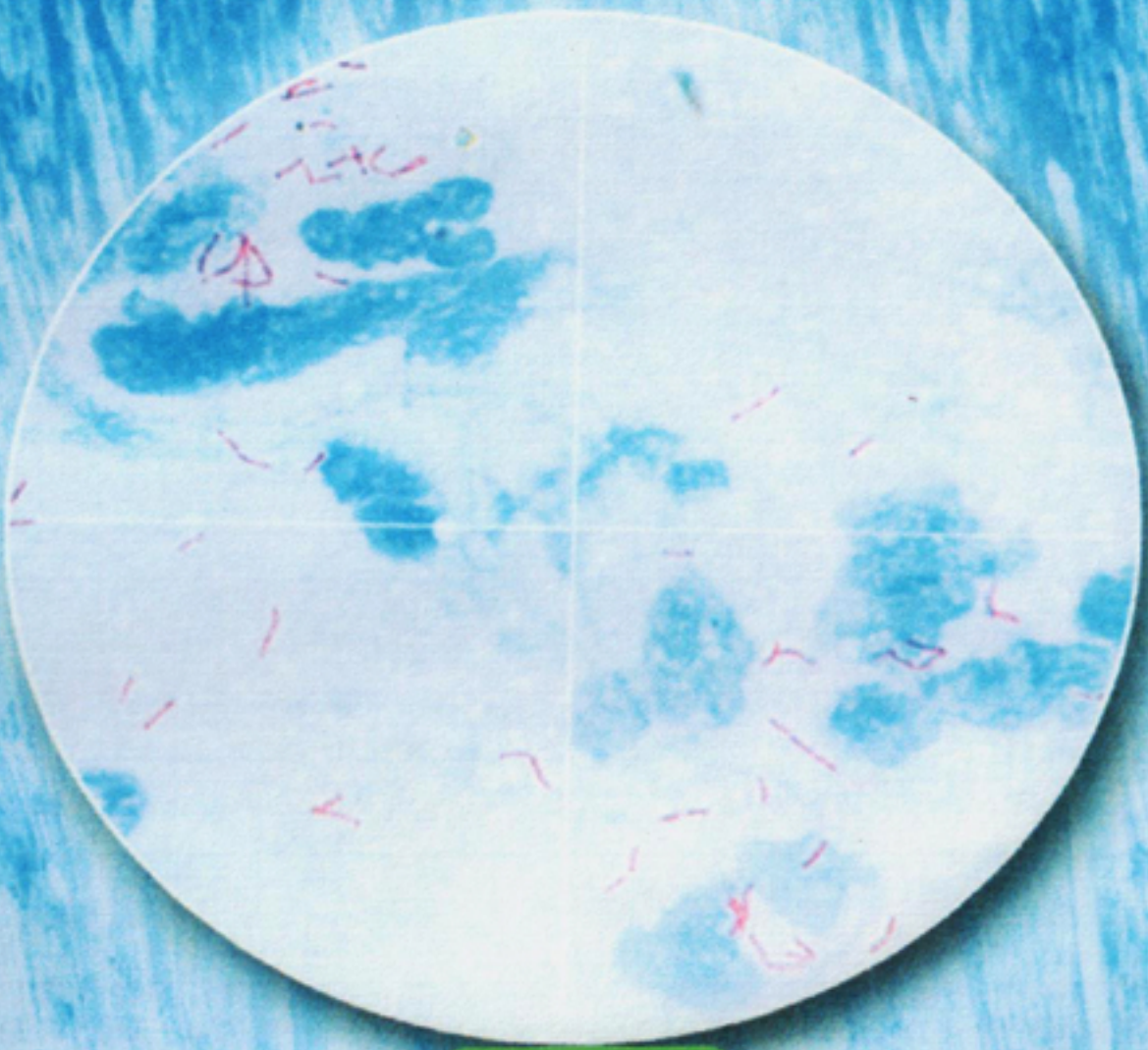
# Tuberculose

## Diagnóstico laboratorial

## Baciloscopia



TELE-LJ3

Ministério da Saúde
Programa Nacional de DST e Aids
Coordenação da Política Nacional de Sangue e Hemoderivados

# Homenagens e agradecimentos


## Agradecimentos

Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará - LACEN-CE
Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal - LACEN-DF
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA
Instituto Adolfo Lutz - IAL - LACEN - SP
Instituto de Pesquisa Biológica - IPB - LACEN - RS
Centro de Referência Professor Hélio Fraga - Rio de Janeiro - RJ
Organização Panamericana da Saúde/OPAS - Brasil
Instituto Adolfo Lutz - IAL - Ribeirão Preto -SP
Laboratório Central de Saúde Pública "Dr. Milton Bezerra Sobral"/ FUSAN - Recife-Pe
Universidade Federal do Espírito Santo -UFES

### Agradecimentos Especiais

Ao Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal,

a Maria do Carmo Gomes Pinheiro e Fábio Tomás de Souza, pelo apoio incondicional para a execução deste projeto.

Os responsáveis pela implantação do TELELAB empenharam toda sua capacidade profissional para tornar este projeto digno da qualidade técnica e científica e da eficiência que nossa coordenadora geral sempre imprimiu às realizações do Programa Nacional de DST e Aids do Ministério da Saúde.

À Dra. Lair Guerra de Macedo Rodrigues, exemplo de coragem e liderança, dedicamos este trabalho.

**Mariângela Batista Galvão Simão**

# Tuberculose: formas de transmissão e diagnóstico

## Formas de transmissão

### Introdução

Em 1882, Robert Koch descobriu o agente etiológico da tuberculose, o que fez crescer a expectativa em relação à cura e erradicação dessa doença, que desde a antigüidade atinge pessoas de todas as classes sociais.

Hoje mais de um século depois, mesmo com métodos adequados de diagnóstico e esquemas de tratamento com drogas específicas capazes de curar a maior parte dos casos, a tuberculose ainda persiste como um grave problema de saúde pública no Brasil e em muitos outros países.

A emergência da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) veio agravar a situação constituindo, além das condições precárias de vida de grande parte da população, um dos principais fatores relacionados a alta prevalência da tuberculose.

**Atenção**

Um diagnóstico rápido e seguro, acompanhado de tratamento precoce, são medidas fundamentais para quebrar a cadeia de transmissão e controlar a tuberculose no Brasil.

O treinamento dos profissionais é uma estratégia fundamental para possibilitar a realização do diagnóstico da tuberculose, com técnicas padronizadas, critérios de controle de qualidade e de biossegurança, em qualquer laboratório da rede pública.

### O que é a Tuberculose?

A tuberculose é uma doença infecciosa que acomete, geralmente, os pulmões, mas pode ocorrer em qualquer outro órgão ou ainda se desenvolver ao mesmo tempo, em vários órgãos do corpo humano. Confira na Figura 1, as localizações mais comuns da doença:

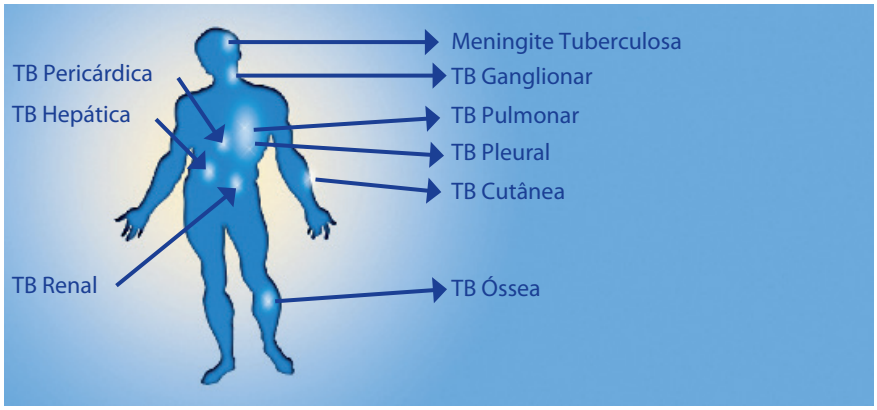



Figura 1: Localizações mais comuns da tuberculose no organismo humano.

## Você sabia?

A designação tuberculose veio do fato de a doença provocar lesões nodulares firmes denominadas de tubérculos, nos tecidos em que se desenvolve.

## Quais os microrganismos que causam a tuberculose?

A tuberculose é causada por cinco espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium*: *M. tuberculosis*, M. bovis, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canetti*. Essas espécies estão agrupadas e definidas como "complexo *M. tuberculosis*".

Gênero Mycobacterium (Micobactéria) - designa as bactérias que apresentam algumas características semelhantes aos fungos quando cultivadas em meio líquido.

No Brasil, quase todos os casos têm como agente etiológico o *M.tuberculosis* conhecido como **bacilo de Koch** (BK) e, muito raramente, a tuberculose tem sido relacionada ao *M. bovis*. As espécies *M.africanum*, *M. microti* e *M. canetti* , têm sido identificadas em outras partes do mundo.

Além das espécies do "complexo *M. tuberculosis*" existem pelo menos 81 outras espécies classificadas como Micobactérias Atípicas, ou Ambientais, ou MNT.

MNT - micobactéria não tuberculosa, anteriormente referida como MOTT - Mycobateria Other Than Tubercle Bacilli = outra micobactéria que não o bacilo da tuberculose.

Quais as principais características das micobactérias?

Veja na Figura 2:

**Observe que:**

- • **as micobactérias** têm a forma de um bastonete e, por isso, todas as espécies são classificadas morfologicamente como bacilos;

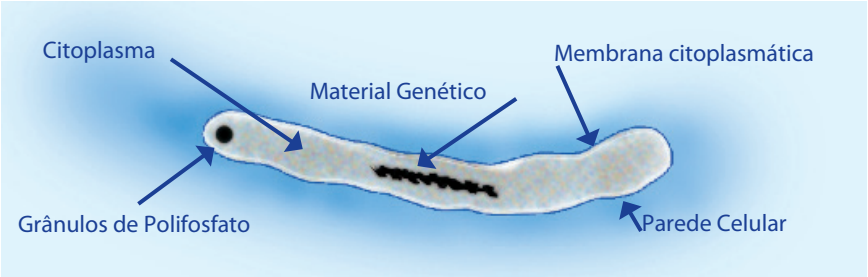



Figura 2 - Representação esquemática das principais características das micobactérias

**Observe que:**

- **as micobactérias** têm a forma de um bastonete e, por isso, todas as espécies são classificadas morfologicamente como bacilos;
- **no citoplasma são** produzidas as enzimas necessárias para a biossíntese celular, dentre elas encontra-se a nitrato-redutase. A membrana citoplasmática sintetiza pigmentos carotenóides e niacina. A nitrato-redutase, os pigmentos e a niacina são utilizados nos testes de identificação do *M. tuberculosis*;
- **os grânulos de polifosfato** ficam armazenados no citoplasma para uso nas atividades energéticas, como a multiplicação. No microscópio, eles podem aparecer como pequeninos grãos escuros localizados nas extremidades do bacilo;
- **a parede celular** é constituída principalmente por grandes quantidades de lipídios. Os ácidos micólicos, que são componentes dos lipídios, retêm corantes e são responsáveis pela propriedade da álcool-ácido resistência;

**Propriedade da álcool-ácido resistência** - é a capacidade das micobactérias de reter corantes, não descorando mesmo após a lavagem com uma solução de álcool-ácido, durante os procedimentos do método de coloração no laboratório.

**Por esse motivo, as micobactérias são classificadas como Bacilos Álcool-Ácido Resistentes, que a prática clínica e laboratorial identifica apenas como BAAR.**

- é também na **parede celular** que se encontra o composto 6,6' dimicolato de trealose, responsável pelo aspecto agregado dos bacilos **("fator corda")** em leitura microscópica e pela película que o *M. tuberculosis* forma em meio de cultura líquido. A parede celular dá forma e rigidez ao bacilo.

## Como se adquire o bacilo da tuberculose?

O bacilo da tuberculose é adquirido, principalmente, pela inalação de **partículas infectantes** suspensas no ar.

Partículas infectantes - são gotículas com diâmetros de até 5 micra contendo bacilos, espalhadas no ar pela tosse, fala e espirro de um paciente com tuberculose pulmonar.

Através da respiração, os bacilos chegam aos **alvéolos pulmonares** onde podem ser **destruídos,** permanecer em estado de **latência** ou se **multiplicar**.

**Você sabia?**

Raramente, o complexo *M. tuberculosis* é adquirido através do contato da pele lesada (cortes ou feridas) com secreções de pacientes com tuberculose. Nesse caso, o bacilo pode ficar na própria pele ou migrar para outras partes do corpo humano, como por exemplo o pulmão.

Raramente, também, o *M. bovis* é adquirido junto com a ingestão de produtos como, por exemplo, o leite ou seus derivados não pasteurizados.

Todas as pessoas que adquirem o bacilo desenvolvem tuberculose?

