

## **La importancia de realizar una correcta tinción de Gram en la identificación bacteriana**

### **Importance of a correct Gram Stain in Identifying Bacteria**

*María Jimena Casasola Bado*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio clínico, Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense de Seguro Social, Costa Rica

Correspondencia: jimecb1990@gmail.com

Recibido: 27/08/2022; aceptado para publicación: 29/08/2022.

#### **Resumen**

La tinción de Gram sigue siendo una técnica crucial en los laboratorios de microbiología. La importancia de una correcta ejecución de esta tinción es clave para una correcta interpretación de los resultados, con implicaciones importantes en la industria farmacéutica y a nivel clínico. Estudios han descrito los principales errores presentes en el proceso de tinción de Gram y han demostrado que a pesar de que esta tinción es sencilla, es muy propensa a errores que se tienden a pasar por alto especialmente por la naturaleza manual de la técnica. El objetivo de esta revisión es repasar el fundamento y el procedimiento de la tinción de Gram, haciendo énfasis en las principales recomendaciones que se encuentran actualmente en la literatura para asegurar la calidad del servicio en los laboratorios de microbiología.

#### **Palabras clave**

Tinción de Gram, identificación bacteriana, errores de laboratorio clínico.

#### **Abstract**

Gram staining remains a crucial technique in microbiology laboratories. The importance of a correct performance of this staining is essential for the correct interpretation of the results, with important implications in the pharmaceutical industry and at a clinical level. Studies have described the main errors seen in the Gram staining process, and have shown that, although this staining is simple, it is very prone to errors that tend to be overlooked, especially due to the manual nature of the technique. The objective of this article is to review the fundamentals and procedure of Gram staining, emphasizing the main recommendations currently found in the literature to ensure the quality of service in microbiology laboratories.

#### **Keywords**

Gram stain, identifying bacteria, clinical laboratory error.

## **Introducción**

En las últimas décadas, el desarrollo de técnicas innovadoras y automatizadas de identificación bacteriana ha permitido mejoras significativas en el diagnóstico microbiológico. Sin embargo, el uso de algunas técnicas tradicionales sigue siendo una pieza fundamental en los laboratorios de microbiología. Una de estas herramientas ancestrales es la tinción de Gram, descrita y usada por primera vez en 1884 por Christian Gram (1).

Esta tinción permite diferenciar dos grandes dominios de especies bacterianas: bacterias gram positivas y bacterias gram negativas (2). Además, permite la caracterización fenotípica de estas por su tamaño y morfología celular (1).

Una de las aplicaciones de la tinción de Gram es la microbiología farmacéutica ya que provee información del origen de cualquier contaminación de productos estériles (2). Mientras que en el área de microbiología clínica, el laboratorio tiene un papel primordial en el manejo de infecciones bacterianas (3). El resultado de una tinción de Gram permite al personal médico la toma rápida de decisiones para el diagnóstico y tratamiento oportuno de pacientes (4).

## **Fundamento**

El principio de la tinción de Gram se basa en las diferencias en la estructura y composición de la pared celular de algunas bacterias (5). No todas las bacterias se pueden teñir con esta técnica ya sea porque carecen de pared celular o que esta tenga una composición diferente (6). Las bacterias gram positivas tienen una pared celular con una capa gruesa de peptidoglicano, con gran cantidad de enlaces cruzados de ácido teicoico (1,6). Debido a esto, posterior a la tinción de Gram, se observan al microscopio teñidas de color violeta (1,6). Por otra parte, las bacterias gram negativas presentan pared celular con una capa delgada de peptidoglicano unida a una membrana externa con contenido lipídico y proteico (6). Estas

reciben este nombre ya que posterior al proceso de tinción pierden el colorante cristal violeta (1,6). Esta tinción se compone de cuatro pasos, primeramente se coloca el cristal violeta como colorante primario, que en solución acuosa se disocia en iones CV<sup>+</sup> y CV<sup>-</sup>, los cuales penetran en la pared y membrana de las bacterias debido a su alta afinidad por el peptidoglicano (2, 6, 7). Luego, se añade una solución de yodo que actúa como fijador del colorante. Este interactúa con los iones CV<sup>+</sup> formando un complejo cristal violeta-yoduro que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana (2,7). Después, se agrega una mezcla de alcohol acetona que destruye la capa lipídica de las bacterias gram negativas las cuales al perder su membrana externa y tener mucho menor cantidad de peptidoglicano, no pueden retener el complejo cristal violeta-yoduro y lo pierden. Por el contrario, el alcohol acetona deshidrata la pared celular de las bacterias gram positivas las cuales sufren una deshidratación lo que cierra sus poros permitiendo la retención del complejo cristal violeta-yoduro (2,6,7). Finalmente, se coloca safranina o fucsina como colorante de contratinción para teñir las bacterias gram negativas que no retuvieron el complejo cristal violeta-yoduro luego de la decoloración (2,6,7).

