

Ministério da Saúde  
Secretaria de Políticas de Saúde  
Programa Nacional de DST e Aids

## **Técnica de Coloração de GRAM**

Brasília 2001

**MINISTÉRIO DA SAÚDE**

**José Serra**

Ministro de Estado da Saúde

**Cláudio Duarte**

Secretário de Políticas de Saúde

**Paulo Roberto Teixeira**

Coordenador Nacional de DST/AIDS-MS

**Miriam Franchini**

Coordenadora de Produção do Projeto TELELAB

**Autores:**

Cláudia Renata Fernandes Martins

José Antônio Pinto de Sá Ferreira

Luiz Fernando de Góes Siqueira

Luís Alberto Peregrino Ferreira

Maria Luísa 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, 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

*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 Programa Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde.*

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

Pedro Chequer





APRESENTAÇÃO .....	6
INTRODUÇÃO E MODIFICAÇÕES AO MÉTODO DE GRAM.....	9
PREPARAÇÃO DOS CORANTES E TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE GRAM.....	15
material necessário para preparar os corantes.....	17
preparação da violeta-de-metila.....	18
preparação do lugol e da safranina.....	19
armazenamentos dos corantes.....	20
técnica de coloração de Gram.....	20
PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO.....	23
CONTROLE DE QUALIDADE.....	27
RESULTADOS.....	31
FÓRMULAS.....	37
BIOSSEGURANÇA.....	41 - 63
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	



Agora você faz parte do Sistema de Educação a Distância para profissionais da saúde envolvidos com o diagnóstico laboratorial das Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids - DST/AIDS - TELELAB.

O TELELAB foi criado para levar até você cursos com informações indispensáveis para que seu trabalho seja realizado dentro dos padrões de qualidade estabelecidos pelo Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids, do Ministério da Saúde - PN-DST/AIDS-MS.

Assistindo ao programa de vídeo e estudando este manual você terá a oportunidade de verificar o que pode ser mudado no seu dia-a-dia e o que pode ser mantido.

Assim, você terá mais confiança nos resultados do seu trabalho e mais tranquilidade no que se refere à sua segurança pessoal.

**GUARDE ESTE MANUAL PARA CONSULTAR SEMPRE  
QUE NECESSÁRIO. ELE É SEU. USE-O!**

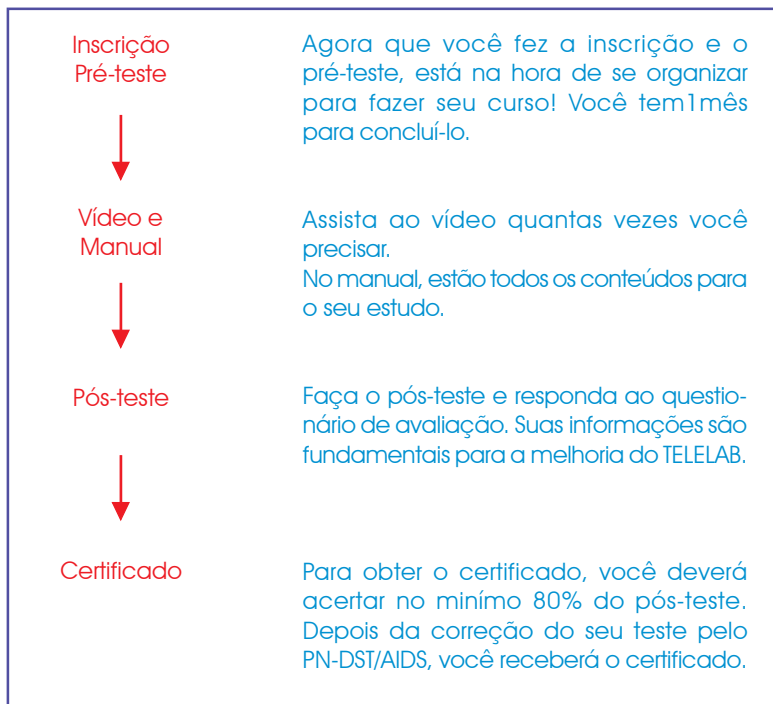
Para esclarecimentos de dúvidas e sempre que precisar,  
comunique-se diretamente com

**TELELAB - PN-DST/AIDS-MS**

Telefax gratuito: 0800 - 61 - 2436



## Funcionamento do seu curso TELELAB



Ao final deste curso você será capaz de:

- identificar os procedimentos e técnicas recomendados pelo PN-DST/AIDS - MS para preparação dos corantes e para a realização da coloração Gram; e
- executar a coloração de Gram, obedecendo aos critérios técnicos, critérios de controle de qualidade e cuidados de biossegurança recomendados.











