

MODIFICAÇÃO DA COLORAÇÃO DE FUNDO DA TÉCNICA DE ZIEHL-NEELSEN NA IDENTIFICAÇÃO DO MYCOBACTERIUM LEPRAE

Luiz Fernando de Góes SIQUEIRA *

Regina Gomes de ALMEIDA **

Walter BELDA ***

RESUMO — A identificação do *M. leprae*, em material obtido de lesões cutâneas de pacientes suspeitos ou doentes de hanseníase, é fundamental nas atividades de controle da endemia. E feita com coloração da linfa proveniente das lesões, espalhada em lâmina, pelo método de Ziehl-Neelsen. Dada a escassez de muco nas preparações rotineiras a técnica teve de ser modificada com alcalinização prévia do azul de metileno. Tal modificação, embora melhorando as possibilidades de uso do Ziehl-Neelsen, apresenta inconvenientes de ordem prática, como os decorrentes da metacromasia e precipitação do corante. A coloração de fundo se apresenta, então, arroxeadada, dificultando a visualização do bacilo corado em vermelho. A precipitação reduz o tempo de uso do corante. Os autores, após demonstrar tais inconvenientes, propõem alteração técnica denominada de "alcalinização concomitante" que, basicamente, consiste em adicionar poucas gotas de solução de hidróxido de sódio, a 1:500, sobre a coloração clássica, no momento de sua execução. Obtém-se assim: a) maior tempo de uso do corante; b) ausência de precipitado em lâmina; c) evidenciação mais fácil do substrato; d) contraste maior entre o substrato e a coloração do bacilo. Recomendam o uso da variante técnica proposta na rotina, principalmente nas preparações com material escasso ou de controle terapêutico.

Palavras chave: *Mycobacterium leprae*. Coloração de fundo.

1 INTRODUÇÃO

Nos programas de controle da endemia hanseníase a pesquisa do *Mycobacterium leprae* é peça fundamental. Sua detecção é feita, de rotina, corando-se a linfa obtida das lesões ou o esfregaço do muco nasal pela técnica de Ziehl-Neelsen.

Fundamentalmente, nos Serviços Públicos de Saúde, observa-se que a coloração vem sendo feita seja pela técnica original, seja em variante com alcalinização prévia da solução contraste de azul de metileno.

Embora aceitáveis, estes procedimentos apresentam dificuldades maiores

(*) Farmacêutico-Bioquímico do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP e Estagiário da Divisão de Hansenologia e Dermatologia Sanitária do Instituto de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde de S. Paulo.

(**) Biologista da Divisão de Hansenologia e Dermatologia Sanitária do Instituto de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde de S. Paulo.

(***) Professor Assistente Doutor responsável pela Área de Dermatologia Sanitária do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP e Diretor do Instituto de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde de S. Paulo.

quando o material, por razões várias, se apresenta mais escasso ou mais espesso ou quando o número de bacilos é reduzido.

A técnica original usa como corante de fundo uma solução aquosa de azul de metileno. No material com substrato mucoso, como por exemplo no escarro, a assimilação do corante é boa, permitindo assim contraste de fundo que auxilia a visualização com facilidade da micobactéria, corada em vermelho^{1,3,5,12,13}. No entanto, quando o substrato é a linfa, liquor, etc ..., há dificuldade de assimilação e nas preparações se torna mais difícil a visualização do esfregaço.

Na rotina, com numerosas lâminas a serem lidas, isto implica perda de sensibilidade e, assim, possibilidade maior de falsos resultados negativos.

No intuito de evitar tais inconvenientes, a prática diária introduziu a alcalinização prévia do azul de metileno, medida aceita por inúmeros autores^{1,4,7,11} tal procedimento obtém-se uma identificação melhor do esfregaço, por maior assimilação deste pelo contracorante alcalinizado.

Na rotina laboratorial, incorpora-se à preparação do azul de metileno uma solução de hidróxido de sódio ou de potássio. Assim preparado, o corante é distribuído às bancas de trabalho, para utilização no tempo, maior ou menor, segundo o movimento do laboratório.

