

CONJUNTO DE COLORAÇÃO GRAM / CONJUNTO DE COLORAÇÃO GRAM (SEG. HUCKER)

FINALIDADE

Conjunto de corantes para coloração diferencial em bacteriologia

APRESENTAÇÃO

Conjunto de Coloração Gram: Composto de 1 frasco com 500 mL de Cristal Violeta, 1 frasco com 500 mL de Lugol para Gram, 1 frasco com 500 mL de Descorante para Gram e 1 frasco com 500 mL de Fucsina Fenicada de Gram - Cód. PA185

Cristal Violeta 500 mL - Cód. PA189

Descorante para Gram 1000 mL - Cód. PA190

Descorante para Gram 500 mL - Cód. PA191

Fucsina fenicada de Gram 1000 mL - Cód. PA198

Fucsina Fenicada de Gram 500 mL - Cód. PA199

Lugol para Gram 1000 mL - Cód. PA217

Lugol para Gram 500 mL - Cód. PA218

Conjunto de Coloração Gram (Seg. Hucker): Composto de 1 frasco com 500 mL de Cristal Violeta, 1 frasco com 500 mL de Lugol para Gram, 1 frasco com 500 mL de Descorante para Gram (seg. Hucker) e 1 frasco com 500 mL de Fucsina Fenicada de Gram - Cód. PA418

Descorante para Gram (seg. Hucker) 1000 mL - Cód. PA419

COMPOSIÇÃO

Formulação	g/L
Cristal Violeta (1%)	
Cristal Violeta	10
Álcool Etilíco Absoluto	100 mL/L
Oxalato de Amônio	8,0
Água purificada: q.s.p.	1000 mL
Lugol para Gram (1%)	
Lugol Forte	500 mL/L
Água purificada: q.s.p.	1000 mL
Descorante para Gram (30%)	
Acetona P.A.	300 mL/L
Álcool Etilíco Absoluto	700 mL/L
Descorante para Gram (seg. Hucker)	
Acetona P.A.	500 mL/L
Álcool Etilíco Absoluto	500 mL/L
Fucsina Fenicada de Gram (0,1%)	
Fucsina Básica	1,0
Fenol fundido	5 mL/L
Álcool etílico	10 mL/L
Água purificada: q.s.p.	1000 mL

REGISTRO ANVISA:

10287910054

ARMAZENAMENTO

Conservar o produto em temperatura ambiente (10 a 30° C).

Válido por 720 dias após a fabricação.

Verificar o prazo de validade na embalagem.

Nunca utilizar produtos com validade expirada.

TRANSPORTE

Não aplicável.

CUIDADOS ANTES DO USO

Por tratar-se de material biológico, manusear o produto utilizando equipamentos de proteção individual (luvas, avental e máscara).

Não usar materiais com selo de qualidade rompido ou violado.

Verificar o prazo de validade na embalagem.

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS COM O PRODUTO

- Alça bacteriológica;
- Bico de Bunsen;
- Microscópio;
- Lâmina de microscopia.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS

- PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

O método de coloração de Gram, descrito por Hans Christian Gram em 1884, é uma técnica diferencial amplamente utilizada em microbiologia para a classificação inicial das bactérias com base nas características estruturais de sua parede celular. O princípio do método baseia-se na capacidade de determinadas bactérias reterem o corante primário Cristal Violeta após a formação de um complexo insolúvel com o iodo (Lugol), enquanto outras bactérias perdem esse corante durante a etapa de

descoloração.

Após a aplicação do Cristal Violeta, adiciona-se o Lugol, que atua como mordente, promovendo a formação de um complexo estável entre o corante e o iodo, conhecido como complexo cristal violeta-iodo (iodopararosanilina).

Esse complexo é fortemente retido pelas bactérias Gram positivas, devido à sua parede celular espessa, rica em peptidoglicano, que se desidrata na presença do álcool acetona, dificultando a saída do corante.

Em contraste, as bactérias Gram negativas possuem uma parede celular mais fina de peptidoglicano e uma membrana externa rica em lipídios, que é solubilizada pelo álcool acetona, permitindo a remoção do complexo cristal violeta-iodo durante a etapa de descoloração.

A aplicação da solução de álcool acetona é o passo crítico do método.

As bactérias que resistem à descoloração permanecem coradas de violeta e são classificadas como Gram positivas.

As bactérias que perdem o corante tornam-se incolores nesse estágio e são classificadas como Gram negativas.

Após a descoloração, aplica-se um corante de contraste, fucsina básica, com a finalidade de evidenciar as bactérias previamente descoradas.