## 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 habitado que assegure a qualidade do produto.

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

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 manual, você vai conhecer a técnica, os corantes e os procedimentos para a correta realização da coloração de Gram, recomendados pelo Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids 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). Este 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, na página seguinte:

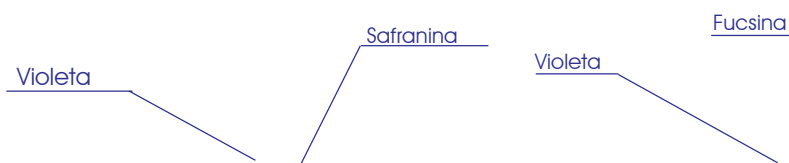


Figura1: representação, no espectro de cores, da distância entre a safranina e a fucsina, em relação à violeta.

*Quais as diferenças bioquímicas entre a safranina e a fucsina?*

SAFRANINA	FUCSINA
Corante Ácido	Corante Básico
Pertencente ao Grupo das Triarilpirazinas	Pertencente ao Grupo dos Triarilmetanos
Solúvel em Água	Insolúvel em Água











*O que é preciso para preparar os corantes de Gram?*

Para preparar os corantes, você vai precisar de:

- 1 béquer de 500 ml;
- 1 béquer 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;
- violeta-de-metila;
- álcool etílico (99,5° Gay-Lussac)
- álcool metílico (99,5° Gay-Lussac)
- axalato de amônia;
- iodeto de potássio;
- iodo metálico;
- safranina; e
- água destilada.



### *Como preparar a violeta-de-metila? (vide Fórmulas)*

#### A) Primeira solução:

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. Assegure-se de que sua balança foi certificada pelo INMETRO.

Transfira a violeta-de-metila para o béquer 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:

Pese 4 gramas de oxalato de amônia. No béquer 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 béquer. Você observará que o preparo desta 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.

#### C) Preparo final:

Junte as duas soluções (A e B) e utilize o restante da água destilada (200 ml) para recuperar os resíduos da violeta-de-metila no béquer. 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? (vide Fórmulas)*

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 preparar o lugol diluído para uso?*

Em um frasco conta-gotas escuro, junte 2 ml de lugol concentrado com 38 ml de água destilada.

### *Como preparar a safranina? (vide Fórmulas)*

Pese 2,5 gramas de safranina. Dissolva bem o pó em 500 ml de água destilada, misturando bem até conseguir a completa dissolução. Guarde em frasco escuro previamente lavado, seco e rotulado.

#### **Lembre-se**

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



### *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. Este 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 este processo promove a desidratação brusca dos constituintes celulares. Lembre-se de que a violeta-de-metila já contém fixador químico. Para fazer a coloração, siga os seguintes passos:



Figura 1: material para coloração de Gram.

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 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. Esta 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, retém 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.

**Gram +**

Figura 1. Esquema da parede das bactérias Gram-positivas

**Gram -**

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 um *Streptococcus pyogenes* ATCC - American Type Culture Collection - nº 19.615 e a Gram-negativa deverá ser a *Escherichia coli* ATCC nº 25.922.

#### Atenção

Para informação sobre a obtenção de cepas-padrão, comunique-se com o:

**TELELAB - PN- DST/AIDS- MS**

Telefax gratuito: 0800 61-2436

### 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. O método detalhado e os protocolos de estoque acompanharão as cepas fornecidas por meio do Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids do Ministério da Saúde.



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

Obedeça ao seguinte procedimento.

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.

O controle de qualidade deverá sempre ser realizado ao término da preparação dos corantes, mesmo que seja uma simples diluição, como no caso do lugol e todas as vezes que o procedimento de coloração for realizado.









Veja, nas figuras de 1 a 6, alguns resultados que podem ser obtidos:



Figura 1:  
Controle de qualidade da coloração de Gram. Cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos.



Figura 2:  
Leveduras apresentando apenas elementos leveduriformes.

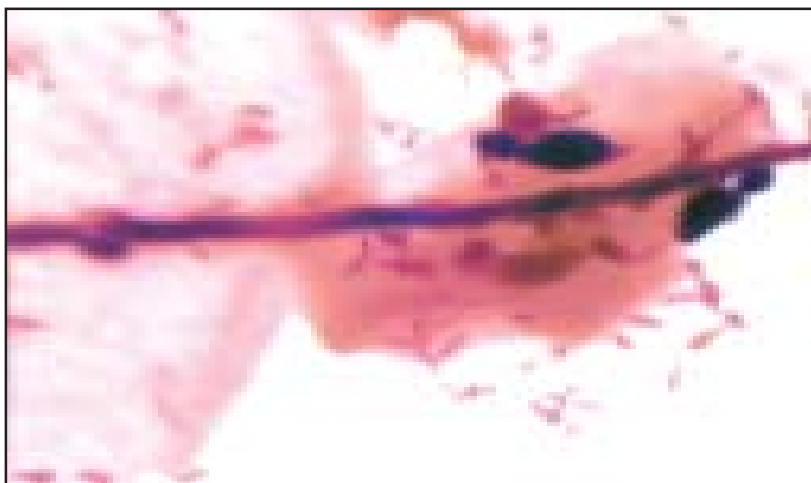


Figura 3:  
Leveduras apresentando filamentos micelianos e elementos leveduriformes.

