

ARCHIVO HISTÓRICO



El presente artículo corresponde a un archivo originalmente publicado en el **Boletín de la Escuela de Medicina**, actualmente incluido en el historial de **Ars Medica Revista de ciencias médicas**. El contenido del presente artículo, no necesariamente representa la actual línea editorial. Para mayor información visitar el siguiente

vínculo: <http://www.arsmedica.cl/index.php/MED/about/submissions#authorGuidelines>

Gram. Más que un Método de Tinción

* T. Lobos M.

Diariamente, en todo Hospital o Clínica, en la sala o en el Laboratorio de Microbiología, se escucha múltiples veces la palabra *Gram*:

- ¿Solicitó el *Gram* de expectoración?
- Infórmese del resultado del *Gram* de L.C.R. de la enferma XX.
- ¿Están listas las tinciones de *Gram* para observarlas al microscopio?

¿Qué significa la palabra *Gram*?, ¿es una sigla G.R.A.M.?, ¿es un término más del para lenguaje médico? Es probable que si solicitamos respuesta a médicos, e incluso a microbiólogos, sólo algunos responderán correctamente y dirán que *Gram* es el apellido del médico danés Hans Christian Gram (1853-1938), quien en 1883 describió el método de coloración que lleva su nombre y que fue publicado el 13 de marzo de 1884, esto es, hace más de 100 años. Este método de tinción se redujo a una sola palabra *Gram*, pero su importancia fue creciendo a través de los años, ya que con esta tinción se logra la identificación presunta de las bacterias, su ubicación taxonómica y, en la actualidad, es de gran utilidad para los clínicos en la orientación de tratamientos antimicrobianos.

He utilizado la coloración de *Gram* por más de 20 años, conozco su técnica, sus modificaciones, sé las hipótesis respecto a su mecanismo, he valorado su importancia desde el punto de vista bacteriológico y clínico, conozco sus aplicaciones prácticas y he enfatizado su valor a alumnos, internos y médicos. No obstante hoy, a más de un siglo del descubrimiento del *Gram*, considero que

se conoce muy poco o prácticamente nada sobre la persona que lo hizo posible y es éste el motivo que me decidí a escribir estas líneas, pues es un deber moral no olvidar a aquellos que merecen ser recordados.

Hans Christian Gram, nació en Copenhague el 13 de octubre de 1853. Se gradúa de médico en la Universidad de Copenhague en 1878; entre los años 1881 y 1883 trabaja como médico residente en el Hospital Municipal de Copenhague. En el año 1883, sigue un curso sobre "Técnicas Bacteriológicas" en la Universidad de Copenhague, dictado por el Dr. Carl Julius Salomonsen, quien a su vez había sido discípulo de Koch en Alemania. A fines de 1883, Gram viaja a Alemania a estudiar Bacteriología y Medicina y durante su estada en el Laboratorio del Dr. Friedländer desarrolla el método de tinción que lleva su nombre.

Es interesante seguir la trayectoria que culminó con su descubrimiento. Su maestro en Alemania, el Dr. Carl Friedländer investigaba la etiología microbiana de las neumonías, en cortes histológicos, para lo cual necesitaba encontrar un método que permitiera teñir las bacterias, las cuales se pudieran diferenciar claramente de los elementos celulares y ésta fue la tarea que encomendó a su discípulo Hans Christian Gram. Este se puso a trabajar en una técnica de tinción basándose en la solución de yodo-yodurada que ocasionalmente usaba su maestro Salomonsen en Dinamarca, pero a su vez decoloró y utilizó colorantes de contraste; demoró menos de dos meses en desarrollar su técnica de tinción, lo que para algunos fue considerado como empírico y obra del azar; pero los que trabajamos en investigación sabemos que el azar en ciencia, sólo favorece a personas prepara-

* Laboratorio de Microbiología Clínica, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

das, que están en condiciones de interpretar y analizar los hechos que incluso fortuitamente se presentan. Basta recordar a Fleming y su descubrimiento de la Penicilina.

Para comprender paso a paso el descubrimiento del Dr. Gram y las implicancias de éste, considero que es interesante seguir la correspondencia de Gram a su maestro el Dr. Salomonsen. En su primera carta le dice: "Ayudé al Dr. Friedländer con las bacterias de la neumonía, mi trabajo ha sido principalmente la demostración de los gérmenes en los cortes de órganos y he tenido la suerte de encontrar lo que al parecer es un método muy bueno para teñir las bacterias y que no tiñe los tejidos. El Dr. Friedländer está encantado con el método; yo tomo el asunto con calma y espero desarrollarlo más en el futuro".