### **Importancia de una tinción de Gram correcta**

Como toda prueba de laboratorio, la tinción de Gram tiene sus limitaciones y está sujeta a variación técnica y a errores en su interpretación (8,9). Su calidad depende de las habilidades del personal técnico la cual puede variar en el tiempo y entre personas (10).

Si la interpretación de la tinción de Gram es incorrecta se puede afectar la selección del método de identificación bacteriana ya sean métodos bioquímicos manuales, como el API<sup>®</sup> (*Analytical Profile Index*, por sus siglas en inglés) o métodos semiautomatizados como el Vitek<sup>®</sup> (2). Esto en la industria farmacéutica puede generar análisis incorrectos de la causa

raíz de contaminación bacteriana dentro del flujo de producción farmacéutica y errores relacionados con la liberación de lotes lo que puede implicar pérdidas millonarias de dinero o la liberación de lotes contaminados (2).

Por otra parte, en el área clínica un error puede tener implicaciones para la salud del paciente, considerando que un 60-70% de las decisiones médicas están basadas en resultados de laboratorio (9)

Además, el flujo creciente de trabajo en los laboratorios de microbiología clínica es un desafío a la calidad de las tinciones, aumentando la incidencia de errores y dificultando establecer correlaciones entre lo observado en la tinción de Gram y el resultado del cultivo para determinar discrepancias en los resultados (3).

A través de los años, se ha hecho un esfuerzo por documentar cuales son los errores más comunes relacionados a la tinción de Gram para que el personal técnico pueda enfatizar su atención en las posibles fuentes de error y así evitarlas. Estudios han demostrado que la mayoría de los errores se deben a incongruencias entre lo observado posterior a la tinción de Gram y la identificación final definitiva, por ejemplo bacterias gram positivas consideradas negativas (5). Dentro de los errores más comúnmente encontrados se tienen: decoloración excesiva, uso de cultivos viejos (más de 24 horas), fijación inadecuada y confusión en la rotulación de las muestras (2).

Es por esto que se debe tratar de reducir la tasa de error por medio de la estandarización del proceso de tinción. Además, se recomienda evaluar la calidad de la tinción y la destreza de del personal técnico para establecer mejoras en el proceso (2).

### **Procedimiento de tinción de Gram y recomendaciones**

Antes de realizar el extendido se debe tener presente que las tinciones de Gram se realizan a partir de cultivos bacterianos jóvenes (18-24 horas) cuya pared celular bacteriana se encuentre intacta (6,7). Las bacterias presentes en los cultivos más viejos pueden presentar rupturas en la pared celular por lo que las bacterias gram positivas pueden teñirse como gram negativas o gram variables (6,7,11).

Además, aquellas muestras que puedan tener conteos muy bajos de microorganismos, como los líquidos corporales, lavados bronco-alveolares y líquidos cefalorraquídeos, se aconseja centrifugar para aumentar la sensibilidad de la tinción (1,6).

También se aconseja revisar que todos los reactivos se encuentran en buenas condiciones. Si los reactivos no están recién preparados, se recomienda filtrar los colorantes (6). Los reactivos se deben conservar en un lugar fresco y en envases oscuros correctamente rotulados (6). Además, las láminas portaobjetos de vidrio deben estar limpias, libres de grasa y secas (6). Idealmente, se debe usar una gradilla de tinción cercana del fregadero, la cual debe estar nivelada para que los colorantes cubran los portaobjetos de manera uniforme. Se recomienda evitar teñir más de cuatro o cinco láminas a la vez para mantener la precisión con el tiempo (12).

Es una buena práctica siempre incluir un control positivo y negativo en el procedimiento de tinción para evaluar la calidad de la tinción así como la de los reactivos (8).

