FUNDAMENTO DE LA COLORACION DE GRAM

TÉCNICAS DE TINCIÓN

**INTRODUCCIÓN**El imperceptible tamaño de las bacterias y otros microorganismos así como la dificultad para observarlas en detalle con el microscopio óptico por causa de la falta de contraste que existe entre estos, debido a que son usualmente transparente en el medio que les rodea; hizo que se crearan métodos para poder apreciarlas, siendo “los métodos más sencillos el de fijación y tinción, iniciados por Paul Ehrlich y Robert Koch, los que permitieron a los microbiólogos distinguir muchas características estructurales normalmente vistas” así el uso de colorantes, es el medio más simple de aumentar el contraste. Estos pueden utilizarse para distinguir entre distintos tipos de células o para apreciar la presencia de algunos elementos celulares, como flagelos, esporas, cápsulas, paredes celulares, mitocondrias, núcleos, membranas celulares, etc.

Existen numerosos colorantes, y en su mayoría son compuestos orgánicos naturales que tienen alguna afinidad específica por los materiales celulares. Los colorantes que se utilizan usualmente son moléculas cargadas positivamente (cationes) y se combinan con intensidad con los componentes celulares cargados negativamente, tales como los ácidos nucleicos y los polisacáridos (azul de metileno, el cristal violeta y la safranina); otros colorantes son moléculas cargadas negativamente (aniones) los que se combinan con los elementos celulares cargados positivamente, como son las proteínas (Eosina, la fucsina ácida y el rojo Congo). Existe otro grupo de colorantes conformado por sustancias liposolubles; los colorantes de este grupo se combinan con los materiales lipídicos de la célula, usándose generalmente para revelar la localización de los depósitos de grasa (negro de Sudán).

La tinción de Gram es uno de los métodos de tinción más importantes en el laboratorio de microbiología. Su aplicación práctica es innegable sobre todo en el trabajo microscópico de rutina; las referencias a la morfología celular bacteriana (cocos, bacilos, espirilos, negativos y positivos fig1) se basan precisamente en la tinción de GRAM\*


Fig. 1: Imagen de Cocos (forma esférica), bacilos (forma alargada, como bastones) y espirilos (forma espiral)\*

Esta técnica de coloración de contraste fue descubierta por Hans Christian Gram en 1884. Es de considerarse que 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.

La capacidad de las células para captar la coloración Gram solo es aplicable de manera adecuada en bacterias; como puede advertirse en las células de vegetales y animales superiores, que no conservan uno de los colorantes de los que está compuesta la técnica; los hongos microscópicos se tiñen con cierta irregularidad; los gránulos de micelios tienden a retener el colorante.

El fundamento de la técnica se hace con base en las diferencias entre las paredes celulares de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

La pared celular de las bacterias Gram positivas, posee una gruesa capa de peptidoglucano. 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 La membrana exterior está hecha de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido (que se encuentra en la cara externa de la membrana externa de este tipo de bacterias)


Fig 4: En se puede apreciar la estructura básica de los fosfolípidos y en b como se organizan estos donde se aprecia como las cabezas polares de orientan hacia el medio acuoso.

La clave es el peptidoglucano o mureína (fig4), 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. Por lo tanto, ambos tipos de bacterias se tiñen de manera distinta debido a estas diferencias constitutivas de su pared.

Fig 5: Estructura química del Ácido Peptidoglucano o mureína

La diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración, es debido a que la membrana externa de las Gram negativas es soluble en solventes orgánicos, como por ejemplo la mezcla de alcohol/acetona. La capa de peptidoglicano 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 los poros cerrándolos, lo que impide que pueda escaparse el complejo cristal violeta/yodo, y manteniendo la coloración azul-violácea.

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 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



Tinción Gram, se aprecia a dos tipos de bacilos Gram positivos en color fuerte y en rosa a los Gram negativos.

Un 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 una laca insoluble en agua. El alcohol o la acetona empleados para aclarar, deshidratan 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 gram positivas) 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.

La pared celular de las bacterias gram positivas y gram negativas es permeable al  cristal violeta. Sin embargo, la de las primeras 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 gram positiva 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 las bacterias gram positivas, a diferencia de la de las gram negativas, sería prácticamente impermeable al cristal violeta. Los microorganismos aparecerán teñidos después de tratarlos con cristal violeta, 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.

El primer paso en cualquier tinción debe ser siempre la fijación con calor. Posteriormente el cristal violeta penetra en todas las células bacterianas (tanto Gram positivas como Gram negativas).

El lugol está formado por I2 (yodo) en equilibrio con KI (yoduro de potasio), el cual está presente para solubilizar el yodo. 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. La función del alcohol-acetona es la quitar el colorante de las bacterias, así si la bacteria conserva el tinte, es Gram positiva y si el tinte no se mantiene es Gram negativa.