Não. Apenas cerca de 10% a 20% se tornarão doentes. Isto porque, para que os bacilos se multipliquem e a doença se manifeste, o indivíduo precisa estar com seu sistema de defesa imunologicamente deficiente, seja por debilidades nutricionais ou outras causas de desgastes físicos, pelo uso de medicamentos imunodepressores ou por doenças imunossupressoras, como por exemplo a aids.

Após a multiplicação bacilar ocorre a disseminação para todo o organismo através da corrente sangüínea e do sistema linfático e, a partir daí, a tuberculose pode surgir em qualquer parte do corpo humano.

## Qual das formas de tuberculose é mais freqüente?

É a **Tuberculose Pulmonar** que, além de **mais freqüente**, é a mais **importante** e preocupante em termos de Saúde Pública, porque é a forma que produz as partículas infectantes responsáveis pela transmissão da doença. As demais formas são relatadas como **Tuberculose Extrapulmonar** e, no Brasil, acometem em torno de **15%** dos doentes.

## Quais os sintomas da tuberculose pulmonar?

Além da **tosse com expectoração constante por mais de 3 semanas**, que identifica o **sintomático respiratório**, são também comuns os seguintes sinais e sintomas clínicos: febre, suor noturno, falta de apetite, cansaço, falta de ar e emagrecimento rápido. Algumas vezes, a lesão tuberculosa atinge vasos sangüíneos pulmonares e o escarro apresenta-se sanguinolento.

# Tuberculose: formas de transmissão e diagnóstico

## Métodos de Diagnóstico

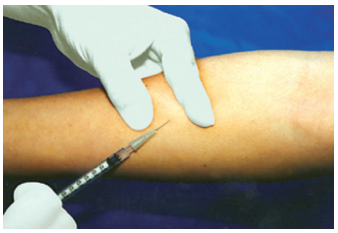
### Como é feito o diagnóstico da tuberculose?

O diagnóstico da tuberculose é feito por:

- **exame clínico**: baseado nos sintomas relatados e no exame físico que possibilitam o diagnóstico preliminar zda doença a ser confirmada por outros exames;

- **exame radiológico de tórax**: pode revelar imagens no pulmão sugestivas de tuberculose, mas sua simples realização não é suficiente para confirmar a doença;

- **prova ou reação tuberculínica**: também conhecida como PPD (*Purified Protein Derivative* - derivado purificado de fração protéica antigênica do bacilo) ou reação de Mantoux, em homenagem ao cientista que aperfeiçoou essa prova criada por Koch. É uma reação intradérmica que apenas verifica se o indivíduo teve ou não contato com o bacilo.



- **diagnóstico laboratorial**: é o que confirma o diagnóstico da tuberculose.

## Como é feito o diagnóstico laboratorial da tuberculose?

- O diagnóstico laboratorial da tuberculose é feito através dos seguintes métodos bacteriológicos:
- **Baciloscopia** - ou exame microscópico, é a pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes - BAAR em esfregaços da amostra, preparados e corados com metodologia padronizada.

Figura 1 – Lâmina de escarro corada pelo método de Ziehl Neelsen

- **Cultura** - é o exame que permite o isolamento e a multiplicação de BAAR, a partir da semeadura da amostra em meios de cultivo específicos para micobactérias.

Figura 2 – Meio de Lowenstein-Jensen com colônias de micobactérias

Como qualquer espécie de micobactéria pode se desenvolver nesses meios, é preciso realizar **testes de identificação**, que possibilitam a diferenciação do *M. tuberculosis* de outras micobactérias, em amostras de culturas positivas para BAAR. Os testes mais utilizados são:

- **prova de crescimento de colônias bacterianas em PNB (ácido p-nitrobenzóico)**: consiste na observação do crescimento de colônias de micobactérias em meio de cultura contendo PNB. O meio de cultura contendo este tipo de ácido (PNB) inibe a multiplicação do *M. tuberculosis* não ocorre a formação de colônias bacterianas;
- **prova de produção da niacina**: detecta a niacina produzida pelo *M. tuberculosis* e acumulada no meio de cultura. As outras micobactérias não produzem niacina em quantidade suficiente para a detecção nessa prova;
- **prova de redução do nitrato**: detecta o nitrito produzido pela redução de nitratos, devido a presença da enzima nitrato-redutase.

É obrigatório realizar a baciloscopia e a cultura em todas as amostras?

Quadro 1 - Recomendações para realização da Baciloscopia e/ou Cultura

| | |
|---|---|
| Na Tuberculose Pulmonar: | ❶ Baciloscopia é obrigatória na análise de todas as amostras, tanto para o diagnóstico quanto para o controle do tratamento.<br>❷ Cultura é obrigatória para:<br>- O diagnóstico em todas as outras amostras, que não o escarro.<br>- A confirmação diagnóstica em amostras de escarro de sintomáticos respiratórios, com baciloscopia repetidamente negativa;<br>- Na verificação da farmacoresistência, em qualquer amostra de casos que não respondem ao tratamento. |
| Na Tuberculose Extrapulmonar | É obrigatória a realização simultânea da baciloscopia e da cultura em todas as amostras menos no sangue. |

**Atenção**

- no sangue realiza-se somente a cultura, uma vez que a baciloscopia nesse tipo de amostra, apresenta com muita freqüência resultado falso-negativo.
- recomenda-se a baciloscopia e a cultura, em qualquer amostra de pacientes HIV positivos, uma vez que eles podem ser acometidos por outras micobactérias, que exigem identificação da espécie para adequação do tratamento.

## Em que se baseia a obrigatoriedade da baciloscopia para o diagnóstico da tuberculose pulmonar?

A baciloscopia é obrigatória na tuberculose pulmonar porque identifica a maioria dos casos bacilíferos, que são as fontes mais importantes de transmissão da doença, além de ser um método simples, rápido e de baixo custo.

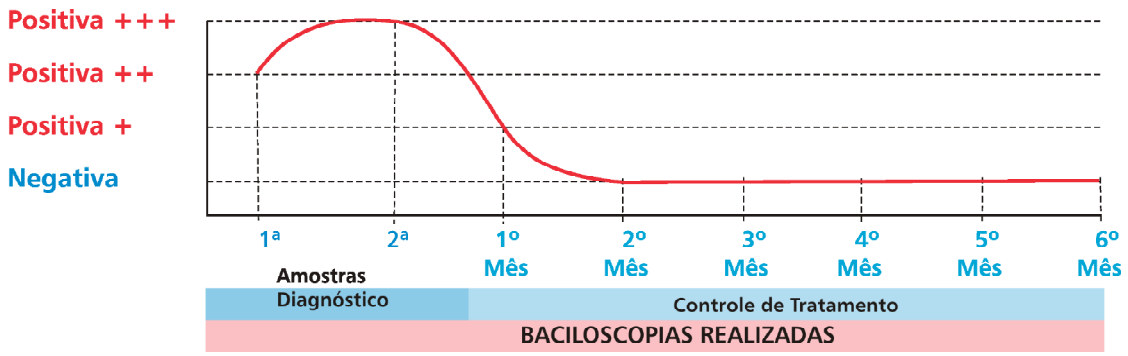
No Brasil, conforme estimativas do Ministério da Saúde, em torno de 70% dos portadores de tuberculose pulmonar possuem amostras de escarro com grande quantidade de bacilos.

Qual é a importância da Baciloscopia para o controle do tratamento?

A **baciloscopia** de controle é importante porque permite avaliar o sucesso ou a falência do tratamento. Para isso, é indispensável que esse controle seja realizado, pelo menos, ao final do 2º, do 4º e do 6º mês de tratamento. O ideal é fazer a baciloscopia ao final de cada mês. Com os resultados mensais, o médico pode construir uma **Curva Baciloscópica.**

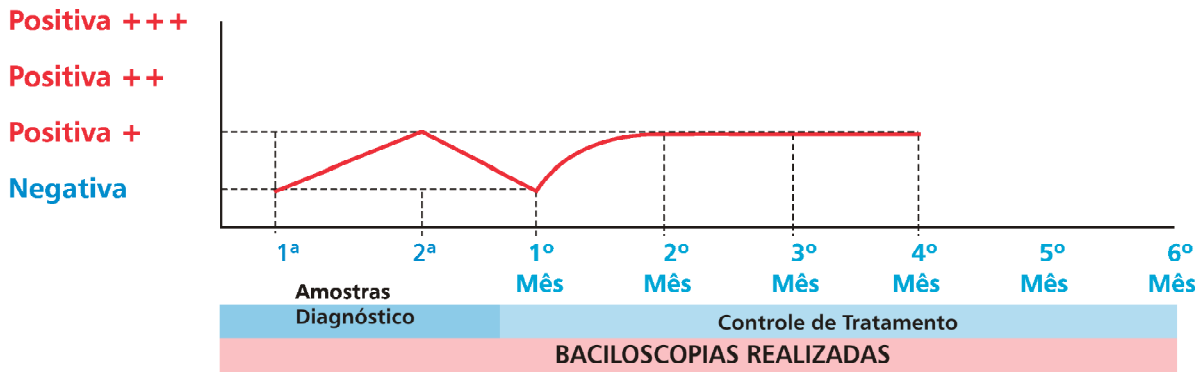
**Confira** nos exemplos que seguem:

Exemplo 1




Veja que o paciente apresentou baciloscopia negativa ao final do 2º mês e permaneceu assim até ao final. Essa é uma curva que demonstra a **cura da doença.**

Exemplo2




Neste exemplo o paciente, voltou a ter baciloscopia positiva a partir do 2º mês. Houve falência do tratamento que pode estar relacionada aos seguintes motivos:

- irregularidade do tratamento: o paciente não toma os medicamentos corretamente; ou
- resistência a uma ou mais drogas do esquema de tratamento.

# Diagnóstico laboratorial - amostras

## Que amostras são utilizadas no diagnóstico laboratorial da Tuberculose?

Depende da forma de tuberculose que está sendo investigada, se pulmonar ou extrapulmonar. Veja no Quadro 1 as amostras mais freqüentemente encaminhadas para baciloscopia e cultura.

| Tuberculose Pulmonar | Tuberculose Extrapulmonar |
|---|---|
| escarro | urina |
| lavado brônquico | líquidos: pleural; sinovial; peritoneal; pericárdico |
| lavado bronco-alveolar | secreções ganglionares e de nódulos mamários |
| lavado gástrico | líquor |
| fragmento de tecido pulmonar (biópsia pulmonar) | fragmentos de tecidos (biópsias cutâneas, de órgãos e de ossos) |
| | secreções purulentas de pele, nariz, ouvido, olhos, garganta |
| | sangue e aspirado de medula |

Quadro 1 - Tipos de amostras freqüentemente utilizadas no diagnóstico laboratorial

***Atenção***

Amostras de fezes **não** devem ser utilizadas para baciloscopia e nem para cultura, uma vez que esse material apresenta com muita freqüência resultado falso positivo. O diagnóstico da TB intestinal é realizado por meio de biópsia.

Neste curso serão detalhados os procedimentos da coleta e da baciloscopia de escarro, que é a amostra mais utilizada para diagnóstico da tuberculose pulmonar.

# Etapas para realização da baciloscopia

## Preparo do Esfregaço

| | | |
|---|---|---|
| 1 Preparo do material e organização da bancada | 2 Identificação da lâmina | 3 Distensão do escarro na lâmina |
| 4 Secagem do esfregaço (temperatura ambiente) | 5 Fixação do esfregaço (usar a chama) | |

## Coloração do Esfregaço

| | | |
|---|---|---|
| 6 Preparo do material necessário | 7 Coloração com fucsina | 8 Lavagem |
| 9 Descoloração | 10 Lavagem | 11 Coloração de fundo |
| 12 Lavagem | 13 Secagem (temperatura ambiente) | |

## Leitura no microscópio

| | | |
|---|---|---|
| 14 Preparo do material e do microscópio | 15 Registro da lâmina no papel quadriculado | 16 Leitura, anotação e interpretação dos resultados no papel quadriculado |
| 17 Registro dos resultados na requisição e no livro | 18 Conferência e liberação dos resultados | |

Figura 1 - Etapas da Baciloscopia

# Baciloscopia - coleta de escarro

## Que recipiente deve ser utilizado para a coleta do escarro?

A coleta do escarro deve ser feita em um pote, fornecido pela unidade de saúde, preferencialmente com as características apresentadas na Figura 3:

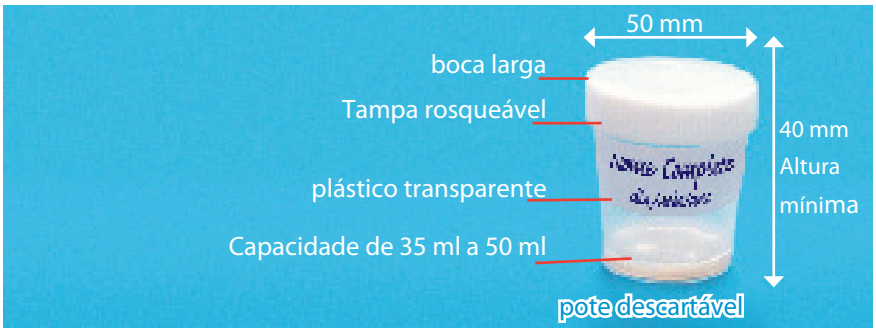



Figura 3 - Características do pote para a coleta de escarro

**É fundamental** que o nome completo do paciente e a data da coleta sejam escritos no corpo do pote, com uma letra que possa ser compreendida por qualquer outra pessoa.

