

TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE

GRAM



Ministério da Saúde
Programa Nacional de DST/AIDS



Homenagens e agradecimentos

Os responsáveis pela implantação do TELELAB empenharam toda sua capacidade profissional para tornar este projeto digno da qualidade técnica e científica e da eficiência que nossa coordenadora geral sempre imprimiu às realizações do Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde.

À Dra. Lair Guerra de Macedo Rodrigues, exemplo de coragem e liderança, dedicamos este trabalho.

Mariângela Batista Galvão Simão

Agradecimentos:

Às equipes da:

Faculdade de Higiene e Saúde Pública - Universidade de São Paulo;

Ao Laboratório ControlBio, São Paulo; e

Hospital Universitário -
Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC

Introdução

O método tintorial predominante utilizado em bacteriologia é o método de Gram. A bacterioscopia, após coloração pelo método de Gram com diagnóstico presuntivo de triagem, ou até mesmo confirmatório em alguns casos, constitui peça importante e fundamental na erradicação e no controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST). Essa técnica é simples, rápida e tem capacidade de resolução, permitindo o correto diagnóstico em cerca de 80% dos pacientes em caráter de pronto atendimento em nível local.

Os custos com investimento e manutenção são consideravelmente baixos diante da eficácia alcançada com os resultados imediatos dos testes. Essa técnica requer instalação simples, necessitando apenas de uma sala pequena com disponibilidade de água e gás, onde deverá ser instalado um balcão com pia e um bico de Busen, eventualmente substituído por uma lamparina ou espiriteira.

São ainda necessários: microscópio com objetiva de imersão e bateria para a coloração de Gram. Os corantes devem ser preparados pelo próprio laboratório ou por um laboratório habilitado que assegure a qualidade do produto.

Finalmente, e mais importante, são necessários técnicos de laboratório treinados, responsáveis e conscientes do valor do seu trabalho.

As interpretações dos esfregaços corados pelo Gram envolvem considerações relacionadas com as características da coloração, tamanho, forma e agrupamento das células. Estas características podem ser influenciadas por vários fatores, incluindo idade da cultura (esfregaço de cultura), meio de cultivo utilizado, atmosfera e incubação e presença de substâncias inibidoras.

A coloração de Gram recebeu este nome em homenagem a seu descobridor, o médico dinamarquês Hans Cristian Joaquim Gram. Em 1884, Gram observou que as bactérias adquiriram cores diferentes, quando tratadas com diferentes corantes. Isso permitiu classificá-las em dois grupos distintos: as que ficavam roxas, que foram chamadas de Gram-positivas, e as que ficavam vermelhas, chamadas de Gram-negativas.

Após descrição do método, inúmeras propostas de modificação foram feitas. Neste curso você vai conhecer a técnica, os corantes e os procedimentos para a correta realização da coloração de Gram, recomendados pelo Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde.

Quais as modificações feitas ao método de Gram?

O método original utilizava violeta-de-genciana. Hoje se utiliza um outro tipo de cristal violeta, a violeta-de-metila. É importante ressaltar que a solução de violeta-de-metila, em sua preparação, já contém fixador químico. Devido a isso, a fixação do esfregaço em chama caiu em desuso e é atualmente contra-indicada.

O diferenciador há 100 anos era uma mistura de solventes. Hoje se usa apenas o álcool etílico (99,5° Gay-Lussac). Esse é mais seguro do que o álcool - acetona utilizado por HURK, que requeria grande habilidade do operador para que não ocorresse a hiperdescoloração. Além do que, não permitia uma boa reprodutibilidade da técnica.

Entretanto, a modificação mais importante foi a do corante secundário, também chamado de corante de fundo. A fucsina fenicada de Gram foi substituída pela safranina. Foi baseado no espectro de cores que substituiu a fucsina pela safranina.

