Jorge Antonio Montaño Rojo 4o BEO 3807

**Tinción de Gram**



Bacterias *Escherichia coli* (Gram negativas) vistas al microscopio tras ser teñidas con la tinción de Gram.



Bacterias *Clostridium perfringens* (Gram positivas).



Bacterias Gram positivas de[Bacillus anthracis](http://es.wikipedia.org/wiki/Bacillus_anthracis) (bacilos morados) que producen una enfermedad llamada [Carbunco](http://es.wikipedia.org/wiki/Carbunco), encontrados en una muestra de [líquido cerebroespinal](http://es.wikipedia.org/wiki/L%C3%ADquido_cerebroespinal). Si hubiera una especie de bacteria Gram negativa, apareceria de color rosa. El resto son [leucocitos](http://es.wikipedia.org/wiki/Leucocito) atacando la infección.



Una tinción Gram en la que observamos un mezclado de[*Staphylococcus aureus*](http://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus) ([Coco](http://es.wikipedia.org/wiki/Coco_%28bacteria%29) Gram positivo) y *[Escherichia coli](http://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli%22%20%5Co%20%22Escherichia%20coli)* ([bacilo](http://es.wikipedia.org/wiki/Bacilo%22%20%5Co%20%22Bacilo)Gram negativo)

La **tinción de Gram** o **coloración de Gram** es un tipo de [tinción diferencial](http://es.wikipedia.org/wiki/Tinci%C3%B3n_diferencial) empleado en [Bacteriología](http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteriolog%C3%ADa) para la visualización de [bacterias](http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria), sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al [bacteriólogo](http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteriolog%C3%ADa) [danés](http://es.wikipedia.org/wiki/Dinamarca) [Christian Gram](http://es.wikipedia.org/wiki/Christian_Gram), que desarrolló la técnica en [1884](http://es.wikipedia.org/wiki/1884). Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose [Bacteria Gram positiva](http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria_Gram_positiva) a las bacterias que se visualizan de color morado, y [Bacteria Gram negativa](http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria_Gram_negativa) a las que se visualizan de color rosa o rojo o grosella

**Metodología**

* Recoger muestras.
* Hacer el extendido con un palillo de madera.
* Dejar secar a temperatura ambiente o fijarlas utilizando un mechero.
* Fijar la muestra con metanol durante un minuto o al calor (flameado 3 veces aprox.)
* Agregar azul violeta ([cristal violeta](http://es.wikipedia.org/wiki/Cristal_violeta) o violeta de genciana) y esperar 1 minuto. Todas las células gram positivas se tiñen de color azul-púrpura.
* Enjuagar con agua.
* Agregar [lugol](http://es.wikipedia.org/wiki/Lugol%22%20%5Co%20%22Lugol) y esperar entre 1 minuto.
* Enjuagar con agua.
* Agregar [alcohol](http://es.wikipedia.org/wiki/Alcohol) [acetona](http://es.wikipedia.org/wiki/Acetona) y esperar 30 segundos o 5 según la concentración del reactivo (parte crítica de la coloración).
* Enjuagar con agua.
* Tinción de contraste agregando [safranina](http://es.wikipedia.org/wiki/Safranina) o [fucsina](http://es.wikipedia.org/wiki/Fucsina) básica y esperar 1 minuto. Este tinte dejará de color rosado-rojizo las bacterias Gram negativas.

Para observar al microscopio óptico es conveniente hacerlo a 100x con aceite de inmersión.

**Explicación**

El [cristal violeta](http://es.wikipedia.org/wiki/Cristal_violeta) (colorante catiónico) penetra en todas las células bacterianas (tanto Gram positivas como Gram negativas) a través de la pared bacteriana. El [lugol](http://es.wikipedia.org/wiki/Lugol%22%20%5Co%20%22Lugol) es un compuesto formado por I2 ([yodo](http://es.wikipedia.org/wiki/Yodo)) en equilibrio con KI ([yoduro de potasio](http://es.wikipedia.org/wiki/Yoduro_de_potasio)) y Sl ([Siulterio](http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Siulterio&action=edit&redlink=1" \o "Siulterio (aún no redactado))), los cuales están presente para solubilizar el yodo, y actúan de mordiente, haciendo que el cristal violeta se fije con mayor intensidad a la pared de la célula bacteriana. El I2 entra en las células y forma un complejo insoluble en solución acuosa con el cristal violeta..

