
UTILIZAÇÃO PREVISTA

Os reagentes de coloração de Gram da Sigma-Aldrich foram concebidos para serem utilizados na delimitação de organismos gram-positivos e gram-negativos em películas e tecido. Os reagentes de coloração de Gram destinam-se à "utilização em diagnóstico in vitro."

A coloração de Gram é utilizada clinicamente para delimitar dois grupos distintos de microorganismos. Os microorganismos que retêm o corante primário (cristal violeta) são designados por gram-positivos. Os microorganismos que perdem o corante primário durante a fase de descoloração são designados por gram-negativos. Não se conhecem os mecanismos através dos quais os organismos gram-positivos retêm o corante primário, embora se tenha quase a certeza que a química e a estrutura das paredes celulares estejam relacionadas.

Foram descritas várias modificações ao método original de Gram¹. O procedimento da Sigma-Aldrich baseia-se na obra de Hucker e Conn², onde se utiliza uma solução de cristal violeta -oxalato de amónio que contribui para a diferenciação e é bastante estável.

REAGENTES

SOLUÇÃO DE CRISTAL VIOLETA, N.º de Catálogo HT90-1

Cristal violeta certificado, 2,3%, oxalato de amónio, 0,1% e álcool etílico a 20%, SD3A.

SOLUÇÃO DE IODO DE GRAM, N.º de Catálogo HT90-2

Iodo, 0,33% e iodeto de potássio, 0,66%.

SOLUÇÃO DESCOLORANTE, N.º de Catálogo HT90-3

Apenas necessária para as películas.

Álcool isopropílico, 75% e acetona, 25%

SOLUÇÃO DE SAFRANINA O, N.º de Catálogo HT90-4

Safranina certificada 0,6% em álcool etílico a 20%, SD3A.

SOLUÇÃO DE TARTRAZINA, N.º de Catálogo HT30-2-8

Apenas necessária para tecido.

Tartrazina, 0,25% e ácido acético, 0,25%.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE:

Armazenar à temperatura ambiente (18–26°C). O prazo de validade está indicado no rótulo do reagente. Utilizar uma vez e eliminar.

PREPARAÇÃO:

Todos os reagentes estão prontos a ser utilizados.

PRECAUÇÕES:

Deverão ser aplicadas as precauções normais relativamente ao manuseamento de reagentes laboratoriais. Eliminar os resíduos de acordo com todos os regulamentos locais, estaduais, regionais ou nacionais. Consultar a ficha de dados de segurança dos materiais para obter informações mais atualizadas sobre os riscos, perigos ou segurança.

As lâminas de controlo TISSUE - TROL de coloração de Gram consistem em tecido animal impregnado em parafina contendo bactérias gram-negativas e gram-positivas, devendo ser consideradas potencialmente infecciosas.

Declarações de riscos e segurança dos EUA

A solução de cristal violeta é COMBUSTÍVEL e IRRITANTE. Irritante para as vias respiratórias e pele. Risco de lesões oculares graves. Prova limitada de um efeito cancerígeno. Nociva para organismos aquáticos, pode causar efeitos negativos a longo prazo no ambiente aquático. Conservar longe de qualquer fonte de ignição – não fumar. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico. Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento de protecção para os olhos/face adequados. Evitar libertação no ambiente. Consultar instruções/fichas de dados de segurança especiais.

Solução de iodo de Gram Atenção: Ainda não foram realizados todos os testes para esta substância.

A solução descolorante é INFLAMÁVEL e IRRITANTE. Altamente inflamável. Irritante para as vias respiratórias e pele. Risco de lesões oculares graves. Conservar longe de qualquer fonte de ignição – não fumar. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico. Usar vestuário de protecção adequado. Manter o recipiente bem fechado em lugar bem ventilado.

A solução de safranina O é INFLAMÁVEL e NOCIVA. Nociva por inalação, em contacto com a pele e em caso de ingestão. Nociva: possibilidade de efeitos irreversíveis por inalação, em contacto com a pele e em caso de ingestão. Irritante para os olhos, vias respiratórias e pele. Conservar longe de qualquer fonte de ignição – não fumar. Usar vestuário de protecção e luvas adequadas. Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente um médico (mostrar-lhe o rótulo se possível).