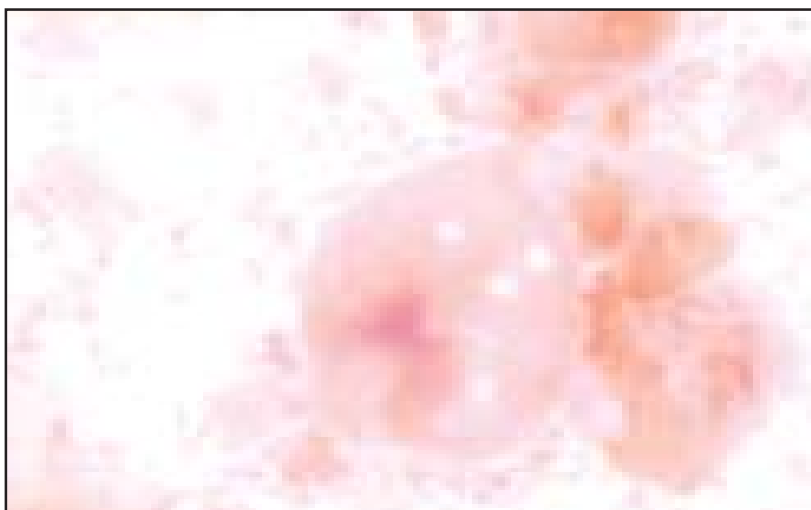


Figura 4:  
*Trichomonas vaginalis* corado pelo Gram.



Figura 5:  
Diplococos Gram-negativos intracelulares sugestivos de *Neisseria gonorrhoeae*.

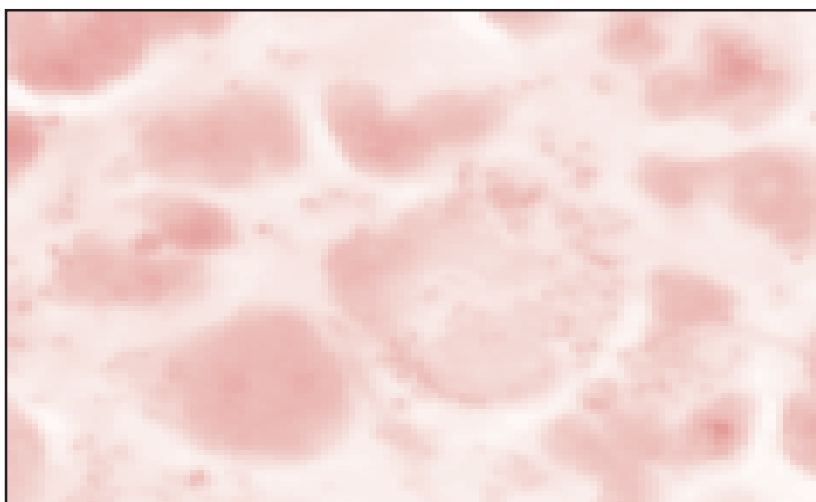


Figura 6:  
Bacilos Gram-negativos intracelulares sugestivos de *Haemophilus ducreyi*.









### Violeta-de-metila:

#### 1ª Solução:

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

#### 2ª Solução:

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

Misturar as duas soluções, deixar em repouso por um período de 24 horas, ao abrigo da luz, após o período de repouso, filtrar em papel de filtro comum e estocar em frasco escuro previamente lavado e seco.

### Lugol:

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

Misturar o iodeto de potássio na água, até a completa dissolução. Acrescentar o iodo metálico e continuar misturando até dissolver completamente. Diluir antes de usar, a uma concentração de 1/20, com água destilada.

### Safranina:

Safranina.....	2,5g
Água destilada.....	500,0ml

Misturar bem o pó na água até a completa dissolução.

#### Atenção:

Identifique cada frasco com o nome do corante e a data do preparo.











*Para cuidar de sua segurança, da segurança de seus colegas de trabalho e do meio ambiente, obedeça aos procedimentos básicos de biossegurança em laboratórios:*



Figura 1. Símbolo de risco biológico



*Todo cuidado é pouco na manipulação de materiais biológicos, tais como soro, sangue ou secreções, fluidos orgânicos, tecidos etc. Redobre suas precauções, pois esses materiais são potencialmente infectantes e muitas vezes estão contaminados com agentes etiológicos diferentes do que se está pesquisando, ou ainda desconhecidos. Nunca pipete com a boca e jamais cheire placas de cultura.*

A inativação do soro em banho-maria a 56°C por 30 minutos não elimina o potencial infectante da amostra.