La mezcla de alcohol-acetona que se agrega, sirve para realizar la decoloración, ya que en la misma es soluble el complejo I2/cristal violeta. Los organismos Gram positivos no se decoloran, mientras que los Gram negativos sí lo hacen.

Para poner de manifiesto las células Gram negativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la [safranina](http://es.wikipedia.org/wiki/Safranina) o la [fucsina](http://es.wikipedia.org/wiki/Fucsina). Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen violetas.

La safranina puede o no utilizarse, no es crucial para la técnica. Sirve para hacer una tinción de contraste que pone de manifiesto las bacterias Gram negativas. Al término del protocolo, las Gram positivas se verán azul-violáceas y las Gram negativas, se verán rosas (si no se hizo la tinción de contraste) o rojas (si se usó, por ejemplo, safranina).

Esta importante coloración diferencial fue descubierta por Hans Christian Gram en 1884. En este método de tinción, la extensión bacteriana se cubre con solución de uno de los colorantes de violeta de metilo, que se deja actuar durante un lapso determinado. Se escurre luego el exceso de violeta de metilo y se añade luego una solución de yodo, que se deja durante el mismo tiempo que la anterior; después se lava el [portaobjetos](http://es.wikipedia.org/wiki/Portaobjetos) con alcohol hasta que éste no arrastre más colorante. Sigue a tal tratamiento una coloración de contraste, como safranina, fucsina fenicada diluida, pardo Bismarck, pironin B o hasta inclusive verde de malaquita.

Algunos microorganismos retienen el colorante violeta, aún después de tratarlos con un decolorante, y el color no se modifica al añadir éste; otros pierden con facilidad el primer tinte, y toman el segundo. Los que fijan el violeta, se califican de grampositivos, y los que pierden la primera coloración y retienen la segunda, de gramnegativos. Basándonos pues, en la reacción Gram, podemos clasificar a los microorganismos en uno de los dos grupos. Los colorantes de [p-rosanilina](http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=P-rosanilina&action=edit&redlink=1) son los que mejores resultados dan en la coloración Gram. Los representantes más usados de este grupo son violeta de metilo y violeta cristal o de genciana. En realidad, violeta de metilo es el nombre atribuido al compuesto [tetrametil-p-rosanilina](http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Tetrametil-p-rosanilina&action=edit&redlink=1" \o "Tetrametil-p-rosanilina (aún no redactado)).

El matiz de color de la p-rosanilina se intensifica al aumentar el número de grupos metilo en la molécula; por consiguiente, de los tres grupos, el tono más oscuro es la [hexametil-p-rosanilina](http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Hexametil-p-rosanilina&action=edit&redlink=1" \o "Hexametil-p-rosanilina (aún no redactado)) (violeta cristal), y el tinte más ligero, la tetrametil-p-rosanilina (violeta de metilo). Los nombres violeta de metilo 3R, 2R, R, B, 2B, 3B, etc., se refieren al número de grupos metilo contenidos. La letra R indica matices rojos, y la letra B, tonos azules. El violeta de cristal contiene seis grupos metilo, y se considera como el mejor colorante primario para teñir por el método de Gram.

La facultad de las células para tomar la coloración Gram no es propia de toda sustancia viviente, sino que se limita casi en absoluto a hongos y bacterias. Así vemos que las células de plantas y animales superiores no conservan la primera coloración; los mohos se tiñen con cierta irregularidad; los gránulos de micelios propenden retener el colorante. La reacción de Gram no es infalible ni constante; puede variar con el tiempo del cultivo y el pH del medio, y quizá por otras causas.

