

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0904690-9 A2**

(22) Data de Depósito: 26/11/2009
(43) Data da Publicação: 12/07/2011
(RPI 2114)



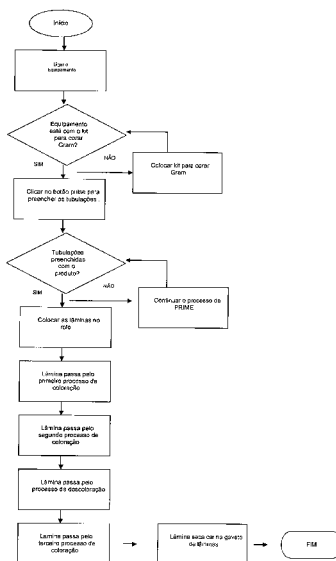
(51) *Int.Cl.:*
C12M 1/34 2006.01
G01N 1/30 2006.01

(54) Título: **PROCESSO E EQUIPAMENTO DE COLORAÇÃO UTILIZADO EM BACTERIOLOGIA**

(73) Titular(es): HEMOGRAM IND. COM. PRODS HOSPITALARES LTDA.

(72) Inventor(es): Eduardo Luiz Resende de Castro

(57) Resumo: PROCESSO E EQUIPAMENTO DE COLORAÇÃO UTILIZADO EM BACTERIOLOGIA. A presente invenção se refere a um processo de coloração, utilizado em bacteriologia, capaz de padronizar, facilitar e agilizar o procedimento de coloração de Oram, evitando variações em seu processo. Ainda mais, se refere a um equipamento capaz de realizar dito processo. O processo compreende distintas etapas de colocação, com diferentes reagentes e tempos de contato com as lâminas de amostra. O equipamento compreende bombas peristálticas para o fornecimento de cada reagente, sensores para indicar a presença da lâmina, switches para indicar o tempo em que as bombas ficaram em funcionamento, um motor junto com um conjunto de engrenagens externas para fazer com que a lâmina se locomova para os processos de coloração, ventoinha para o auxílio de secagem da lâmina após o processo, botões para acionamentos e ligação de circuito e as lâmpadas para indicações de máquina em uso e falta de reagente, bem como tanque de escoamento de reagente.





PI0904690-9

"PROCESSO E EQUIPAMENTO DE COLORAÇÃO UTILIZADO EM BACTERIOLOGIA"

A presente invenção se refere a um processo de coloração, utilizado em bacteriologia, capaz de padronizar, facilitar e agilizar o procedimento de coloração de Gram, evitando variações em seu processo.

Ainda mais, se refere a um equipamento capaz de realizar dito processo.

INTRODUÇÃO

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.

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.

As bactérias são classificadas basicamente em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas.

No que diz respeito às características tintoriais, as bactérias Gram-positivas coram-se em azul arroxeadado e as bactérias Gram-negativas coram-se em rosa.

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.

PROCESSO DE COLORAÇÃO

Para determinar o mecanismo envolvido no método de coloração, vários conceitos têm sido apresentados, tais como:

5 - As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas possuiriam diferentes afinidades com o corante primário cristal de violeta;

 - A existência de diferentes graus de permeabilidade na parede dos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos.

10 Tanto a espessura da parede celular, quanto às 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
15 celulares são cobertas pelo Cristal Violeta, todas se coram em roxo. Após este processo a lâmina recebe uma solução limpante para remover o excesso de Cristal Violeta. Com a adição do lugol, também chamado de mordente, ocorre a formação do completo iodo-pararosanilina. Esta reação tem a propriedade de fixar o corante
20 primário nas estruturas coradas. Algumas estruturas perdem a cor violeta rapidamente, quando se aplica um agente descorante, como álcool etílico (solução descolorante), enquanto outras perdem sua cor mais lentamente ou não perdem a cor. A fucsina/ safranina cora as estruturas que foram descoradas.

25 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.

DESCRIÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA

5 Os processos de coloração conhecidos da técnica atual apresentam alguns inconvenientes.

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.

Um problema da técnica atual se refere ao fato de que o mesmo é realizado manualmente, ficando susceptível a diversos fatores externos que podem afetar o processo.

No processo manual, não há precisão no tempo de contato do reagente com a lâmina de coloração.