Lembre-se de que, com a automação, aumentou muito o número de amostras processadas em laboratório e, conseqüentemente, aumentou também o risco de contaminação. Como você sabe, é difícil afirmar que um profissional se contaminou, de fato, em serviço. Isso faz com que as doenças infecto-contagiosas causadas por acidentes de trabalho não sejam devidamente notificadas; em conseqüência, as medidas de segurança envolvendo o biorrisco acabam não sendo implementadas.



*Use sempre Equipamento de Proteção Individual (EPI): avental ou jaleco longo de mangas compridas e punho retrátil, luvas descartáveis, óculos de proteção, pipetadores manuais ou automáticos e, quando for o caso, protetor facial.*

Os EPI são regulamentados pelo Ministério do Trabalho e seu uso visa a minimizar a exposição do técnico aos riscos e evitar possíveis acidentes nos laboratórios. Note que, às vezes, os profissionais de laboratório precisam de um tempo para se adaptar ao uso dos equipamentos na sua rotina. O importante é que você se adapte e incorpore a utilização dos EPI à sua prática profissional. O uso indevido dos EPI, ao invés de proteger, poderá ocasionar acidentes.

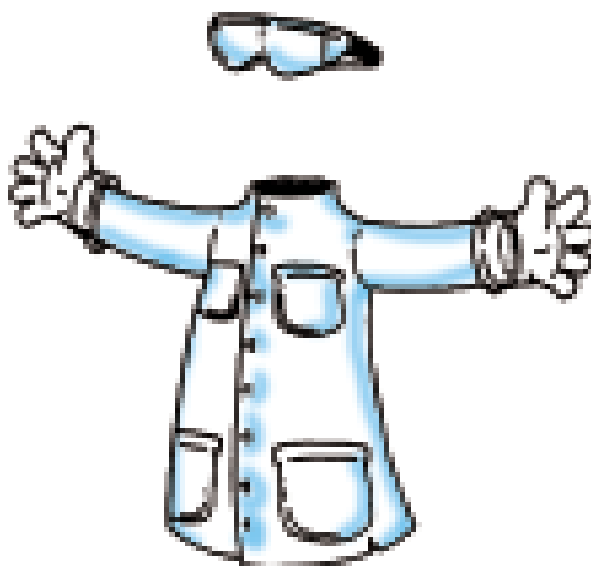


Figura 2. Ilustração dos principais Equipamentos de Proteção Individual (EPI)



*Evite a formação e dispersão de aerossóis.*

*Aerossóis são micropartículas sólidas e líquidas com dimensões aproximadas entre 0,1 e 50 micra que podem, caso contenham microorganismos, permanecer em suspensão e plenamente viáveis por várias hora.*

*A pipetagem, flambagem de alças, abertura de frascos e ampolas, manipulação de seringas, agulhas, lancetas, lâminas e outros assemelhados podem gerar e propagar aerossóis.*

Abertura de frascos, ampolas, tubos e garrafas de cultura requer cuidados especiais. Envolve a parte a ser aberta com um pedaço de gaze. Utilize um pedaço de gaze para cada material, prevenindo assim a contaminação cruzada. Descarte-a imediatamente em hipoclorito de sódio a 2 %.

Centrífugas, agitadores e maceradores, quando manipulados sem as precauções e abertos antes da total parada ou término da operação, igualmente podem contaminar o ambiente laboratorial.



*Jamais reencape agulhas. Esse procedimento é uma das principais causas da contaminação de profissionais de saúde por microorganismos, existentes no sangue e em outros fluidos orgânicos, como por exemplo, o vírus da hepatite B e o HIV. Após a coleta, você deve descartar esse material diretamente em recipiente de paredes rígidas com tampa, contendo hipoclorito de sódio a 2 % em volume superior a metade do recipiente.*

*Lembre-se: Cada mililitro de sangue contaminado com o vírus da hepatite B contém 100.000.000 de partículas virais, que podem permanecer viáveis por até uma semana. Basta uma dessas partículas para contaminar a pessoa.*

Figura 3. Ilustração do descarte de agulha em recipiente apropriado



*Reduza ao máximo o manuseio de resíduos, em especial os perfurocortantes. Descarte o rejeito perfurocortante diretamente em recipiente de paredes rígidas, contendo hipoclorito de sódio a 2 %. Deixe em imersão total no mínimo por 24 horas e, em seguida, faça a autoclavagem desse material.*

Esta é uma regra básica para diminuir os riscos de acidente nos laboratórios. É fundamental que os materiais perfurocortantes sejam autoclavados depois da imersão em hipoclorito de sódio a 2%. Só então esses materiais devem ser encaminhados ao lixo hospitalar. O acondicionamento dos resíduos de laboratório deve seguir a Norma Brasileira (NBR) 9190 da Associação Brasileira de Normas Técnicas- ABNT, que recomenda sacos brancos leitosos para os resíduos potencialmente infectantes e hospitalares e escuros para o lixo comum.

