

MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA COMO PROCEDIMENTO PARA A REALIZAÇÃO DO EXAME BACILOSCÓPICO EM HANSENÍASE

Maria Conceição MARTINS *
 Moisés PALACI *
 Suely Yoko Mizuka UEKI *
 Lucilaine FERRAZOLI*
 Daisy Nakamura SATO *
 Tamiko ICHIKAWA **
 Holmes Campanelli COSTA ***

RESUMO - *Visando comparar os métodos de microscópio fluorescente e de Ziehl-Neelsen para evidenciação de bacilos resistentes em material proveniente de derme de pacientes hansenianos, foram examinados 355 esfregaços. Obteve-se 98,81% de concordância ajustada (KAPPA) entre os métodos. Verificou-se no entanto aproximadamente 55% de resultados discordantes em relação ao índice baciloscpico (Ridley), decorrentes de contagens de bacilos por campo mais elevadas pelo método fluorescente.*

Palavras chave: *Mycobacterium leprae. Microscopia. Colorações.*

1. INTRODUÇÃO

O aperfeiçoamento e implementação de técnicas e procedimentos para o exame baciloscpico em hanseníase tem sido freqüente objeto de estudo^{3,10,12}, por ser este até o momento o principal recurso bacteriológico utilizado para o diagnóstico e o controle da evolução desta doença.

A coloração através de diferentes técnicas constitui um fator fundamental neste processo, pois dela decorre uma observação microscópica eficaz. Entre os métodos utilizados para identificação de bacilos álcool ácidos resistentes (BAAR) em diferentes tipos de esfregaços, destacam-se fundamentalmente o

de Ziehl-Neelsen¹ e o método fluorescente proposto por P.K.H. Hagemann, em 1937^{6,12}.

Desde a introdução dos métodos originais, inúmeras modificações e estudos comparativos têm sido realizados, alguns destes inclusive, mostrando um alto grau de concordância entre os dois métodos ou revelando um maior percentual de sensibilidade no método fluorescente^{5,9,12,13}.

Apesar das constatações favoráveis ao método fluorescente, verifica-se na prática uma baixa aceitação e difusão desta técnica para a realização do exame baciloscpico em hanseníase.

Baseados nestas considerações nos propusemos a:

(I) realizar um estudo comparativo entre os

(**) Pesquisador Científico do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo (SP).

(**) Bióloga do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo (SP).

(***) Biólogo do Instituto Lauro de Souza Uma - Bauru (SP) e Professor Adjunto da Disciplina de Microbiologia da Universidade do Sagrado Coração, Bauru (SP).

métodos de microscopia de fluorescência e de Ziehl-Neelsen para a detecção de BAAR em esfregaços de lesões de cotovelo e de lóbulos auriculares de pacientes hansenianos;

(ii) verificar a viabilidade do emprego rotineiro do método de microscopia de fluorescência para o exame baciloscópico em hanseníase.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem

Durante um período de um ano, foram analisados 355 esfregaços de lesões de cotovelo e de lóbulos auriculares de pacientes hansenianos matriculados em Centros de Saúde do SUDS-2 (Sic) Paulo, SP).

2.2. Colorações e microscopia

Todos os esfregaços mencionados acima foram inicialmente fixados e corados pelo método de O.W. Richards, & D.K. Miller,¹⁴(fluorescência) e a seguir observados em um microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss) com ocular de 10x e objetiva de 40x. Quando detectada a presença de BAAR, passou-se a uma objetiva de imersão de 100x e efetuou-se a contagem bacilar segundo o índice baciloscópico proposto por D.S. Ridley,¹⁵ em 1964. Após a realização da leitura em microscopia de fluorescência, todos os esfregaços foram recorados pela técnica de Ziehl-Neelsen¹ e reexaminados em um microscópio ótico comum (Carl Zeiss Jena) com ocular de 10x e objetiva de imersão de 100x. Para os esfregaços positivos adotou-se o mesmo critério de contagem de bacilos, utilizado para o método fluorescente.