Ora, em 1891, Unna preconizava a utilização do azul de metileno de policromo, obtido por ele a partir da alcalinização de uma solução de azul de metileno. Mallory⁸ a este preparado denomina "solução de azul de metileno alcalina velha". Na realidade uma oxidação lenta se processa, tendo como produto final combinação de azul de metileno, metil violeta e vermelho de metileno. Este processo pode ser acelerado pelo aquecimento. Modernamente⁶

se admite que o processo de policromasia ocorra livremente em soluções alcalinas sem adição de oxidante, acelerado pelo aumento do pH e por aquecimento. Assim, o azul de metileno de policromo seria a mistura de azul de metileno, na forma original, com azure A e azure B.

Com o uso, na rotina, de azul de metileno previamente alcalinizado, na realidade estamos utilizando o azul de policromo, que proporciona coloração de fundo arroxeadas, dificultando a identificação do bacilo.

Além disso, este corante azul alcalinizado se precipita com facilidade, mostrando em lâmina grumos que reduzem substancialmente a nitidez da preparação^{2,9,10}.

Tendo em vista esta dificuldade, procuramos introduzir modificação técnica na coloração que permitisse identificação mais fácil do esfregaço e um contraste maior com relação aos bacilos, principalmente para as preparações paucibacilares.

2 METODOLOGIA

2.1 Preparou-se solução aquosa de azul de metileno a 1%, repartida em quatro balões contendo:

Balão "A" — solução original, exposta à luz;

Balão "B" — solução original, mantida ao abrigo da luz;

Balão "C" — solução original adicionada de 1 ml de solução de hidróxido de sódio a 1%, para cada 100 ml, exposta à luz;

Balão "D" — solução idêntica à do "C", mantida ao abrigo da luz.

Os balões foram examinados semanalmente, durante quatro semanas, para observação de possíveis alterações.

2.2 Foram preparados esfregaços em três lâminas para baciloscopia,

obtidos do mesmo local (lobo da orelha) de um paciente portador de hanseníase de forma "V" e virgem de tratamento. Os esfregaços foram corados por três técnicas diferentes que descrevemos a seguir.

As fases de coloração primária e descoloração foram comuns às três técnicas utilizadas. Modificou-se apenas a etapa de coloração de fundo do método de Ziehl-Neelsen:

a) Cobrir a lâmina, previamente fixada com carbofucsina de Ziehl. Aquecer lentamente até emissão de vapores. Repetir esta operação por mais duas vezes, aguardando a cessação dos vapores entre um aquecimento e outro, tomando a precaução de não deixar que o líquido entre em ebulição ;

b) lavar em fino fio de água corrente incidindo fora do esfregaço;

c) imergir rapidamente em solução de álcool-ácido clorídrico a 3%; lavar em seguida em fino fio de água corrente incidindo fora do esfregaço, repetir esta etapa, caso necessário, uma ou duas vezes, até que não haja mais remoção do corante.

2.2.1 Técnica I: Cobrir a lâmina com uma solução aquosa de azul de metileno a 1% durante 1 minuto. Lavar em fino fio de água corrente incidindo fora do esfregaço. Secar à temperatura ambiente.

2.2.2 Técnica II: Cobrir a lâmina com solução aquosa de azul de metileno a 1% adicionada, previamente, de 1 ml de solução de hidróxido de sódio a 1%, para cada 100 ml, durante 1 minuto. Lavar em fino fio de água corrente incidindo fora do esfregaço. Secar à temperatura ambiente.

2.2.3 Técnica III: Cobrir a lâmina com uma solução aquosa de azul de metileno a 1%, adicionada de quatro a seis gotas de uma solução de hidróxido de sódio a 1:500 (200 mg de hi-

dróxido de sódio em 100 ml de água destilada), no momento da coloração. A mistura deve ser homogeneizada, provocando deslocamentos de ar sobre o líquido utilizando-se de uma pipeta vazia (ou outro objeto similar). Deixar agir por 1 minuto. Lavar em fino fio de água corrente incidindo fora do esfregaço. Secar à temperatura ambiente.

3 RESULTADOS

Após a primeira semana de repouso, foi observada a presença de precipitado, tanto disperso como aderido à parede, nos balões contendo o alcalinizante (balões "C" e "D") . Fato que não foi alterado pela exposição ou não à luz natural, mantendo-se mesmo após um mês. Nos balões sem alcalinizante (balões "A" e "B") não, foi notada a presença de qualquer precipitado nos mesmos períodos de observação (Figura 1).

