8002 PL.8002/4.0 PL.8002/5.0 | H226, H319, H341 P201, P210, P280, P308+P313, P370+P378, P403+P235 |
| | PL.8010 PL.8010/4.0 PL.8010/5.0 | H226, H302, H315, H319, H332, H373 P210, P260, P264, P370+P378, P403+P235, P501 |
| | PL.7073 PL.7074 PL.7075 | H226, H319, H350, H412 P201, P210, P280, P308+P313, P370+P378, P403+P235 |
| | PL.7306/25 PL.7306 PL.7307 PL.7308 PL.7406 PL.7407 PL.7408 | H225, H302, H311, H319, H331, H371 P210, P260, P280, P321, P370+P378, P403+P233 |
| | PL.8003 PL.8003/4.0 PL.8003/5.0 | H226, H318 P210, P233, P305+P351+P338, P310, P370+P378, P403+P235 |
| | PL.7106 PL.7107 PL.7108 PL.7206/25 PL.7206 PL.7207 PL.7208 | H319, H225, H336, EUH066 P210, P261, P312, P370+P378, P403+P233, P501 |
| | PL.7056 PL.7057 PL.7058 | H319, H225, H332, H336, EUH066 P210, P261, P312, P370+P378, P403+P233, P501 |
| | PL.7006/100 PL.7006/25 PL.7006 PL.7007 PL.7008 | H226, H319, H331, H336, EUH066 P321, P210, P261, P304+P340, P370+P378, P403+P233 |



| | | |
|--|---|---|
|  ADVERTENCIA | PL.7116 PL.7117 PL.7118 PL.7009/100 PL.7009/25 PL.7009 PL.7010 PL.7011 PL.7012/100 PL.7012/25 PL.7012 PL.7013 PL.7014 | H226, H319 P210, P233, P337+P313, P363, P370+P378, P403+P235 |
|  ADVERTENCIA | PL.7015/100 PL.7015/25 PL.7015 PL.7016 PL.7017 | H226, H400 P210, P273, P370+P378, P391, P403+P235, P501 |
|  PELIGRO | PL.7000/100 PL.7000/25 PL.7000 PL.7001 PL.7002 PL.7113 PL.7114 PL.7115 | H350, H412 P201, P202, P273, P280, P308+P313, P501 |
| | PL.7100/CV PL.7101/CV PL.7102/CV | H350 P201, P202, P280, P308+P313, P405, P501 |
| | PL.7110 PL.7111 PL.7112 | H412 P273, P501 |
| | PL.7003/100 PL.7003/25 PL.7003 PL.7004 PL.7005 PL.7052 PL.7053 PL.7053-2 PL.7101 PL.7102 PL.7103 | Esta mezcla está clasificada como no peligrosa conforme al Reglamento (CE) 1272/2008 [CLP]. No está clasificado (SI 2019/758 y modificaciones). |