Por ser realizado manualmente, o processo fica dependente da intervenção de um operador para executá-lo. Por isso, pode ainda ocorrer a aplicação em excesso de reagente para uma única amostra, acarretando em desperdício de reagente e alteração nos resultados.

No processo manual conhecido da técnica atual, existe o contato direto do operador e lâmina no meio do processo.

25 Ainda mais, por se tratar de um processo manual, existe a possibilidade de erro na coloração e as lâminas saem úmidas ao final do processo de coloração.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

O processo de coloração e o respectivo equipamento para realizá-lo têm como objetivo padronizar, facilitar e agilizar o procedimento de coloração de Gram evitando variações em seu processo, padronizando o procedimento da seguinte maneira:

- Quantidade de cada corante na amostra;
- Quantidade de solução limpante na amostra;
- Quantidade de descorante na amostra;
- 10 - Tempo de contato do corante na amostra;
- Tempo de Contato do descorante na amostra;
- Tempo de término de cada amostra.

Evita-se assim a variação da técnica existente no processo manual. Desta forma, temos lâminas com coloração homogêneas, melhorando a análise e diagnóstico das células analisadas.

O processo de coloração da presente invenção é realizado por um equipamento, através do qual se obtém um tempo padronizado no contato do reagente com a lâmina.

20 Outra vantagem da presente invenção se refere ao fato de que o processo depende apenas da alimentação das lâminas no equipamento de coloração por um operador, sendo que não há contato do mesmo durante a execução do processo.

Ainda mais, o equipamento efetua a aplicação necessária de reagente para cada amostra, evitando-se o desperdício de reagentes no processo.

25 Por se tratar de um processo automatizado, não há a possibilidade de erro na coloração, resultando em uma coloração

homogênea, sendo ainda que as lâminas saem secas ao final do processo de coloração.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

5 A figura 1 apresenta um diagrama de blocos indicando as etapas do processo de coloração da presente invenção, realizado a partir de um equipamento de coloração.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

10 A presente invenção se refere a um processo de coloração utilizado em bacteriologia, com o objetivo realizar a coloração de Gram, de forma automatizada, por meio de um equipamento para sua realização, sendo que dito processo compreende as seguintes etapas:

- alimentação do equipamento de coloração com o kit para coloração Gram;
- 15 - preenchimento das tubulações do equipamento com os reagentes;
- introdução das lâminas a serem coradas no rolo do equipamento de coloração;
- primeira coloração das lâminas;
- 20 - remoção do excesso de reagente;
- segunda coloração das lâminas;
- descoloração das lâminas;
- terceira coloração das lâminas;
- deposição das lâminas já secas na gaveta de
- 25 lâminas.

O processo de coloração é realizado por meio de um equipamento, composto por bombas peristálticas para o fornecimento de cada reagente, sensores para indicar a presença da

lâmina, switches para indicar o tempo em que as bombas ficaram em funcionamento, um motor junto com um conjunto de engrenagens externas para fazer com que a lâmina se locomova para os processos de coloração, ventoinha para o auxílio de secagem da lâmina após o processo, botões para acionamentos e ligação de circuito e as lâmpadas para indicações de máquina em uso e falta de reagente.

São cinco reagentes que compõem o Kit de coloração, utilizado pelo aparelho:

1. Cristal Violeta: Corante primário cora o citoplasma de púrpura, independentemente do tipo de célula.

2. Solução de Limpeza: Possui apenas a finalidade de remoção de excesso de Cristal Violeta.

3. Solução de Iodo-Lugol : Mordente - aumenta a afinidade entre o violeta de cristal e a célula e forma com o corante um complexo insolúvel dentro da célula.

4. Solução Descolorante - Álcool etílico, acetona ou ambos: solvente lipídico.

5. Solução de Safranina / Solução de Fucsina: Corante contrastante - safranina ou fucsina básica: cora o citoplasma de vermelho das células gram-negativas que forma descoradas.

