

IMPORTÂNCIA DA COLORAÇÃO DE GRAM NO DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO E VARIAÇÕES NA SUA EXECUÇÃO

GRAM STAINING OF IMPORTANCE IN THE DIAGNOSIS Microbiological AND VARIATIONS IN EXECUTION

¹ JACOB, Fernando Rodrigues , ²GATTI Luciano Lobo

¹Discente do Curso de Farmácia – Faculdades Integradas de Ourinhos - FIO/FEMM

²Professor Orientador - Curso de Farmácia – Faculdades Integradas de Ourinhos - FIO/FEMM

RESUMO

A Técnica da Coloração de gram é uma importante ferramenta laboratorial dentro da Microbiologia, auxiliando o laboratório no diagnóstico. A partir de características bioquímicas das bactérias as mesmas podem ser classificadas como gram positiva ou gram negativas, corando-se de roxo ou rosa respectivamente. Esta coloração se dá através de metodologias padronizadas até chegar na leitura final. O objetivo geral do trabalho foi realizar a Técnica de Gram variando várias etapas (tempos) durante o procedimento para verificar se tais alterações influenciam no resultado final da coloração. Os resultados preliminares até o momento mostraram que as diferenças nos procedimentos aplicados não alteraram o resultado das colorações das cepas padrão.

Palavras-chave: Coloração de Gram. Bactérias. Gram Positivo. Gram Negativo.

ABSTRACT

The technique of Gram staining is an important laboratory tool in the microbiology, helping the laboratory diagnosis. From biochemical characteristics of the bacteria they can be classified as gram positive or gram negative staining to purple or pink respectively. This coloration is through standardized methodologies to arrive at the final reading. The overall objective of the study was the Gram technique varying number of steps (times) during the procedure to verify that these changes influence on the outcome of color. Preliminary results to date have shown that the differences in the procedures applied did not change the outcome of the colorations of the standard strains..

Keywords: Gram Staining. Bacteria. Gram Positive. Gram Negative.

INTRODUÇÃO

Em 1884 o bacteriologista Hans Christian Gram desenvolveu a coloração de Gram, que classifica as bactérias em dois grandes grupos: gram-positivas, as quais coram-se de roxo e gram-negativas que coram-se de rosa. Essas bactérias reagem de modo diferente a coloração de Gram, devido as diferenças estruturais presentes em suas paredes celulares que afetam a retenção ou liberação do complexo violeta-iodo (PEREIRA, PETRECHEN, 2011).

De acordo com Freitas, Picoli (2007), em laboratórios de microbiologia, o Gram é uma ferramenta diagnóstica de muita importância, que tem finalidade, de classificar os microrganismos com base em suas características tintoriais, forma, tamanho e arranjos celulares, envolvendo vários procedimentos antes de chegar a etapa final de leitura da lamina.

A observação de microrganismos nas amostras é de suma importância, uma vez que pode indicar uma terapia antimicrobiana direcionada a um determinado grupo de patógeno, também com a necessidade da escolha certa do meio de cultura para obtenção correta do crescimento bacteriano (BARBOSA HR, TORRES EB, 1998).

Segundo o Ministério da saúde (1997), quando cobre-se as células das bactérias com a violeta de metila, as mesmas coram-se de roxo, quando adicionado o iodo (Iugol), ocorrendo a formação do complexo violeta-iodo. Esse complexo fixa o corantes nas estruturas coradas e com a aplicação do descorante (álcool etílico), algumas estruturas perdem a cor enquanto outras não descoram.

Bactérias que possuem sua parede celular, composta por mureína (peptídeoglicano - peptídeo de ácido n-acetilmurâmico), retém o complexo violeta-iodo, já as que possuem ácidos graxos (lipopolissacarídeos e lipoproteínas) em sua parede celular, perdem esse complexo, assumindo a coloração do corante secundário, fucsina de gram (safranina).

