

A Coloração de Gram e as Variações na sua Execução

Valdionir da Rosa Freitas, Simone Ulrich Picoli

Centro Universitário Feevale – Laboratório de Biomedicina

Resumo

A coloração de Gram é um importante teste realizado nos laboratórios de microbiologia, sendo um recurso auxiliar no diagnóstico de doenças bacterianas. A partir de um determinado perfil tintorial as bactérias coram-se de roxo ou de rosa e conseqüentemente são classificadas como Gram-positivas ou Gram-negativas, respectivamente. A coloração de Gram envolve uma série de procedimentos antes de chegar à etapa final de leitura da lâmina preparada: envolve a confecção do esfregaço, sua fixação e passa pela coloração propriamente. Nesta, o corante Cristal Violeta adsorve-se nas células, forma um complexo com o iodo (Lugol) e após a etapa diferencial, com álcool-acetona, as células são contra-coradas com Fucsina de Gram. Neste estudo avaliou-se a influência de variações na referida coloração considerando os tempos de exposição aos corantes Cristal Violeta e a Fucsina de Gram e o emprego ou não de lavagens com água entre as etapas. Os resultados obtidos mostraram que as diferenças nos procedimentos aplicados em cada técnica testada não alteraram o resultado quando comparados a lâminas padrão.

Palavras-chave: Gram-positivo, Gram-negativo, bactérias, coloração de Gram

Summary

Gram staining and the variations in its execution

The Gram staining is an important test carried through in microbiology laboratories, being an auxiliary resource in the diagnosis of bacterial illnesses. From a determined staining profile the bacteria are stained purple or pink and consequently classified as Gram positive or Gram negative, respectively. The Gram staining involves several procedures before the final reading stage: it begins with the deposition of the sample in the slide as well as its setting, passes for the Gram stain properly said with violet colouring matter and the formation of a complex with iodine (Lugol), followed by the distinguishing stage with alcohol-acetone and the background staining with Gram fuchsin. The influence of variations in the aforementioned staining was evaluated, considering the times of violet and fuchsin exposition as well as the use or not of the washings with water among steps. The results obtained had shown that differences in the procedures applied in each tested technique did not modify the result when compared with a standard design.

Keywords: Gram positive, Gram negative, bacteria, Gram staining.

Introdução

Em geral, são necessárias colorações biológicas para a visualização de bactérias de

modo adequado e demonstração dos detalhes finos das suas estruturas. O advento da coloração representa, em grande parte, o

fundamento dos principais avanços produzidos em microbiologia clínica e em outros campos da microscopia diagnóstica durante

os últimos 100 anos (1).

A maioria das colorações utilizadas em bacteriologia tem por finalidade o diagnóstico presuntivo rápido do processo infeccioso e também a prévia avaliação da qualidade da amostra (2).

A coloração de Gram é o método bacterioscópico mais importante e mais utilizado atualmente na bacteriologia e sua finalidade é a classificação de microrganismos com base em suas características tintoriais, tamanho, forma e arranjo celular (3, 4, 5).

As bactérias são classificadas basicamente em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas (6, 7, 8). No que diz respeito às características tintoriais, as bactérias Gram-positivas coram-se de roxo e as bactérias Gram-negativas coram-se de rosa (9, 10).

A detecção de microrganismos na amostra é de suma

importância, uma vez que pode indicar uma terapia antimicrobiana direcionada a um determinado grupo de patógenos e, também, a necessidade da realização de cultura com finalidade diagnóstica e/ou epidemiológica (11, 12).

A técnica de coloração de Gram geralmente 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. Nesse sentido, este trabalho se propôs a verificar se estas pequenas variações de tempo e lavagens a partir de protocolos específicos refletem em alguma alteração na interpretação dos resultados da coloração de Gram.

Materiais e Métodos

Inicialmente, foi realizada a documentação da técnica da coloração de Gram executada por diferentes laboratórios, bem como a aquisição de protocolos das bulas de diferentes kits de Gram e de protocolos da literatura vigente. Foram obtidos 13 protocolos de Gram dos quais 10 eram discrepantes. As técnicas que apresentaram diferenças entre si encontram-se resumidas na Tabela 1.