Ao ligar o equipamento, as lâminas começam a se movimentar, através de eixos de rosca sem fim que estão acoplados em um conjunto de engrenagens, sendo que em uma delas esta fixado um motor AC de 1RPM. Com a lâmina em movimento ela chega ao primeiro ponto onde ativa o primeiro sensor de presença, a bomba do primeiro reagente, Cristal Violeta, preenche a lâmina com o reagente. Após aproximadamente 1 minuto com o reagente em contato

com a lâmina esse reagente escorre por meio de um rasgo na mesa, e segue para a Solução Limpeza, que atua de forma contínua durante a passagem da lâmina, apenas removendo o excesso do corante primário e escorrendo por um outro rasgo na mesa, a lâmina segue então para
5 o segundo reagente, o Lugol, que também preenche a lâmina por aproximadamente 1 minuto assim que o terceiro sensor de presença é ativado. O reagente é novamente escorrido por meio de um rasgo na mesa. Ao ativar o quarto sensor de presença, a bomba começa a injetar Álcool Absoluto, de uma forma contínua, atuando durante
10 quase toda a passagem da lâmina.

Por último vem a Safranina, ou Fucsina, que também preenche a lâmina inteira só que o contato com a lâmina é menor, de apenas 30 segundos, ao ativar o quinto sensor de presença, que após isso também escorre através de um rebaixo na
15 mesa.

Cada um dos sensores acima da mesa funciona em série com o sensor de tempo de atuação na engrenagem, de modo que apenas quando ambos os sensores estão acionados, a placa de controle da bomba envia o sinal para que a bomba seja acionada.

20 O equipamento possui uma lâmpada de liga/desliga que é ligada em paralelo com o botão para ligar a máquina, de modo que acionando-se o botão e ligando-se a máquina a luz deverá acender sempre. Já a lâmpada de nível é ligada em série com o sensor da bandeja, que é ativado ou não através da mola de tração,
25 de modo que quanto menos reagente há, mais leve a bandeja fica, acionando o sensor e ligando a lâmpada.

A alimentação das tubulações com reagentes é acionada por meio de uma tecla Pulso, sendo que a tensão irá

direto para as placas e fará com que as bombas funcionem todas ao mesmo tempo, preenchendo a mangueira com os reagentes e deixando a máquina pronta para atuar.

5 O equipamento conta com um sistema de transporte deslizante, com espirais de locomoção. São duas espirais paralelas com rotações opostas que locomovem a lâmina no decorrer da mesa, além de controlar o tempo de locomoção da lâmina.

A mesa abrange todo o espaço entre as espirais. Possui guias elevadas para facilitar o movimento da lâmina durante
10 o processo de coloração. Feita com liga de aço inoxidável e com design moldado para controle de entrada e saída dos reagentes.

O tanque de escoamento está localizado na parte frontal do aparelho, logo abaixo da mesa, tendo a função de armazenar o excedente de reagente utilizado no processo.

15 O equipamento possui cinco bombas, uma para cada reagente. Cada bomba possui uma placa própria para controle de funções.

Os sensores de presença das lâminas são ativados pela própria lâmina quando esta chega a determinado ponto após o
20 tempo de espera programado. Eles atuam, liberando o reagente, sendo que cada bomba possui um sensor que fica localizado na parte superior da mesa.

O equipamento compreende ainda um depósito de lâminas que as armazena após o processo de coloração.

REIVINDICAÇÕES

1) "PROCESSO DE COLORAÇÃO UTILIZADO EM BACTERIOLOGIA", caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- alimentação do equipamento de coloração com o
5 kit para coloração Gram;
- preenchimento das tubulações do equipamento com os reagentes;
- introdução das lâminas a serem coradas no rolo do equipamento de coloração;
- 10 - primeira coloração das lâminas;
- remoção do excesso de reagente;
- segunda coloração das lâminas;
- descoloração das lâminas;
- terceira coloração das lâminas;
- 15 - deposição das lâminas já secas na gaveta de lâminas.

2) "PROCESSO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o reagente utilizado na primeira etapa de coloração das lâminas é o Cristal Violeta.

20 3) "PROCESSO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o reagente utilizado na remoção de excesso de reagente das lâminas é a Solução Limpante.

4) "PROCESSO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o reagente utilizado na segunda
25 etapa de coloração das lâminas é a solução Iodo-Lugol.

5) "PROCESSO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a solução descolorante utilizada na descoloração das lâminas é o álcool etílico, acetona ou ambos.

6) **"PROCESSO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o reagente utilizado na terceira etapa de coloração das lâminas é a solução de safranina ou fucsina.

5 7) **"PROCESSO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o reagente da primeira coloração das lâminas fica em contato com as mesmas por 1 minuto.