Geralmente a coloração de Gram é feita a partir de protocolos padrões e respeita um protocolo de ações que a padroniza. Contudo, há variantes nesse procedimento relacionadas aos tempos de execução da coloração e à utilização de lavagem com água em dadas etapas que podem ou não interferir na visualização das estruturas coradas ou tempos dos reagentes durante a coloração. Visto a importância da Técnica de Coloração de Gram dentro do diagnóstico microbiológico, o presente trabalho tem como objetivo verificar se pequenas variações de tempo e lavagem a partir de protocolos específicos refletem em alguma alteração na interpretação dos resultados da coloração de Gram.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo das Cepas Padrão: Inicialmente foi feita a aquisição de protocolos, bulas de kits de Gram e protocolos da literatura vigente. Posteriormente a inoculação de cepas padronizadas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), ambas incubadas em caldo BHI (Brean Heart Infusion) em estufa, a 37°C, durante 24 horas. Feita a cultura dos microrganismos em Ágar MacConkey e Ágar Sangue respectivamente em placa de Petri pela técnica de esgotamento, tendo como finalidade a obtenção de colônias puras isoladas.

Confecção do Esfregaço bacteriano: A confecção de esfregaços bacterianos a partir das cepas Padrão cultivadas foram feitas a partir desse ágar, com alças de platina de 10 µl a fim de padronizar uma quantidade aproximada de microrganismos em cada lâmina. Foi preparado um total de 20 lâminas para serem testadas frente aos diferentes protocolos obtidos. Estas foram fixadas através de calor, em bico de Bunsen.

Técnica de Gram: Executada a técnica de coloração de Gram descrita para cada protocolo envolvido no estudo utilizado um único kit de coloração de Gram (NewProv) afim de reduzir o máximo de interferentes. Foi utilizada variações de tempo de exposição em cada corante, e lavagens das lâminas, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Levantamento de diferentes técnicas de coloração de Gram.

Técnica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cristal violeta	1 min	1 min	1 min	1 min	30 s	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min
Lavagem H ₂ O/ Lugol#	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim#	Sim#
Lugol	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min
Lavagem H ₂ O	Sim	Sim	Sim	SIM	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim
Álcool-acetona	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Lavagem H ₂ O	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
Fucsina Gram	20 s	30 s	1 min	30 s	30 s	30 s	20 s	30 s	30 s	30 s

*: gotejar álcool-acetona até o momento em que não desprenda mais a cor violeta do esfregaço.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre as lâminas parcialmente coradas (n=10), aplicando 5 técnicas (da Técnica 1 à 5) segundo os protocolos analisados, nenhuma apresentou alteração morfotintorial com relação as cepas padrão (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados Tintoriais das Técnicas de Gram

Resultado	Número de Lâminas
Alterado	0
Não Alterado	10

Os tempos que foram alterados foram o cristal de violeta e fucsina de gram e também a lavagem ou não com água entre as colorações. Verificou-se a cor roxa para a cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e rosa para cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922). Até o momento aplicando as técnicas parciais as variações dos Reagentes Cristal de Violeta e Fucsina de gram não alteraram as características tintoriais das cepas padrões, pois os cocos gram positivo permaneceram corados de roxo e os bacilos permaneceram corados de rosa.

CONCLUSÕES

Até o momento não foi observado nenhuma alteração tintorial e ou morfológica das cepas de acordo com os protocolos realizados, porém novas técnicas serão ainda submetidas.

REFERÊNCIAS

Barbosa HR, Torres EB. **Microbiologia Básica**. São Paulo: Atheneu, 1998. 196 p.

FREITAS, V. R. PICOLI, S. U. **A Coloração de Gram e as Variações na sua Execução**. Newslab, 2007. Disponível via URL em: <http://people.ufpr.br/~microgeral/arquivos/pdf/pdf/Gram.pdf>. Acesso em: 06 Mar 2106.

Ministério da Saúde, **Técnica de Coloração de Gram**. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, 1997. 63 p.: il. (Série TELELAB) 1. Gram I. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, (Brasil). II. Série TELELAB. Disponível via URL em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/115_03gram.pdf. Acesso em: 06 Mar 2016.

PEREIRA, R. E. P., PETRECHEN, G. G. Principais métodos diagnósticos bacterianos – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, n. 16, p. 1- 12, 2011. Disponível via URL em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/u94lwYWgePGj05L_2013-6-26-11-11-29.pdf. Acesso em: 09 Mar 2016.