



| FICHA DE TRABAJO | |
|-------------------|-----------------------|
| MÓDULO | MICROBIOLOXÍA CLÍNICA |
| UNIDADE DIDÁCTICA | UD2 |
| ACTIVIDADE : 1 | Tinción de GRAM |

PROTOCOLO NORMALIZADO DE TRABAJO

OBXETIVOS

- Obxetivos xerais:
 - Aprender a traballar en condicións de esterilidade.
 - Coñecer o significado da utilización dun mordiente.
 - Manexar correctamente o obxectivo húmido (100x).
 - Manexar correctamente a posición do condensador e diafragma en función do tipo de mostra que se vaia visualizar.
- Obxetivos específicos:
 - Aplicar tincións diferenciais a mostras problema.
 - Coñecer a aplicación da tinción de Gram no proceso da identificación bacteriana.
 - Diferenciar entre bacterias Gram+ y Gram –, en base á distinta composición da parede como fundamento da técnica.

MATERIAIS

- Mostras problema.
- Gradilla e tubos de ensaio
- Pipeta Pasteur.
- Asa de sementeira bacteriolóxica.
- Chisqueiro.
- Ponte de tinción.
- Portaobxetos
- Pinzas.
- Microscopio óptico.
- Aceite de inmersión.
- Kit de tinción de Gram (cristal violeta, lugol, alcol-acetona, safranina).
- Auga destilada.
- Alcol de 70º.
- Papel de filtro.

MÉTODO

1. Limpar e desinfectar a zona de traballo. Colocar un papel de filtro e dispor todos os materiais necesarios para desenvolver o procedemento
2. Prender o chisqueiro, tomando las precauciones necesarias para evitar quemaduras.
3. Flamear a asa de sementar ata a incandescencia. Deixar enfriar, coidando sempre de manernos dentro do perímetro de esterilidade do chisqueiro (uns 15 cms). Cargar a asa de sementar na mostra.
4. Nun portaobxetos colocar unha gota de auga destilada, e sobre ésta extender a mostra facendo unha emulsión no centro do porta, para conseguir un frotis.
5. Fixar a mostra, con axuda da lapa do chisqueiro. Tendo sempre coidado de non aplicar calor directo sobre a mostra, que pudiera deformar la morfología bacteriana.
6. Colocar o portaobxetos sobre a ponte de tinción e cubrir o frotis co cristal violeta; incubar 1 minuto.
7. Retirar o exceso de cristal violeta (sen lavar), e cubrir a mostra con Lugol. Incubar por 1 minuto.
8. Retirar o exceso de Lugol, lavar con auga destilada, e cubrir con abundante alcol-acetona ou alcol de 96°C. Incubar por 20 ou 30 segundos (non deixar máis tempo ou correremos o risco de decolorar tamén as Gram +).
9. Lavar con abundante auga destilada.
10. Retirar o exceso de agua e cubrir a mostra co colorante de contraste, a safranina. Deixar actuar 2 minutos.
11. Lavar con abundante auga destilada, deixar secar, e levar a preparación ó microscopio óptico, para a observación das distintas morfologías celulares e agrupamentos.

RESULTADOS

1. Documenta con fotos os pasos que foches realizando e os resultados obtidos.
2. Comenta os resultados: tipos de morfología bacteriana observadas, diferenciación entre Gram+ e Gram-, e agrupacións bacterianas observadas.

CUESTIÓN

1. Qué finalidade ten aplicar calor á mostra? Qué efectos produce sobre a estrutura e morfología celular?
2. Qué tipo de colorante é o cristal violeta? Por qué ten afinidade pola parede bacteriana?
3. Nesta tinción, qué función cumpre o Lugol?
4. Qué tipo de colorante é a safranina? Por qué tingue unhas bacterias e outras non?
5. No caso de que realicemos a tinción sobre unha mostra mixta de bacterias Gram + e Gram -, e os resultados amosen todas as bacterias de cor rosa; qué cres que pudo fallar? Razona a túa resposta.