**Teorías**

Un [microorganismo](http://es.wikipedia.org/wiki/Microorganismo) gram positivo debe presentar una pared celular sana. El mismo microorganismo, si sufre daño de la pared por una u otra causa, se vuelve gram negativo. Esto indica la importancia de la pared para la retención o el escape del colorante. Una posible teoría del mecanismo de tinción es la siguiente:

El colorante básico entra al microorganismo, donde forma con el [yodo](http://es.wikipedia.org/wiki/Yodo) una laca insoluble en agua. El [alcohol](http://es.wikipedia.org/wiki/Alcohol) o la [acetona](http://es.wikipedia.org/wiki/Acetona) empleados para aclarar, deshidrata las paredes de los microorganismos gram positivos, tratados con mordiente, y forma una barrera que la laca no puede atravesar. En las células gram negativas, los lípidos de la pared (más abundantes que en las células compositivas) se disuelven por este tratamiento, lo que permite el escape del complejo de cristal violeta con yodo. Algunos autores objetan esta teoría, pero es indudable la importancia general de la pared celular.

Varias son las teorías emitidas para explicar el mecanismo de la tinción de Gram. Stearn (1923) basó la suya en una combinación química entre el colorante y las proteínas de las bacterias, Las proteínas y aminoácidos son cuerpos anfóteros, esto es, tienen la facultad de reaccionar con ácidos y con bases, gracias a sus grupos amino y carboxilo; en soluciones ácidas, reaccionan con los ácidos, y en soluciones alcalinas lo hacen con las bases. De igual manera, comprobaron que la reacción de tinción de las bacterias obedece en gran parte a su contenido proteínico; estos microorganismos se conducen como cuerpos anfóteros, al combinarse con colorantes ácidos en soluciones ácidas y con los básicos en medio alcalino. La combinación con ambos tipos de colorante no se produce en el “punto isoeléctrico”. Como los microorganismos contienen más de una proteína, ese punto no tiene un valor preciso y definido, sino que constituye más bien una gama o escala que comprende dos o tres unidades de pH. Según Stern y Stearn, los microorganismos grampositivos tienen una escala isoeléctrica de pH inferior a la de los microorganismos gramnegativos; y, a base de sus datos experimentales, deducen las siguientes conclusiones:

* Los microorganismos grampositivos pueden hacerse gramnegativos al aumentar la acidez.
* Los microorganismos gramnegativos pueden hacerse grampositivos al aumentar la alcalinidad.
* Los microorganismos de reacción positiva a los colorantes ácidos pueden hacerse gramnegativos por aumentar la alcalinidad.
* Los microorganismos de reacción positiva a los colorantes básicos pueden hacerse gramnegativos por aumentar la acidez.
* En la zona isoeléctrica característica de cada especie es muy escasa la tendencia a retener cualquier colorante.
* Parece estar bien demostrado que las proteínas de las bacterias no son simples, sino más bien una débil combinación de sustancias proteínicas con otras lipoideas o grasas.
* La materia grasa extraída de los microorganismos grampositivos difiere de la obtenida de los microorganismos gramnegativos, en que la primera contiene una proporción mucho mayor de ácidos no saturados que muestren gran afinidad por los agentes oxidantes. Todos los mordientes (como el yodo) empleados en la coloración Gram son oxidantes; su efecto, en general, consiste en dar a la sustancia oxidada un carácter más ácido. Esto aumenta la afinidad de un microorganismo por los colorantes básicos.
* El cambio de respuesta a la coloración de Gram con el tiempo es propio, sobre todo, de los microorganismos débilmente grampositivos cultivados en los medios que contengan sustancias capaces de fermentar, y cuya reacción se vuelve ácida en el curso del desarrollo.

Gianni (1952) comprobó que los microorganismos grampositivos Bacillus subtilis y B. anthracis tomaban negativamente el Gram cuando los cultivos databan de dos a tres horas. Luego se desarrollaba la sustancia grampositiva debajo de la pared celular, para invertir la reacción. Otra explicación de la reacción de Gram puede ser la posible existencia de una capa exterior alrededor de un núcleo gramnegativo. Libenson y Mcllroy, han comunicado que si la reacción grampositiva depende de que se forme una combinación compleja entre los componentes de la coloración de Gram y las proteínas de la pared celular, sería de esperar que las bacterias desintegradas por medios físicos retuviesen este tinte, ya que ese tratamiento no podría cambiar el carácter químico de los materiales de dicha pared. Por el contrario, los gérmenes grampositivos desintegrados pierden su capacidad de retener el colorante primario y toman negativamente el Gram.