Quanto à observação macroscópica das três lâminas coradas segundo as técnicas I, II e III, descritas anteriormente, verificou-se que na lâmina onde foi utilizado o azul de metileno não alcalinizado não houve boa assimilação do corante, dificultando a visualização do esfregaço. Na lâmina corada pelo azul de metileno previamente alcalinizado observou-se boa assimilação, porém com uma distorção na tonalidade do corante, que se apresentou arroxeadado. Na terceira lâmina, corada pelo método de alcalinização concomitante, proposto por nós, observou-se boa assimilação do corante sem alteração de sua tonalidade (Figura 2).

Microscopicamente observamos na primeira lâmina, sem alcalinizante, ausência de coloração do substrato, o que dificultou a focalização do esfregaço, apesar de apresentar bacilos bem corados (Figura 3).

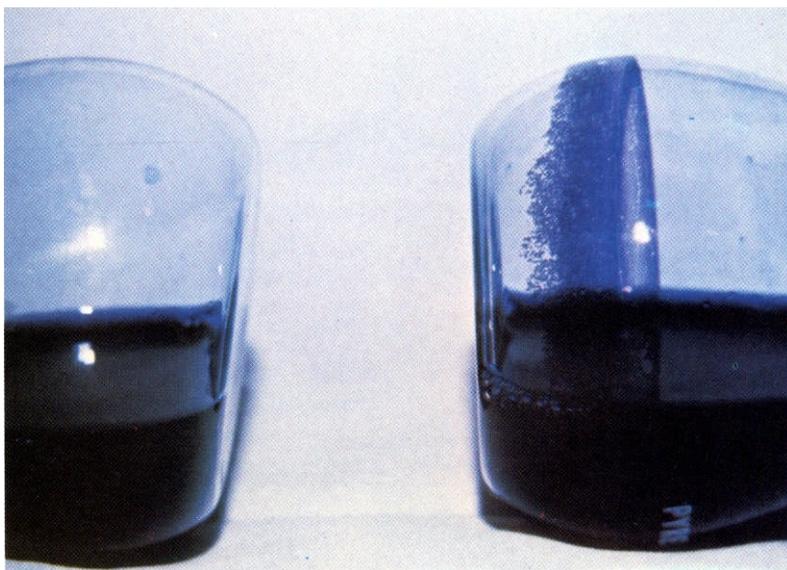


FIGURA 1 — O balão que apresenta precipitado aderido à parede, contém a solução de azul-de-metileno, aquosa, a 1 %, adicionada de solução de hidróxido de sódio. O outro balão, que não apresenta precipitado, contém a solução sem o alcalinizante.

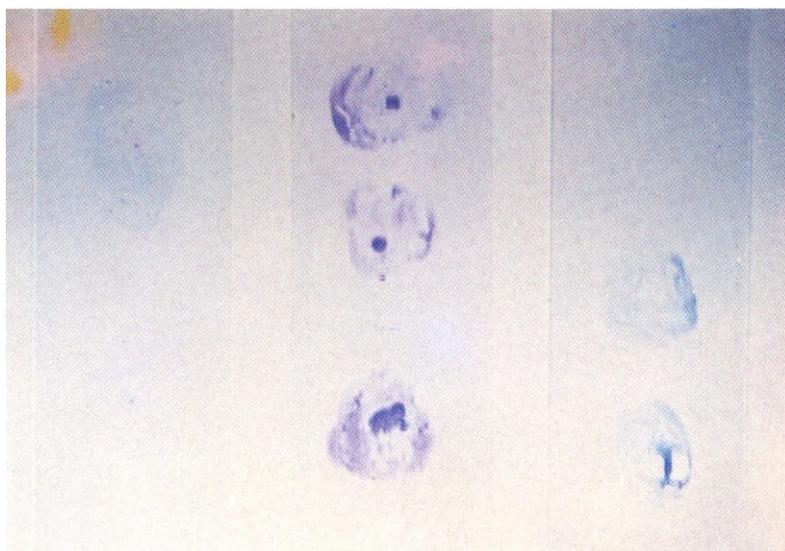


FIGURA 2 — Três lâminas de material obtido de um mesmo paciente de hanseníase, forma "V". Coradas pelo Ziehl-Neelsen segundo as técnicas: I, a lâmina com esfregaço francamente corado; II, a lâmina com esfregaço corado em tom arroxeado e III, a lâmina com esfregaço corado em azul.



