

Finalidade:

Kit utilizado para realização da Coloração de Gram em diversos materiais.

Registro ANVISA:

10097010156

Apresentação:

620520 - COLORACAO GRAM CONJ 4x100mL
620521 - COLORACAO GRAM CONJ 4x500mL
620181 - DESCORANTE GRAM 30% ACETONA FR 1000mL
621000 - DESCORANTE GRAM 30% ACETONA FR 500mL
620511 - LUGOL FRACO GRAM 0,3%/0,7%KI FR 500mL
621218 - VIOLETA GENCIANA GRAM 1% FR 1000mL
621219 - FUCSINA FENICADA GRAM 0,1% FR 1000mL
620501 - SAFRANINA CORANTE GRAM 0,25% FR 500mL

LB 170722
Rev. 18-08/2024

1. INTRODUÇÃO

A técnica de Gram, mundialmente conhecida como coloração de Gram, é um método de coloração de bactérias desenvolvido pelo médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram em 1884, o qual permite diferenciar bactérias com diferentes estruturas de parede celular a partir das colorações que estas adquirem após tratamento com agentes químicos específicos. O método consiste em tratar sucessivamente um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor, com os reagentes violeta de genciana, lugol, etanol-acetona (descorante) e fucsina. As bactérias que adquirem a coloração azul violeta são chamadas de Gram-positivas e aquelas que adquirem a coloração vermelho são chamadas de Gram-negativas.

A coloração de Gram é um dos mais importantes métodos de coloração utilizados em laboratórios de microbiologia e de análises clínicas, sendo quase sempre o primeiro passo para a caracterização de amostras de bactérias. A técnica tem importância clínica uma vez que muitas das bactérias associadas a infecções são prontamente observadas e caracterizadas como Gram-positivas ou Gram-negativas em esfregaços de pus ou de fluidos orgânicos. Essa informação permite ao clínico monitorar a infecção até que dados de cultura estejam disponíveis. É possível a análise de vários esfregaços por lâmina, o que facilita a comparação de espécimes clínicos. As lâminas podem ser montadas de forma permanente e preservadas como documentação.

O método consiste no tratamento de uma amostra de uma cultura bacteriana crescida em meio sólido ou líquido, com um corante primário, o violeta de genciana, seguido de tratamento com um fixador, o lugol. Tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas absorvem de maneira idêntica o corante primário e o fixador, adquirindo uma coloração violeta devido à formação de um complexo cristal violeta-iodo, insolúvel, em seus citoplasmas. Segue-se um tratamento com um solvente orgânico, o etanol-acetona. O solvente dissolve a porção lipídica das membranas externas das bactérias Gram-negativas e o complexo violeta-iodo é removido, descorando as células. Por outro lado, o solvente desidrata as espessas paredes celulares das bactérias Gram-positivas e provoca a contração dos poros do peptidoglicano, tornando-as impermeáveis ao complexo; o corante primário é retido e as células permanecem coradas. A etapa da descoloração é crítica, pois a exposição prolongada ao solvente provoca a remoção do cristal violeta dos dois tipos de bactérias, podendo produzir resultados falsos. A retenção ou não do corante primário é, portanto, dependente das propriedades físicas e químicas das paredes celulares bacterianas tais como espessura, densidade, porosidade e integridade.

Em seguida, a amostra é tratada com um corante secundário, a fucsina básica. Ao microscópio, as células Gram-positivas aparecerão coradas em violeta escuro e as Gram-negativas em vermelho ou rosa escuro. Células de bactérias Gram-positivas, células velhas, mortas ou com envelopes danificados por agentes

físicos ou químicos, tendem a perder o cristal violeta e uma mesma amostra bacteriana pode exibir parte ou todas as células coradas como Gram-negativas. Portanto, o uso de material fresco é importante. Por outro lado, resultados do tipo "falso Gram-positivo" só são obtidos se o tratamento com etanol-acetona for omitido.

2. COMPOSIÇÃO

VIOLETA GENCIANA-GRAM-1%

Formulação *	Concentração/L
Álcool Etilíco Anidro	190mL
Violeta Genciana	10g
Oxalato de Amônio	8g
Água Deionizada qsp	1000mL

LUGOL FRACO-GRAM-0,3%/0,7%KI

Formulação *	Concentração/L
Iodo Metaloide	3,33g
Iodeto de Potássio	6,67g
Água Deionizada qsp	1000mL

DESCORANTE-GRAM-30% ACETONA

Formulação *	Concentração/L
Acetona Pura	300mL
Álcool Etilíco Anidro	665mL
Água Deionizada	35mL

FUCSINA FENICADA-GRAM

Formulação *	Concentração/L
Fenol	4,5g
Fucsina básica	0,9g
Álcool etílico	9,0mL
Água Deionizada qsp	1000mL

SAFRANINA CORANTE GRAM

Formulação *	Concentração/L
Safranina	2,5g
Álcool etílico	100 mL
Água Deionizada qsp	1000mL

* A formulação pode ser ajustada e/ou suplementada, conforme necessário, para cumprir os critérios de desempenho.

