

PESQUISA DE BACILO ÁLCOOL-ÁCIDO RESISTENTE – BAAR

1. FUNDAMENTO

O diagnóstico das Micobactérias patogênicas (*Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*), por bacterioscopia direta é feito através dos métodos de coloração de Ziehl-Neelsen e de Kinyoun, os quais utilizam a característica destas bactérias de possuírem paredes celulares com alto teor de lipídeos (cerca de 60%, principalmente de Ácido micólico), que quando tratadas pelo corante Fucsina fenicada, coram-se de vermelho e persistem ao descoramento subsequente por uma solução de Álcool-ácido forte (diferenciador). É por isto que são conhecidas por Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR).

As outras bactérias, que não possuem tais paredes celulares ricas em lipídeos, têm a sua coloração pela Fucsina descorada pela solução de Álcool-ácido e coram-se em azul pela coloração de fundo do Azul de metileno (contra corante).

2. METODOLOGIAS DE COLORAÇÃO

2.1. MÉTODO DE COLORAÇÃO À QUENTE – MÉTODO DE ZIEHL-NEELEN

- 2.1.1. Preparar um esfregaço homogêneo, delgado e identificado em uma lâmina nova desengordurada, limpa e seca;
- 2.1.2. Deixar secar à temperatura ambiente;

- 2.1.3. Fixar o material do esfregaço passando 3 a 4 vezes pela chama do bico de Bunsen;
- 2.1.4. Cobrir a totalidade da superfície do esfregaço com solução de Fucsina fenicada, previamente filtrada ou filtrado sobre a lâmina no momento da coloração;
- 2.1.5. Deixar agir por cerca de 5 minutos, aquecendo brandamente utilizando algodão umedecido em álcool ou com a chama do bico de Bunsen, passando lentamente por baixo da lâmina, até que se produza emissão de vapores e, quando estes são visíveis, cessar o aquecimento. Repetir essa operação até completar três emissões sucessivas. Evitar a fervura e secagem do corante (adicionar mais corante, se preciso, dentro deste período para evitar que a lâmina seque porque o esfregaço precisa estar coberto permanentemente durante o aquecimento). Este aquecimento deve ser intermitente, pois é importante manter a solução aquecida durante o tempo previsto;
- 2.1.6. Lavar em água corrente para eliminar a Fucsina. Toma-se a lâmina pelo extremo numerado, inclinar para frente e lavar deixando cair um jato d'água de baixa pressão sobre a película corada, de maneira que essa não se desprenda;
- 2.1.7. Cobrir toda a superfície do esfregaço com a solução de Álcool-ácido. Tomar a lâmina entre o polegar e o indicador e fazer um movimento de vai-e-vem, de modo que o Álcool-ácido vá descorando suavemente a Fucsina. Se o esfregaço estiver ainda com a cor vermelha ou rosada, descora-se novamente. Considera-se descorado o esfregaço, quando suas partes mais grossas conservarem somente um ligeiro tom rosado. Essa operação dura, em geral, dois minutos;

- 2.1.8. Terminada a fase de descoloração e eliminado o Álcool-ácido, lavar a lâmina da mesma forma como se procedeu depois da coloração com a Fucsina, com cuidado para não desprender a película;
- 2.1.9. Cobrir toda a superfície do esfregaço com solução de Azul de metileno durante 30 segundos a 1 minuto;
- 2.1.10. Lavar, da mesma forma como se indicou para a Fucsina, tanto o esfregaço como a parte inferior da lâmina;
- 2.1.11. Colocar a lâmina com o esfregaço para cima, sobre o papel limpo, para secar à temperatura ambiente ou estufa a 35° C;
- 2.1.12. Observar ao microscópio com objetiva de imersão (100 x).