A safranina mantém-se mais distante da violeta no espectro de cor, diferenciado com maior nitidez as bactérias Gram-negativas que se destacam das Gram-positivas e da coloração de fundo, que assume a cor vermelho-claro. Veja a figura 1:

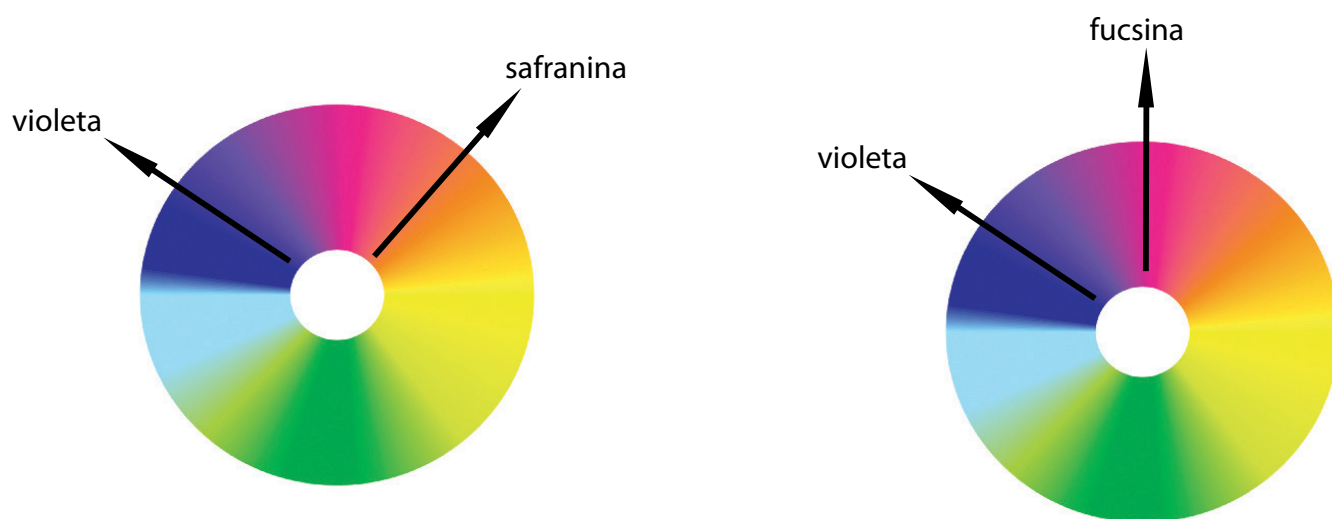


Figura1: representação, no espectro de cores, da distância da cor violeta entre as cores safranina e fucsina.

Quais as diferenças bioquímicas entre a safranina e a fucsina?

Safranina	Fucsina
Corante Ácido	Corante Básico
Pertencente ao Grupo das Triarilpirazinas	Pertencente ao Grupo das Triarilmetanos
Solúvel em Água	Insolúvel em Água

O que é preciso para preparar os corantes de Gram?

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 1 copo de Becker de 500 ml• 1 copo de Becker de 1 litro• 1 balança gramatária ou eletrônica• 2 bastões de vidro• 1 proveta de 200 ml• 1 proveta de 500 ml• 1 espátula ou uma colher de café | <ul style="list-style-type: none">• violeta de metila• álcool etílico (99,5° Gay-Lussac)• álcool metílico (99,5° Gay-Lussac)• Oxalato de amônia• iodeto de potássio• iodo metálico• safranina• água destilada |
|---|--|

Como preparar a violeta de metila?

A) Primeira solução:

Fórmula:

Violeta-de-metila.....	2,0g
Álcool etílico (99,5° Gay-Lussac).....	100,0 ml
Álcool metílico (99,57° Gay-Lussac).....	100,0 ml

Modo de preparo:

Se você utilizar uma balança gramatária ou eletrônica, coloque o papel de passagem no prato e pese o papel. Adicione a este valor 2 gramas de violeta de metila. Siga atentamente as instruções contidas no manual do equipamento.

Transfira a violeta de metila para o copo de Becker de 500 ml, junte 100 ml de álcool etílico e, em seguida, 100 ml de álcool metílico. Misture lentamente com o auxílio do bastão de vidro. Deixe descansar por alguns minutos e repita o procedimento de mistura várias vezes, até conseguir a completa dissolução do corante.