Os profissionais responsáveis pela limpeza e conservação devem ser bem orientados e usar equipamentos de proteção. Todos os recipientes para descarte devem estar identificados.

Lembre-se de que, pela legislação brasileira, quem gera o resíduo é o responsável pela sua eliminação e controle.

No caso dos materiais reutilizáveis, como vidraria e utensílios, deposite-os em recipiente contendo o desinfetante próprio, pelo tempo de contato recomendado e, em seguida, faça a autoclavagem. Depois, lave normalmente esses materiais e guarde-os para uso posterior.





*Identifique e sinalize os principais riscos presentes em seu laboratório. Produtos e áreas que oferecem risco devem ser marcados com os devidos símbolos internacionais em etiquetas auto-adesivas padrão.*

Veja, a seguir, os principais símbolos associados aos riscos em laboratórios.

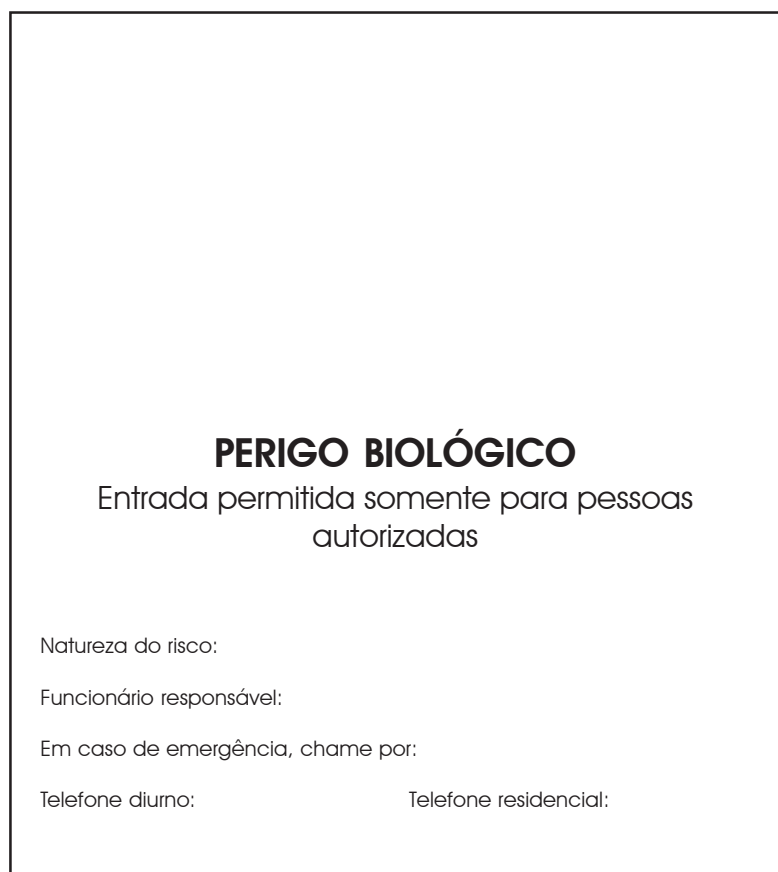


Figura 4. Símbolo de risco biológico para entrada de laboratório.



Figura 5. Principais símbolos internacionais associados aos riscos em laboratórios.



*Verifique sempre as condições de funcionamento dos equipamentos de Proteção Coletiva (EPC): extintores de incêndio, chuveiros de segurança, lava-olhos, pia para lavagem de mãos, caixa de areia e cabine de segurança biológica.*

Existem três tipos de cabines de segurança biológica disponíveis no mercado: as de classe I, classe II e classe III. São recomendadas para o uso em laboratórios clínicos as de classe II. Veja a figura , na página seguinte.

Procedimentos que devem ser observados na cabine de segurança biológica:

- ♦ Descontamine a superfície interior, antes e depois do uso, com gaze estéril embebida em desinfetante adequado;
- ♦ Ligue a cabine e a luz ultravioleta 20 minutos antes e deixe tudo ligado pelo mesmo tempo ao final de sua utilização;
- ♦ Use avental de mangas longas, luvas descartáveis e máscara;
- ♦ Não efetue movimentos rápidos ou bruscos dentro da cabine e evite operações que causem turbulência;
- ♦ Não use bico de Bunsen, pois pode acarretar danos ao filtro HEPA e causar desequilíbrio do fluxo de ar. Se necessário, use incinerador elétrico ou microqueimador automático; e
- ♦ Mantenha as grelhas anteriores e posteriores da cabine desobstruídas. A cabine não é um depósito. Evite guardar equipamentos ou quaisquer outros objetos no seu interior.