2.2. MÉTODO DE COLORAÇÃO À FRIO – MÉTODO DE KINYOUN

- 2.2.1. Preparar um esfregaço homogêneo, delgado e identificado em uma lâmina nova desengordurada, limpa e seca;
- 2.2.2. Deixar secar à temperatura ambiente;
- 2.2.3. Fixar o material do esfregaço passando 3 a 4 vezes pela chama do bico de Bunsen;
- 2.2.4. Cobrir a totalidade da superfície do esfregaço com solução de Fucsina fenicada (Kinyoun), previamente filtrada ou filtrado sobre as lâminas no momento da coloração, deixando agir por cerca de 5 minutos, adicionando mais corante se preciso dentro deste período, evitando que a lâmina seque;
- 2.2.5. Lavar em água corrente para eliminar a Fucsina. Toma-se a lâmina pelo extremo numerado, inclinar para frente e lavar deixando cair um jato d'água de baixa pressão sobre a película corada, de maneira que essa não se desprenda;

- 2.2.6. Cobrir toda a superfície do esfregaço com a solução de Álcool-ácido. Tomar a lâmina entre o polegar e o indicador e fazer um movimento de vai-e-vem, de modo que o Álcool-ácido vá descorando suavemente a Fucsina. Se o esfregaço estiver ainda com a cor vermelha ou rosada, descora-se novamente. Considera-se descorado o esfregaço, quando suas partes mais grossas conservarem somente um ligeiro tom rosado. Essa operação dura, em geral, dois minutos;
- 2.2.7. Terminada a fase de descoloração e eliminado o Álcool-ácido, lavar a lâmina da mesma forma como se procedeu depois da coloração com a Fucsina, com cuidado para não desprender a película;
- 2.2.8. Cobrir toda a superfície do esfregaço com solução de Azul de metileno durante 30 segundos a 1 minuto;
- 2.2.9. Lavar, da mesma forma como se indicou para a Fucsina, tanto o esfregaço como a parte inferior da lâmina;
- 2.2.10. Colocar a lâmina com o esfregaço para cima, sobre o papel limpo, para secar à temperatura ambiente ou estufa a 35° C;
- 2.2.11. Observar ao microscópio com objetiva de imersão (100 x).

Observações:

Na coloração do *Mycobacterium leprae*, segue-se o mesmo procedimento, mas a descoloração deve ser feita com Ácido sulfúrico a 4% em água, pois esse microrganismo é sensível a descoloração alcoólica.

Ao realizar uma coloração de esfregaço, em qualquer método, alguns procedimentos devem ser observados a fim de evitar cometer erros por utilizar:



Programa Nacional de Controle de Qualidade

Patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC)

Provedor de ensaios de Proficiência para Laboratórios Clínicos, Bancos de Sangue, Organizações de Diagnóstico *in vitro* e Alimentos

- (a) Substâncias corantes não certificadas;
- (b) Substâncias corantes precipitadas;
- (c) Corantes com concentração inadequada;
- (d) Esfregaços demasiados espessos, concentrados ou delgados;
- (e) Metodologia incorreta.

3. TABELA DE INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO DA BACTERIOSCOPIA PARA BAAR:

A leitura deve ser feita no mínimo em cem campos microscópios, o que corresponde, aproximadamente, à leitura de uma linha reta que vai do extremo, onde está a numeração, até o extremo oposto, isso corresponde aproximadamente a mais ou menos 5 minutos de observação.

Recomenda-se um intervalo de 10 minutos de descanso para cada dez lâminas lidas e utilizar um desenho quadriculado para ir anotando o número de bacilos encontrados em cada campo microscópio e o resultado deve ser informado em número de cruces segundo as normas do Ministério da Saúde em vigor.

Manual de Bacteriologia da Tuberculose – Ministério da Saúde / FNS / CENEPI / CNPS / Centro de Referência Prof. Hélio Fraga – 2ª Edição Revisada e Ampliada – 1994.

Número Total de Campos Observados	Número de bacilo álcool-ácido resistente observados por campo	Resultado
100	Não foram encontrados	Negativo
100	Menos de 1 BAAR por	Positivo (+)

	campo	
50	De 1 a 10 BAAR por campo	Positivo (++)
20	Mais de 10 BAAR por campo	Positivo (+++)

Observação:

Nos casos de diagnóstico, ao encontrar de 1 a 4 bacilos em 100 campos observados, deve-se ampliar a leitura para mais 100 campos. Se a quantidade de bacilos encontrados depois de observar os 200 campos se mantiver entre 1 a 4 bacilos, informar o resultado como “NEGATIVO” e solicitar nova amostra. Se nos materiais subsequentes deste paciente persistir a negatividade, proceder a cultura.