O álcool reagente é INFLAMÁVEL e IRRITANTE. Irritante para os olhos, vias respiratórias e pele. Manter o recipiente adequadamente fechado. Conservar longe de qualquer fonte de ignição – não fumar. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico. Usar vestuário de protecção adequado. Órgãos alvo: Nervos e fígado.

O xilol é INFLAMÁVEL e NOCIVO. Possibilidade de risco de comprometimento da fertilidade. Pode ser prejudicial para o feto. Nocivo por inalação e em contacto com a pele. Irritante para as vias respiratórias e pele. Risco de lesões oculares graves. Conservar longe de qualquer fonte de ignição – não fumar. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata

e abundantemente com água e consultar um médico. Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento de protecção para os olhos/face adequados. Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente um médico (mostrar-lhe o rótulo se possível).

A acetona é INFLAMÁVEL e IRRITANTE. Irritante para os olhos. A exposição repetida pode causar secura ou gretas na pele. Os vapores podem causar sonolência e tonturas. Conservar o recipiente num local bem ventilado. Conservar longe de qualquer fonte de ignição – não fumar. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico. Órgãos alvo: Fígado e rins.

Declarações de riscos e segurança da UE (Atenção: Ainda não foram realizados todos os testes para estas substâncias)

A solução de cristal violeta é NOCIVA. Inflamável. Prova limitada de um efeito cancerígeno. Nociva para organismos aquáticos, pode causar efeitos negativos a longo prazo no ambiente aquático. Conservar longe de qualquer fonte de ignição – não fumar. Usar vestuário de protecção e luvas adequadas. Evitar libertação no ambiente. Consultar instruções/fichas de dados de segurança especiais.

Solução de iodo de Gram Atenção: Ainda não foram realizados todos os testes para esta substância.

A solução descolorante é INFLAMÁVEL e IRRITANTE. Altamente inflamável. Irritante para as vias respiratórias e pele. Risco de lesões oculares graves. Conservar longe de qualquer fonte de ignição – não fumar. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico. Usar vestuário de protecção adequado.

A solução de safranina O é INFLAMÁVEL. Conservar longe de qualquer fonte de ignição – não fumar.

O álcool reagente é ALTAMENTE INFLAMÁVEL e IRRITANTE. Altamente inflamável. Irritante para os olhos, vias respiratórias e pele. Manter o recipiente adequadamente fechado. Conservar longe de qualquer fonte de ignição – não fumar. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico. Usar vestuário de protecção adequado.

O xilol é NOCIVO. Inflamável. Nocivo por inalação e em contacto com a pele. Irritante para a pele. Evitar o contacto com os olhos.

A acetona é ALTAMENTE INFLAMÁVEL e IRRITANTE. Altamente inflamável. Irritante para os olhos. A exposição repetida pode causar secura ou gretas na pele. Os vapores podem causar sonolência e tonturas. Conservar o recipiente num local bem ventilado. Conservar longe de qualquer fonte de ignição – não fumar. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico.

PROCEDIMENTO

COLHEITA DE AMOSTRAS:

Recomenda-se que a colheita de amostras seja realizada de acordo com o documento M29-A2 da NCCLS. Nenhum método de teste conhecido poderá garantir totalmente que as amostras sanguíneas ou de tecido não irão transmitir infecções. Por essa razão, todos os derivados sanguíneos ou amostras de tecido deverão ser considerados potencialmente infecciosos.

Películas: Qualquer película bem preparada, fixada por calor é aceitável. A espessura da película irá influenciar o tempo necessário para a descoloração.

Tecido: Qualquer tecido bem fixado e embebido em parafina cortado em 5 microns.