CLASSE I

CLASSE II

CLASSE III

Figura 6. Ilustração das cabines de segurança biológica - classes I, II e III.

As cabines de classe I e II são consideradas como barreira de proteção parcial e a de classe III é uma barreira de proteção total.



*Para descontaminação pessoal, de equipamentos e superfícies fixas, utilize desinfetantes eficientes e adequados. Use sempre produtos registrados no Ministério da Saúde.*

Não existe um desinfetante único que atenda a todas as necessidades. É fundamental conhecer os diversos agentes químicos e sua compatibilidade de uso para evitar custos excessivos e utilização inadequada.

Para a descontaminação de amostras biológicas na rotina dos laboratórios clínicos, recomendamos os compostos liberadores de cloro. O mais comumente utilizado é o hipoclorito de sódio a 2 %. Sua forma mais ativa é o ácido hipocloroso (HOCl), que é formado em soluções com pH entre 5 e 8. A eficácia do cloro decresce com o aumento do pH e vice-versa. Cabe lembrar que a atividade desse ácido é diminuída na presença de matéria orgânica, fato que deve ser considerado quando aplicado em superfícies contendo sangue e outros líquidos corpóreos. Os hipocloritos têm sua estabilidade dependente de fatores como concentração, temperatura, pH, luz, metais e prazo de validade.

Os hipocloritos são corrosivos para metais. Objetos de prata, alumínio e até mesmo de aço inoxidável são atingidos, quando imersos em soluções rotineiramente utilizadas em laboratório. O hipoclorito de sódio é tóxico e causa irritação na pele e olhos. Se ingerido, provoca corrosão das membranas e mucosas e sua inalação causa irritação severa no trato respiratório. Jamais misture os hipocloritos com outras substâncias químicas, tais como desinfetante, álcool, soluções germicidas etc.

Após o tratamento por 24 horas com hipoclorito de sódio a 2%, os materiais devem ser autoclavados. A autoclavagem é recomendada tendo em vista a possibilidade de o hipoclorito não atingir as partes do material a ser esterilizado. Caso isso não seja possível, a alternativa é o método de fervura por período não inferior a 30 minutos.



Observe, na tabela abaixo, a indicação de alguns agentes químicos e seu espectro de ação antimicrobiana.

Eficiência antimicrobiana de alguns agentes químicos desinfetantes frente a agentes microbianos.

	Bactérias	Virus lipofílicos	Virus hidrofílicos	Microbactérias	Fungos	Esporos bacterianos
Etanol	+	+	-	+	√	-
Formaldeído	+	+	+	+	+	+
Glutaraldeído	+	+	+	+	+	+
Comp. Cloro	+	+	+	+	+	+
Fenóis	+	+	-	+	+	-
Quaternários de amônia	+	+	+	-	+	-
Iodóforos	+	+	+	-	+	-

(+) Atividade

(-) Ausência de atividade

(V) Variável de acordo com o microorganismo



*Tenha muito cuidado com a manipulação e estocagem de substâncias químicas. Leia com atenção as informações contidas nos rótulos.*

A estocagem de matéria-prima deve ser feita em armários apropriados, bem ventilados, ao abrigo da luz solar e calor. É importante observar a incompatibilidade entre as diferentes substâncias.

Sempre que recomendado pelo fabricante, os agentes químicos devem ser manipulados em capelas de exaustão química devidamente instaladas. Atenção: Não confunda capela de exaustão química com cabine de segurança biológica.

Veja a seguir os riscos relacionados a cada categoria química:  
**Categoria química e riscos relacionados**

<b>Grupo químico</b>	<b>Risco</b>
Ácidos	Corrosão
Bases	Corrosão
Cianetos e Sulfetos	Envenenamento
Líquidos inflamáveis	Incêndio
Sólido Inflamável	Incêndio



*Seja sempre consciente da importância de suas ações na preservação da biossegurança em seu local de trabalho:*

- ♦ Lave as mãos antes e depois de qualquer procedimento laboratorial;
- ♦ Nunca pipete com a boca;
- ♦ Jamais cheire placas de cultura;
- ♦ Dentro do laboratório, não fume, não coma, não beba, não prepare refeições;
- ♦ Quando estiver usando luvas, não manuseie objetos de uso comum, como telefones, maçanetas de portas e janelas, jornais, revistas etc;
- ♦ Não guarde alimentos ou bebidas em geladeiras e congeladores para armazenagem de material biológico; e
- ♦ Vacine-se rotineiramente contra a hepatite B.