Posteriormente, foi feita a inoculação de cepas padronizadas (*American Type Culture Collection - ATCC*) de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 em Caldo Soja Trip-tona (TSB). Estas foram incubadas em estufa, 37°C, durante 24 horas. As cepas de referência foram utilizadas porque possuem um comportamento frente ao Gram que é

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

	Técnica 1	Técnica 2	Técnica 3	Técnica 4	Técnica 5	Técnica 6	Técnica 7	Técnica 8	Técnica 9	Técnica 10
Cristal Violeta	1 min	1 min	1 min	1 min	30 s	1 min				
Lavagem H ₂ O/lugol#	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim#	Sim#
Lugol	1 min									
Lavagem H ₂ O	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim
Álcool-acetona	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Lavagem H ₂ O	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.

Tabela 2. Controle de qualidade da coloração pelo método de Gram

Resultado	Cepa	Resultado esperado
Gram-negativo	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Bacilos cor rosa
Gram-positivo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Cocos cor roxo

Fonte: Oplustil et al., 2000 (2).

consenso e com isso elas isentam-se de dificuldades como se corarem fracamente e/ou não adquirirem cor na referida coloração.

Posteriormente, se confeccionaram esfregaços a partir destes caldos, utilizando-se pipetas automáticas de 10 µL a fim de dispensar uma quantidade aproximada de microrganismos em cada lâmina. Preparou-se um total de 40 lâminas (esfregaços) para serem testadas frente aos 10 protocolos obtidos. Para cada técnica foram confeccionadas duas lâminas do bacilo Gram-negativo (*E. coli*) e duas lâminas do coco Gram-positivo (*S. aureus*), fixadas através do calor.

A seguir, executou-se rigorosamente a técnica de coloração de Gram descrita por cada um dos protocolos envolvidos neste estudo. Foi empregado unicamente um mesmo kit de coloração para evitar variabilidades na concentração de corantes encontradas em outras marcas. O kit de coloração de Gram foi manipulado sempre pelo mesmo técnico a fim de reduzir ao máximo os interferentes.

Por fim, as lâminas foram analisadas microscopicamente em objetiva de imersão, procedendo-se sempre no mesmo

microscópio, marca Nikon Eclipse E200. Foram lidas cegamente duas vezes as duplicatas, num total de 80 leituras. O registro das lâminas lidas foi computado e posteriormente rastreado o protocolo pertencente àquela lâmina bem como o tipo de cepa correspondente.

As lâminas coradas pelas diferentes técnicas de Gram obtidas nesse estudo foram comparadas às lâminas controle: controle Gram positivo e Gram negativo (Tabela 2). Se o grupo testado mostrasse alguma diferença na coloração em relação ao grupo controle seria considerado resultado alterado.

No que concerne aos corantes, verificou-se o aspecto das soluções. Para minimizar a interferência devido à precipitação de algum dos reagentes realizou-se a filtração dos mesmos. Os corantes foram armazenados a temperatura ambiente, em local sem variações bruscas de temperatura, a fim de evitar precipitação, e ao abrigo da luz (12).

Resultados

Entre as lâminas coradas (n=40) segundo os protocolos obtidos, nenhuma apresentou alteração tintorial em relação às lâminas controle (Tabela 3).

Os tempos utilizados para Cristal Violeta foram de 30 s e 1 min, e em todas as técnicas aplicadas verificou-se a cor roxa para cepa de *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923, ou seja, todas as lâminas preparadas com estes cocos coraram-se adequadamente, sendo equivalentes à lâmina controle Gram positivo. Os tempos utilizados para a Fucsina de Gram foram de 20 s, 30 s e 1 min, e em todas as técnicas aplicadas empregando a cepa *Escherichia coli*, ATCC 25922, verificou-se que os bacilos coraram-se de rosa, de forma similar à lâmina controle Gram negativo.

O protocolo 2 ofereceu uma melhor visualização das características tintoriais das bactérias Gram negativas.