3. AMOSTRA

a- Tipos de amostras

- A Coloração de Gram pode ser utilizada em diversos materiais biológicos.
- O laboratório deve estabelecer critérios de coleta, rejeição e conservação das amostras, conforme sua política da qualidade.
- Sempre considerar as necessidades específicas dos microrganismos alvos das análises, microrganismos com necessidades especiais (suplementos específicos ou ambiente controlados) podem não apresentar crescimento adequado se semeados em meio de cultura que não apresente os requisitos mínimos

4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO

a- Princípio

O método da coloração de Gram é baseado na capacidade das paredes celulares de bactérias Gram-positivas de reterem o corante cristal violeta no citoplasma durante um tratamento com etanol-acetona enquanto as paredes celulares de bactérias Gram-negativas não o fazem.

b- Armazenamento e estabilidade

Para fins de transporte e armazenamento, o produto pode permanecer em temperatura ambiente, condições em que se mantém estáveis até a data de vencimento expressa em rótulo, desde que isento de contaminação de qualquer natureza. Recomenda-se manter o produto protegido de incidência direta de luz (natural ou artificial) e evitar grandes variações de temperatura até a utilização.

c- Precauções e cuidados especiais

- O produto é destinado apenas para o uso diagnóstico *in vitro*;
- Uso restrito por profissionais;
- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso, observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;
- Não inalar ou ingerir;
- Não utilizar produto com sinais de contaminação, ressecamento ou com alterações de cor ou espessura;
- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;
- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para "Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI® M29-A" para o manuseio seguro;
- Para acondicionamento e descarte do material usado, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Recomendamos o uso dos sacos DetriLab;
- Os procedimentos de manuseio referentes ao processamento e manuseio para o descarte deverá estar de acordo com a RDC 222, de 28 DE MARÇO DE 2018 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

4. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)

- Bico de Bunsen;
- Lâminas;
- Alça bacteriológica;
- Microscópio.

5. PROCEDIMENTO TÉCNICO

a- Preparar as lâminas para coloração:

- Materiais líquidos: espalhar o material sobre uma lâmina limpa e desengordurada, 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, colocar uma gota de água estéril no centro de uma lâmina limpa e desengordurada, e em seguida pegar a alçada de uma colônia bacteriana, emulsionar 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 desengordurada, deixar secar ao ar, e em seguida fixar passando-a pela chama de um bico de Bunsen, deixando resfriar;

b- Coloração:

- Cobrir o material com a solução de violeta genciana e deixar atuar por um minuto;
- Lavar em água corrente rapidamente para remover o excesso de corante;
- Cobrir a lâmina com o lugol fraco e deixar atuar um minuto;
- Lavar com água corrente;
- Gotejar a solução decolorante até que não escorra mais o violeta genciana (cuidado para não descorar demais);
- Lavar em água corrente e cobrir a lâmina com a solução de safranina ou fucsina deixando atuar por 30 segundos;
- Lavar com água corrente, deixar secar na posição vertical e observar ao microscópio usando a objetiva de imersão (100x de aumento total).

c- Precauções e cuidados especiais

- Esfregaços muito delgados ou muito espessos dificultam o processo de coloração;
- Cuidar na etapa da decoloração, pois a falta ou o excesso podem igualmente prejudicar o resultado;

6. RESULTADOS

As células microbianas que apresentarem 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 em tonalidade avermelhada.

7. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 830/2023)

- Os resultados falsamente aumentados ou diminuídos, riscos associados à instabilidade, que poderiam levar a resultados errôneos, danos relacionados ao usuário, podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:
- Após abertos, os componentes tornam-se suscetíveis a contaminações químicas ou microbianas que podem inviabilizar sua utilização.
 - Manter os frascos dos padrões sempre fechados de maneira a evitar alterações em concentrações.
 - Os reagentes se destinam ao uso diagnóstico *in vitro*, não devendo ser ingeridos ou entrar em contato com a pele e mucosas;
 - Utilização de reagente vencido, contaminado ou em condições inadequadas.
 - Não utilizar água tamponada adequada para a realização da coloração.
 - Erro na conservação dos reagentes.
 - Deve-se evitar o uso de materiais que possam contaminar os reagentes, tais como ponteiros plásticos de micropipetador reaproveitados.
 - Deve-se evitar o uso de materiais que possam contaminar os reagentes, tais como tubos para a reação.
 - Interpretação equivocada de resultados.
 - Tempo excessivo ou insuficiente de coloração.
 - Armazenamento ou transporte de amostra inadequado.
 - Não utilizar a proporção amostra reagente sugerida na técnica.
 - Todas as amostras devem ser manipuladas com extrema cautela, pois podem veicular diversas doenças infectocontagiosas (hepatite, SIDA, etc.).