### **Preparación del extendido**

La muestra debe homogenizarse correctamente antes de realizar el extendido (1). Si la muestra es líquida o un hemocultivo, al realizar el frotis se debe colocar una gota de la muestra sobre la lámina portaobjetos de vidrio, y si este se va a realizar a partir de colonias bacterianas, se debe colocar una gota de agua destilada estéril o una gota de solución salina estéril (1). El extendido se debe hacer de forma uniforme con movimientos circulares con ayuda de un asa estéril (1,6,12).

El frotis se debe dejar secar al aire y una vez seca se fija. Se debe tener certeza que el extendido se ha secado adecuadamente antes de realizar la fijación (12).

Para realizar la fijación se puede utilizar una placa calefactora o un mechero Bunsen con cuidado de no sobreexponer la lámina al calor ya que este puede alterar físicamente las paredes celulares bacterianas, generando que las bacterias no respondan como deberían a la tinción de Gram (6).

### **Otros cuidados al realizar la tinción**

El grosor del frotis es decisivo en el resultado de la tinción (7). La interpretación de la tinción puede ser difícil si el extendido es grueso y se encuentra aglomerado de células componentes de la matriz de la muestra que impiden observar la forma y disposición de las células y bacterias en la muestra (11). Por esto se tiene que considerar la matriz de la muestra al realizar el frotis porque el material de fondo y otros artefactos presentes en algunas muestras, pueden interferir con una correcta observación microscópica tras la tinción. (7). Por lo que aquellas muestras cuya composición pueda afectar una correcta observación del frotis, como los hemocultivos y muestras respiratorias (3,10), se recomienda hacer duplicados de las láminas para aumentar el número y la calidad de los campos examinados (3,10).

### **Procedimiento de tinción de Gram, según la American Society for Microbiology**

- A. El frotis se cubre completamente con la solución de cristal violeta y se deja actuar durante 30 segundos. Se decanta el cristal violeta, se enjuaga con agua y se escurre el exceso de agua (1).

**Recomendación:** Todos los lavados se deben realizar con una piseta o con un chorro fino de agua evitando que caiga directamente sobre el frotis y este se dañe (6). Además, el enjuague excesivo puede provocar que el colorante se lave de las células (1).

Se debe respetar el orden correcto entre los pasos. Si por error se coloca primero la solución de yodo en vez del cristal violeta, la decoloración será similar para gram negativos y gram positivos (6).

- B. La preparación se cubre con la solución de yodo y se deja actuar durante 30 segundos. Se enjuaga la preparación con agua y se escurre el exceso de agua.

**Recomendación:** Al final de este paso se recomienda agitar el portaobjetos para eliminar la mayor cantidad de agua posible. Si no se elimina el exceso de agua y se agrega el alcohol-acetona, este puede diluirse lo que ocasiona que reaccione más rápido de lo normal (12).

- C. Se realiza la decoloración agregando el alcohol-acetona gota a gota hasta que no se arrastre más cristal violeta. Se enjuaga el exceso de alcohol acetona con agua y se escurre su exceso.

**Recomendación:** El tiempo de decoloración se debe ajustar de acuerdo al grosor del frotis evitando decoloraciones insuficientes o excesivas (1, 11). Una decoloración insuficiente conlleva a resultados gram positivos en bacterias gram negativas y una

decoloración excesiva hacer parecer a una bacteria gram positiva en gram negativa o gram variable (7).

- D. Se cubre la preparación con el colorante de contratinción safranina y se deja actuar por 30 segundos (1). Se enjuaga la preparación con agua y se escurre el exceso de agua. La preparación se seca al aire o se puede utilizar una placa calefactora.

**Recomendación:** Evitar dejar actuar al colorante de contratinción más de 30 segundos ya que esto podría desplazar el complejo cristal violeta-yoduro de la pared celular de las bacterias gram positivas (5).

Si se utiliza el colorante de contratinción fucsina se debe dejar actuar más de un minuto (1).

### **Evaluación microscópica de la calidad del frotis**

Se debe evaluar el frotis con un objetivo de bajo poder.