8) **"PROCESSO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o reagente da segunda coloração das
10 lâminas fica em contato com as mesmas por 1 minuto.

9) **"PROCESSO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o reagente da terceira coloração das lâminas fica em contato com as mesmas por 30 segundos.

10) **"PROCESSO"**, de acordo com a reivindicação 1,
15 caracterizado pelo fato de que a secagem das lâminas se dá por meio de um sistema de secagem composto por ventoinha, que direciona o fluxo de ar, funcionando de modo contínuo.

11) **"EQUIPAMENTO PARA A COLORAÇÃO DE LÂMINAS"**, caracterizado por compreender bombas peristálticas para o
20 fornecimento de cada reagente, sensores para indicar a presença da lâmina, switches para indicar o tempo em que as bombas ficaram em funcionamento, um motor junto com um conjunto de engrenagens externas para fazer com que a lâmina se locomova para os processos de coloração, ventoinha para o auxílio de secagem da lâmina após o
25 processo, botões para acionamentos e ligação de circuito e as lâmpadas para indicações de máquina em uso e falta de reagente, bem como tanque de escoamento de reagente.

12) **"EQUIPAMENTO"**, de acordo com a reivindicação

11, caracterizado pelo fato de que as lâminas se movimentam através de eixos de rosca sem fim que estão acoplados em um conjunto de engrenagens.

5 13) "EQUIPAMENTO", de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que cada um dos sensores acima da mesa funciona em série com o sensor de tempo de atuação na engrenagem, de modo que apenas quando ambos os sensores estão acionados, a placa de controle da bomba envia o sinal para que a
10 bomba seja acionada.

 14) "EQUIPAMENTO", de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a alimentação das tubulações com reagentes é acionada por meio de uma tecla Pulso, sendo que a tensão vai direto para as placas e faz com que as bombas funcionem
15 todas ao mesmo tempo, preenchendo a mangueira com os reagentes e deixando a máquina pronta para atuar.

 15) "EQUIPAMENTO", de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de compreender um sistema de transporte deslizante, com espirais de locomoção, com duas
20 espirais paralelas com rotações opostas que locomovem a lâmina no decorrer da mesa, além de controlar o tempo de locomoção da lâmina.

 16) "EQUIPAMENTO", de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a mesa abrange todo o espaço
25 entre as espirais, possuindo guias elevadas para facilitar o movimento da lâmina durante o processo de coloração.

 17) "EQUIPAMENTO", de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que dita mesa é feita com liga de

aço inoxidável e com design moldado para controle de entrada e saída dos reagentes.

18) "EQUIPAMENTO", de acordo com a reivindicação 5 11, caracterizado pelo fato de que o tanque de escoamento está localizado na parte frontal do aparelho, logo abaixo da mesa, armazenando o excedente de reagente utilizado no processo.

19) "EQUIPAMENTO", de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de compreender cinco bombas, uma para 10 cada reagente, sendo que cada bomba possui uma placa própria para controle de funções.

20) "EQUIPAMENTO", de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que os sensores de presença das lâminas são ativados pela própria lâmina quando esta chega a 15 determinado ponto após o tempo de espera programado.

21) "EQUIPAMENTO", de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de compreender um depósito de lâminas que as armazena após o processo de coloração.

22) "EQUIPAMENTO", de acordo com a reivindicação 20 11, caracterizado pelo fato de compreender uma lâmpada de liga/desliga que é ligada em paralelo com o botão para ligar a máquina.

23) "EQUIPAMENTO", de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de compreender uma lâmpada de nível 25 ligada em série com o sensor da bandeja, que é ativado ou não através da mola de tração, de modo que quanto menos reagente há, mais leve a bandeja fica, acionando o sensor e ligando a lâmpada.