***Atenção***

No **Anexo 1**, deste manual, você encontra um exemplo de requisição.

## Quantas amostras de escarro devem ser coletadas para diagnóstico?

Devem ser coletadas duas amostras de escarro de cada paciente, para aumentar as chances de se obter um resultado positivo. Essas amostras devem ser coletadas de acordo com o seguinte esquema:

- **primeira amostra** - coletada quando o sintomático respiratório procura o atendimento na unidade de saúde, para aproveitar a presença dele e garantir a realização do exame laboratorial. **Não** é necessário estar em jejum;
- **segunda amostra** - coletada, na manhã do dia seguinte, assim que o paciente despertar. Essa amostra, em geral, tem uma quantidade maior de bacilos porque é composta da secreção acumulada na árvore brônquica por toda a noite.

Observação: para o controle do tratamento coleta-se apenas uma amostra.

Que orientações devem ser fornecidas para o paciente coletar as amostras do escarro?

**É fundamental que o profissional de saúde:**

- entregue as orientações por escrito e converse com os pacientes sobre todas elas para verificar se ele tem dúvidas, pois parte deles pode não saber ler e ter vergonha de declarar isso. Se possível, **faça** uma demonstração dos procedimentos de coleta.
- deixe bem claro para o paciente que a requisição do exame **não** deve ficar dentro do mesmo saco plástico onde ele colocou a amostra.

> ***Atenção***
>
> Veja, no **Anexo 2,** as orientações que devem ser fornecidas ao paciente para coleta da primeira e da segunda amostra.

## Qual o procedimento de coleta quando o paciente tem pouca secreção e não consegue expelir o escarro?

Quando o paciente **não** consegue coletar normalmente a 1ª e a 2ª amostras, é feita a **coleta por indução**, de acordo com a orientação médica.

### Coleta de escarro por indução

Feita após a realização de nebulização com solução salina hipertônica a 3% durante no mínimo 5 e no máximo 20 minutos. A nebulização fluidifica a secreção do pulmão e provoca uma irritação que leva à tosse e facilita a expulsão do escarro. Esse procedimento deve ser acompanhado por profissional treinado e em unidade de saúde equipada.

Após a nebulização, o paciente deve seguir as mesmas orientações para forçar a tosse e coletar o escarro, apresentadas no **Anexo 2**.

> ***Atenção***
>
> Na coleta por indução é preciso orientar o paciente para: ingerir, no mínimo, 8 copos de líquido (água, refrescos) e dormir sem travesseiro no dia anterior; fazer a higiene oral apenas com bochechos de água e comparecer ao exame em jejum.

No **corpo do pote**, além do nome completo do paciente e data da coleta, deve estar escrito **coleta por indução**, uma vez que esse escarro é menos viscoso e semelhante à saliva.

A coleta de escarro por indução é especialmente útil para pacientes com Aids, grupos indígenas e em controle de tratamento.

# Baciloscopia - recepção e transporte das amostras de escarro

## Quais os procedimentos ao receber as amostras de escarro?

A amostra deve ser recebida em qualquer horário de funcionamento da unidade de saúde. Na recepção, juntamente com a pessoa que trouxe a amostra, é importante adotar os seguintes procedimentos:

1. verificar a identificação da amostra, no corpo do pote. Se for necessário, escreva de novo o nome completo do paciente e a data da coleta;
2. verificar se a requisição do exame está preenchida corretamente e com todos os dados. Atenção especial deve ser dada aos endereços do paciente e da unidade solicitante. Se faltar alguma informação, peça esclarecimentos à pessoa que estiver entregando a amostra;
3. conferir se o nome do paciente que consta na requisição é o mesmo que está no pote da amostra;
4. observar se o pote contém realmente a amostra e se a requisição é para diagnóstico ou controle de tratamento. Anote essas informações na requisição;
5. informar à pessoa que entregou a amostra, quando e onde pegar o resultado;
6. encaminhar a amostra **imediatamente** para o laboratório. Se isso **não** for possível, para garantir a qualidade da amostra é preciso obedecer às seguintes orientações:
   - se o **envio** ao laboratório for realizado no **máximo em 24 horas**, as **amostras** de escarro poderão ficar em **temperatura ambiente**, **protegidas da luz solar**;
   - se a **demora** para o envio ao laboratório for **no máximo de 7 dias**, as **amostras** de escarro deverão ser **mantidas refrigeradas entre 2°C e 8°C**, em geladeira **exclusiva** para armazenar material contaminado;
   - se **não** for possível encaminhar em **24 horas** ou se **não** houver **geladeira** disponível para armazenar material contaminado, a unidade deverá **processar** as **amostras**, ou seja, **preparar e fixar os esfregaços**, seguindo os procedimentos descritos no bloco "Baciloscopia", deste manual.

***Atenção***

Utilize equipamentos de proteção individual - (**EPI**) e manipule as amostras como material potencialmente infectantes

## Como transportar as amostras de escarro da recepção para o laboratório?

O transporte de amostras de escarro deve ser feito em caixa própria, com as características apresentadas no exemplo da Figura 1:

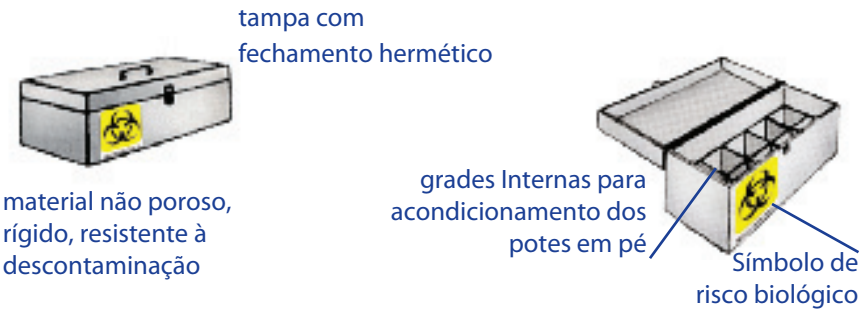



Figura 1 - Exemplo de caixa para transporte de amostras de escarro

## O preparo para o transporte, envolve os seguintes procedimentos:

1. conferir cada uma das solicitações com a amostra correspondente;
2. colocar os potes, com as tampas bem fechadas e voltadas para cima, dentro da caixa. **É recomendável** colocar cada um dos potes dentro de um saco plástico por questão de biossegurança. Desse modo, em caso de extravazamento da amostra, o risco biológico fica limitado ao saco plástico e não se espalha por toda a caixa;
3. acondicionar as solicitações correspondentes, dentro de um envelope protegido com um saco plástico bem fechado, e **enviá-las** junto com a caixa de transporte de amostras para o laboratório;
4. colocar a caixa com as amostras dentro de uma caixa térmica. Se o **tempo** de transporte for **superior** a **24 horas, coloque gelo** reciclável. Se o serviço **não** tiver gelo reciclável, **acondicione** cubos de gelo comum dentro de um saco plástico resistente e bem vedado. A quantidade de gelo utilizada deve corresponder a, no mínimo, 1/3 do volume (cubagem) da caixa térmica;
5. fechar a caixa térmica hermeticamente e prender firmemente com fita adesiva, em cima da tampa ou do lado externo da caixa, o envelope plástico com as solicitações. **Jamais** coloque as solicitações dentro da caixa junto com as amostras;
6. colar sobre a tampa ou do lado da caixa uma etiqueta com o nome e endereço do laboratório destinatário, nome da unidade de saúde remetente, endereço, telefone e fax;
7. entrar em contato com o laboratório destinatário para comunicar o envio das amostras. **Não** envie amostras às sexta-feiras, sábados, domingos e feriados a não ser que o destinatário autorize.

***Importante***

Se o laboratório estiver localizado em outro serviço é preciso **continuar** a preparação das amostras para o transporte, de acordo com os próximos passos:

# Recebimento e registro de amostras no laboratório

## Como receber e registrar amostras no laboratório?

1- Abra as caixas e verifique se os potes estão íntegros. Se tiver algum pote derramado, é importante que você:

- anote esse fato na requisição correspondente;
- peça nova amostra à unidade de saúde remetente;
- faça **imediatamente** o descarte dessa amostra, de acordo com as orientações de biossegurança;
- Se houver material derramado dentro da caixa, **antes** de tirar as outras amostras é preciso **envolver** os sacos plásticos contendo os potes em algodão embebido com **fenol a 5%,** fechar a caixa, **deixar** por **5 minutos**.
- Veja como preparar o fenol a 5% no bloco "Fórmulas";

2- retire as amostras da caixa, tire o saco plástico delas e coloque-as enfileiradas em cima de uma bandeja forrada com um papel absorvente (tipo papel toalha);

3- descarte os sacos plásticos e descontamine a caixa, seguindo os procedimentos do bloco "Biossegurança";

4- identifique a requisição correspondente a cada amostra;

5- 0bserve, olhando por fora do pote, sem abri-lo, o aspecto da amostra;

Confira, na Figura 1, os aspectos que podem ser observados nas amostras de escarro

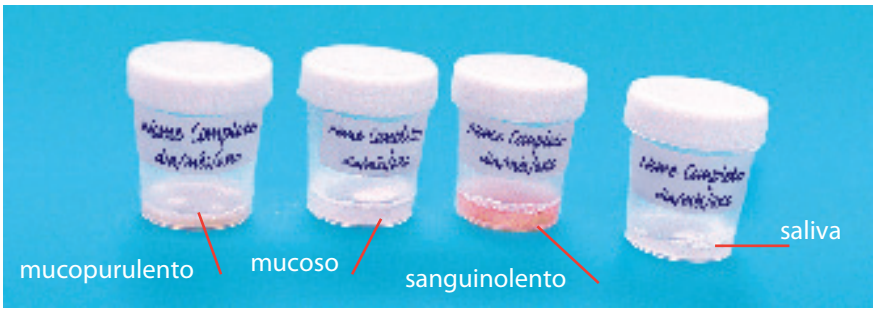



Figura 1 - Aspectos observados nas amostras de escarro

6- **registre** o aspecto observado no escarro, no campo apropriado da requisição correspondente;

7- deixe os potes na bancada e faça o **registro** das amostras do seguinte modo:

- pegue as solicitações e numere cada uma delas de acordo com a ordem seqüencial da numeração do livro de "Registro de baciloscopia para diagnóstico e controle da tuberculose". No **Anexo 3**, você encontra um exemplo de página desse livro;
- coloque as solicitações em ordem crescente seguindo o número seqüencial já registrado nelas;
- escreva os dados de cada uma das solicitações nos campos correspondentes no livro. **Lembre-se:** confira sempre se você registrou todos os dados de forma correta e completa.

8- escreva no corpo do pote da amostra o mesmo número que está na requisição correspondente;

9- prepare, fixe e faça a coloração do esfregaço, conforme descrito no bloco "Baciloscopia", deste manual.

***Atenção***

O laboratório deve processar a amostra de escarro no mesmo dia do recebimento. O prazo máximo para a liberação do resultado é de 24 horas.

***Importante***

As amostras de escarro coletadas para controle do tratamento devem ser processadas independentemente da qualidade e quantidade.

# Baciloscopia - preparação do esfregaço

## Onde são realizados os procedimentos para preparar o esfregaço?

O esfregaço pode ser preparado na bancada do laboratório desde que sejam atendidas as seguintes condições:

- bancada instalada em ambiente arejado;
- bico de Bunsen aceso entre o técnico e a amostra que está sendo manipulada, durante todos os procedimentos. **O calor da chama forma uma barreira de proteção** para os aerossóis formados durante a preparação do esfregaço. **Recomenda-se** que, sempre que possível, os procedimentos para preparação do esfregaço sejam realizados em **cabine de segurança biológica**.

Com exceção do bico de Bunsen aceso, os procedimentos na cabine ou na bancada, são os mesmos.

**Proteja-se dos riscos de contaminação:**

- utilize sempre Equipamentos de Proteção Individual - EPI;

Figura 1 - Equipamentos de proteção individual

- mantenha o bico de Bunsen aceso durante todos os procedimentos da preparação do esfregaço, realizados fora da cabine de segurança biológica;
- siga as orientações de biossegurança em todos os procedimentos.