*Seguindo essas recomendações, você vai estar contribuindo para a diminuição de acidentes.*

*Se acontecer um acidente de trabalho em seu laboratório, notifique imediatamente a sua chefia.*





## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitas das atividades aqui descritas já fazem parte do seu cotidiano. Faça uma reflexão sobre o que acabou de ler e verifique o que pode ser mantido, modificado e incorporado a seu trabalho e ao seu laboratório para que a sua prática profissional se desenvolva de acordo com os procedimentos técnicos e cuidados de biossegurança recomendados pelo **Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids**, do Ministério da Saúde. As questões colocadas a seguir facilitarão essa reflexão.



### Condições gerais do laboratório

- ◆ As áreas de circulação estão desobstruídas?
- ◆ Qual a situação geral quanto ao aspecto de limpeza?
- ◆ Qual o estado de conservação e manutenção de pisos, escadas, paredes e tetos?
- ◆ O local de trabalho está adequado para atividades envolvendo o risco biológico?
- ◆ As bancadas e demais mobiliários do laboratório estão em condições de uso?
- ◆ Existem bancadas apropriadas para trabalhos com solventes e demais substâncias químicas corrosivas?
- ◆ Existe pia diferenciada para lavagem das mãos no laboratório?
- ◆ Existem mecanismos de contenção que previnam a entrada de insetos e roedores?
- ◆ Existem programas de manutenção preventiva de equipamentos?

### Estocagem

- ◆ Os produtos armazenados e a área de estocagem estão organizados com os devidos cuidados de segurança?
- ◆ Existe o cuidado de se estocar materiais e/ou substância incompatíveis separadamente?



### Local de higiene pessoal e de alimentação

- ♦ O local é mantido limpo e em condições de higiene?
- ♦ Existe água potável disponível?
- ♦ Existem sabão e toalha em condições de uso?
- ♦ Existe local para troca de roupa e guarda de objetos pessoais?
- ♦ Existe área para alimentação separada da área de laboratório?
- ♦ Existe adequada organização para coleta de lixo e demais rejeitos (não-infecciosos)?

### Refrigeração e Ventilação

- ♦ A temperatura de trabalho está entre 20 e 26°C?
- ♦ As janelas estão protegidas contra o excesso de luz solar?
- ♦ Existe ventilação adequada, especialmente nas salas com cabines de fluxo laminar?

### Iluminação

- ♦ A iluminação geral é adequada?
- ♦ Existe iluminação dirigida nas bancadas de trabalho?

### Serviços

- ♦ O laboratório tem suficiente abastecimento de água, energia elétrica e gás?
- ♦ Existe adequada manutenção de fusíveis, lâmpadas e cabos elétricos?
- ♦ A limpeza e higienização das caixas d`água são realizadas com periodicidade recomendada?



### Segurança geral

- ♦ O laboratório é devidamente fechado e seguro quando não está ocupado?
- ♦ As portas e janelas são mantidas devidamente fechadas?
- ♦ Os materiais tóxicos e equipamentos de risco são estocados em área segura?

### Prevenção de incêndio

- ♦ Existe sistema de alarme?
- ♦ As passagens pelas portas de emergência estão desobstruídas?
- ♦ O sistema de detecção de incêndio está em bom funcionamento e é regularmente testado?
- ♦ Existe sinalização de emergência?
- ♦ Existem extintores de incêndio para os diversos tipos de materiais e em quantidade suficiente?
- ♦ Os extintores estão dentro do prazo de validade?
- ♦ Existe sinal de "não fumar" na área de laboratório?
- ♦ A equipe está treinada em combate a incêndio?

### Estocagem de líquidos inflamáveis

- ♦ O local está separado do prédio principal?
- ♦ Existe ventilação suficiente para retirar vapores?
- ♦ O local está devidamente sinalizado?
- ♦ Existem lâmpadas seladas para proteção contra ignição nos vapores?
- ♦ Existe advertência de "não fumar"?



### Risco com eletricidade

- ◆ As instalações estão de acordo com os padrões estabelecidos pela ABNT?
- ◆ Existe fio de terra? Os equipamentos estão devidamente aterrados?
- ◆ Os equipamentos com potencial de risco de desligamento estão devidamente ligados a um circuito de emergência para os casos de queda ou interrupção de energia?
- ◆ Os cabos de conexão aos diversos equipamentos estão em perfeito estado de manutenção?
- ◆ Cada equipamento está ligado em uma tomada; evita-se o uso de benjamim?
- ◆ Todas as tomadas têm sua voltagem identificada?
- ◆ Você sabe onde fica o quadro-geral de força da sua unidade?

### Gases e líquidos comprimidos

- ◆ Os diversos tipos de gases estão devidamente identificados?
- ◆ Os cilindros possuem válvulas de segurança?
- ◆ Existe advertência de não-utilização de óleo nas válvulas?
- ◆ Os cilindros estão devidamente seguros contra quedas?
- ◆ Existe ventilação suficiente para evitar a formação de bolsões de gases e explosões?