B) Segunda solução:

Fórmula:

Oxalato de amônia.....	4,0 g
Água destilada.....	400,0 ml

Modo de preparo:

Pese 4 gramas de oxalato de amônia. No copo de Becker de 1 litro, junte o oxalato de amônia à metade da água destilada (200 ml). Misture lenta e constantemente como na 1ª solução, até conseguir a completa dissolução, observando se não restaram resíduos no fundo do copo de Becker. Você observará que o preparo dessa solução vai desencadear uma reação endotérmica, isto é, a solução ficará ligeiramente gelada. Para acelerar o processo de dissolução do sal, você pode aquecer em banho-maria a 37° C. Reserve 200ml de água destilada para o preparo final.

C) Preparo final:

Junte as soluções, a primeira e a segunda, e utilize o restante da água destilada (200 ml) para recuperar os resíduos da violeta de metila no copo de Becker. Deixe descansar por 24 horas e filtre em papel de filtro comum, acondicionando o corante em frasco de vidro escuro, previamente lavado, seco e rotulado.

Como preparar o lugol?

Fórmula:

Iodeto de potássio.....	4,5g
Iodo metálico.....	3,0g
Água destilada.....	450,0ml

Modo de preparo:

Para preparar essa solução, pese 4,5 gramas de iodeto de potássio. Transfira o iodeto de potássio para um béquer contendo 450 ml de água destilada. Com o auxílio de um bastão de vidro, misture até a completa dissolução. Em seguida, pese 3 gramas de iodo metálico e junte à solução de iodeto de potássio. Continue misturando até a completa dissolução. Armazene em frasco de vidro escuro, previamente lavado, seco e rotulado.

Como diluir o lugol para uso?

Antes de usar, dilua a solução preparada 1/20 em água destilada. Por exemplo, em um frasco conta-gotas escuro, junte 2 ml de lugol concentrado com 38 ml de água destilada.

Como preparar a safranina?

Fórmula:

Safranina.....	2,5g
Álcool etílico a 95%.....	250,0mL

Modo de preparo:

Pese 2,5 gramas de safranina. Dissolva bem o pó em 250 ml de álcool etílico 95%, prossiga retirando 10 mL desta solução e diluindo em 90 mL de água destilada, misturando bem até conseguir a completa dissolução. Guarde em frasco escuro previamente lavado, seco e rotulado.



Atenção

A boa prática laboratorial recomenda a identificação de todos os seus reagentes. Você deve incluir o nome do corante, a concentração, a data de preparação e o prazo de validade.

Como armazenar os corantes?

Os recipientes utilizados para os corantes devem ser de cor âmbar-escuro, pois, de forma geral, as substâncias corantes sofrem ação da luz, produzindo alterações variadas. Os corantes devem ser colocados em frascos de 1 litro e distribuídos em frascos conta-gotas com cerca de 100 ml de capacidade, para uso diário. Sempre que os frascos conta-gotas forem reabastecidos, filtre o corante. Esse procedimento evitará os inconvenientes advindos da precipitação do corante.

Como fazer a coloração de Gram?

Antes de iniciar a coloração, assegure-se de que o esfregaço esteja seco. Não fixe o esfregaço em chama, pois esse processo promove a desidratação brusca dos constituintes celulares. Lembre-se de que a violeta-de-metila já contém fixador químico.

Não se pode deixar de destacar que a coloração de Gram somente será um recurso rápido e útil quando for corretamente realizada (tecnicamente) e interpretada por profissionais experientes.

Para fazer a coloração, siga os seguintes passos:

- 1 - cubra o esfregaço com violeta-de-metila e deixe por aproximadamente 15 segundos;
- 2- adicione igual quantidade de água sobre a lâmina coberta com violeta-de-metila e deixe agir por mais 45 segundos;
- 3- escorra o corante e lave em um filete de água corrente. Cubra a lâmina com lugol diluído (1/20) e deixe agir por aproximadamente 1 minuto;
- 4- escorra o lugol e lave em um filete de água corrente;
- 5 - adicione álcool etílico (99,5° GL) sobre a lâmina, descorando-a, até que não desprenda mais corante;
- 6 - lave em um filete de água corrente;
- 7 - cubra a lâmina com safranina ou (fucsina básica 0,1 a 0,2%) e deixe agir por aproximadamente 30 segundos;
- 8 - lave em um filete de água corrente;
- 9 - deixe secar ao ar livre, ou seque suavemente, com o auxílio de um papel de filtro limpo;
- 10 - coloque uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço; e
- 11 - leia em objetiva de imersão (100 X).

Como funciona a coloração de Gram?