2.3. Preparo de esfregaços a partir de uma suspensão de *M. leprae* padronizada

Biópsias de pele de pacientes virchovianos, colhidas em diversos Centros de Saúde do Estado de São Paulo, foram autoclavadas a 120°C por 15 minutos e

processadas de acordo com o método de preparação de Mitsudina preconizado pela OMS¹⁷. A suspensão final de *M. leprae* obtida deste processo foi diluída 10 vezes em uma solução tampão fosfato (pH 7,2) e homogeneizada durante 30 segundos em um agitador de tubos (Phoenix, modelo AT 56A). Imediatamente após a homogeneização adicionou-se igual volume de formol-leite¹⁶ suspensão e distribuiu-se em triplicate 10 microlitros desta diluição em círculos de 1 cm de diâmetro pré-confeccionados em laminas para microscopia. Após a secagem e fixação, as lâminas com numeração de 1 a 4 foram coradas pelo método de Ziehl-Neelsen e as com numeração de 5 a 8 foram coradas inicialmente pelo método de fluorescência e após a observação microscópica, recoradas pelo método de Ziehl-Neelsen.

A análise dos resultados obtidos com a técnica de microscopia de fluorescência teve por base o confronto com o método de Ziehl-Neelsen.

Os resultados dos exames realizados através de ambos os métodos estão expressos na Figure 1. Foram observados 352 resultados coincidentes. Efetuado cálculos estatísticos para determinação dos valores de concordância entre os métodos obteve-se: 99,72% de concordância bruta, 76,33% de concordância esperada e 98,81% de concordância ajustada (Kappa).

Verificou-se que o total de resultados positivos obtidos através dos exames de 355 esfregaços foi de 13,56% pelo método de Ziehl-Neelsen e de 13,84% pelo método fluorescente.

A discordância dos resultados em relação ao índice baciloscópico dos esfregaços é observada nitidamente acima da linha diagonal, refletindo contagens mais elevadas pelo método fluorescente. Com a finalidade de analisar esta discordância efetuou-se um estudo pelo qual se determinou independentemente através de três indivíduos, o número BAAR/campo em esfregaços preparados a partir de uma suspensão de mitsudina. Os resultados deste estudo encontram-se na Tabela 1.

FIGURA 1 - Correlação entre a microscopia ótica comum (Ziehl-Neelsen) e a microscopia de fluorescência (Richards & Miller). Resultados dos exames de 355 esfregaços.

	Microscopia de fluorescência					TOTAL
	-	+	++	++	+++	
-	305	2	0	0	0	307
+	1	0	0	2	0	3
++	0	0	3	3	2	8
+++	0	0	0	5	20	25
	0	0	0	0	12	12
TOTAL	306	2	3	10	34	355

TABELA 1 - Número de BAAR/campo em esfregaços preparados a partir de uma suspensão de *Mycobacterium leprae* examinados por diferentes indivíduos.

Observador	Lâmina	Ziehl-Neelsen	Lâmina	Auramina	Au+ZNb
A	1	13,8+/-9,8	5	22,6+/-17,2	14,2+/-8,9
	2	12,5+/-8,9	6	17,4+/-17,2	11,4+/-8,6
	3	12,6+/-7,1	7	18,2+/-14,0	12,2+/-8,3
	4	11,5+/-7,3	8	17,5+/-13,0	10,6+/-8,4
Média		12,6+/-8,2		18,9+1-15,3	12,1+1-8,5
B	1	12,9+/-7,2	5	16,0+/-7,0	13,4+/-7,8
	2	10,0+/-6,5	6	14,6+/-9,2	9,3+/-5,7
	3	12,8+/-6,6	7	17,6+/-8,8	12,7+/-8,5
	4	12,4+/-6,	8	17,0+/-11,4	12,9+/-6,5
Media		12,0+/-6,7		16,3+/-9,1	12,0+1-7,1
C	1	6,8+/-4,9	5	14,4+/-9,2	6,8+/-4,8
	2	7,3+/-5,0	8	14,2+/-12,6	7,0+/-5,2
	3	8,8+/-6,2	7	16,6+/-15,0	8,7+/-7,6
	4	9,3+/-6,8	8	15,2+/-15,2	6,5+/-5,7
Media		13,0+/-5,7		15,1+1-13,0	7,2+/-5,8

MÉDIA DO Nº BACIOS POR CAMPO a

a- Média de 60 campos observados e desvio padrão.

b- Esfregaços corados pelo método de Richards & Miller (Auramina) e recorados pelo método de Ziehl-Neelsen.