Posteriormente escribe: "Examino toda clase de muestras con la ayuda de mi excelente método yodado". En otra carta dice a su maestro: "He terminado mis estudios sobre el famoso método yodado de coloración el cual espero será publicado pronto; he observado que los gérmenes teñidos muestran claramente diferentes morfologías: cocos y bacilos y más aún algunos conservan el color azul y otros son decolorados".

Finalmente, en una de sus últimas cartas al Dr. Salomonsen comunica: "Mi trabajo en Berlín será publicado en el próximo número del "Fortschritte der Medicin", con el nombre de "La coloración diferencial de los *Schizomycetes* en cortes de tejidos y en preparaciones secas" y concluye, "el hecho es que he desarrollado y extendido mi famoso método yodado, para que sea válido para casi todos los *Schizomycetes* y creo que este descubrimiento marcará época".

Se puede apreciar al analizar la correspondencia entre Gram y su profesor Salomonsen, la rapidez con que Gram llega a su descubrimiento, aproximadamente dos meses, lo cual puede explicarse por el uso que ya hacía su maestro Salomonsen con la solución de yodo-yodada y que Gram conoció durante su curso de "Laboratorio para Bacteriología Médica" en Copenhagen, lo cual no resta méritos a su descubrimiento.

También es posible constatar que fue en aumento su aprecio y entusiasmo por su método de tinción y es así como en un comienzo dice: "buen método de tinción"; posteriormente "excelente

método" y finalmente concluye: "método que marcará época".

Además, descubre que claramente es posible diferenciar morfología, describe cocos y bacilos notando que algunas formas conservan el color y otras son decoloradas, pero no apreció la importancia de este fenómeno y sólo con posterioridad se valoró este hecho.

Así como la lectura de la correspondencia de Gram a su maestro de Bacteriología nos permitió seguir la trayectoria de su investigación, creo que también es de interés mostrar un breve resumen del trabajo que publicó Gram, comunicando su tinción, en el que es posible constatar que se dió una organización formal, indicando la naturaleza del problema, cómo lo abordó, qué encontró y qué significó lo que encontró.

Tituló su trabajo: "La coloración diferencial de los *Schizomycetos*, en cortes de tejidos y en preparaciones secas". Lo publicó en "Fortschritte der Medicin" el 15 de marzo de 1884.

A modo de introducción dice: "Sería muy deseable disponer de un método de coloración diferencial para *Schizomycetos*; para utilizarlo rutinariamente; yo he descubierto por experimentación, un procedimiento de coloración diferencial para los *Neumococos* que he extendido a otros gérmenes. Para la coloración se utiliza solución de violeta de genciana por 1-3 minutos, luego a las preparaciones se les coloca una solución de yoduro de K yodado en agua (I: 1 parte; KI: 2 partes y H₂O:300 partes). Luego se agrega a las preparaciones alcohol absoluto hasta que sean decoloradas completamente. Los *Schizomycetos* se tiñen de azul oscuro (la intensidad de la coloración no ha sido igualada por ninguno de los métodos de coloración). Es posible después de la coloración con alcohol, colocar las preparaciones un momento con una solución de pardo de Bismark, de tal manera de obtener una coloración de contraste".

En los resultados muestra dos cuadros:

- I. Después del tratamiento por el yodo, las formas siguientes de *Schizomycetos*, en las muestras, no son decoloradas por el alcohol.
 - a) Cocos de neumonía bronquial (9 casos).
 - b) *Schizomycetos* piógenos (9 casos).
 - c) Cocos de absceso hepático (1 caso).

- d) Cocos de osteomielitis (2 casos).
- e) Cocos de artritis supurada después de la escarlatina (1 caso).
- f) Cocos de nefritis supurada después de cistitis (3 casos).
- g) Cocos de abscesos cerebrales después de un empiema (2 casos).
- h) Cocos de erisipela (1 caso).
- i) Bacilos de ántrax (3 casos en ratón).
- j) Bacilos de la putrefacción (3 casos).

II. Las formas siguientes de *Schizomycetos* son decoloradas por el alcohol, después del tratamiento con yodo.

- a) Un caso de neumonía bronquial, con cocobacilos que forman cápsula.
- b) Cinco casos de bacilos de la tifoidea.