4. PREPARAÇÃO DOS CORANTES

4.1. Corantes de Ziehl – Neelsen

4.1.1. Fucsina fenicada de Ziehl-Neelsen:

Fucsina básica	0.3g
Álcool etílico 95º GL	10ml
Fenol fundido	5,75ml
Água destilada ou deionizada q.s.	100ml

Na preparação dos corantes de Fucsina fenicada (Ziehl – Neelsen e Kinyoun), dissolver em um gral o corante (Fucsina) no Álcool etílico 95º, juntar aos poucos o Fenol fundido. Misturar sempre de modo a obter uma solução bem homogênea. Juntar a água, pouco a pouco, lavando o gral. Filtrar após 24 horas de repouso. Estocar em frasco escuro.

Segundo Langeron, a prática seguida por outros autores de misturar a solução alcoólica saturada do corante com água fenolada não dá soluções tão estáveis e dotadas de poder corante tão intenso como esta técnica descrita acima.

Observação:

Para manter o fenol fundido, adicionar-lhe 15% de água destilada. De tal solução (de água em fenol), na fórmula acima, tomar-se-ão 5,75 ml ao invés de 5 ml.

4.1.2. Álcool-Ácido:

Ácido clorídrico, densidade 1.19	3ml
Álcool etílico 95 ^o %	97ml

Com uma pipeta deixar escorrer o Ácido clorídrico pelas paredes do frasco contendo o Álcool e agitar suavemente.

Observação:

Alguns autores recomendam Álcool-Ácido à 1%.

4.1.3. Azul de metileno:

Azul de metileno	0.3g
Álcool etílico 95 ^o %	3ml
Água destilada ou deionizada q.s.	100ml

Dissolver o Azul de metileno com Álcool por agitação e juntar Água destilada ou deionizada até completar 100 ml. Deixar repousar por 24 horas. Filtrar e estocar em frasco escuro.

4.2. Corantes do método de Kinyoun:

4.2.1. Fucsina fenicada de Kinyoun:

Fucsina básica	4g
Álcool etílico 95º %	20ml
Fenol fundido	9,75ml
Água destilada ou deionizada q.s.	100ml

Na preparação dos corantes de Fucsina fenicada (Ziehl – Neelsen e Kinyoun), dissolver em um gral o corante (Fucsina) no Álcool etílico 95º, juntar aos poucos o Fenol fundido. Misturar sempre de modo a obter uma solução bem homogênea. Juntar a água, pouco a pouco, lavando o gral. Filtrar após 24 horas de repouso. Estocar em frasco escuro. Segundo Langeron, a prática seguida por outros autores de misturar a solução alcoólica saturada do corante com água fenolada não dá soluções tão estáveis e dotadas de poder corante tão intenso como esta técnica descrita acima.

Observação:

Para manter o fenol fundido, adicionar-lhe 15% de água destilada. De tal solução (de água em fenol), na fórmula acima, tornar-se-ão 9,75 ml ao invés de 9 ml.

4.2.2. Álcool-Ácido:

Ácido clorídrico, densidade 1.19	3ml
Álcool etílico 95 ^o %	97ml

Com uma pipeta deixar escorrer o Ácido clorídrico pelas paredes do frasco contendo o Álcool e agitar suavemente.

4.2.3. Azul de metileno:

Azul de metileno	0.3g
Álcool etílico 95 ^o %	3ml
Água destilada ou deionizada q.s.	100ml

Dissolver o Azul de metileno com Álcool por agitação e juntar Água destilada ou deionizada quente até completar 100 ml. Deixar repousar por 24 horas. Filtrar e estocar em frasco escuro.

Observação:

Para a coloração de fundo, outras soluções de Azul de metileno podem ser usadas, tais como a de Azul de metileno segundo Loeffler (Azul alcalino de Loeffler) e Azul de metileno segundo Kühne (Azul fenicado de Kühne).

4.3. Azul de metileno segundo Loeffler (Azul alcalino de Loeffler):

Solução A:

Azul de metileno	0.3g
Álcool etílico 95º %	30ml

Dissolver o Azul de metileno com Álcool por agitação.

Solução B:

Hidróxido de sódio 0,01 N	0,3ml
Água destilada ou deionizada q.s.	100ml

Dissolver o Hidróxido de sódio com Água destilada ou deionizada.

Solução C – para uso:

Misturar soluções A e B em partes iguais.

Observação:

Para o método de Ziehl-Neelsen, diluir na proporção de 1/10 com água destilada ou deionizada antes de usar.