### Proteção pessoal

- ◆ Existem em quantidade suficiente:
  - Lava-olhos?
  - Chuveiros de emergência?
  - Proteções contra radiações, incluindo os dozímetros?
  - Máscara contra partículas?
  - Luvas descartáveis?
  - Pipetadores manuais e/ou automáticos?
  - Óculos de proteção e outros?



### Segurança e saúde ocupacional

- ♦ Existe serviço de saúde ocupacional?
- ♦ Existe caixa com materiais para primeiros-socorros?
- ♦ Existem profissionais treinados em primeiros-socorros?
- ♦ Existem informações sobre como agir em caso de emergência, tais como: telefone de hospitais, pronto-socorros e bombeiros?
- ♦ Existe um programa de vacinação atualizado?
- ♦ Existe sinalização educativa para prevenir o risco?

### Equipamento de laboratório

- ♦ Os equipamentos estão validados e certificados quanto a seu uso?
- ♦ Existe procedimento de desinfecção de equipamentos antes de enviá-los à manutenção?
- ♦ As cabines de segurança biológica e química são regularmente testadas?
- ♦ As autoclaves estão validadas?
- ♦ As centrífugas, rotores e frascos têm seus tempos de utilização devidamente anotados?
- ♦ Vidrarias quebradas e trincadas são descartadas?
- ♦ Existem recipientes adequados para descartar frascos quebrados e material perfurocortante?
- ♦ As capelas de exaustão para manipulação estão devidamente sinalizadas?
- ♦ Suas balanças estão certificadas pelo Inmetro?
- ♦ Seus congeladores, geladeira, fornos, estufas ou equipamentos termo-reguláveis possuem sinais de controle e registro de temperatura?



### Material infeccioso, químico e radioativo

- ◆ Os materiais biológicos são recebidos em condições de segurança?
- ◆ Utilizam-se luvas descartáveis, quando se está manipulando material biológico?
- ◆ As bancadas são desinfetadas com a devida frequência?
- ◆ Existe protocolo de descarte de material contaminado?
- ◆ Os desinfetantes são apropriados e devidamente validados?
- ◆ As substâncias estão devidamente etiquetadas?
- ◆ Existe cartaz com os riscos e categorias toxicológicas das diversas substâncias?
- ◆ O estoque de radioisótopos é devidamente controlado?
- ◆ Existe procedimento de descarte de substâncias químicas e radioisótopos?
- ◆ Existem procedimentos que visam a evitar contato entre substâncias químicas incompatíveis?

Utilize este manual, junto com o vídeo, como fonte permanente de consulta. Mantenha este manual sempre ao seu alcance e faça dele um instrumento a mais de trabalho.

Você tem comunicação direta e gratuita com o:

**TELELAB - PN- DST/AIDS - MS**

**Telefax gratuito: 0800 - 61- 2436**







## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARON, E.J. & FINEGOLD, S.N., *Appendix B, Formúlas 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.
- 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.
- MANGELS, J.I., COX, M.E. & LINDENBERG, L.H. *Methanol fixation: an alternative to heat fixation of smears before staning.* Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2: 129, 1984.
- 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.
- FRANCHINI, MIRIAM, *Procedimentos Laboratoriais no Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis*, Brasília, 1983, Senado Federal-Centro Gráfico.
- TEIXEIRA, PEDRO & VALLE, SILVIO. *Biossegurança - Uma abordagem Multidisciplinar*. Rio de Janeiro , 1996, Editora FIOCRUZ.
- 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.
- GRISHT, N.R., 1995. *Manual de Segurança para Laboratório*. Eitora Santos , São Paulo, 133p.
- VALLE,S. & TEIXEIRA, P., 1996. *Biossegurança: Uma abordagem multidisciplinar*. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 362p.
- COSTA, M.F., 1996. *Segurança Química em Biotecnologia e Ambientes Hospitalares*. Editora Santos, São Paulo, 99p.
- VALLE,S. 1996, *Regulamentação da Biossegurança em Biotecnologia*. Edição Curso de Biossegurança da FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 80p.
- SIMONS,J. & SOTTY,P., 1991. *Prévention el Laboratorie de Recherche*, Editions INSERM/INRA/ Institute Pasteur, Paris , 248p.
- 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.
- FLEMING, D.O. at al., 1995. *Laboratory Safety: Principles and Practices*, 2<sup>nd</sup> Ed. American Dociety for Microbiology. Washington, DC, 406 p.

*Agradecimentos:* Às equipes da:  
Instituto de Saúde Pública do Distrito Federal - ISDF;  
Ao Laboratório ControlBio, São Paulo; e  
ao Hospital Universitário - Universidade  
Federal de Santa Catarina-UFSC.

Projeto Gráfico, Diagramação e Arte-final:

**Coordenação Nacional de DST e Aids**