## Quais os procedimentos recomendados para preparação do esfregaço?

O **esfregaço** pode ser **preparado** de duas formas:

- **após a digestão** da amostra com agentes mucolíticos e **centrifugação** (exame de escarro após concentração). Essa forma exige equipamentos e procedimentos específicos, apresentados no **Anexo 5** deste manual;
- por **distensão do escarro** diretamente sobre a lâmina (exame direto). Essa é a forma mais comum e universalmente utilizada. Você deve preparar o esfregaço para o exame direto, de acordo com os seguintes procedimentos:

***Atenção***

As lâminas têm que ser novas, sem uso. Lâminas arranhadas podem reter a fucsina e simular a presença de bacilos na amostra, confundindo a leitura.

1. verifique se as lâminas a serem utilizadas estão limpas. A limpeza da lâmina é feita antes de se iniciar a preparação do esfregaço, pois freqüentemente elas vêm de fábrica engorduradas pelo polimento. Nesse caso, é preciso:

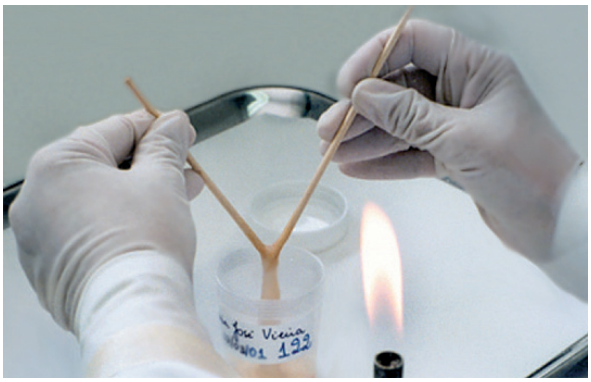
    - lavar essas lâminas com água e detergente neutro, enxaguá-las bem e depois colocá-las imersas em um recipiente com álcool etílico comercial e tampa. Você vai retirá-las e secá-las no momento do uso;

    - secar com gaze as lâminas que vão ser utilizadas. Pegue as lâminas pela borda fosca para não engordurá-las novamente;

2. forre a bancada com papel toalha ou outro capaz de absorver respingos;
3. providencie os materiais para preparar e fixar o esfregaço, e organize tudo na bancada de forma a assegurar um fluxo de trabalho lógico e seguro. **Mantenha** na bancada papel toalha ou jornal e fenol a 5%, para cobrir os respingos antes da desinfecção.
4. coloque enfileirados, na sua frente, os potes das amostras que vai processar primeiro. **Siga** o número de ordem delas. Para evitar trocas, **recomenda-se** processar no máximo 12 amostras de cada vez;
5. identifique uma lâmina para cada amostra. Para isso, escreva, com lápis grafite, na borda fosca da lâmina o mesmo número colocado no corpo do pote. **Coloque cada lâmina identificada exatamente em frente ao pote da amostra com o número correspondente;**
6. coloque, entre você e as amostras, uma bandeja de inox forrada com papel absorvente. Essa bandeja será sua área de trabalho para preparar cada esfregaço;

    - **Se estiver** trabalhando fora da cabine de segurança biológica, **acenda** o bico de Bunsen entre você e a bandeja. **Mantenha** a chama acesa até o final dos procedimentos. **Cuidado** para **não** se queimar!

7. coloque, em cima da bandeja, somente a lâmina e o pote da amostra que vai processar. Para evitar a troca de resultados, só continue depois de verificar se a **lâmina** e a **amostra** estão identificadas com o **mesmo número**;
8. tire **lentamente** a tampa da amostra, para evitar a formação de aerossóis, e **coloque-a** virada **para cima**, na bandeja;
9. quebre ao meio um palito de madeira;
10. retire, com as duas pontas farpadas do palito, a partícula maior e mais purulenta da amostra e deposite-a na lâmina próximo à borda fosca.



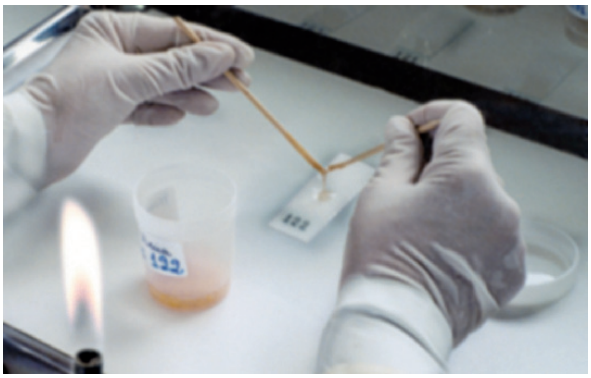


Figura 2 - Exemplo de retirada da partícula da amostra de escarro e colocação na lâmina.

- Quando existirem apenas pequenas partículas purulentas ou mucosas, você deve pegar três porções ou mais, depositá-las na lâmina e misturá-las com a ponta do palito.

11. distenda a amostra na lâmina, com uma das partes do palito em posição horizontal. **Faça** movimentos de vai-e-vem em cima da amostra, até obter um esfregaço **homogêneo** que cubra **2/3** da lâmina, **sem deixar espaços vazios**.

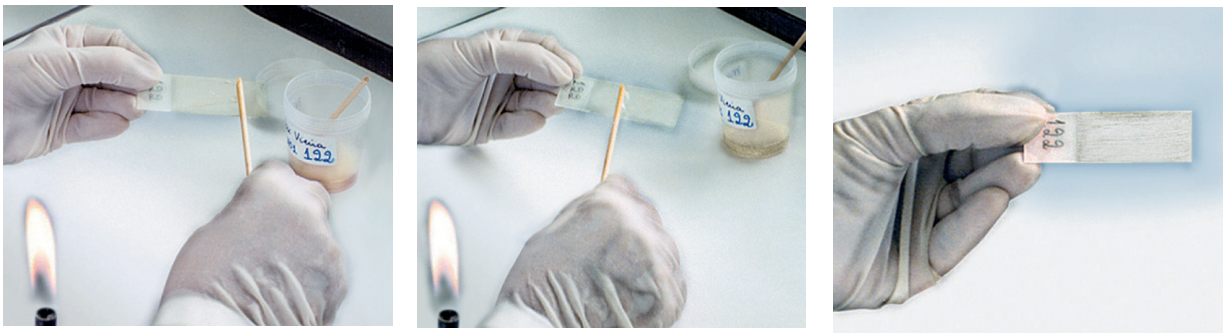


Figura 3 - Distensão da amostra

- **jamais** aqueça a lâmina durante a preparação do esfregaço. Esse procedimento é uma fonte importante de formação de aerossóis no ambiente laboratorial e, além disso, produz precipitados granulosos que prejudicam a coloração e a detecção do bacilo.

***Atenção***

Esfregaços muito finos ou muito grossos dificultam a leitura e podem levar a resultados falso negativos. Por isso, se houver **excesso** de escarro na lâmina, **retire**, com o mesmo palito, e devolva para o pote. Se o esfregaço ficar muito **fino**, **pegue mais** amostra e **repita** os passos **10 e 11**.

12. descarte as duas partes do palito, num recipiente com tampa. O recipiente para descarte pode ser de metal, (uma lata, por exemplo), vidro ou uma caixa de papelão rígido. **Coloque** sempre um saco plástico autoclavável dentro do recipiente utilizado para descarte;
13. coloque a lâmina, com o esfregaço voltado para cima, para secar em temperatura ambiente, numa superfície forrada com papel seco. Você pode usar uma outra bandeja em cima da bancada. **Cuidado** para **não** tocar na superfície da lâmina e remover o esfregaço;
14. feche bem o pote da amostra, já utilizada, e coloque-o num espaço reservado na bancada para as amostras já trabalhadas;
15. repita os passos de **7 a 14**, até processar todas as amostras;
16. guarde, em geladeira, as amostras processadas. Os potes com as amostras devem ficar guardados até a liberação dos resultados, para o caso de ser necessário repetir a baciloscopia ou realizar a cultura.

***Importante***

Quando as lâminas estiverem completamente secas, fixe o esfregaço.

## Como fixar o esfregaço?

É preciso fixar o esfregaço, de acordo com os seguintes procedimentos:

1. pegue a lâmina, com o esfregaço voltado para cima, e passe-a **rapidamente,** por **3 vezes,** sobre a chama do bico de Bunsen;
2. coloque a lâmina, com o esfregaço voltado para cima, numa bandeja. As lâminas devem ser colocadas umas separadas das outras;
3. repita os procedimentos **1 e 2** até fixar todos os esfregaços processados;

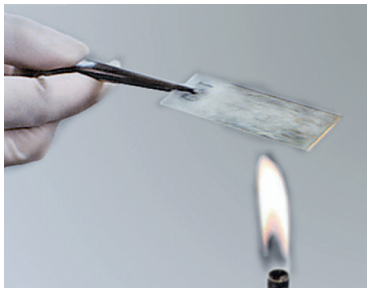


Figura 4 - Fixação do esfregaço

***Atenção***

Aquecimento excessivo pode danificar o bacilo e prejudicar a leitura da lâmina; aquecimento insuficiente pode impedir a fixação.

4. descarte o papel que está forrando a bancada de trabalho e **faça** a descontaminação seguindo os procedimentos de biossegurança;

- Depois da fixação, os esfregaços ficam aderidos às lâminas e estão prontos para a coloração.
- Em unidades de saúde que apenas preparam e fixam os esfregaços, as lâminas devem ser acondicionadas, em caixa própria, e enviadas ao laboratório que realizará a coloração e a leitura.

## Como transportar as lâminas com esfregaços já fixados para o laboratório que vai fazer a coloração e a leitura?

O transporte dos esfregaços fixados deve ser feito em caixa plástica porta-lâmina, bem vedada com fita crepe e identificada com os nomes e endereços dos laboratórios destinatário e remetente.

Figura 5 - Caixa plástica porta-lâmina

***Cuidado***

Mesmo após a fixação ainda podem existir bacilos viáveis no esfregaço. Siga as normas de biossegurança para o transporte e identifique a caixa com o símbolo de risco biológico.

# Baciloscopia - coloração

## Quais os métodos de coloração recomendados na baciloscopia?

**Recomenda-se** a utilização rotineira do método de Ziehl-Neelsen, uma vez que ele **possibilita** a identificação mais segura de BAAR; exige apenas microscópio óptico comum; é **rápido** e de **baixo custo.**

No entanto, se forem examinadas **mais de 50 amostras de escarro diariamente**, pode-se optar pela utilização da Microscopia por Fluorescência com Auramina O com o objetivo de triagem, para reduzir o tempo de leitura dos exames negativos.

Nos casos positivos, corados com a auramina, os exames deverão ser confirmados pelo método de Ziehl-Neelsen. Isso permitirá a emissão do resultado de acordo com os critérios de leitura padronizados para o método de Ziehl-Neelsen, pela **Organização Mundial de Saúde - OMS**, que você vai ver na continuação desse bloco.

### Em que se baseia o método de coloração de Ziehl-Neelsen?

Baseia-se na propriedade da álcool-ácido resistência. Veja na Figura 1:

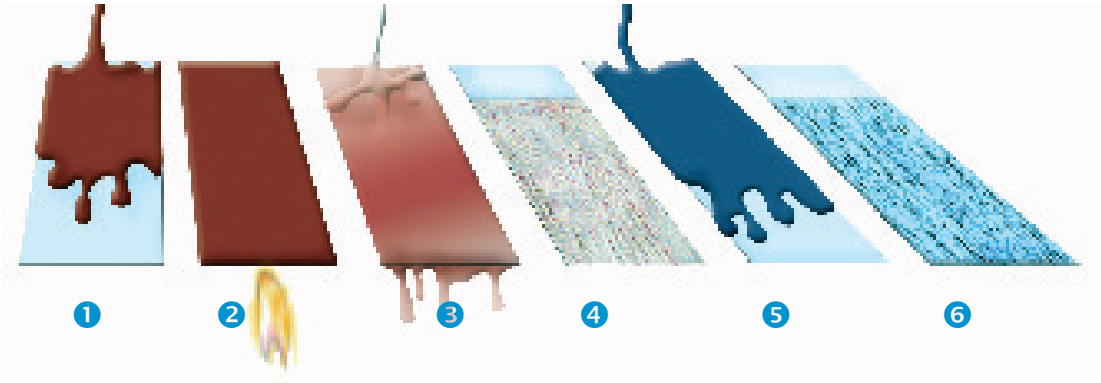



Figura 1 - Representação esquemática das etapas da coloração pelo método de Ziehl-Neelsen

Observe que:

- **na etapa 1**, adiciona-se a fucsina sobre o esfregaço previamente fixado;
- **na etapa 2**, faz-se o aquecimento até a emissão de vapores, por 3 vezes, para facilitar a penetração da fucsina;
- **na etapa 3**, derrama-se o corante na pia e lava-se o esfregaço com água;
- **na etapa 4**, faz-se a descoloração com álcool-ácido e lava-se o esfregaço com água. Apenas os BAAR presentes no esfregaço reterão a fucsina;
- **na etapa 5**, adiciona-se azul de metileno;
- **na etapa 6**, lava-se o esfregaço com água e faz-se a leitura.