As bactérias Gram negativas passam a apresentar coloração vermelha ou rosada.

As bactérias Gram-positivas permanecem roxas ou violeta, pois retêm o corante primário.

Esse método é fundamental para a identificação preliminar bacteriana, orientação terapêutica e definição de fluxos analíticos em laboratórios de microbiologia clínica e industrial.

- USUÁRIO PRETENDIDO

Profissionais de laboratório de pesquisa ou análise clínica que realizam estudos ou serviços em microbiologia.

- AMOSTRA

Materiais clínicos variados, como: urina, líquido cefalorraquidiano, líquidos corporais (pleural, peritônio, pericárdico, amniótico, sinovial), secreções genitais, amostras do trato respiratório superior (ouvido, nariz, orofaringe), amostras do trato respiratório inferior (escarro, lavado brônquico), secreções oculares, fistulas, úlceras, feridas, abscessos, secreções purulentas, fezes, colônias desenvolvidas em ágar, culturas em meios líquidos.

- TÉCNICA DE USO

1- Recobrir a lâmina com a solução de Cristal Violeta e deixar por trinta segundos a um minuto. Escorrer o excesso de corante.

2- Sem lavar com água, verter sobre a lâmina a solução de Lugol para Gram, deixar agir durante um minuto, verter fora o excesso de solução.

3- Ainda sem lavar a preparação, recobrir a lâmina com a solução de Álcool-Acetona e lavar a lâmina com esta solução até que a cor roxa cesse de desprender-se.

4- Lavar com água.

5- Corar com Fucsina Fenicada de Gram, durante 30 segundos.

6- Escorrer o corante, lavar com água. Secar e proceder a leitura com objetiva de imersão.

- LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A leitura da coloração de Gram deve ser realizada utilizando a objetiva de imersão (100x), após a aplicação do óleo de imersão, permitindo a adequada visualização da morfologia bacteriana, do arranjo celular e da reação tintorial.

De modo geral, as bactérias de morfologia cônica apresentam-se como Gram positivas, com exceção das pertencentes ao gênero *Neisseria*, que são cocos Gram negativos, destacando-se *Neisseria gonorrhoeae* (gonococo) e *Neisseria meningitidis* (meningococo).

As bactérias de morfologia bacilar, por sua vez, são predominantemente Gram negativas. Entretanto, existem importantes exceções entre os bacilos Gram positivos, como os gêneros: *Corynebacterium*, incluindo *Corynebacterium diphtheriae*, agente etiológico da difteria; *Bacillus*, como *Bacillus anthracis*, agente causador do carbúnculo (antraz); *Clostridium*, incluindo *Clostridium tetani*, agente do tétano.

A coloração de Gram possui grande relevância no diagnóstico presuntivo das infecções bacterianas, uma vez que fornece informações rápidas e fundamentais para a tomada de decisão clínica inicial, incluindo a escolha empírica de antimicrobianos.

Sua aplicação é especialmente valiosa em infecções que acometem sítios anatómicos normalmente estéreis, tais como: Líquido cefalorraquidiano (meningites); Sangue (bacteremias e septicemias).

Além do seu valor diagnóstico, a coloração de Gram é uma ferramenta essencial para a avaliação da qualidade das amostras clínicas, permitindo verificar: Adequação da amostra; Presença de microbiota contaminante; Relação entre células inflamatórias e células epiteliais.

Essa aplicação é particularmente importante em amostras como: Escarro, para avaliação da representatividade do trato respiratório inferior; Feridas superficiais, para identificação de contaminação da microbiota cutânea; Urina, para triagem microbiológica inicial e correlação com achados clínicos.

INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES

Algumas situações poderão comprometer a execução dos testes e gerar interferências analíticas, como:

- Esfregaços excessivamente finos ou espessos prejudicam a uniformidade e a qualidade da coloração;
- Problemas recorrentes também podem estar relacionados à fixação inadequada do material;
- De acordo com a rotina do laboratório, deve-se manter um cronograma de troca dos corantes, geralmente necessário quando as colorações se tornam visivelmente mais fracas;
- Após abertos, os componentes tornam-se suscetíveis a contaminações químicas ou microbianas que podem inviabilizar sua utilização;
- 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;
- 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.

REAÇÕES ADVERSAS

Não aplicável.

CARACTERÍSTICA DE DESEMPENHO DO PRODUTO**- ESPECIFICIDADE**

Não aplicável.

- LIMITE DE DETECÇÃO

Não aplicável.

