

CONJUNTO PARA COLORAÇÃO DE GRAM

1. FINALIDADE

Conjunto para coloração de Gram em materiais diversos.

2. INTRODUÇÃO

A coloração de Gram classifica as bactérias em dois grandes grupos, as Gram positivas e Gram negativas. Através da reação da bactéria ao Gram pode-se prever alguns detalhes tanto para sua classificação como para um início de terapia por antibióticos ou quimioterápicos. Algumas bactérias que possuem características morfológicas particulares, como os meningococos e gonococos, que apresentam o formato de um grão de café e agrupam-se sempre aos pares, podem ser presumivelmente identificadas através deste método.

3. AMOSTRA

Pode-se usar uma infinidade de materiais como amostra: secreções, urina, fezes, material de cultura, alimentos etc. O laboratório deve estabelecer critérios definidos para rejeição e conservação das amostras.

4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO

a- **Registro no Ministério da Saúde:** 100.970.10117.

b- Princípio

O material fixado em lâmina é submetido à ação da solução de violeta genciana, que irá corar todas as estruturas presentes. Na segunda etapa, a exposição ao lugol garante que as bactérias Gram positivas irão fixar a violeta formando um composto, a iodo-para-rosanilina, que irá resistir à ação da solução descolorante. Por último, para corar as demais estruturas, usa-se a fucsina fenicada de Gram, que irá conferir uma coloração vermelha às bactérias Gram negativas e demais estruturas.

c- Reagentes

- Solução corante de violeta genciana fenicada (cód. LB 620517);
- Solução de lugol fraco (cód. LB 620511);
- Solução descolorante à base de álcool-acetona (cód. LB 621000);
- Solução corante de fucsina fenicada para Gram (cód. LB 620515).

d- Armazenamento e estabilidade

O material deve ser mantido em temperatura ambiente, em local fresco, seco e isento da incidência direta de luz solar, permanecendo assim estável até a data de validade expressa em rótulo, desde que isento de contaminação química ou biológica.

e- Precauções e cuidados especiais

- O material se destina ao uso diagnóstico *in vitro*, não devendo ser ingerido ou entrar em contato com os olhos, pele e mucosas;
 - É comum aos corantes, com o tempo, formarem precipitados, neste caso, recomenda-se a filtração dos mesmos sempre que se perceber tal situação;
 - Evitar deixar os frascos abertos desnecessariamente, pois pode haver evaporação de solventes e conseqüente alteração na concentração dos componentes;
 - Pelo fato de alguns corantes conterem ácido fênico (fenol) em sua formulação, deve-se evitar o contato acidental com pele e mucosas. O procedimento técnico deve ser executado em local dotado de boas condições de ventilação e exaustão, haja visto a volatilidade dos componentes. Não se recomenda a reutilização das embalagens usadas, e seu descarte deverá seguir as normas sanitárias vigentes.
- Todos os reagentes e corantes podem ser adquiridos separadamente.

f. Observações

- Alguns laboratórios optam pelo uso da solução corante de safranina a 0,25% (cod. LB 620501) no lugar da fucsina e da solução corante de cristal violeta a 1%(cód. LB 620519) no lugar da violeta genciana;
- Diluindo-se o lugol forte (iodo a 5% e iodeto de potássio a 10%, cód. LB 620509) a 1:15 com água deionizada ou destilada pode-se obter o lugol fraco.

5. MATERIAL NECESSÁRIO (porém não fornecido)

- Alça bacteriológica em platina e bico de Bunsen;
- Lâminas para microscopia e suporte para coloração.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

- a- Preparar as lâminas para coloração:
- **Materiais líquidos:** espalhar o material sobre uma lâmina limpa e desgordurada, deixar secar ao ar e fixar o material passando a lâmina pela chama do bico de Bunsen, deixar resfriar;
 - **Material de culturas em meio sólido:** usando uma alça de platina flambada, colocar uma gota de água estéril no centro de uma lâmina limpa e

- desengordurada, e em seguida encostar a alça em uma colônia bacteriana, e Emulsionar esta na água estéril, deixar secar ao ar, e fixar o material na chama De um bico de Bunsen, deixar resfriar;
- **Amostras diretas:** Espalhar a amostra no centro de uma lâmina limpa e desgordurada, deixar secar ao ar, e em seguida fixar passando-a pela chama de um bico de Bunsen, deixando resfriar;
- b- Cobrir o material com a solução de violeta genciana e deixar atuar por um minuto, escorrendo ao final sem lavar;
- c- Cobrir a lâmina com o lugol fraco e deixar atuar um minuto;
- d- Remover o lugol da lâmina gotejando sobre esta a solução descolorante até que o líquido se torne incolor (15-30 segundos);
- e- Lavar em água corrente e cobrir a lâmina com a solução de fucsina para Gram, deixando atuar por 30-60 segundos (indicado para anaeróbios);
- f- Lavar com água corrente, deixar secar na posição vertical e observar ao microscópio usando a objetiva de imersão (100x de aumento total).

Resultados:

As células microbianas que apresentarem-se com a coloração púrpura escura são consideradas Gram positivas ao passo que as coradas em tonalidade avermelhada são consideradas Gram negativas. Estruturas como células epiteliais, leucócitos e muco coram-se em tonalidade avermelhada.

- Precauções e cuidados especiais

- Esfregaços muito delgados ou muito espessos dificultam o processo de coloração;
- Cuidar na etapa da descoloração, pois a falta ou o excesso podem igualmente prejudicar o resultado;
- Não lavar a lâmina após a adição da violeta genciana e antes da adição do lugol.

7. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

- A bacterioscopia por Gram não substitui a cultura em termos de valor diagnóstico;
- Materiais provenientes de culturas com mais de 24h ou com células mortas podem apresentar resultados falsos ao Gram;
- Microrganismos isolados de pacientes sob antibioticoterapia podem apresentar respostas anormais à coloração de Gram, tanto morfológica como tintorial.

8. CONTROLE DA QUALIDADE

- Materiais necessários

Cepas padrão de bactérias Gram positivas e Gram negativas (ATCC ou derivadas).

- Periodicidade

Usar as cepas padrão cada vez que se iniciar o uso de uma nova partida de reagentes. Estabelecer a periodicidade do controle segundo a necessidade do laboratório.

- Interpretação e avaliação

Uma vez que a função do controle de qualidade é garantir que o material usado esteja fornecendo resultados compatíveis com os esperados e dentro de um padrão de desempenho, espera-se que as bactérias Gram positivas coram-se em púrpura escuro e as Gram negativas em tonalidade avermelhada. Resultados anormais devem ser esclarecidos antes de se liberar o produto para uso.

9. GARANTIA DA QUALIDADE

A Laborclin obedece o disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário:

- que o usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;
- que os materiais estejam sendo armazenados em condições adequadas;
- que os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza.

Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser solicitados junto ao SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente, bem como em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, através do telefone 0800-410027. Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Mahon, C.R.; Manuselis, G.Jr. Textbook of diagnostic microbiology; Saunders Co., Philadelphia, 1997.



Laborclin produtos para laboratórios Ltda.
R. Casemiro de Abreu, 521 Pinhais/PR - CEP. 83.321-210
CNPJ: 76.619.113/0001-31 - Insc.Est.: 13700129-26
Responsável Técnico: Elisa H. Uemura CRF-PR 4311
www.laborclin.com.br
Indústria Brasileira