Se houver BAAR na amostra eles ficarão vermelhos devido à retenção da fucsina e serão visualizados microscopicamente. O fundo azul no esfregaço, faz o contraste para essa visualização.

Se **não** houver BAAR na amostra, a fucsina será retirada e todos os **elementos** do esfregaço serão **visualizados** em **azul**.

## Como corar os esfregaços pelo método de Ziehl-Neelsen?

1. Providencie os materiais para corar, descorar e fazer a coloração de fundo. **Organize** tudo em cima da bancada da pia;
2. coloque as lâminas já fixadas no suporte para corar;
3. coloque papel de filtro num funil de vidro e filtre a fucsina fenicada a 0,3%, dentro de um frasco conta-gotas.

   - **É fundamental** filtrar a fucsina, na hora do uso, para retirar os cristais que se formam nela e prejudicam a coloração dos esfregaços.
   - **Filtre** apenas o volume suficiente para cobrir os esfregaços das lâminas que você vai corar;

4. **cubra**, com a fucsina filtrada, todo o esfregaço de cada uma das lâminas;
5. enrole um chumaço de algodão na ponta de uma haste de metal, com proteção contra aquecimento na outra extremidade;
6. umedeça o algodão com álcool. **Cuidado** para **não** escorrer álcool na haste. **Mantenha** o álcool longe do fogo;
7. coloque fogo no algodão umedecido com álcool;
8. aqueça a fucsina do seguinte modo:

**a)** passe a chama **lentamente** por debaixo das lâminas, **até ocorrer a emissão de vapores**. **Retire** a chama **imediatamente** e **marque** o tempo de **5 minutos**;

b)Passe novamente a chama por debaixo das lâminas até a emissão de vapor. Repita esta operação mais uma vez.

- No **total**, você passa a chama lentamente por debaixo da lâmina até a emissão de vapores, por **3 vezes**, no tempo **máximo de 5 minutos**.

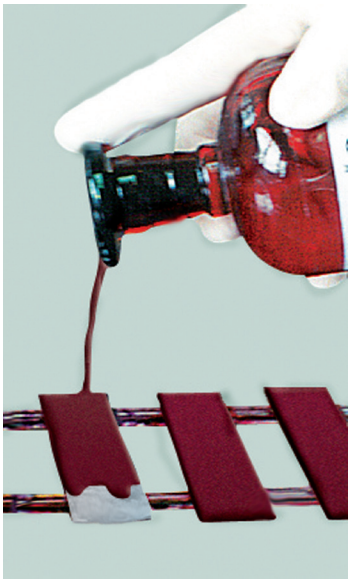


Figura 1 - Colocação da fucsina na lâmina

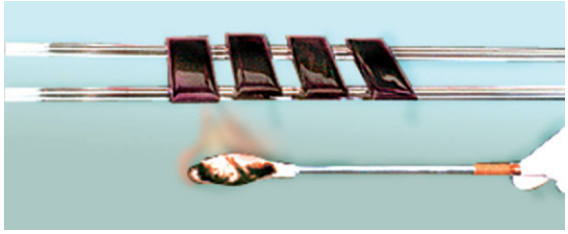


Figura 2 - Aquecimento da fucsina na lâmina

***Atenção***

A fucsina **não** pode ferver e deve cobrir o esfregaço durante todo o processo. Se ela evaporar ou derramar durante o aquecimento, **coloque** mais fucsina sobre o esfregaço e continue o procedimento. Se a fucsina ferver ou ficar seca na lâmina, serão formados cristais que poderão ser confundidos com bacilos na leitura.

9. incline cada uma das lâminas e derrame a fucsina na pia. Cuidado para não respingar fucsina de uma lâmina nas outras.
10. abra devagar a torneira até obter um filete de água corrente;
11. deixe a água cair sobre o número da lâmina, para que escorra suavemente sobre o esfregaço até eliminar todo o corante.

Figura 3 - Lavagem da fucsina em água corrente

***Cuidado***

Jatos fortes de água podem desprender o esfregaço.

12. lave a lâmina também no lado oposto ao esfregaço para tirar a fucsina;
13. coloque a lâmina de volta no suporte com o esfregaço voltado para cima.

## Como descorar o esfregaço pelo método de Ziehl-Neelsen?

1. Cubra completamente todas as lâminas com a solução de álcool-ácido a 3% e **espere 1 minuto**;
2. segure pela borda numerada e incline a lâmina até derramar a solução de álcool-ácido na pia;
3. deixe o filete de água corrente cair sobre o número da lâmina, para que escorra suavemente sobre o esfregaço eliminando o álcool-ácido;

***Atenção***

Os procedimentos de **1 a 3 não** devem ultrapassar **3 minutos** no trabalho com 12 lâminas.

4. verifique se os esfregaços ficaram descorados. Considera-se **descorado** o esfregaço que apresentar **coloração esbranquiçada** ou **levemente rosada**.

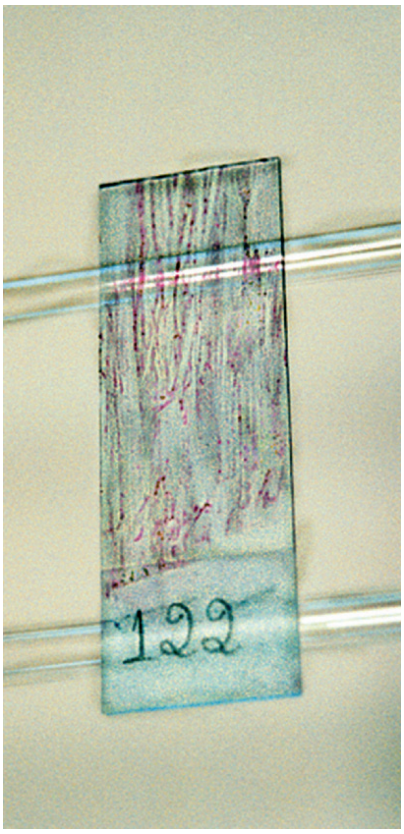



Figura 4 - Esfregaço descorado

Se algum esfregaço ainda **não estiver descorado**, faça **uma segunda** descoloração de acordo com os seguintes procedimentos:

- **a)** cubra novamente a lâmina com álcool-ácido;
- **b)** pegue, com a pinça, a lâmina pela extremidade numerada e **faça**, no máximo por **1 minuto**, um **movimento de vai-e-vem inclinando de um lado para o outro**, de modo que a solução de álcool-ácido vá descorando o esfregaço. Quando o esfregaço adquirir a cor ligeiramente rosada, **lave** a lâmina com um filete de água

***Atenção***

Se na segunda descoloração o esfregaço não ficar descorado **descarte** essa lâmina e **prepare** um novo esfregaço. **Depois de descorar os esfregaços, faça a coloração de fundo.**

## Como realizar a coloração de fundo?

1. Coloque papel de filtro num funil de vidro e filtre o azul de metileno a 0,3 % num frasco conta-gotas. Filtre apenas o volume suficiente para cobrir o esfregaço das lâminas;
2. Cubra os esfregaços das lâminas com o azul de metileno já filtrado. **Espere 30 segundos**;

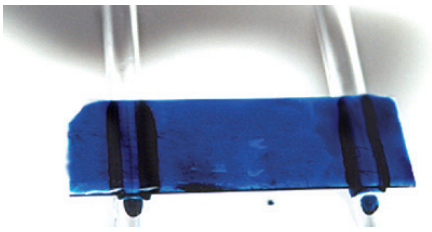


Figura 5 - Lâmina com azul de metileno.

3. derrame o azul de metileno na pia;
4. **lave** cada lâmina em um filete de água corrente;

Figura 6 - Lavação da lâmina com azul de metileno.

5. umedeça uma gaze com álcool etílico comercial, e **limpe** a lâmina do lado contrário ao esfregaço. **Cuidado** para não tocar no esfregaço.
6. coloque cada uma das lâminas para secar, em pé, em uma estante de tubos forrada com papel absorvente, de preferência papel de filtro.

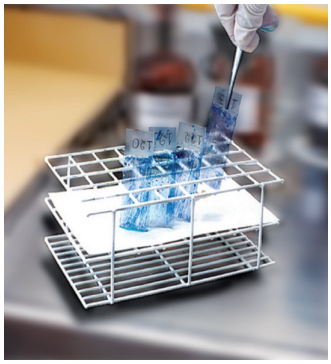


Figura 7 - Lâminas em estante de tubos para secar depois da coloração de fundo

***Atenção***

A estante não deve ficar exposta à luz solar. Quando as lâminas estiverem secas faça a leitura microscópica e a interpretação.

**Lembre-se de limpar a pia depois da coloração.**

# Baciloscopia - Leitura e interpretação dos resultados

## Como os BAAR podem se apresentar na visualização microscópica?

No método Ziehl-Neelsen, além da coloração vermelha, os bacilos podem se apresentar isolados, em grupos ou fragmentados. Veja na Figura 1:

Figura1 - Formas de apresentação dos BAAR na visualização microscópica.

**Observe que:**

- os BAAR, mesmo isolados, podem estar longitudinalmente muito próximos, em uma disposição que lembra um acento circunflexo. Essa imagem é indicativa da etapa final da multiplicação bacilar;
- a quantidade de bacilos existentes nos agrupamentos é variável. **Lembre-se**: o aspecto agregado dos bacilos é devido à produção do "fator corda";
- o aspecto fragmentado é encontrado com freqüência nas baciloscopias de controle de tratamento. A fragmentação é decorrente, principalmente, da perda da integridade da parede celular do bacilo, pela ação das drogas do tratamento antituberculose ou tuberculostáticos.

## Quais os critérios para interpretação dos resultados da baciloscopia, padronizados para o método de Ziehl-Neelsen pela Organização Mundial da Saúde?

**Em amostras de escarro, quando:**

- **não** são encontrados BAAR em **100 campos** = relata-se o resultado como **negativo**;
- são encontrados de **1 a 9** BAAR em **100 campos** = relata-se apenas a **quantidade** de BAAR **encontrada**;
- são encontrados de **10 a 99** BAAR, em **100 campos** = relata-se o resultado como **positivo +**;
- é encontrada em **média de 1 a 10** BAAR **por campo, nos primeiros 50 campos** observados = relata-se o resultado como **positivo ++**;
- é encontrada em **média mais de 10** BAAR **por campo, nos primeiros 20 campos** observados = relata-se o resultado como **positivo +++**.

**Em outras amostras, quando:**

- **não** são encontrados BAAR = relata-se o resultado como **negativo**;
- são encontrados BAAR em **qualquer quantidade, em 100 campos** = relata-se o resultado como **positivo**.

# Leitura e interpretação da baciloscopia - Método Ziehl-Neelsen

## Como fazer a leitura do esfregaço?

**Limpe o microscópio, objetivas e oculares, antes do uso.**

Verifique se os materiais necessários estão na mesa de leitura. **Siga** a ordem crescente de numeração das lâminas para fazer a leitura;

1. Verifique se os materiais necessários estão na mesa de leitura. **Siga** a ordem crescente de numeração das lâminas para fazer a leitura;
2. registre, no papel quadriculado, o nº da lâmina e se é para diagnóstico ou controle do tratamento;

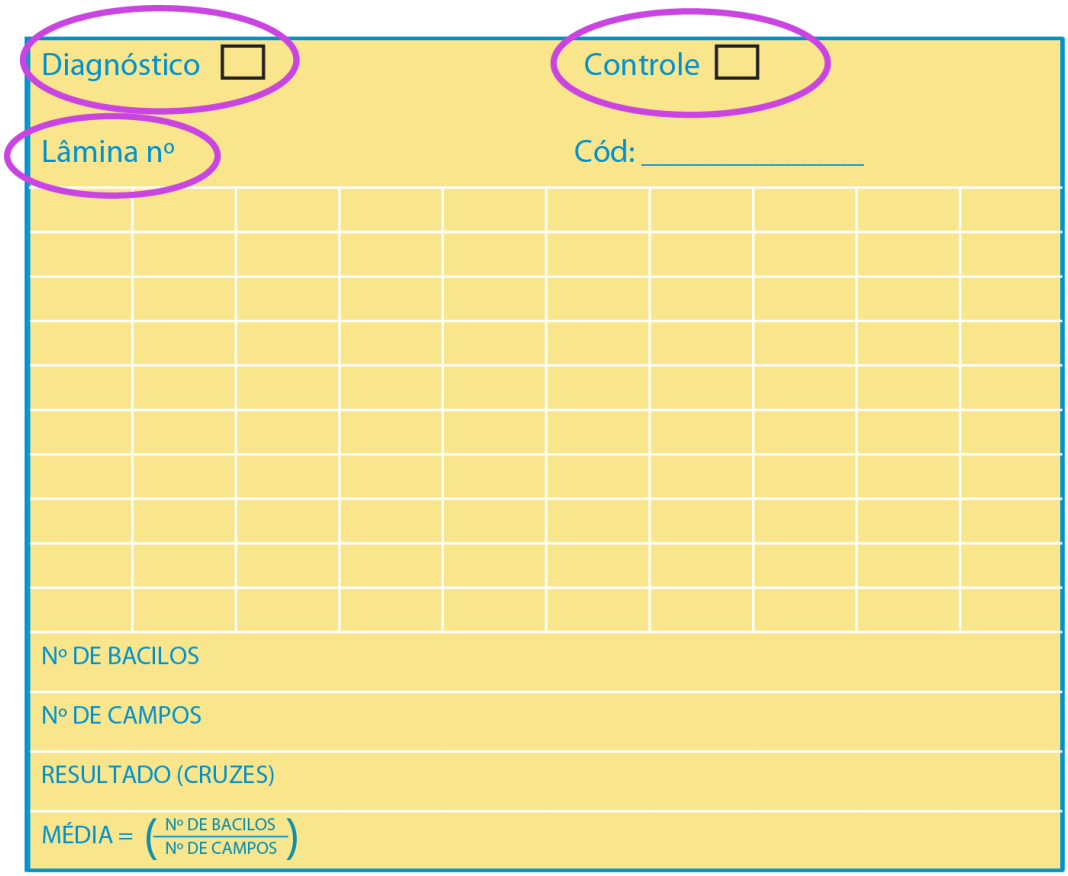



Figura 2 - Registro da leitura

**No ANEXO 10 você tem modelos de registros da leitura para impressão.**

3. pingue uma gota de óleo de imersão, próximo ao número e no centro da lâmina. Você vai fazer a leitura em linha reta e no sentido horizontal;