Desde o trabalho original de Hans Gram, vários pesquisadores tentaram, com pouco sucesso, determinar o mecanismo envolvido no método de coloração. Conceitos diversos têm sido apresentados, tais como:

- 1 - a existência de um substrato Gram-positivo e específico;
- 2 - as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas possuíam diferentes afinidades com o corante primário cristal de violeta; e
- 3 - a existência de diferentes graus de permeabilidade na parede dos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos.

Este último é o mais aceito atualmente. Tanto a espessura da parede celular, quanto as dimensões dos espaços intersticiais, por exemplo, "diâmetro do poro", parecem ser determinantes do resultado final da coloração de Gram.

Segundo esse conceito, quando as estruturas celulares são cobertas pela violeta-de-metila, todas se coram em roxo. Com a adição do lugol, também chamado de mordente, ocorre a formação do complexo iodo-pararosanilina. Essa reação tem a propriedade de fixar o corante primário nas estruturas coradas. Algumas estruturas perdem a cor violeta rapidamente, quando se aplica um agente descorante, como álcool etílico, enquanto outras perdem sua cor mais lentamente ou não perdem a cor. A safranina cora as estruturas que foram descoradas.

As bactérias que têm a parede celular composta por mureína (peptídeoglicano - peptídeo de ácido n-acetil murâmico), durante o processo de descoloração com álcool etílico, retêm o corante. Já as bactérias com parede celular composta predominantemente por ácidos graxos (lipopolissacarídeos e lipoproteínas) perdem o complexo iodo-pararosanilina, assumindo a cor do corante de fundo.

Veja as figuras 1 e 2.

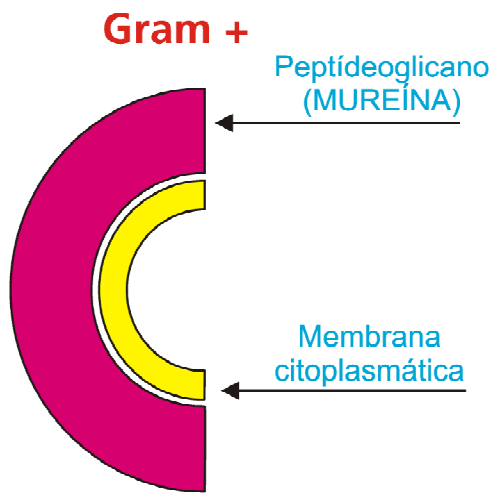


Figura 1. Esquema da parede das bactérias Gram-positivas

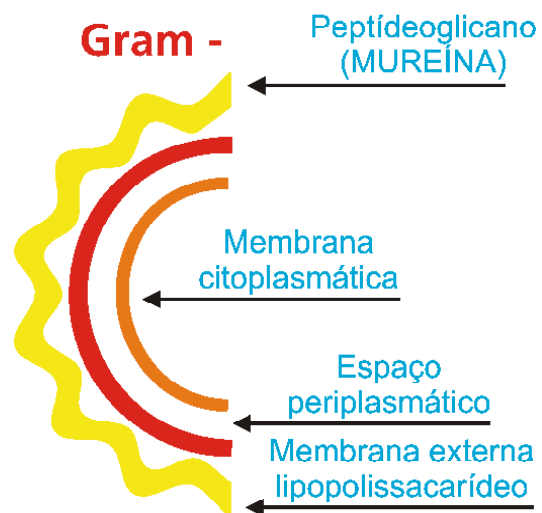


Figura 2. Esquema da parede das bactérias Gram-negativas.

Como fazer o controle de qualidade do método de coloração de Gram?

O controle de qualidade é uma atividade obrigatória da rotina diária. Para realizar o controle de qualidade dos corantes e da coloração de Gram, você precisa de duas cepas bacterianas: a Gram-positiva deverá ser a *Streptococcus pyogenes* ATCC - American Type Culture collection - nº 19.615 e a Gram-negativa deverá ser a *Escherichia coli* ATCC nº 25.922. Cocos Gram-positivos apresentam coloração roxa e Cocos Gram-negativos apresentam coloração rosa.