FIGURA 3 — Material de lesão obtido de paciente de hanseníase, forma "V", mostrando *M. leprae* corado pelo Ziehl-Neelsen, com o fundo corado segundo a Técnica I. 100x.

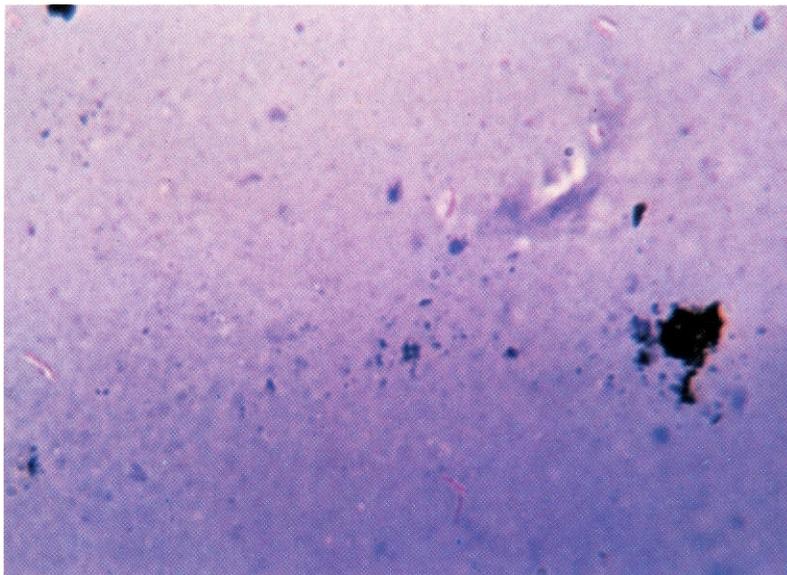


FIGURA 4 — Material de lesão obtido de paciente de hanseníase, forma "V", mostrando *M. leprae* corado pelo Ziehl-Neelsen, com o fundo corado segundo a Técnica II. 100x.

Na lâmina corada pelo azul de metileno previamente alcalinizado, observamos que a tonalidade arroxeada comprometia a visualização dos bacilos corados pela fucsina, por proximidade dos tons no espectro de cor, além de apresentar precipitado em toda a lâmina, reduzindo a nitidez da preparação (Figura 4).

Na proposta de coloração de lâminas pelo método de alcalinização concomitante, observamos que o substrato apresentou-se uniformemente corado em azul, o que possibilitou um real contraste frente à distância existente entre a cor do fundo e a cor do bacilo, não havendo formação de nenhum precipitado (Figura 5).

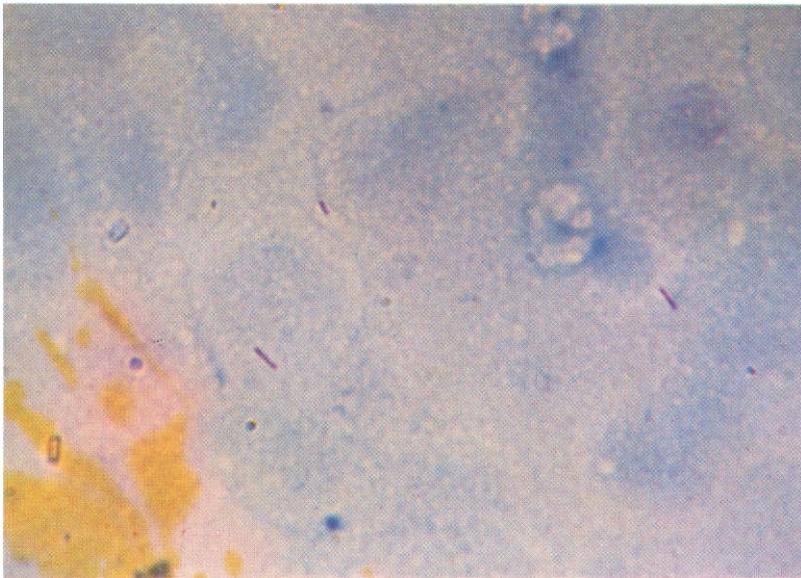


FIGURA 5 — Material de lesão obtido de paciente de hanseníase, forma "V", mostrando *M. leprae* corado pelo Ziehl-Neelsen, com o fundo corado segundo a Técnica III. 100x.