4.4. Azul de metileno segundo Kühne (Azul fenicado de Kühne):

Azul de metileno	1.5g
Álcool etílico 95º %	10ml
Fenol fundido	5,75ml

Água destilada ou deionizada q.s.	100ml
-----------------------------------	-------

Dissolver o Azul de metileno com Álcool por agitação e juntar o Fenol e Água destilada ou deionizada quente até completar o volume de 100 ml. Deixar repousar por 24 horas. Filtrar e estocar em frasco escuro.

Observações:

Para manter o fenol fundido, adicionar-lhe 15% de água destilada. De tal solução (de água em fenol) , na fórmula acima, tomar-se-ão 5,75 ml ao invés de 5 ml.

Para o método de Ziehl-Neelsen, diluir na proporção de 1/10 com água destilada ou deionizada antes de usar.

5. CONTROLE DE QUALIDADE DOS CORANTES:

- 5.1. Todos os corantes, preparados ou comprados prontos, utilizados no Laboratório Clínico, devem ser submetidos a um controle da qualidade, para a verificação do seu desempenho.
- 5.2. Preparar uma suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 cultivando em tubo com meio de cultura 7H9. Fazer um esfregaço em uma lâmina com a suspensão e deixe secar ao ar. Deve-se preparar várias lâminas em câmaras de fluxo laminar e deixar estocadas em temperatura ambiente numa caixa fechada. Fixar e corar da mesma maneira que uma lâmina com amostra desconhecida. Examinar ao microscópio com objetiva de imersão (100x). A micobactéria irá corar-se de vermelho, as demais bactérias e artefatos em azul.
- 5.3. As lâminas estocadas e não coradas servirão como controle do desempenho para cada nova bateria de corantes e a cada semana de intervalo.

5.4. Na falta de bactérias padronizadas, podem ser utilizadas as dos esfregaços enviados pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade – PNCQ, ou solicitar nos Postos de Saúde dos Estado ou Municípios, os frascos utilizados para estocagem das Vacinas BCG, e, com as gotas restantes fazer o esfregaço para testar a qualidade do corante.

6. CAUSAS DE ERROS NO EXAME MICROSCÓPIO DIRETO DE ESCARRO:

- 6.1. Amostra insuficiente em quantidade e qualidade;
- 6.2. Identificação inadequada no pote/frasco. Não deve colocar a identificação na tampa, e sim no corpo do pote/frasco;
- 6.3. Área de trabalho inadequada ou mal iluminada;
- 6.4. Troca das lâminas por falta de procedimento no trabalho;
- 6.5. Processamento de uma série muito grande de amostras simultaneamente;
- 6.6. Esquecer de misturar os escarros se as eliminações são poucas e se estão separadas dentro do pote/frasco;
- 6.7. Esfregaços muito espessos ou muito delgados;
- 6.8. Uso de lâminas arranhadas ou que tenham sido utilizadas anteriormente – podem simular bacilos pela deposição de corantes nas ranhuras;
- 6.9. Fucsina seca e cristalizada no fundo do frasco. Deve-se usar Fucsina recentemente filtrada e colocada em frasco bem lavado;
- 6.10. Descuido no aquecimento da Fucsina (método de Ziehl-Neelsen), permitindo que seque e cristalize no esfregaço;
- 6.11. Descoramento insuficiente das lâminas pode deixar corados em vermelho outros bacilos, que assim confundem com o BAAR;
- 6.12. Tempo de descoramento muito prolongado pode levar ao descoramento do BAAR;



Programa Nacional de Controle de Qualidade

Patrocinado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC)

Provedor de ensaios de Proficiência
para Laboratórios Clínicos,
Bancos de Sangue, Organizações
de Diagnóstico *in vitro* e Alimentos

- 6.13. Não revisar a numeração das lâminas ou não identificar se apagar o número durante a coloração;
- 6.14. Não limpar a lente de imersão depois de cada exame positivo;
- 6.15. Existência de bacilos no óleo de imersão devido ao mau costume de tocar o esfregaço com o conta-gotas do frasco;
- 6.16. Anotação errada do resultado na folha de trabalho diário;
- 6.17. Transcrição errada da planilha de trabalho diário para o impresso a ser fornecido ao setor de laudo.