Para se evitar a evaporação dos reagentes que pode afetar sua eficácia recomenda-se que as soluções de trabalho sejam trocadas regularmente, dependendo da demanda. Deve-se também fazer manutenção preventiva e limpeza nos microscópios e sistema de revisão dos resultados do Gram. A revisão de lâminas por um supervisor poderá determinar a necessidade de treinamentos e adicionar informações de relevância clínica. Pode-se também comparar os resultados da cultura com leitura do Gram.

Como fazer a manutenção das cepas-padrão?

Para manter as cepas bacterianas do controle de qualidade em seu laboratório, você deverá repicá-las, a cada 15 dias, em ágar nutriente (tubo com ágar inclinado). O controle da pureza das cepas bacterianas deverá ser realizado a cada 2 meses. As cepas deverão ser repicadas em placas (método do esgotamento por estrias) e identificadas segundo procedimentos microbiológicos tradicionais. Após confirmação da pureza das cepas, estas deverão voltar a ser estocadas em tubos com ágar nutriente.

Como preparar as lâminas de controle de qualidade para uso diário?

Prepare uma suspensão de *Streptococcus pyogenes* e *Escherichia coli*. Para isso, pipete 2 ml de solução salina estéril em um tubo de ensaio limpo e estéril. Junte uma alçada do *Streptococcus pyogenes* e outra de *Escherichia coli*. Muita atenção com os procedimentos técnicos e cuidados de biossegurança durante a execução. Flambe a alça bacteriológica antes e após a utilização com cada uma das cepas bacterianas. Não se esqueça de esfriar a alça após a flambagem.

Prepare 30 lâminas para utilizar durante 1 mês, pipetando uma gota da suspensão bacteriana sobre cada uma das lâminas de vidro, limpas, secas e desengurduradas. Deixe as lâminas secarem naturalmente. Estoque-as em um porta-lâminas em temperatura ambiente. Lembre-se de identificar o porta-lâminas.

➔ **Atenção**
O controle de qualidade deverá sempre ser realizado ao término da preparação dos corantes, mesmo no caso da diluição do lugol.

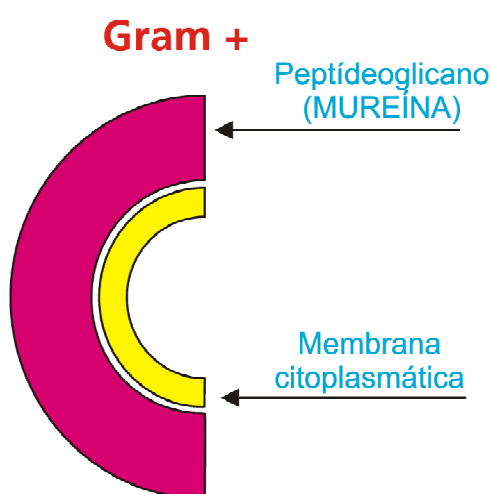


Figura 1. Esquema da parede das bactérias Gram-positivas

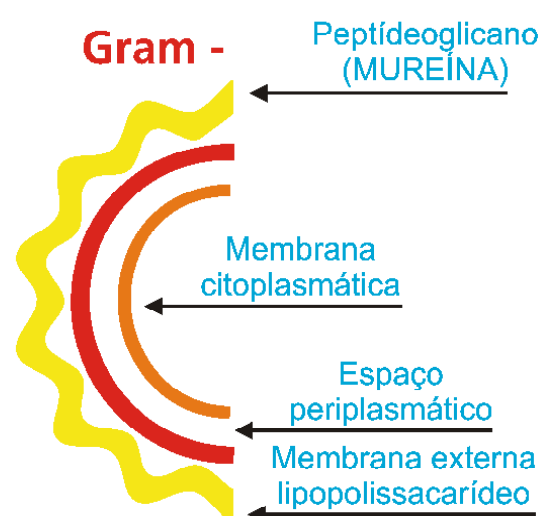


Figura 2. Esquema da parede das bactérias Gram-negativas.