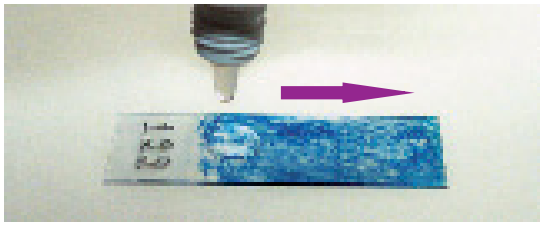


Figura 3 - Gota de óleo e sentido de leitura da lâmina

> ***Cuidado***
>
> Para não tocar o conta-gotas no esfregaço. Se isso acontecer, alguns bacilos poderão ser transferidos para o óleo e daí para a próxima lâmina e serem causa de resultado falso positivo. Por isso, se necessário, **descarte** todo o óleo e limpe o conta-gotas álcool antes de utilizá-lo novamente.

4. Coloque a lâmina no charriot do microscópio;
5. gire o canhão até que a objetiva de 10X esteja sobre a lâmina, **foque** a imagem com os botões macro e micrométricos;
6. ajuste a distância entre as lentes oculares de acordo com a distância entre seus olhos, de modo que você enxergue apenas uma imagem;
7. gire o botão para ajustar a altura do condensador e abra o diafragma para obter uma boa luminosidade;
8. troque a objetiva de 10X pela objetiva de 100X imergindo-a no óleo;
9. aproxime a objetiva de 100X lentamente para não quebrar a lâmina;
10. ajuste o foco com o botão micrométrico até que a imagem fique nítida. Durante toda a leitura você deve ir ajustando o foco apenas com esse botão;
11. divida mentalmente o campo microscópico, que você está visualizando, em quatro quadrantes, utilizando os números 12, 3, 6 e 9, como no mostrador de um relógio.

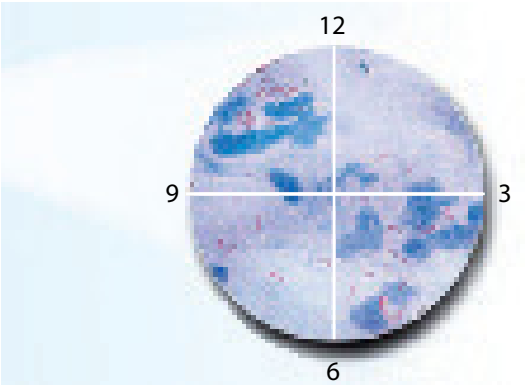



Figura 4 - Divisão imaginária do campo microscópico

12. inicie a leitura pelo quadrante superior direito, entre os números 12 e 3. Utilize o botão micrométrico para verificar a presença de BAAR na superfície e em profundidade. Se você encontrar bacilos neste quadrante, conte quantos existem;
13. continue a leitura dos outros quadrantes no sentido dos ponteiros do relógio. Sempre que encontrar bacilos em um quadrante, conte cada um deles e some ao número total de bacilos que você encontrou nos outros quadrantes;

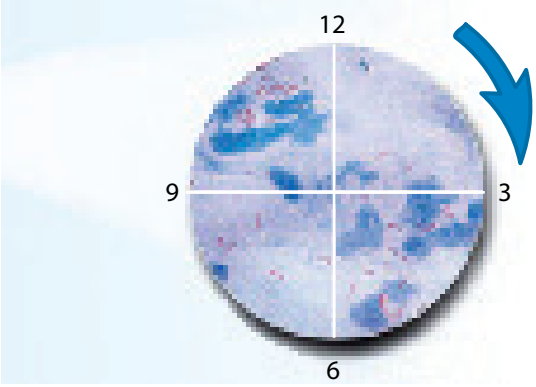
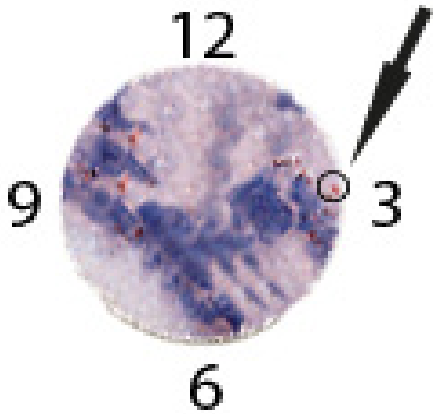



Figura 5 - Divisão imaginária do campo microscópico

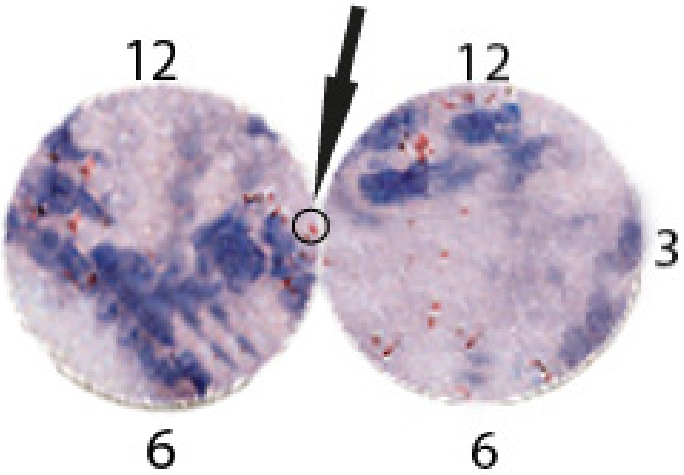
14. anote no papel quadriculado o número total de bacilos que foram encontrados nesse campo:
15. divida mentalmente o próximo campo microscópico em quatro quadrantes, faça a leitura e anote os resultados no papel quadriculado, da mesma maneira que você fez no primeiro campo;

## Atenção

**Para separar um campo microscópico do próximo sem que fiquem sobrepostos, o ponto chave é o do número 3.**




**Qualquer estrutura observada nesse ponto, uma célula, uma fibra, um bacilo, deverá ficar imediatamente antes do número 9 do campo seguinte.**




Campo anteriror Campo seguinte

16. faça a leitura e anote os resultados até **completar 20 campos**, seguindo os mesmos procedimentos;
17. some os resultados dos 20 campos e calcule a **média**;

18. analise a **média** obtida para os resultados nos **20 primeiros campos** observados, considerando as seguintes possibilidades:

- se a **média** for de **mais de 10** BAAR **por campo**, estará encerrada a leitura. Essa amostra é **positiva +++**;

Diagnóstico [X] Controle [ ]

Lâmina nº 122 Cód: _____

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 15 | 81 | 01 | 37 | | 12 | 18 | 94 | | 6 |
| 25 | 19 | 12 | 30 | 18 | 10 | 13 | 11 | 81 | 3 |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |

Nº DE BACILOS: 261

Nº DE CAMPOS: 20

RESULTADO (CRUZES): +++

MÉDIA = $\frac{261}{20}$ = 13,05

Figura 6 - Papel quadriculado com resultado da leitura de 20 campos e cálculo da média

- se a **média** for **inferior a 10** BAAR **por campo** ou **não** contiver BAAR, **continue** a leitura até **completar 50 campos.**

19. faça a leitura e anote os resultados até **completar 50 campos**, seguindo os mesmos procedimentos;

20. some os resultados dos 50 campos e calcule a média;

21. analise a **média** obtida para os resultados dos **50 campos observados**, considerando as seguintes possibilidades:

- se a **média** for de **1a10** BAAR **por campo**, estará encerrada a leitura. Essa amostra é **positiva ++**;

Diagnóstico [X] Controle [ ]

Lâmina nº 123 Cód: _____

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | 2 | 4 | 1 | - | 2 | - | 3 | 5 | 8 |
| 2 | - | - | 3 | 4 | 6 | 2 | - | 3 | 1 |
| 4 | 3 | - | 2 | 1 | 5 | 7 | 2 | - | 4 |
| - | 2 | 3 | 5 | 7 | 4 | - | 3 | 1 | 2 |
| - | 3 | 4 | 6 | - | 2 | 1 | - | 4 | 3 |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |

Nº DE BACILOS: 129

Nº DE CAMPOS: 50

RESULTADOS (CRUZES): ++

MÉDIA = $\frac{129}{50}$ = 2,5

Figura 7 - Papel quadriculado com resultado da leitura de 50 campos e cálculo da média.

- se a **média** for **inferior a 1** BAAR **por campo** ou **não** contiver BAAR, **continue** a leitura até **completar 100 campos.**

22. faça a leitura e anote os resultados até completar 100 campos, seguindo os mesmos procedimentos;
23. some e analise os resultados dos 100 campos considerando as seguintes possibilidades:
    - se for encontrado um **total de 10 a 99** BAAR nos **100 campos** examinados, estará encerrada a leitura. Essa amostra é **positiva +**;
    - se for encontrado um **total de 1 a 9** BAAR nos **100 campos** examinados, **relate o número exato** de BAAR encontrados;
    - se **não** forem encontrados BAAR, nos **100 campos** observados, essa amostra é **negativa.**

| Diagnóstico | | | | | Controle | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Lâmina nº 124 | | | | | Cód: _____ | | | | |
| – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Nº DE BACILOS: 0 | | | | | | | | | |
| Nº DE CAMPOS: 100 | | | | | | | | | |
| RESULTADO (CRUZES): negativo | | | | | | | | | |
| MÉDIA = ---------- = | | | | | | | | | |

Figura 8 - Papel quadriculado com resultado negativo da leitura de 100 campos

## Repita todos os procedimentos de leitura e interpretação da baciloscopia para cada uma das lâminas a serem lidas.

***Atenção***

**Limpe** bem a lente da objetiva com papel absorvente cada vez que terminar a leitura de uma lâmina positiva. **Lembre-se:** você pode carregar fragmentos de esfregaço na lente de uma lâmina para outra. Isto pode ser causa de resultado falso positivo.

## Como proceder com as lâminas quando terminar a leitura?

1. Limpe as lâminas, depois de lidas, pressionando levemente o esfregaço com papel absorvente. **Cuidado** para não remover o esfregaço;
2. coloque as lâminas, organizadas em seqüência numérica, dentro de uma caixa porta-lâminas, identificada com o símbolo de risco biológico, o mês e o nome do laboratório e do município;
3. Conserve a caixa com as lâminas, em temperatura ambiente, por **3 meses**. Durante este período o Laboratório Central -LACEN ou regional, pode solicitar que elas sejam enviadas para o controle de qualidade externo. O envio é feito junto com a "Relação de Lâminas para Controle de Qualidade", formulário padronizado que você encontra no **Anexo 6**. **Veja** mais orientações no bloco "Controle de Qualidade".

***Biossegurança***

**Descarte** todos os potes com o resto das amostras (que você guardou na geladeira) e todo o lixo produzido durante os procedimentos, de acordo com as orientações de biossegurança.

## Como fazer o registro dos resultados?

Faça o registro dos resultados, de acordo com os seguintes procedimentos:

1. organize as solicitações de exame em ordem numérica;
2. transcreva o resultado anotado no quadriculado para sua respectiva requisição; **Muita atenção** na transcrição, para **não** haver troca de resultados;
3. confira o resultado transcrito em cada requisição;
4. pegue as solicitações e faça o registro dos resultados no livro de registro de baciloscopia. Os resultados positivos devem ser registrados em vermelho para permitir uma rápida localização. Veja um exemplo, no **Anexo 3;**
5. confira a transcrição do registro e coloque a data da liberação do exame no livro;
6. date, assine e encaminhe, imediatamente, a requisição com o resultado transcrito para entrega ao paciente ou à unidade de saúde solicitante.

