

ESTUDO COMPARATIVO DAS VARIANTES DO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE MICOBACTÉRIAS

Holmes Campanelli COSTA ¹
Luiz Carlos Duarte de SOUZA ²
Jussara Pereira MARTINI ³
Lucilene FERRAZOLI ⁴
Maria Conceição MARTINS ⁴
Diltor Vladimir Araujo OPROMOLLA ⁵
Antônio Carlos Del GIUDICE ⁶

RESUMO - Este artigo tem a intenção de mostrar qual é o melhor método de coloração para micobactérias. As amostras foram coletadas e processadas pelos métodos de Ziehl-Neelsen a quente, Ziehl-Neelsen a frio, Ziehl Gabbet e Ziehl-Neelsen com azul de metileno alcalino. Após microscopia por cinco pessoas diferentes o método selecionado foi o de Ziehl-Neelsen a frio,

Palavras chave: Coloração. Micobactéria. Índice bacilosópico.

1 - INTRODUÇÃO

O gênero *Mycobacterium*, da ordem actinomicetales, compreende bastonetes delgados, retos ou ligeiramente encurvados, com raras formas ramificadas (Bier, O.¹).

As micobactérias são bacilos álcool-ácido resistentes, aeróbios, não esporulados e imóveis. Seu conteúdo de lipídios é elevado (Lennette, E.H.⁸).

A álcool-ácido resistência é demonstrada pelo método de Ziehl-Neelsen e é baseada no

-
- (1) Professor iadjunto da disciplina I de Microbiologia da Universidade do Sagrado Coração, Bauru, estado de São Paulo. Biólogo do Hospital Lauro de Souza Lima.
 - (2) Professor assistente da disciplina de Parasitologia da Universidade do Sagrado Coração, Bauru, estado de São Paulo. - Biólogo do Hospital Lauro de Souza Lima.
 - (3) Bióloga do Hospital Lauro de Souza Lima.
 - (4) Pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz.
 - (4) Pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz.
 - (5) Diretor Clínico do Hospital Laura de Souza Lima.
 - (6) Técnico de Laboratório do Hospital Lauro de Souza Lima.

fato de que certas bactérias, como os bacilos de Kock (tuberculose) e o de Hansen (hanseníase), quando tratados pela fucsina fenicada, resistem a descoloração subsequente por uma solução de ácido forte e, assim sendo, permanecem coradas em vermelho; outras não resistem à descoloração e tomam a coloração de fundo. A resistência, evidenciada pela coloração de Ziehl-Neelsen, está definitivamente relacionada à existência na parede celular das micobactérias, de lipídios fortemente ligados, que resistem à extração sucessiva do resíduo bacteriano seco com álcool / éter e clorofórmio. A integridade física da parede celular é também essencial à resistência, pois esta propriedade, se perde quando as bactérias se desintegram pelo ultra-som (Bier, 0.¹).

Existem 3 métodos variantes do clássico Ziehl-Neelsen; os métodos de Ziehl-Neelsen à frio; Ziehl Gabbet e Ziehl-Neelsen com azul de metileno alcalino (Leiker, D.L. & McDougall, A.C.⁷; Brasil³).

Na tuberculose a baciloscopia direta do escarro é o método prioritário, porque permite descobrir as fontes mais importantes de infecção; os casos bacilíferos. Por ser um método simples e seguro, deve ser praticado em todos os serviços de saúde que disponham de laboratório (Brasil²).

Segundo Leiker, D.L. & McDougall, A.C.⁷ a baciloscopia na hanseníase é de grande importância, como um exame complementar para o diagnóstico clínico, embora algumas formas da doença exibam baciloscopia negativa. Indicam também a baciloscopia como de grande valia no diagnóstico de hanseníase virchoviana, em alguns casos de hanseníase bordeline e na forma indeterminada; no início da doença para confirmação diagnóstica e classificação; na avaliação dos pacientes que tiveram recaída por ingestão inadequada do medicamento ou naqueles com resistência medicamentosa.

O exame bacilosκόpico adquiriu uma maior importância para a hanseníase, após a introdução pela Organização Mundial da Saúde, em 1981, do esquema terapêutico multidrogas. Esse esquema classifica os pacientes nas formas paucibacilíferas e multibacilíferas⁹. O índice bacilar classifica quantitativamente os esfregaços dos pacientes, segundo uma escala logarítmica, que varia de 1+ a 6+, possibilitando ao médico um acompanhamento da evolução clínica do paciente. O exame bacilosκόpico também nos mostra quantitativamente a presença de bacilos íntegros (viáveis), que são evidenciados intensamente corados, é o índice morfológico, que expressa a quantidade de bacilos íntegros em 100 bacilos totais.

Apesar de ser um método simples, o exame bacilosκόpico deve ser executado com todo o rigor possível para que os resultados sejam reprodutíveis.

Como até hoje, nenhum trabalho foi realizado com o objetivo de se avaliar qual variante da coloração de Ziehl-Neelsen funciona melhor nos exames baciloscópicos de hanseníase, o objetivo do presente estudo foi o de demonstrar o melhor método e propor uma padronização para as unidades de saúde.

2 - CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Casuística.

Esfregaços de 10 pacientes virchovianos em atividade foram coletados no Hospital Lauro de Souza Lima, Bauru, estado de São Paulo, sendo que de cada paciente se coletaram 4 esfregaços de locais diferentes.