Referências bibliográficas

- ANVISA, 2004. Procedimentos laboratoriais: Da requisição do exame à análise microbiológica, módulo III. Brasília, 43 p.
- BARON, E. J. & FINEGOLD, S. N, Appendix B, Fórmulas for commonly used stains. In: Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 8º ed. St. Louis, 1990. Mosby.
- BARON, E. J.; PETERSON, L. R. & FINEGOLD, S. N., Optical methods for laboratory diagnosis of infectious diseases. In: bailey and Scott's diagnostic microbiology, 9º ed.st.Louis, 1994, Mosby.
- BARTHOLOMEW, J. W., CROMWELL, T. & GAN, R.. Analysis of the mechanism of Gram differentiaton by use of filter paper chomatographic Technique. J.Bacteriol, 90:766, 1965.
- BOTTONE, E. J. The gram stain: The century-old quintessential rapid diagnostic test. Lab. Med. 19:288, 1988.
- CLARRINDGER, J. E. & MULLINS, J. M. Microscopy and Staining. In: Howard, B, J.; Klass, J. II & Rubin, S. J. eds. clinical and Pathogenic Microbiology, 1987. Mosby. ST.Louis.
- COSTA, M. F., 1996. Segurança Química em Biotecnologia e Ambientes Hospitalares. Editora Santos, São Paulo, 99p.
- CURA, E. WENDEL, S., 1994, Manual de Procedimentos de controle de Calidad para los laboratórios de Serologia de los Bancos de Sangue. Organización Panamericana de la salud (OPS). Washington, DC, 61 p.
- DAVIES, J. A., ANDERSON, G. K. & BEVERIDGE, T.J. Chemical mechanism of the Gram stain and Synthesis of a new electron-opac marker for eletron microscopy which replaces the idione mordant of the stain. J. Bacteriol. 156:837, 1983.
- DOUGLAS, S. D. Microscopy. In: Lenette, E.H., editor. Manual of clinical Microbiology, 4º ed. Washington D.C., 1985, American Society for Microbiology.
- FLEMING, D. O. at al., 1995. Laboratory Safety: Principles and Practices, 2nd Ed. American Dociety for Microbiology. Washington, DC, 406 p.
- FRANCHINI, MIRIAM, Procedimentos Laboratoriais no Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis, Brasília, 1983, Senado Federal- Centro Gráfico.
- GRISHT, N. R., 1995. Manual de Segurança para Laboratório. Eitora Santos, São Paulo, 133p.
- MANGELS, J. I., COX, M. E. & LINDENBERG, L.H. Methanol fixation: na alternative to heat fixation of smears before staning. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2: 129, 1984.
- Ministério da Saúde, 1994, Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimento de Saúde. 2º edição, Brasília, 49p.
- Ministério da Saúde, 1995, Segurança no Ambiente Hospitalar. Brasília, 196p.
- RICE-SPEARMAN, L. The Gram Stain: still a diagnostic tool? Clin. Lab. Sci. 6: 16, 1993.

STAINIER, R.Y.; DOUDOROFF, M. & ADELBERG, E, Metodos de coloraciones, In: Microbiologia. 2º ed.Madrid,1977, Aguilar S. de ediciones.

SIMONS, J. & SOTTY, P., 1991. Prévention el Laboratoire de Recherche, Editons INSERM/INRA/ Institute Pasteur, Paris , 248p.

TEIXEIRA, PEDRO & VALLE, SILVIO. Biossegurança - Uma abordagem Multidisciplinar. Rio de Janeiro , 1996, Editora FIOCRUZ.

VALLE, S. & TEIXEIRA, P., 1996. Biossegurança: Uma abordagem multidisciplinar. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 362p.

VALLE, S. 1996, Regulamentação da Biossegurança em Biotecnologia. Edição Curso de Biossegurança da FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 80p.



Créditos e autoria

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Secretaria de Vigilância em Saúde

Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais

Unidade de Laboratório - D-DST/AIDS-HV

Mirian Franchini

Coordenadora de Produção do Projeto TELELAB

Autores:

Claudia Renata Fernandes Martins

José Antônio Pinto de Sá Ferreira

Luiz Alberto Peregrino Ferreira

Luiz Fernando de Góes Siqueira

Maria Luiza Bazzo

Miriam Franchini

Oscar Jorge Berro

Sílvio Valle

Assessoria Pedagógica:

Maria Lúcia Ricciotti Ribinik

Martistela Arantes Marteleto

Técnica de Coloração de Gram

Brasília: Ministério da Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 1997.

64 p.il. (Série TELELAB)

I. Gram I. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais (Brasil). II. Série TELELAB