Para poner de manifiesto las células Gram negativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica. Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen azules.

La safranina no es crucial para la técnica por lo que puede o no utilizarse. Sirve para hacer una tinción de contraste que pone de manifiesto las bacterias Gram negativas.

Al término de la tinción, las Gram positivas se verán azúl-violáceas y las Gram negativas, se verán rosas (si no se hizo la tinción de contraste) o rojas (si se usó, por ejemplo, safranina).

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 gram positivos, y los que pierden la primera coloración y retienen la segunda, de gram negativos. Basándonos pues, en la reacción Gram, podemos clasificar a los microorganismos en uno de los dos grupos.

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

- Identificación preliminar de la bacteria causal de la infección.
- Utilidad como control calidad del aislamiento bacteriano.
- Importancia de la calidad de la muestra biológica para el estudio.

**A partir de la tinción de Gram pueden distinguirse varias formas distintas:
-** Los cocos de forma esférica. Pueden presentarse aislados después de la división celular (Micrococos), por pares (Diplococos), formar cadenas (Estreptococos), o agruparse de manera irregular (Estafilococos).

- Los bacilos poseen forma alargada. En general suelen agruparse en forma de cadena (Estreptobacilos) o en empalizada.

- También pueden distinguirse los espirales, que se clasifican en espirilos si son de forma rígida o espiroquetas si son blandas y onduladas, si poseen forma de “coma”, - curvados, entonces se les llama vibriones.

**TECNICA DE LA COLORACION GRAM**

1) El primer paso es preparar y fijar un frotis de la siguiente manera:

• Con la ayuda de un mechero, flamear un asa bacteriológica y esperar que enfríe un poco. - Tomar el asa (previamente flameada) y con ésta coger un poco de muestra. - Una vez obtenida una pequeña cantidad de la muestra (con el asa), hacer que ésta tenga contacto con una lámina portaobjetos, la cual servirá para depositar la muestra contenida en el asa.

• Con el asa (conteniendo la muestra) sobre la lámina portaobjetos, proceder a realizar la extensión de la muestra en el portaobjetos mediante movimientos giratorios (dar vueltas con el asa) sobre la lámina, de tal forma que al terminar la extensión, tengamos como producto un espiral en la parte media la lámina.

• Esperar que seque al aire libre o ayudarse con la llama de un mechero para fijar la muestra, teniendo en cuenta que el calor no debe ser directo (sólo se pasa por la llama), puesto que el calor excesivo puede cambiar la morfología celular de las bacterias a observar. El calor deseable es aquel en el que el portaobjetos sea apenas demasiado caliente para ser colocado sobre el dorso de la mano.

2) Una vez obtenido el frotis con la muestra, se procede a teñir la misma con violeta cristal o violeta de genciana, utilizando una cantidad suficiente de dicho colorante sobre la muestra, como para lograr cubrirla por completo. Se deja actuar al colorante por 1 minuto. Esta tinción de 1 minuto está dada para trabajar a una temperatura ambiente de 25 grados.

3) Al transcurrir el minuto, se debe enjuagar la lámina conteniendo la muestra con agua corriente. Para realizar el lavado, se debe tener en cuenta que el chorro de agua NO debe caer directamente sobre la muestra, ésta debe caer sobre la parte superior de la lámina que no contiene muestra. El chorro debe ser un chorro delgado, aproximadamente de medio a un centímetro de espesor. También el enjuague se debe realizar poniendo la lámina en posición inclinada hacia abajo.

4) Una vez enjuagado el portaobjetos, se aplica como mordiente yodo o lugol durante 1 minuto más.

• El mordiente es cualquier sustancia que forme compuestos insolubles con colorantes y determine su fijación a las bacterias.

5) Pasado el minuto de haber actuado el mordiente, el frotis se decolora con etanol al 75 %, etanol al 95 %, acetona o alcohol-acetona, hasta que ya no escurra más líquido azul. Para esto se utiliza el gotero del frasco del decolorante. Se van añadiendo cantidades suficientes del decolorante, hasta lograr que éste salga totalmente transparente, es decir, hasta que ya no escurra más líquido azul.

6) Lavar con agua para quitar los residuos de decolorante y esperar que seque la lámina al aire libre o con la ayuda de la llama de un mechero de la forma anteriormente descrita.

7) Una vez que la lámina ya secó, procedemos a teñir nuevamente, pero esta vez se va a utilizar un colorante de contraste como por ejemplo la safranina, dejar actuar durante 1 minuto.

8) Pasado el minuto correspondiente, se procede a enjuagar la lámina con agua, se escurre el agua sobrante y se seca en la forma anteriormente descrita.

De esta manera, ya tendremos listo el frotis para su respectiva observación microscópica.