RISCOS RESIDUAIS

Não aplicável.

INTERVALO DE REFERÊNCIA

Não aplicável.

REQUISITOS DE INSTALAÇÃO, TREINAMENTO OU QUALIFICAÇÕES ESPECIAIS

Não aplicável.

DESCARTE DO PRODUTO E DA AMOSTRA

Descartar o produto e a amostra de acordo com o programa de gerenciamento de resíduos do laboratório.

* Para o produto sem contato com a amostra seguir o plano de gerenciamento de resíduos químicos.

* Para a amostra e produto com amostra seguir plano de gerenciamento de resíduos infectantes ou possivelmente infectantes.

* Após incubação o produto deverá ser autoclavado a 121° C por 30 minutos e descartado em lixo apropriado.

CONTROLE DE QUALIDADE

ANÁLISES	RESULTADO ESPERADO
Desempenho Microbiológico S. aureus ATCC 25923	Especificação: Coloração púrpura após técnica de Gram.
Desempenho Microbiológico E. coli ATCC 25922	Especificação: Coloração vermelha após técnica de Gram.

GARANTIA DA QUALIDADE

Este produto é fabricado e liberado para venda após testes de controle de qualidade para cada lote, conforme normas das Boas Práticas de Fabricação e Controle de produtos para diagnóstico de uso *in vitro*.

Para eficácia do produto é necessário:

- Utilizar amostras clínicas coletadas, transportadas e armazenadas de acordo com a indicação da literatura especializada;
- Seguir rigorosamente todas as etapas descritas nesta instrução de uso.
- Utilizar acessórios e equipamentos adequados e em boa conservação.
- Transportar e armazenar o produto de acordo com as condições indicadas.
- Nunca utilizar produtos com a embalagem original danificada.
- Nunca utilizar produto com prazo de validade expirado.

Caso ocorra qualquer problema na utilização do produto relativo à qualidade intrínseca do mesmo, que tenha ocorrido por falha de fabricação comprovada, a Newprov resolverá a questão sem ônus ao cliente, conforme determinado na Lei 8.078/90 – Código de Defesa do Consumidor.

A Newprov disponibiliza, aos seus clientes, assessoria técnica-científica para quaisquer esclarecimentos necessários quanto a utilização deste produto que não estejam contemplados nesta instrução de uso, através de contato com o SAC – Serviço de Atendimento ao Consumidor.

Certificados de análise de cada lote estão disponíveis na empresa e podem ser encaminhados ao cliente sempre que solicitados ao SAC ou acesso pelo site www.newprov.com.br após cadastro no campo de acesso restrito.

Consulte sempre a instrução de uso através do QR code impresso no rótulo do produto para garantir a correlação adequada de versão/revisão do documento frente ao produto adquirido. Na necessidade de versão impressa da instrução de uso solicitar sem custo adicional (inclusive de envio) ao nosso SAC pelo (41) 38881300 ou sac@newprov.com.br

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecções relacionadas à assistência à saúde**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, s.d.

BEVERIDGE, T. J. **Use of the Gram stain in microbiology**. Biotechnic & Histochemistry, v. 76, n. 3, p. 111–118, 2001.

DIFCO & BBL. **Manual of Microbiological Culture Media**. Maryland: Becton, Dickinson and Company, 2003.

GRAM, H. C. **Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten**. Fortschritte der Medizin, v. 2, p. 185–189, 1884.

ISENBERG, H. D. (Ed.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. 2. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM), 2004.

MADIGAN, M. T.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; SATTLEY, W. M.; STAHL, D. A. **Brock Biology of Microorganisms**. 16. ed. New York: Pearson, 2021.

MANUAL OXOID. **Manual Oxoid de meios de cultura**. São Paulo: Oxoid Brasil Ltda., 2000.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2021.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. (Eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. 9. ed. Washington, DC: American

Society for Microbiology (ASM), 2007.

NCCLS. **Quality Assurance for Commercially Prepared Microbiological Culture Media**. 2. ed. NCCLS Document M22-A2. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1996.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2020.

WINN Jr., W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO DE USO IN VITRO

Fabricado e distribuído por:

Newprov Produtos para Laboratório Ltda

Rua 1º de Maio, 590/608 - Centro - CEP: 83323-020 - Pinhais - PR

CNPJ: 73.636.391/0001-09

Responsável Técnica:

Bárbara Pereira Albini – CRF/PR 19057

Indústria Brasileira

Serviço de Assessoria e Soluções de excelência em análises laboratoriais