A modo de discusión plantea: "En mi procedimiento, los elementos tisulares no se tiñen, mientras que los *Schizomycetos* se tiñen intensamente, esto permite visualizarlos más fácilmente. Algunos *Schizomycetos* se tiñen de azul intenso pero cuando son tratados con alcohol, algunos son decolorados".

Finalmente concluye: "El estudio de los *Schizomycetos* ha sido mejorado significativamente por el uso de este método. Es por esto que yo publico mis resultados, no obstante consciente que ellos son escasos y con algunos vacíos. Espero que este método sea también útil en manos de otros trabajadores".

Al analizar su publicación, vemos que su objetivo fue poder visualizar las bacterias de la neumonía y diferenciarlos de los elementos tisulares, ya que sus observaciones fueron directamente de tejidos; posteriormente experimentó con otros *Schizomycetos* - antiguo grupo taxonómico que incluía las bacterias - y observó que otras bacterias también se teñían de azul, tales como los cocos de la osteomielitis, (es decir *Staphylococcus*); los cocos de la erisipela, - (*Streptococcus*); los bacilos de la putrefacción - (*Clostridium*)-, etc.; y además constató que algunas bacterias se decoloraban por el alcohol y se teñían con las tinciones de contraste, en ese tiempo, pardo de Bismark o vesunina, actualmente fucsina o safranina. Entre los que no retenían el colorante de cristal violeta, mencionaba el "cocobacilo de la neumonía de Friedlän-

der (*Klebsiella pneumoniae*); el bacilo de la tifoidea (*Salmonella*).

Estos hallazgos no los analizó profundamente, pero esta distribución empírica entre los dos grandes grupos: *Gram (+)* y *Gram (-)*, ha sido y es de gran utilidad para diagnósticos presuntivos y en la época actual es una orientación importante en la indicación de antibióticos.

Por último, no puedo dejar de destacar la frase con que termina su publicación: "Espero que este método sea útil en manos de otros trabajadores", lo que constituye el objetivo fundamental en la publicación científica, esto es el traspaso de información nueva y original a la comunidad científica.

El mecanismo de la tinción de *Gram*, fue durante mucho tiempo un misterio, que condujo a numerosos e infructuosos esfuerzos para explicarla en términos de la existencia de una afinidad tintorial diferencial de los distintos componentes celulares. El descubrimiento de la diferente composición de la pared celular entre bacterias *Gram (+)* y *Gram (-)*, centró la atención en dicha pared y los recientes hallazgos han aportado pruebas reveladoras que han permitido explicar que las diferencias entre bacterias *Gram (+)* y *Gram (-)* radica en las propiedades de permeabilidad en que participa el grosor de la capa glicopéptica que es menos en las *Gram (-)* lo cual sumado a la presencia de lípidos que incrementan la permeabilidad, contribuyen a la *Gram* negatividad. Esto nos aclara un importante rasgo de la tinción de *Gram*, la tendencia de las bacterias *Gram (+)* a transformarse en *Gram (-)* en los cultivos viejos, debido a que las enzimas autolíticas atacan la pared; además la *Gram*-labilidad de las bacterias en frotis directos de pacientes que han recibido terapia con antibióticos que actúan directamente sobre la pared celular.

Continuando con la muy poco conocida biografía de *Gram*, es de interés señalar que al año siguiente de la publicación de su trabajo, ya varios investigadores, empezaron a valorar su método de tinción y comenzó a ser incluido en los textos de Bacteriología.

Por su parte, Hans Christian Gram, regresó a su patria y a la práctica de la Medicina Interna, desempeñándose primero en el Hospital Municipal de Copenhagen, y posteriormente en el Royal

Frederick Hospital. Llega a ser profesor titular de Farmacología y Medicina en la Universidad de Copenhagen, cargo que desempeña hasta 1924. Fallece en 1938.

Para nosotros, los microbiólogos, Hans Christian Gram forma parte de nuestro patrimonio; no obstante no ser un bacteriólogo sino que un clínico que se interesó por la Bacteriología, lo cual se manifestó durante toda su carrera, por su dispo-

sición permanente de ofrecer la posibilidad a sus asistentes y alumnos de compenetrarse de la Microbiología Clínica y quien en su juventud llegó al descubrimiento de su famosa tinción, vislumbrando la transcendencia que ésta tendría al escribir a su maestro: "Querido profesor, he tenido la suerte de encontrar lo que parece ser un método muy bueno para teñir las bacterias, descubrimiento que creo marcará época."