O laboratório deverá enviar para o laboratório de referência, o **Informe Mensal da Baciloscopia de Tuberculose**, formulário padronizado, que você encontra no **Anexo 7**. Além disso, todo laboratório deve **notificar** os casos **positivos** para BAAR à Vigilância Epidemiológica local.

## Como realizar a baciloscopia pelo método da fluorescência?

No **Anexo 8**, você encontra orientações para corar, descorar, fazer a coloração de fundo, a leitura e a interpretação pelo método da fluorescência.

**É dever do laboratório: liberar o resultado da baciloscopia em no máximo 24 horas.**

***Atenção***

**É um direito do paciente: receber** seu resultado o mais **rápido** possível e, se o escarro estiver **positivo**, **iniciar o tratamento** imediatamente para que possa **recuperar** sua saúde e **não** contaminar outras pessoas.

# Anexo 6

## Relação de lâminas para controle de qualidade externo

| Programa de Garantia da Qualidade da Baciloscopia Relação de Lâminas para Controle de Qualidade Externo | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Laboratório: | | | | | | | |
| Município: | | | | UF: | | | |
| Mês: | | | | Ano: | | | |
| Informação do laboratório local | | | | Resultados do controle de qualidade externo | | | |
| Nº da lâmina | ÁREA PARA DOBRAR | Resultado (1) | Obs. (2) | Baciloscopia (3) | Numeração (4) | Esfregaçõ (5) | Coloração (6) |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

**Total de baciloscopias realizadas:**

(**1**) Resultado da Baciloscopia no laboratório local: anotar **negativo** ou **positivo** (em cruzes), ou **nº de bacilos** = ou < que 9

(**2**) **Observações**: anotar o tipo de amostra quando não escarro;

(**3, 4, 5 e 6**): campos preenchidos pelo supervisor

O espaço marcado como **área para dobrar** deve ser dobrada e grampeada, de modo que o número da lâmina cubra o resultado. Faça isso antes do envio ao laboratório supervisor, para que a releitura das lâminas seja feita sem a informação prévia do resultado.

# Baciloscopia e biossegurança

## Quais os requisitos de biossegurança para as instalações do laboratório que realiza diagnóstico da tuberculose?

As instalações do laboratório que realiza diagnóstico da tuberculose, devem atender aos seguintes requisitos:

1. requisitos gerais exigidos para qualquer laboratório de diagnóstico, ou seja, paredes, pisos e bancadas laváveis e apenas os equipamentos e materiais necessários aos procedimentos, para facilitar a limpeza e a descontaminação além de evitar acidentes, como você pode ver no curso Telelab "Biossegurança em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública";
2. requisitos específicos para o diagnóstico laboratorial da tuberculose. Esses requisitos variam de acordo com o exame realizado, ou seja, se baciloscopia e/ou cultura.

## Quais os requisitos de biossegurança específicos para as instalações do laboratório que realiza a baciloscopia?

As instalações do laboratório que realiza a baciloscopia devem atender, no mínimo, aos seguintes requisitos de biossegurança:

1. área de recepção de amostras o mais perto possível da sala de procedimentos;
2. área equipada com autoclave para descontaminação de materiais;
3. áreas para procedimentos limpos como: atividades administrativas, armazenamento de materiais;
4. áreas para armazenamento e preparo de corantes, desinfetantes e soluções, equipada com **capela de exaustão química**;

**Capela de exaustão química:** é um equipamento que protege os profissionais na manipulação de substâcias que liberam vapores tóxicos ou irritantes.

***Atenção***

Jamais prepare os corantes e as outras soluções fora da capela de exaustão química. O fenol é irritante para os olhos e cancerígeno. Se o laboratório **não** dispuser dessa capela, os corantes e o fenol a 5% deverão ser preparados e distribuídos pelo laboratório de referência.

5. ambiente adequado para a preparação do esfregaço. Esse ambiente pode ser conseguido de dois modos:

- sala de procedimentos equipada com cabine de segurança biológica. **Sempre** que possível, deve-se utilizar a cabine para a preparação do esfregaço.
- bancada instalada em sala arejada e apropriada para a preparação do esfregaço.

## Que condições deve atender a sala da preparação do esfregaço?

**Sala ventilada**, com janelas que possibilitem a renovação natural de ar e a entrada de luz solar. A localização da sala e o posicionamento das janelas, porta e bancada devem facilitar a circulação do ar e a dispersão dos aerossóis, diminuindo o risco de contaminação para o técnico, sem expor as pessoas que estão em outras áreas.

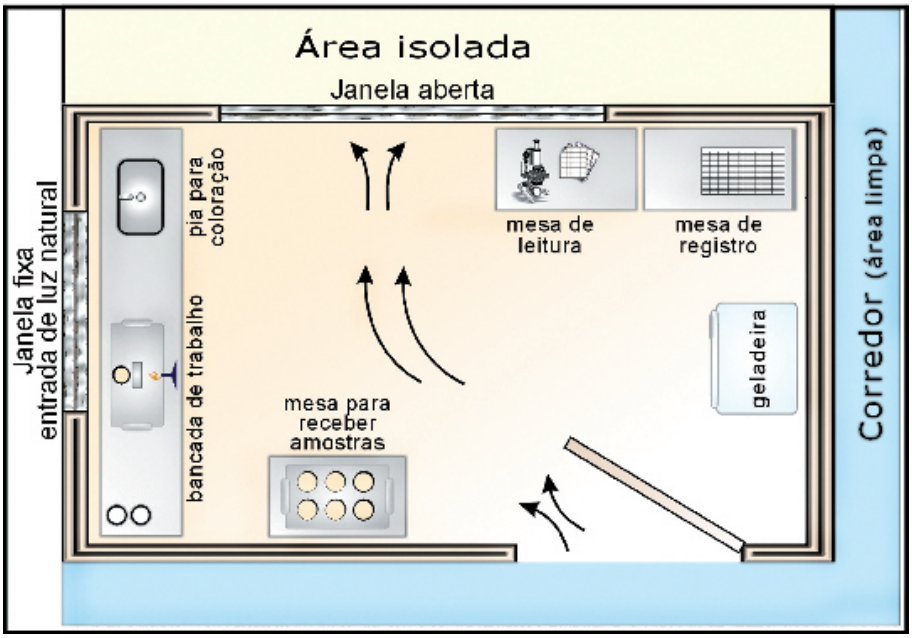



Figura 1 - Exemplo de planta da sala de baciloscopia

**Observe** que o ar potencialmente contaminado sai pela janela e se dispersa numa área isolada, no exterior da unidade. **O ideal** é que esta sala seja **exclusiva** para a baciloscopia.

Onde **não** houver condições apropriadas de ventilação, **recomenda-se** também a instalação de um exaustor, com capacidade de 6 a 12 ciclos por hora, para facilitar a retirada do ar contaminado do ambiente laboratorial.

## Como diminuir o risco de contaminação por aerossóis contendo o bacilo, durante a baciloscopia do escarro?

Para diminuir o risco de contaminação pelos aerossóis formados durante a manipulação da amostra, **é fundamental** que as instalações do laboratório estejam de acordo com os requisitos mínimos de biossegurança, já apresentados.

**É importante** destacar que quando a baciloscopia é realizada fora da cabine de segurança biológica, os aerossóis produzidos durante a manipulação da amostra se espalham no ambiente. **Quanto mais arejado** estiver o ambiente e quanto mais rigorosamente os profissionais responsáveis pelo trabalho, técnicos e chefias, observarem as **medidas de biossegurança recomendadas**, **menor o risco** de contaminação.

Na **cabine de segurança biológica**, os aerossóis formados se concentram e ficam retidos nos filtros, não se espalhando no ambiente laboratorial. No entanto, o **uso inadequado** da cabine, com **excesso de materiais** e **equipamentos** em seu interior, e a **falta de manutenção** favorecem a **saída** de **aerossóis** para o ambiente laboratorial. Nesse caso, a cabine deixa de proteger o profissional e o ambiente, e o risco de contaminação aumenta, uma vez que salas com esse tipo de equipamento não possuem fluxo de ar constante.

**Utilize** sempre EPI - equipamentos de proteção individual

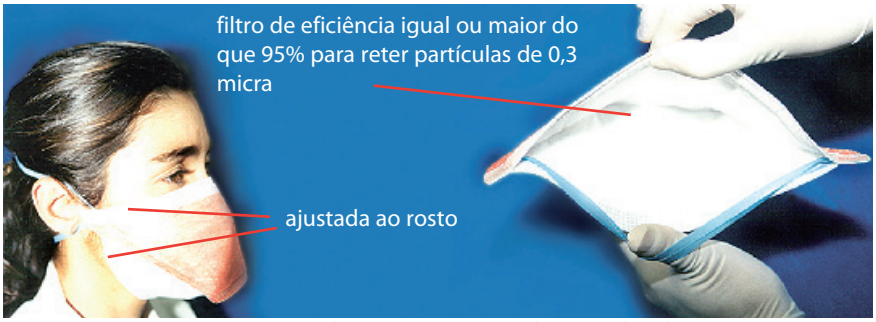



Figura 2 - Características da máscara apropriada para a baciloscopia

**Atenção:**

- **só utilize máscaras com filtro aprovado para reter partículas de 0,3 micra, com eficiência igual ou maior do que 95%; e**
- **que esteja bem ajustada ao seu rosto, sem deixar vãos para a entrada de ar.**

## Que medidas de biossegurança devem ser observadas na recepção da amostra no laboratório?

O uso de luvas, máscaras e aventais deve sempre fazer parte da rotina de recebimento, uma vez que os potes ou recipientes com amostras de escarro são contaminados em sua parte externa. Uma recepção envidraçada, que permita apenas a passagem da amostra e da requisição de exames, representa uma medida de proteção complementar. As amostras devem ser colocadas em uma bandeja com as requisições ao lado.

## Que medidas de biossegurança devem ser observadas durante o transporte das amostras da recepção até a área de procedimentos ou de exames?

É importante adotar as seguintes medidas de biossegurança:

1. transportar as amostras em caixa própria com tampa, preferencialmente de metal, para que possa ser descontaminada posteriormente por métodos químicos (fenol 5%) ou físicos (autoclave). Em caso de acidente, o risco de contaminação fica limitado à caixa de transporte;
2. escolher o caminho mais curto e com menos obstáculos.

## Que medidas de biossegurança específicas devem ser adotadas durante a realização da baciloscopia?

- uso de EPI para a realização dos procedimentos;
- ambiente arejado e bico de Bunsen permanentemente aceso entre o técnico e a amostra ou uso de cabine de segurança biológica.

**Além dessas**, é **fundamental** também a **adoção** das seguintes medidas:

1. manter um frasco com fenol a 5%, fechado, na bancada, próximo a área de trabalho, para as desinfecções e a contenção de acidentes, quando necessário;
2. manipular amostras cuidadosamente, ou seja, **sem pressa** e **sem movimentos bruscos** para **evitar** a **produção** de aerossóis e o **derrame** para fora do recipiente;
3. utilizar palitos de madeira para a preparação do esfregaço. **Jamais** utilize alça de platina, pois a flambagem da alça é o procedimento que mais produz aerossóis;
4. manter na bancada um recipiente, de metal, vidro ou caixa de papelão rígido, com tampa e um saco autoclavável dentro, para descarte de material - palitos, algodão;
5. colocar os potes de escarros, os papéis utilizados durante o procedimento para forrar a bancada e as bandejas, etc. num saco de autoclavação ou caixa com tampa que resista a autoclavação;
6. autoclavar o material reutilizável (bandejas, etc.) e o lixo produzido, antes de encaminhar para o descarte final.

***Biossegurança***

**Descontamine** a bancada do laboratório e a Cabine de Segurança Biológica com gaze embebida em álcool à 70% (p/p), no inicío e no término do procedimento..

1. Cubra imediatamente o local onde o escarro está derramado para evitar que a produção de aerossóis continue. **Utilize** qualquer papel absorvente disponível, como por exemplo, papel toalha ou jornal;
2. derrame sobre o escarro já coberto, fenol a 5%, até que tudo fique bem molhado e **deixe** em repouso pelo menos por **5 minutos**;
3. recolha com um papel absorvente os materiais envolvidos no acidente (potes e o material usado na limpeza); **coloque** tudo dentro de uma lata com tampa ou caixa de papelão resistente com tampa ou de um saco de lixo autoclavável;
4. encaminhe para autoclavação e depois para descarte final;
5. limpe o local do acidente.