MATERIAIS ESPECIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS:

Devem incluir-se lâminas de controlo positivo em cada execução

ÁLCOOL, ABSOLUTO

ACETONA, GRADUAÇÃO ACS

XILOL

Microscópio

NOTAS:

É necessário prestar especial atenção para evitar uma descoloração excessiva das lâminas com a solução descolorante. Mesmos os organismos gram-positivos ficarão incolores e aparecerão a vermelho se a solução descolorante permanecer na lâmina durante períodos de tempo excessivos.⁴

Os dados obtidos com este procedimento servem apenas para auxiliar o diagnóstico e deverão ser analisados em conjunto com outros testes de diagnóstico ou informações clínicas.

PROCEDIMENTO:

PROCEDIMENTO PARA AS PELÍCULAS:

1. Imergir a película em solução de cristal violeta, N.º de Catálogo HT90-1, durante **1 minuto**.
2. Lavar bem em água desionizada.
3. Imergir a película em solução de iodo de Gram, N.º de Catálogo HT90-2, durante **1 minuto**.
4. Lavar bem em água desionizada.
5. Imergir em solução descolorante, N.º de Catálogo HT90-3 durante, no máximo, **10 segundos** até deixar de sair cor.
6. Lavar bem em água desionizada.
7. Imergir a película em solução de safranina O, N.º de Catálogo HT90-4, durante **1 minuto**.
8. Lavar bem em água desionizada.
9. Deixar secar ao ar e examinar a película microscopicamente.

PROCEDIMENTO PARA TECIDO:²

1. Desparafinar as secções e hidratar em água desionizada.
2. Colocar as lâminas no suporte de coloração e cobri-las com solução de cristal violeta, N.º de Catálogo HT90-1, durante **1 minuto**.
3. Escoar a solução de cristal violeta e lavar bem em água desionizada.

4. Aplicar mordente em solução de iodo de Gram, N.º de Catálogo HT90-2, durante **5 minutos**.
5. Passar por água desionizada e secar as secções.
6. Proceder à diferenciação em álcool absoluto ou acetona.
7. Lavar em água desionizada.
8. Cobrir as lâminas com solução de safranina O, N.º de Catálogo HT90-4, durante **30–60 segundos**.
9. Passar por água desionizada e secar as secções.
10. Cobrir as secções com solução de tartrazina, N.º de Catálogo HT30-2 durante **5–10 segundos**.
11. Secar o corante em excesso.
12. Lavar em 2 banhos de álcool absoluto.
13. Limpar em xilol e montar.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Organismos gram-positivos – Púrpura

Organismos gram-negativos – Vermelhos

Se os resultados observados forem diferentes dos esperados, contactar a Assistência Técnica da Sigma-Aldrich para mais informações.

BIBLIOGRAFIA

1. Gram C: Ueber die isolierte färbung der schizomyceten in schnitt und trockenpräparaten. Fortschr Med 2:185, 1884
2. Hucker GJ, Conn HJ: Further studies on the methods of Gram staining. NY Agric Exp Stn Tech Bull No. 128, 1927
3. Histopathological Technic and Practical Histochemistry, 3rd ed., RD Lillie, Editor. McGraw-Hill, New York, 1965, pp 565-567
4. Theory and Practice of Histotechnology, 2nd Edition, Sheehan DC and Hrapchak BB, Battelle Press, Columbus (OH), 1980 p 234

A Sigma-Aldrich, Inc. garante que os seus produtos estão em conformidade com as informações contidas nesta e em outras publicações da Sigma-Aldrich. O comprador deverá determinar a adequação do(s) produto(s) ao fim particular a que se destinam. Poderão aplicar-se termos e condições adicionais. Consultar o verso da factura ou carta de porte para mais informações sobre os termos e condições de venda adicionais.

Procedimento N.º HT90
Revisão Anterior: 2003-09
Revisto: 2005-01



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham, TW20 9BD Reino Unido

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 EUA +1 314 771 5765

Assistência Técnica: chamada paga no destino +1 314 771 3122

ou endereço de correio electrónico: clintech@sial.com

Para encomendar: chamada paga no destino +1 314 771 5750

www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

P.O. 1120, 89552 Steinheim, Alemanha 49-7329-970