La pared celular de los microorganismos grampositivos y gramnegativos es permeable al violeta cristal. Sin embargo, la de los primeros no lo es al complejo de yodo y colorante formado en el interior de la célula. Los resultados experimentales obtenidos con una difusión celular exenta de proteínas, y la escasa solubilidad del complejo de yodo y violeta cristal en alcohol y acetona, parecen sustentar la opinión de que la reacción grampositiva consiste esencialmente en la formación, dentro de la célula, de una cantidad apreciable de complejo de yodo y colorante difícil de eliminar con el disolvente. La pared celular de los microorganismos grampositivos, a diferencia de la de los gramnegativos, sería prácticamente impermeable al violeta cristal. Los microorganismos aparecerán teñidos después de tratarlos con violeta cristal, por ser absorbido el colorante en la superficie externa de la pared celular, y el disolvente eliminará sin dificultad el complejo formado después del tratamiento con yodo.

Ni los grupos sulfhidrilo ni las proteínas básicas han influido específicamente en el mecanismo del colorante de Gram. Libenson y Mcllroy han sostenido que la permeabilidad de la pared celular al violeta cristal, la escasa solubilidad del complejo de yodo y colorante en alcohol y acetona, y el libre acceso del disolvente al complejo constituido, son los principales factores que intervienen en el mecanismo de esa coloración.

Los pasos que se han de seguir para realizar la tinción son los siguientes:

1º Fijamos la muestra mediante calor.

2º Violeta cristal (Tiñe todas las baterías, gram + y -) 1´.

3º Fijamos con Lugol, 1´.

4º Decoloremos con una mezcla alcohol-cetona (los gram - se decoloren).

5º Safranina (colorante de contraste, tiñe a los gram -), 1´.

Los tiempos para aplicar cada colorante es orientativo. En la tinción se observarán de color azul-violeta las gram + y de color rosa las gram -.

**Bacterias resistentes a la tinción Gram**

Las siguientes bacterias de naturaleza grampositiva, tiñen como gramnegativas:

* [Mycobacterias](http://es.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium) (están encapsuladas).
* [Mycoplasmas](http://es.wikipedia.org/wiki/Mycoplasma) (no tienen pared).
* [Formas L](http://es.wikipedia.org/wiki/Formas_L) (pérdida ocasional de la pared).
* [Protoplastos](http://es.wikipedia.org/wiki/Protoplasto) y [esferoplastos](http://es.wikipedia.org/wiki/Esferoplasto%22%20%5Co%20%22Esferoplasto) (eliminación total y parcial de la pared, respectivamente).

**Utilidades**

En el análisis de muestras clínicas suele ser un estudio fundamental por cumplir varias funciones:

* Identificación preliminar de la [bacteria](http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria) causal de la [infección](http://es.wikipedia.org/wiki/Infecci%C3%B3n).
* Utilidad como control calidad del aislamiento bacteriano. Los [morfotipos bacterianos](http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Morfotipos_bacterianos&action=edit&redlink=1" \o "Morfotipos bacterianos (aún no redactado)) identificados en la tinción de Gram se deben de corresponder con aislamientos bacterianos realizados en los cultivos. Si se observan mayor número de formas bacterianas que las aisladas hay que reconsiderar los medios de cultivos empleados así como la atmósfera de incubación.

A partir de la tinción de Gram pueden distinguirse varios morfotipos distintos: Los [**cocos**](http://es.wikipedia.org/wiki/Coco_%28bacteria%29) son de forma esférica. Pueden aparecer aislados después de la división celular ([*Micrococos*](http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Micrococo&action=edit&redlink=1)), aparecer por pares ([*Diplococos*](http://es.wikipedia.org/wiki/Diplococo)), formar cadenas ([*Estreptococos*](http://es.wikipedia.org/wiki/Estreptococos)), o agruparse de manera irregular ([*Estafilococos*](http://es.wikipedia.org/wiki/Estafilococo)).

Los [**bacilos**](http://es.wikipedia.org/wiki/Bacilo) poseen forma alargada. En general suelen agruparse en forma de cadena (*[Estreptobacilos](http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Estreptobacilo&action=edit&redlink=1" \o "Estreptobacilo (aún no redactado))*) o en empalizada.