1 / 1

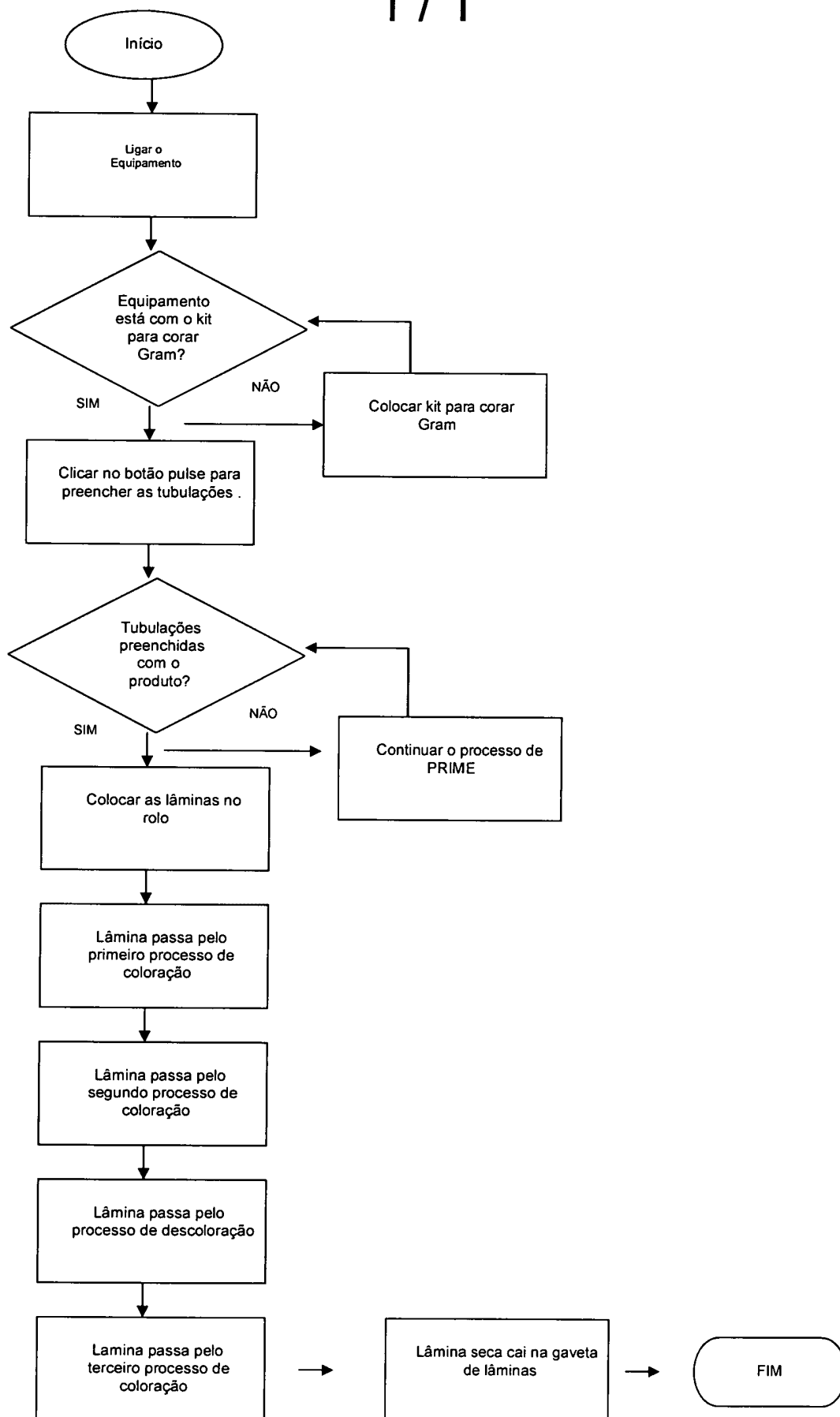


FIG. 1

P10904690-9

RESUMO

"PROCESSO E EQUIPAMENTO DE COLORAÇÃO UTILIZADO EM BACTERIOLOGIA"

5 A presente invenção se refere a um processo de coloração, utilizado em bacteriologia, capaz de padronizar, facilitar e agilizar o procedimento de coloração de Gram, evitando variações em seu processo.

Ainda mais, se refere a um equipamento capaz de realizar dito processo.

10 O processo compreende distintas etapas de colocação, com diferentes reagentes e tempos de contato com as lâminas de amostra.

O equipamento compreende bombas peristálticas para o fornecimento de cada reagente, sensores para indicar a
15 presença da lâmina, switches para indicar o tempo em que as bombas ficaram em funcionamento, um motor junto com um conjunto de engrenagens externas para fazer com que a lâmina se locomova para os processos de coloração, ventoinha para o auxílio de secagem da lâmina após o processo, botões para acionamentos e ligação de
20 circuito e as lâmpadas para indicações de máquina em uso e falta de reagente, bem como tanque de escoamento de reagente.