4. DISCUSSÃO

O diagnóstico bacteriológico da hanseníase depende fundamentalmente do exame microscópico direto. Em decorrência deste fato vários estudos têm sido realizados comparando os principais métodos de coloração utilizados para esta finalidade. Os resultados destes estudos, no entanto, têm se mostrado controversos. J.L. de Faria, (1974)⁴, V. Hardas, & V. Lele, (1981)⁸ avaliando método fluorescente para detecção de *M. leprae* em esfregaços de linfa e biópsia, constataram menores índices de positividade do que nos métodos de Fite-Faraco e Ziehl-Neelsen. Por outro lado M.A.G. Prendes et al. (1953)¹³, H.J. Jariwala, & S.S. Kelkar, (1979)⁹ encontraram diferenças de positividade em favor do método fluorescente. Outros autores, como A. Dubois, & L. Swertz, (1951)⁵ e R.E. Mansfield, (1970)¹² em trabalhos efetuados com o mesmo propósito, concluíram que não houve vantagem do método fluorescente sobre o da carbofucsina

Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram-se compatíveis aos encontrados por estes últimos autores, tendo em vista que o valor de concordância ajustada entre os métodos avaliados foi substancialmente elevado (98,81%). Embora tenha ocorrido um alto grau de concordância entre os métodos, verificou-se aproximadamente 55% de resultados discordantes em relação ao índice baciloscópio. As contagens de bacilo/campo mais elevadas pelo método fluorescente resultou em quase sua totalidade no aumento de uma cruz na escala.

Devemos mencionar, no entanto, que nos trabalhos realizados por R.E. Mansfield, (1970)¹², H.J. Jariwala, & S.S. Kelkar, (1979)⁹ não foram

registradas tais diferenças. Em contraposição, N.M. Collins, et al. (1980)² encontraram em média 6,0 a 7,4 bacilos a mais por campo através do método fluorescente.

Estas diferenças de contagem a favor do método fluorescente também foram observadas em nosso estudo quando se determinou através de três indivíduos, o número de BAAR/campo nos esfregaços preparados a partir da suspensão de Mitsudina (Tabela 1). Convém ressaltar, contudo, que a variabilidade do número de bacilos por campo, refletidos através dos altos valores de desvio padrão ocorreu possivelmente em função da não utilização do método de desagregação de BAAR proposto por J.H. Hanks, et al.⁷.

Além dos aspectos suscitados é oportuno salientar-se que os resultados dos exames dos esfregaços corados pelo método de Ziehl Neelsen e daqueles corados pelo método fluorescente e recordados pelo método de Ziehl- Neelsen (Tabela 1) foram semelhantes, indicando portanto que o processo de recoloração não Interferiu na característica álcool-ácido resistente dos bacilos e conseqüentemente na quantificação dos mesmos.

Parece-nos pertinente à luz destes resultados considerar-se a microscopia de fluorescência como um procedimento eficiente para a realização do exame baciloscópio em hanseníase, principalmente em laboratórios que já possuam aparelhagem adequada e que apresentem uma demanda significativa deste tipo de exame. Deve-se assinalar, no entanto que a introdução deste método nas atividades de rotina deve ocorrer inicialmente com a triagem de esfregaços e posteriormente, quando se estiver familiarizado com a técnica, a execução do índice baciloscópio.

ABSTRACT - In order to compare the fluorescent microscopy and Ziehl-Neelsen methods for detection of resistant acid fast bacilli in dermal fluid and pulp from the tiny wound of leprosy patients, three hundred fifty five smears were examined. Both methods have given 98,71% of adjusted concordance (Kappa). However in relation to bacilloscopic index (Ridley) we found 55% of discordant results. This could be explained by the fact that in fluorescent method the count of bacilli per camp has been higher.