También pueden distinguirse los [**espirales**](http://es.wikipedia.org/wiki/Espiral), que se clasifican en [espirilos](http://es.wikipedia.org/wiki/Espirilo) si son de forma rígida o [espiroquetas](http://es.wikipedia.org/wiki/Espiroqueta) si son blandas y onduladas. Si por el contrario, poseen forma de "*coma*", o curvados, entonces se los designa [**vibrios**](http://es.wikipedia.org/wiki/Vibrio).

**Fundamentos de diferenciación de Gram positivo y Gram negativo**

Los fundamentos de la técnica se basan en las diferencias entre las [paredes celulares](http://es.wikipedia.org/wiki/Pared_celular) de las bacterias Gram positivas y Gram negativas

La pared celular de las bacterias Gram positivas posee una gruesa capa de [peptidoglicano](http://es.wikipedia.org/wiki/Peptidoglicano%22%20%5Co%20%22Peptidoglicano), además de dos clases de [ácidos teicoicos](http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_teicoico): Anclado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática, se encuentra el [ácido lipoteicoico](http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=%C3%81cido_lipoteicoico&action=edit&redlink=1), y más en la superficie, el [ácido teicoico](http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_teicoico) que está anclado solamente en el peptidoglicano (también conocido como [mureína](http://es.wikipedia.org/wiki/Mure%C3%ADna%22%20%5Co%20%22Mure%C3%ADna))

Por el contrario, la capa de peptidoglucano de las Gram negativas es delgada, y se encuentra unida a una segunda membrana plasmática exterior (de composición distinta a la interna) por medio de lipoproteínas. Tiene una capa delgada de peptidoglicano unida a una membrana exterior por [lipoproteínas](http://es.wikipedia.org/wiki/Lipoprote%C3%ADna). La membrana exterior está hecha de [proteína](http://es.wikipedia.org/wiki/Prote%C3%ADna), [fosfolípido](http://es.wikipedia.org/wiki/Fosfol%C3%ADpido%22%20%5Co%20%22Fosfol%C3%ADpido) y [lipopolisacárido](http://es.wikipedia.org/wiki/Lipopolisac%C3%A1rido%22%20%5Co%20%22Lipopolisac%C3%A1rido).

Por lo tanto, ambos tipos de bacterias se tiñen diferencialmente debido a estas direrencias constitutivas de su pared. La clave es el peptidoglicano, ya que es el material que confiere su rigidez a la pared celular bacteriana, y las Gram positivas lo poseen en mucha mayor proporción que las Gram negativas.

La diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración, se debe a que la membrana externa de las Gram negativas es soluble en [solventes orgánicos](http://es.wikipedia.org/wiki/Solvente_org%C3%A1nico), como por ejemplo la mezcla de alcohol/acetona. La capa de peptidoglucano que posee es demasiado delgada como para poder retener el complejo de cristal violeta/yodo que se formó previamente, y por lo tanto este complejo se escapa, perdiéndose la coloración azul-violácea. Pero por el contrario, las Gram positivas, al poseer una pared celular más resistente y con mayor proporción de peptidoglicanos, no son susceptibles a la acción del solvente orgánico, sino que este actúa[deshidratando](http://es.wikipedia.org/wiki/Deshidrataci%C3%B3n) los [poros](http://es.wikipedia.org/wiki/Poro) cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta/yodo, y manteniendo la coloración azul-violeta.

**Causas que alteran la tinción de Gram**

* I: Edad de la bacteria.
* II: Errores del operador.
* III: Uso de antibióticos

A pesar de la gran utilidad del la tinción de Gram, este método debe ser valorado con precaución, ya que la reacción puede variar según la edad de las células (cultivos viejos de bacterias grampositivas pueden perder capas de peptidoglicanos y teñirse como gram negativos) y la técnica empleada (Al decolorar por un tiempo muy prolongado se puede correr el riesgo que bacterias gram positivas se tiñan como gram negativas),Es por esta situación que junto a la muestra deben teñirse controles con bacterias gram positivas (ej. *S. aureus*) y gram negativas (ej. *E. coli*).