Tabela 3. Resultados tintoriais das técnicas de Gram

Resultado	Nº Lâminas
Alterado	0
Não alterado	40

Discussão

As variações nos tempos dos reagentes Cristal Violeta e Fucsina de Gram não alteraram as características tintoriais das cepas padrões, pois os cocos Gram positivos mostraram-se sempre corados em roxo, enquanto que os bacilos Gram negativos, em rosa.

Não foi possível avaliar o Lugol, pois o tempo empregado para este foi o mesmo em todas as técnicas (1 min).

A descoloração obedeceu sempre o mesmo procedimento, ou seja, a aplicação do álcool-acetona perdurou até o momento em que a cor violeta não fosse mais despreendida do esfregaço. Devido a isso, não foi possível relacionar sua influência nesse estudo.

O emprego ou não de lavagem com água entre as etapas da co-

loração de Gram não interferiu na interpretação dos resultados.

Assim, concluiu-se que não há comprometimento dos resultados ao executar a técnica de coloração de Gram aplicando modificações nos tempos dos corantes e lavagens com água apresentados nesse estudo. A reprodutibilidade dos resultados foi equivalente já que as variações testadas não afetaram o resultado final.

Uma contribuição importante desse estudo foi a demonstração de que a aplicação de determinado protocolo permitiu uma melhor visualização de bactérias Gram-negativas. A partir da comparação das técnicas de coloração executadas foi possível observar que na execução do protocolo 2 a cepa *Escherichia coli*, ATCC 25922, corou-se de rosa claro diferentemente dos outros que se coraram de rosa mais escuro.

Segundo Oplustil (2), a colora-

ção das bactérias Gram-negativas de rosa escuro (no uso da Fucsina) ou de vermelho (no uso da Safranina) pode ser confundida com violeta, pois na escala de cores do espectro eletromagnético o vermelho/rosa escuro está mais próximo do violeta do que do rosa claro. Nesse aspecto, a aplicabilidade prática do referido protocolo no dia-a-dia dos laboratórios pode aumentar a sensibilidade do teste na pesquisa deste grupo bacteriano em espécimes cuja presunção seja de Bacilo Gram-negativo. 

Correspondências para:

Simone Ulrich Picoli
simonepi@terra.com.br

AGRADECIMENTOS

À coordenação do Curso de Biomedicina e ao Laboratório de Biomedicina do Centro Universitário Feevale pelo apoio no desenvolvimento deste estudo.

Referências Bibliográficas

1. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn JRWC. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p.
2. Oplustil CP, Zoccoli CM, Tobouti NR, Sinto SI. *Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica*. São Paulo: Sarvier, 2000. 254 p.
3. Maza LM de la, Pezzlo MT, Baron EJ. *Atlas de Diagnóstico Microbiológico*. Porto Alegre: Artmed, 2001. 216 p.
4. Spicer WJ. *Clinical Bacteriology, Mycology and Parasitology*. London: Churchill Livingstone, 2000. 221 p.
5. Walters NJ, Estridge BH, Reynolds AP. *Laboratório Clínico: Técnicas Básicas*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 1998.
6. Oliveira SJ. *Microbiologia Veterinária*. 2.ed. Canoas: Ulbra, 2000. 237 p.
7. Silva CHPM. *Bacteriologia: um texto ilustrado*. Teresópolis (RJ): Eventos, 1999. 531 p.
8. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827 p.
9. Albin CA, Souza HAPHM, Pereira SM. *Manual Newprow de Microbiologia*. Curitiba: Microscience, 2002. 152 p.
10. Rossi F, Andreazzi DB. *CD Bacterioscopias: métodos de exame direto*. São Paulo: MD Millennium Diagnósticos.
11. Barbosa HR, Torres EB. *Microbiologia Básica*. São Paulo: Atheneu, 1998. 196 p.
12. Stinghen AEM, Albin CA, Souza HAPHM. *Coloração de Gram: Como fazer, Interpretar e Padronizar*. Curitiba: Microscience, 2002. 70 p.