Key words: *Mycobacterium leprae. Microscopy. Stains.*

Agradecimentos

Ao Prof. Rinaldo Mero e ao Pesquisador Científico José Leopoldo Ferreira Antunes, pela colaboração e sugestões recebidas durante a redação deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- 1 BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. DMsão Nacional de Dermatologia Sanitária. **Normas técnicas e procedimentos para o exame baciloscópico em hanseníase**. Brasília, 1989, 32p.
- 2 COLLINS, N.M.; MORRISON, N.E.; DHOPLÉ, A.M.; WATSON, S.R. Microscopic counts carried out on **Mycobacterium leprae** and **Mycobacterium tuberculosis** suspensions. A comparison of three staining procedures. *Int. J. Lepr.*, 48(4):402-407, 1980.
- 3 COSTA, H.C.; SOUZA, LCD.; MARTINI, J.P.; FERRAZOLI, L MARTINS, M.O.; OPROMOLLA, D.V.A.; DEL GIUDICE, A. C. Estudo comparativo das variantes do método de coloração de micobactérias. *Hansen. Int.*, 13(2):37- 41, 1988.
- 4 FARIA, J.L. Fluorescent staining for **Mycobacterium leprae** in tissue sections comparison with Fite- Faraco Procedure. *Int. J. Lepr.*, 42:52-54, 1974.
- 5 DUBOIS, A. & SWERTZ, L L'emploi du microscope a fluorescence dans le diagnostic de la lepre. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, 30:1473, 1950 (also abstracted In *Int. J. Lepr.*, 19:260, 1951).
- 6 HAGEMANN, P.K.H. Fluorescence of Mycobacteria with auramine. *Muchen Med. Wschr.*, 85:1066, 1938.
- 7 HANKS, J.H.; CHATTERGEE, M.B.; LECHAT, M.F. A guide to the counting of mycobacteria in clinical and experimental materials. *Int. J. Lepr.*, 32(2): 156- 167, 1964.
- 8 HARDAS, V. & LELE, V. Evaluation of fluorescent microscopy for detection of **Mycobacterium leprae**. *Lepr. India*, 53(2):273-277, 1981.
- 9 JARIWALA, H.J. & KELKAR, S.S. Fluorescence microscopy for detection of M. leprae in tissue sections. *Int. J. Lepr.*, 47(1):33-36, 1979.
- 10 KUPER, S.W.A. & MAY, JR. Detection of acid-fast organisms in tissue sections by fluorescence microscopy. *J. Path. Beet.*, 79:59-68, 1960.
- 11 LEIKER, D.L & McDOUGALL, A.C. Technical guide for smear examination for leprosy by direct microscopy. *Infolep-Royal Tropical institute*. Amsterdam, p.35.
- 12 MANSFIELD, R.E. An improved method for the fluorochrome staining of mycobacteria in tissues and smears. *Am. J. Olin. Pathol.*, 53:394-406, 1970.
- 13 PRENDES, M.A.G.; CARBONELE, A.F.; PARDO-CASTELLO, V.; HERNANDES, A.C. La microscopia fluorescente em le prolog la . Valoracion del metodo fluorescente frente al Ziehl-Neelsen en el diagnóstico bacteriológico. *Int. J. Lepr.*, 21(1):35- 40, 1953.
- 14 RICHARDS, O.W. & MILLER, D.K. An efficient method for the identification of tuberculosis bacteria with a simple fluorescent microscope. *Am. J. Win. Pathol. Tech. Suppl.*, 5:1-8, 1941.
- 15 RIDLEY, D.S. *Bacterial indices*. In:

MARTINS, M.C. et al. Microscopia de fluorescência como procedimento para a realização do exame baciloscópico em hanseníase.

COCHRANE, R.G. & DAVEY, T. ***Leprosy in theory and practice***, 2nd ed. Bristol: John Wright & Sons, 1964, 659p.

16 SHEPARD, C.C. & McRAE, D.H. A method for counting acid fast bacteria. ***Int. J. Lepr.***, **36**:78-82, 1968.

17 UNDP/WORLD BANK/WHO. Special programme for Research and Training in Tropical Diseases. IMMLEP. Recommended safety requirements for the preparation of lepromin: a WHO memorandum. ***Bulletin of World Health Organization***, **57**(6):921- 923, 1979.