4 CONCLUSÕES

O método de Ziehl-Neelsen teve sua destinação inicial à identificação do bacilo de Koch. O componente mucóide do substrato, geralmente escarro, facilitava a absorção do corante.

Seu uso para o *M. leprae*, em material geralmente desprovido ou pobre de muco, impôs a alcalinização. No entanto, quando realizada previamente se segue dos inconvenientes da meta-

cromasia e da precipitação, não só no frasco como na própria lâmina. A coloração de fundo tornando-se arroxeada, oferece pouco contraste com o bacilo e assim torna difícil sua visualização.

Desse modo, a nosso ver a alteração técnica sugerida, alcalinização concomitante, apresenta as vantagens seguintes :

- a) maior tempo de uso do corante ;
- b) ausência de precipitado em lâmina ;

- c) evidênciação mais fácil do substrato corado suavemente em azul;
 d) maior contraste do substrato com a coloração vermelha do bacilo.

Estes elementos permitem uma identificação mais fácil e segura do bacilo de Hansen, principalmente nas preparações pobres de material ou de controle de tratamento.

ABSTRACT — Authors analyse the counterstain with methylene blue solution in the usual Ziehl-Neelsen method. Considerations are made on the characteristics of the dye substance. A technique alteration is proposed: a "concomitant alkalization" of the classic aqueous methylene blue solution, by adding some drops of sodium hydroxide solution, 1:500, on the slide at the moment of the staining. By this technique it was observed: a) a larger validity period of the solution; b) an absence of precipitate in the slides; c) an easier visualization of the substrate; d) a larger contrast among the substrate and the bacilli.

Key words: **Mycobacterium leprae**. Counterstain.

REFERÊNCIAS

- 1 BIER, O. Técnicas bacteriológicas. Método de Ziehl-Neelsen. In: — *Bacteriologia e imunologia*. 18.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1977. cap. 48, p.840.
- 2 BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária. Coloração de Ziehl-Neelsen. In: — *Manual de bacteriologia da tuberculose*. Rio de Janeiro, 1980. p.25-26.
- 3 COLOUR index. 3.ed. Yorkshire, Society of Dyers and Colourists, 1971.
- 4 FRANKEL, S.; REITMAN, S.; SONNENWIRTH, A.C., ed. *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*. 7.ed. Saint Louis, Mosby, 1970. v.1.
- 5 KANTOR, I.N. El examen microscópico. La coloración del extendido por el método de Ziehl-Neelsen. In: — *Bacteriologia de la tuberculose humana y animal*. Buenos Aires, OPS, 1979. p.22. (Série de monografias científicas y técnicas. Centro Panamericano de Zoonosis, 11).
- 6 LILLIE, R.D. Acid fast stains. In: — *Histopathological technic and practical histochemistry*. 3.ed. London, McGraw Hill, 1965. p.575-581.
- 7 LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. Métodos de laboratório aplicados à clínica. 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1969. 653p.
- 8 MALLORY, F.B. & WRIGHT, J.H. *Pathological technique; a practical manual for workers in pathological histology and bacteriology*. Philadelphia, W.B. Saunders, 1921. 555p.
- 9 PHARMACOPEIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo, Editora Nacional, 1929.
- 10 THE PHARMACOPEIA of the United States of America. 12. ed. Easton, PA., Mack Printing, 1942. 880p.
- 11 TREO, M.M. Bacteriologia. Técnicas de coloração de bacilos álcool-ácido-resistentes. In: — BRASIL. Serviço Nacional de Leprosia. *Noções de leprologia*. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, 1969. p.15-17.
- 12 VESTAL, A.L. Microscopy and staining. Ziehl-Neelsen (Z-N). In: — *Procedures for the isolation and identification of mycobacteria*. Washington, D.C., U.S. Department of Health, Education, and Welfare, 1969. sect.2, p.27-32. (Public Health Service Publication n.1995).
- 13 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy: examination for the bacillus in nodules and skin lesions. In: — *Manual of basic techniques for a health laboratory*. Geneva, 1980. Part 2, cap. 33, p.259-263.