8. CONTROLE DA QUALIDADE

- Materiais necessários

Cepas padrão: ATCC® (*American Type Culture Collection*) ou derivadas).

- Controle de qualidade recomendado:

Parâmetro	Resultado esperado
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Cocos Gram Positivos: Células esféricas coradas em tonalidade violeta

<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Bacilos Gram Negativos: Células em formato de bastão coradas em tonalidade rósea
Células Epiteliais	Tonalidades avermelhadas ou magenta claro
Coloração de Fundo o fundo da lâmina	Apresenta-se límpido e isento de sujidades ou precipitados
Corantes não utilizados	Lugol Fraco - Solução amarelo queimado, livre de partículas visíveis. Fucsina - Solução vermelho escuro, livre de partículas visíveis. Violeta genciana - Solução violeta, livre de partículas visíveis. Safranina – Solução vermelho claro, livre de partículas visíveis. Descorante - Solução incolor, livre de partículas visíveis

16. TRABULSI, L. R; *et al.* Microbiologia. 3ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.



Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda

CNPJ 76.619.113/0001-31
Insc. Estadual 1370012926
Rua Casimiro de Abreu, 521
Pinhais/PR CEP 83.321-210
Telefone (41) 3661-9000
www.laborclin.com.br

Responsável Técnico:

Maire Wakamori – CRF/PR-20176
Serviço de Assessoria ao Cliente
SAC 0800-0410027
sac@laborclin.com.br

9. GARANTIA DA QUALIDADE

A Laborclin obedece ao 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;
- Os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas;
- 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 conforme calendário estabelecido pela empresa até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser obtidos no site www.laborclin.com.br. Em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, entrar em contato com o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-0410027 ou pelo e-mail sac@laborclin.com.br. 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

1. ELEUTÉRIO, J. Noções Básicas de Citologia Ginecológica. Livraria Santos Editora Ltda, São Paulo, 2003.
2. FLEMING, D. O. *et al.* Laboratory Safety: Principles and Practices, 2ªed. American Society for Microbiology. Washington, DC.
3. IZHAR, S, Kaur R, Masih K. Efficacy of rapid, economical, acetic acid, Papanicolaou stain in cervical smears as an alternative to conventional Papanicolaou stain. J Cytol. 2014.
4. JOHNSON, PL, Klein MN: Application of Papanicolaou stain to paraffin sections. Stain Technol 31:223, 1956.
5. KONEMAN, Elmer; *et al.* Diagnostic Microbiology. Lippincott, USA, 5 ed., 1997.
6. LIMA, O. A.; Soares J.B; Greco J.B. Galizzi; Cançado J.R: Métodos de laboratório aplicados à clínica; 1992.
7. LIU, W: A simplified cytologic staining technic. Am J Clin Pathol 54:767, 1970
8. MAHON, Connie, Manuselis, George Jr. Diagnostic Microbiology. Saunders, USA, 1995.
9. MURRAY, P. R. *et al.* Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington, DC: ASM Press, 2007.
10. OPLUSTIL, C. P. *et al.* Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 3. ed. São Paulo, 2010.
11. PELCZAR Jr, M. J.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R.; Microbiology: concepts and applications; McGrawHill; 1993; 75-76 pp.
12. RIBEIRO, M. C.; Soares, M. M. S. R.; Microbiologia prática: roteiro e manual; Atheneu; 1993.
13. RUNYON, E.H. *et al.* Manual of clinical microbiology, p.141-174, Washington DC, Am. Soc. Mic., 1974.
14. STANER, R. Y.; Dourdoroff, M & Adelberg, E. Metodos de coloraciones in. Microbiologia. 2ªed. Madrid, 1977.
15. STANLEY S. Raphael: Lynch: Técnicas de laboratório; 1986.

ANEXO 1 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

	Código do produto		Número de lote
	Número de série		Fabricante
	Consultar instruções para utilização		Validade
	Temperatura de armazenagem (limite de temperatura)		Produto para saúde para diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada		Representante autorizado na Comunidade Européia
	Quantidade suficiente para <n> ensaios		Frágil, manusear com cuidado
	Esterilizado utilizando técnicas assépticas de processamento		Esterilização utilizando óxido de etileno
	Esterilização utilizando irradiação		Esterilizado utilizando vapor ou calor seco.
	Risco biológico		Cuidado. Importante consultar instruções de uso.
	Controle		Controle Negativo
	Controle Positivo		Manter seco
	Manter afastado da luz solar e longe do calor		Somente para avaliação de desempenho
	Não utilizar		Não reesterilizar

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Terceira edição (24.08.2022)