- ⇒ Si se observa un exceso de colorante precipitado, se recomienda decolorar y volver a teñir el frotis. También se puede repetir la tinción de Gram. Si el problema persiste se debe filtrar el cristal violeta y la safranina y utilizar un recipiente limpio (1).
- ⇒ Se debe comprobar que la decoloración fue correcta mediante la evaluación de la matriz que dependiendo de la muestra el fondo debe ser claro o rosado. Si el frotis se encuentra muy decolorado se propone preparar otro frotis y repetir la tinción (1).
- ⇒ Se evalúa si el grosor del frotis es el adecuado para una correcta visualización, si este presenta áreas muy densas se recomienda repetir el frotis (1).
- ⇒ En el caso de muestras clínicas, la interpretación de células inflamatorias se realiza a bajo poder. Esto debido a que las áreas representativas de inflamación son ideales



en la búsqueda de microorganismos, la cual se debe realizar utilizando el lente de inmersión (1).

⇒ Si se están observando varias láminas, se debe limpiar el lente del objetivo con papel para lentes para evitar el arrastre de células entre un frotis y otro (1).

## Conclusión

Como se recapituló en esta revisión, la tinción de Gram debe desarrollarse en condiciones que minimicen la incidencia de errores los cuales por la naturaleza del procedimiento son difíciles de detectar. Por la gran responsabilidad que tienen los laboratorios de microbiología en asegurar la calidad de sus análisis, es una buena práctica que cada laboratorio estandarice su proceso de tinción de Gram para obtener reproducibilidad en los resultados e interpretaciones. De esta forma, se puede hacer conciencia de las posibles fuentes de error para así evitar su incidencia y mantener un servicio de calidad.

## Conflictos de interés

La autora declara que no tiene conflictos de interés.

## Referencias

1. Leber AL (ed.). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 4th ed. Washington, DC: ASM press; 2016. p. 3.2.1.1-3.2.1.23. Recuperado de: <https://doi.org/10.1128/9781555818814.ch3.2.1>
2. Sandle T. Assessing gram-stain error rates within the pharmaceutical microbiology laboratory. *EJPPS*. 2021; 25(3). Recuperado de: <https://www.ejpps.online/post/vol25-1-assessing-gram-stain-error-rates-within-the-pharmaceutical-microbiology>
3. Fischer A, Azam N, Rasga L, Barras V, Tangomo M, Renzi G, et al. Performances of automated digital imaging of Gram-stained slides with on-screen reading against manual microscopy. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*.

- 2021;40(10):2171-2176. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33963927/>
4. Boyanova L. Direct Gram staining and its various benefits in the diagnosis of bacterial infections. *Postgraduate Medicine*. 2018;130(1):105-110. Recuperado de: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00325481.2018.1398049?journalCode=ipgm20>
  5. Thairu Y, Usman Y, Nasir I. Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases. *Sub-Saharan African Journal of Medicine*. 2014;1(4):168-174. Recuperado de: <https://www.ssajm.org/article.asp?issn=23845147;year=2014;volume=1;issue=4;spage=168;epage=174;aulast=Thairu>
  6. González RC, Elizalde B, Cortés ME, Orduña M. *Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico*. Zaragoza: Universidad Nacional Autónoma de México; 2020. p. 83-103.
  7. American Society for Microbiology. *Protocols: Gram Stain Protocols*. Recuperado de: <https://asm.org/Protocols/Gram-Stain-Protocols>
  8. Samuel L, Plebani M. Targeting errors in microbiology: the case of the Gram stain. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2017;55(3): 309-310. Recuperado de: <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0828>
  9. Samuel LP, Balada-Llasat JM, Harrington A, Cavagnolo R. Multicenter Assessment of Gram Stain Error Rates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016 Jun;54(6):1442-1447. Recuperado de : <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.03066-15>
  10. Froböse NJ, Bjedov S, Schuler F, Kahl BC, Kampmeier S, Schaumburg F. Gram Staining: a Comparison of Two Automated Systems and Manual Staining. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020; 58 (12). Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32938735/>
  11. Tripathi N, Sapra A. *Gram Staining*. U.S.: Treasure Island (FL) StatPearls; 2021. Recuperado de: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/#\\_NBK562156\\_pubdet\\_](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/#_NBK562156_pubdet_)
  12. Jones G, Dever S. *The Gram stain: a new look at an old tool*. Atlanta: Centre for Disease Control (U.S.); 1985. Recuperado de: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/7646>