2.2 - Material e Métodos

As lâminas de cada paciente foram numeradas de 2 a 5, sendo que todas as de

2 foram coradas pelo método de Ziehl-Neelsen à quente, as de número 3 pelo método de Ziehl-Neelsen à frio, as de número 4 pelo método de Ziehl Gabbet e as de número 5 pelo método de Ziehl-Neelsen utilizando o azul de metileno alcalino. As 5 pessoas que realizaram as leituras desconheciam a origem do material e o tipo de coloração utilizado em cada esfregaço. Os valores atribuídos as colorações, após a observação foram; (1) ruim; (2) regular; (3) bom; e (4) ótimo.

2.2.1 - Métodos e Coloração

As técnicas de coloração utilizadas seguiram as metodologias indicadas nas seguintes referências: a) Ziehl-Neelsen à quente (Bier, O.¹); b) Ziehl-Neelsen à frio (Leiker, D.L. & McDougall, A.C.⁷); c) Ziehl Gabbet (Bier, O.¹; Brasil³); d) Ziehl-Neelsen com azul de metileno alcalino, (Brasil³).

2.2.2 - Metodologia estatística

As comparações entre os quatro métodos de coloração, nas várias categorias de respostas (ruim, regular, bom e ótimo) foram realizadas através do teste de Goodman L.A.^{5,6}, para contrastes entre e dentro de proporções multinomiais.

Todas as comparações foram realizadas ao nível de 5% de significância. As letras minúsculas colocadas ao lado das proporções servem para comparações entre os métodos de coloração fixadas a categoria de respostas, enquanto que as maiúsculas colocadas abaixo das proporções, para comparações entre as categorias de respostas dentro dos métodos.

Para interpretação das letras entenda-se que: 1º) duas proporções seguidas de uma mesma letra minúscula numa dada coluna não diferem entre si quanto aos respectivos métodos de coloração; 2º) duas proporções seguidas de uma mesma letra maiúscula numa dada linha não diferem entre si quanto às respectivas categorias de resposta.

3-RESULTADOS

TABELA 1 - Número de votos para as categorias de resposta atribuídas pelos cinco leitores para os métodos de coloração.

Métodos de Coloração \ Categorias de Resposta	RUIM	REGULAR	BOM	ÓTIMO	TOTAL
2	26	17	5	2	50
3	2	9	29	10	50
4	7	2	18	23	50
5	17	27	4	2	50

TABELA 2 - Proporções multinomiais das várias categorias de respostas atribuídas pelos cinco leitores com as quatro variantes de coloração.

Metodos de Coloração \ Categorias de Resposta	RUIM	REGULAR	BOM	ÓTIMO
2	0,520 c	0,340 bc	0,100 a	0,040 a
	B	B	A	A
3	0,040 a	0,180 ab	0,580 b	0,200 ab
	A	A	B	A
4	0,140 ab	0,040 a	0,360 b	0,460 b
	AB	A	BC	C
5	0,340 bc	0,540 c	0,080 a	0,040 a
	B	B	A	A

4 - DISCUSSAO E CONCLUSAO

Os resultados das Tabelas 1 e 2, evidenciaram que as taxas ruim e regular são maiores que as bom e ótimo nos métodos 2 e 5, o contrário acontecendo quase plenamente nos outros dois métodos. Além disso, nas respostas bom os métodos 3 e 4 superaram os outros dois, e na ótimo, a superioridade acontece só em relação ao método 4. Nessas condições o método que melhor respondeu ao nosso objetivo foi o de número 4.

Podemos então concluir que o método de

Ziehl Gabbet foi o que melhor respondeu, nas condições do presente estudo, e portanto deve ser utilizado rotineiramente.

Entretanto, do ponto de vista operacional, como todos os laboratórios de Saúde Pública trabalham tanto com tuberculose como com hanseníase, e os corantes utilizados no método de Ziehl Neelsen à quente e à frio são os mesmos, e como o Ziehl-Neelsen à frio foi o segundo método mais votado, esses laboratórios poderiam se utilizar do método de Ziehl-Neelsen à frio tanto na coloração de esfrega-*os* de hanseníase como de tuberculose.

ABSTRACT - The present paper intends to show what coloration method for mycobacteria is the better. Samples was assessed and processed by hot Ziehl-Neelsen, cold Ziehl-Neelsen, Ziehl Gabbet and Ziehl-Neelsen with alkaline metilene blue. After microscopy by five different persons the method selected were the cold Ziehl-Neelsen.

Key words: Stain. Mycobacteria. Baciloscopic index.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (No prelo).
- 1 - BIER, O. **Bacteriologia e imunologia**. São Paulo, Melhoramentos. 22a. Led.. 1982, 1062 p.
 - 2 - BRASIL. Ministério da Saúde. Centro de Documentação do Ministério da Saúde. **Manual de normas para o controle da tuberculose**, Brasília, 3a. ed., 1988, 36p.
 - 3 - BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. **Gula para o controle de hanseníase**. 2a. ed., 1984, 100p.
 - 4 - BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. **Normas técnicas e procedimentos para o exame baciloscópico da hanseníase, 1989**,
 - 5 - GOODMAN, L.A. On simultaneous confidence for multinomial proportions. **Technometrics 712): 247-54, 1965.**
 - 6 - GOODMAN, L.A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. **Ann. Math. Statists., 35:716-25, 1964.**
 - 7 - LEIKER, D.L. & McDOUGALL, A.C. **Gula técnico, Baciloscopia da hanseníase**. Wurzburg, Telmilep, 2a. ed., 1987, 32pgs.
 - 8 - LENNETTE, E.H. **Manual de microbiologia clínica**, Buenos Aires, Panamericana, 4a. ed. 1985, 1408 pgs.
 - 9 - WORLD HEALTH ORGANIZATION STUDY GROUP. **Chemotherapy of leprosy for control programmes**. Geneva, 1982. 36p. (Who Technical Report Series 675).

Recebido para publicação em outubro de 1988; aceito para publicação em dezembro de 1988.