# Método de coloração fluorescente

## Reagentes para o método de coloração fluorescente

### Auramina fenicada

Para o preparo de 1 litro de Auramina fenicada é necessário que sejam preparadas, separadamente, uma solução de Auramina (solução A) e uma solução de Fenol aquoso (solução B).

| Materiais necessários: | |
|---|---|
| balança semi-analítica | 1 balão volumétrico de 100ml |
| papel de pesagem e 1 espátula<br><br>funil | 3 provetas: 1 de 100 ml; 200ml e 1 de 1.000ml<br>1 balão de fundo chato de 1.000ml |

### Solução da auramina - Solução A

Fórmula:

- Álcool etílico PA (95%) - 100mL
- Auramina O - 1g

### Preparo da auramina (solução A)

**a)** Pese 1 grama de auramina-O e coloque em um balão volumétrico de 100 ml;

**b)** coloque 70 ml de álcool etílico 95% PA em uma proveta de 100 ml;

**c)** adicione aos poucos o álcool à auramina;

**d)** agite o balão suavemente até completa dissolução;

**e)** coloque no balão o restante do álcool etílico 95% PA, agite e guarde fechado.

### Fenol aquoso (solução B)

Fórmula:

- Cristais de fenol - 30g
- Água destilada - 870mL

### Preparo do fenol aquoso (solução B)

**a)** pese 30g de fenol e coloque em um balão de fundo chato de 1.000 ml;

**b)** coloque 700 ml de água destilada em uma proveta de 1.000 ml;

**c)** adicione lentamente a água no fenol;

**d)** aqueça em banho-maria até que o fenol dissolva completamente;

**e)** retire do banho-maria, **acrescente** 170 ml de água destilada com o auxilio de uma proveta de até 200 ml e **deixe** esfriar à temperatura ambiente.

## Preparo final da solução de auramina fenicada

**a)** misture todo volume da **solução B na solução A**;

**b)** coloque em um frasco escuro, bem vedado e com rótulo contendo as seguintes informações: **nome do corante, data da preparação e de validade**.

| Auramina fenicada |
|---|
| Datas: preparação validade |
| Atenção: Esta solução pode ser usada até 3 meses após a preparação. |

**c)** armazene a soluçãoauramina ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.

## Solução descorante de álcool-ácido - (auramina)

| Materiais necessários: | |
|---|---|
| 1 balão fundo chato de 1.000 ml | 1 pipeta de 10 ml |
| 1 proveta de 1.000 ml | 1 funil |

Fórmula:

- Álcool etílico a 70% - 1000mL
- Ácido clorídrico concentrado - 5 mL

## Preparo do álcool ácido

**a)** Com auxílio de uma proveta coloque 1000mL de álcool a 70% em um balão de fundo chato;

**b)** adicione lentamente 5 ml de ácido clorídrico ao álcool, com uma pipeta de 10 ml. **Cuidado:** deixe o ácido clorídrico escorrer lentamente pelas paredes do balão de fundo chato que contém o álcool;

**c)** agite o balão suavemente;

**d)** coloque a solução descorante de álcool-ácido em um frasco bem vedado e identificado:

| Solução descorante de álcool-ácido (auramina) |
|---|
| Datas: preparação validade |
| Atenção: Esta solução pode ser usada até 3 meses após a preparação. |

**e)** armazene a solução de álcool-ácido à temperatura ambiente.

## Solução de permanganato de potássio- (auramina)

| Materiais necessários: | |
|---|---|
| Balança semi-analítica | 1 proveta de 100ml |
| Papel de pesagem<br>1 espátula<br>1 balão volumétrico de 1.000 ml | Papel de filtro comum<br>1funil |

Fórmula:

- permanganato de potássio - 5g
- água destilada - 1000mL

### Preparo do permanganato de potássio

**a)** pese 5 gramas de permanganato de potássio e coloque em um balão;

**b)** com auxílio de uma proveta**,** adicione parte da água destilada ao permanganato de potássio. Agite;

**c)** continue colocando a água e agitando até a completa dissolução do permanganato e até utilizar todo o volume de água;

**d)** coloque a solução de permanganato em um frasco âmbar bem vedado e identificado:

Solução de permanganato de potássio
(auramina)

Datas: preparação validade

Atenção: Esta solução pode ser usada até
3 meses após a preparação.

.

**e)** armazene o frasco com a solução de permanganato ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.

## Solução descontaminante de fenol a 5%

| Materiais necessários: | |
|---|---|
| 1 balão volumétrico 1.000 ml | 1 proveta de 1.000ml |

### Fenol aquoso a 5% (solução B)

Fórmula:

- Cristais de fenol - 50g
- Água destilada qsp - 1000mL

### Preparo do fenol a 5%

**a)** pese 50 gramas de fenol e coloque em um balão volumétrico de 1.000 ml;

**b)** coloque 700 ml de água destilada em uma proveta de 1.000 ml;

**c)** adicione lentamente a água no fenol;

**d)** coloque para aquecer em banho-maria a 56ºC até que o fenol dissolva completamente;

**e)** retire do banho-maria, acrescente água destilada até completar 1.000 ml;

**f)** deixe esfriar em temperatura ambiente.

g) coloque a solução em um frasco com tampa de rosca e identificado:

Solução descontaminante de fenol a 5%

Datas: preparação validade

Atenção: Esta solução pode ser usada até 12 meses após a preparação.

.

# Solução de hidróxido de sódio a 4%

| Materiais necessários: | |
|---|---|
| 1 balão volumétrico 1.000 ml | 1 proveta de 1.000ml |

## hidróxido de sódio a 4%

Fórmula:

- hidróxido de sódio - 40g
- Água destilada qsp - 1000mL

## Preparo do hidróxido de sódio a 4%

a) pese 40 g de hidróxido de sódio e coloque no balão volumétrico de 1.000 ml;

b) com auxílio de uma proveta adicione lentamente 700mL de água destilada ao balão contendo o hidróxido de sódio.;

c) agite o balão ate que o hidróxido dissolva completamente;

d) coloque o restante da água destilada no balão até a quantidade suficiente para (qsp) 1000mL;

e) tampe esse balão com uma bucha de algodão, coloque papel alumínio ao redor e autoclave a 121º C, por 15 minutos;

f) deixe esfriar em temperatura ambiente. Assepticamente coloque em um frasco estéril, com tampa de rosca e identificado:

Hidróxido de sódio a 4%

Datas: preparação validade

Atenção: Esta solução pode ser usada até 2 meses após a preparação.

.

# Método de Coloração de Ziehl-Neelsen

***Biossegurança***

A fucsina, o fenol, a solução descorante de álcool-ácido e o azul de metileno devem ser preparados, obrigatoriamente, em capela de exaustão química e com a utilização de EPI's apropriados.

## Reagentes do Método de Coloração de Ziehl-Neelsen

### Fucsina fenicada a 0,3%

Para obter 1 litro de fucsina fenicada a 0,3% é necessário que sejam preparadas, separadamente, uma solução de fucsina básica **(solução A)** e uma solução de fenol aquoso **(solução B).**

| Equipamentos e materiais necessários | |
|---|---|
| balança semi-analítica | 2 provetas de 100 e 1.000 ml |
| banho-maria | papel de pesagem e espátula |
| 2 balões volumétricos de 1.000 ml | funil e papel de filtro comum |

### Fucsina básica - Solução A

Fórmula:

- Álcool etílico PA (95%) - 100mL
- Fucsina básica - 3g

***Atenção***

Três gramas é a quantidade indicada na fórmula, desde que a fucsina tenha no **mínimo 88%** de **concentração de corante**. Se a concentração for **menor**, é preciso calcular o **fator de correção do peso** e depois **multiplicá-lo** por 3 gramas, para encontrar a quantidade de fucsina necessária à obtenção de um corante adequado.

$$\textbf{Fator de correção do peso} = \frac{1}{\text{equivalente decimal da concentração do corante}}$$

$$\textbf{Equivalente decimal} = \frac{\text{percentual de concentração do corante}}{100}$$

**Correção do peso da fucsina** = 3g x equivalente decimal

**Por exemplo:** fucsina em pó com concentração do corante = **75%**

$$\textbf{Equivalente decimal} = \frac{75}{100} = 0{,}75$$

$$\textbf{Fator de correção} = \frac{1}{0{,}75} = 1{,}33$$

**Correção do peso da fucsina =** 3g x 1,33 = 3,99g

**Neste exemplo, é preciso pesar 3,99g de fucsina para preparar a solução A.**

## Preparo da fucsina básica (solução A)

**a)** pese 3g de fucsina básica ou a **quantidade corrigida**.

**b)** coloque a fucsina básica pesada em um balão de 1.000ml;

**c)** coloque 100 ml de álcool etílico 95% PA em uma proveta.**Recomenda-se** o álcool etílico 95% PA porque ele dissolve melhor a fucsina;

**d)** adicione aos poucos todo o volume de álcool etílico sobre a fucsina;

**e)** agite o balão suavemente até a completa dissolução da fucsina.

## Fenol aquoso a 5% (solução B)

Fórmula:

- Cristais de fenol - 50g
- Água destilada qsp - 1000mL

## Preparo do fenol aquoso a 5% (solução B)

**a)** pese 50 gramas de fenol e coloque em um balão volumétrico de 1.000 ml;

**b)** coloque 700 ml de água destilada em uma proveta de 1.000 ml;

**c)** adicione lentamente a água no fenol;

**d)** coloque para aquecer em banho-maria a 56ºC até que o fenol dissolva completamente;

**e)** retire do banho-maria, acrescente água destilada até completar 1.000 ml;

**f)** deixe esfriar em temperatura ambiente.

## Preparo final da solução de fucsina fenicada a 0,3%

**a)** Com auxílio de uma proveta transfira 900 ml do fenol aquoso a 5% (**solução B)** para o balão contendo a fucsina básica (**solução A**) e agite a mistura. Reserve os 100mL restantes do fenol aquoso a 5%.

**b)** tampe a boca do balão com papel alumínio e deixe repousar por 24 horas;

**c)** filtre, em funil com papel de filtro, diretamente em frasco âmbar de 1.000 ml já rotulado com as seguintes informações:

> Fucsina fenicada a 0,3%
>
> Datas: preparação validade
>
> FILTRE ANTES DE USAR
>
> Atenção: este corante pode ser usado até 12 meses após a preparação.

**d)** armazene a fucsina fenicada a 0,3% ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.

***Atenção***

Os 100 ml do fenol aquoso (fenol a 5%) que sobraram podem ser utilizados como solução descontaminante.

## Solução descorante de álcool - ácido a 3%

| Materiais necessários: | |
|---|---|
| 1 balão volumétrico 1.000 ml | 1 proveta de 1.000 ml |
| 1 proveta de 100 ml | 1 funil |

Fórmula:

- Álcool etílico comercial - 970mL
- Ácido clorídrico concentrado - 30mL

## Preparo de álcool - ácido a 3%

**a)** Com auxílio de uma proveta coloque 970mL de álcool no balão volumétrico de 1.000 ml;

**b)**coloque 30 ml de ácido clorídrico em uma proveta de 100 ml;

**c)** adicione o ácido clorídrico, lentamente, deixando escorrer pelas paredes do balão volumétrico que contém o álcool. **Cuidado:** sempre adicione o ácido cuidadosamente sobre álcool, pois esta mistura aquece;

**d)** agite o balão suavemente;

**e)** coloque o álcool-ácido, com o auxílio de um funil, em um frasco de 1.000 ml rotulado com as seguintes informações:

| Álcool - ácido a 3% |
|---|
| Datas: preparação validade |
| Atenção: Esta solução pode ser usada até 12 meses após a preparação. |

**f)** armazene essa solução em temperatura ambiente.

## Azul de metileno a 0,3%

| Materiais necessários: | |
|---|---|
| balança semi-analítica | 1 proveta de 100 ml |
| papel de pesagem e 1 espátula | 1 funil e papel de filtro comum |
| 1 balão volumétrico de 1.000 ml | |

Fórmula:

- Azul de metileno - 3g
- Água destilada qsp - 1000mL

***Atenção***

Três gramas é a quantidade indicada na fórmula, desde que o azul de metileno tenha no **mínimo 82%** de **concentração de corante**. Se a concentração for **menor**, é preciso calcular o **fator de correção do peso** e depois **multiplicá-lo** por 3 gramas, para encontrar a quantidade de azul de metileno necessária à obtenção de um corante adequado.

$$\textbf{Fator de correção do peso} = \frac{1}{\text{equivalente decimal da concentração do corante}}$$

$$\textbf{Equivalente decimal} = \frac{\text{percentual de concentração do corante}}{100}$$

**Correção do peso da fucsina** = 3g x equivalente decimal

## Preparo de azul de metileno a 0,3%

**a)** pese 3g de azul de metileno ou a quantidade corrigida e coloque em um balão volumétrico de 1.000 ml;

**b)** coloque água destilada em uma proveta 100 ml;

**c)** adicione a água destilada ao azul de metileno;

**d)** agite o balão suavemente até completa dissolução.

**e)** complete o volume com água destilada em quantidade suficiente para (qsp) 1000mL. **Agite bem**.

**f)** filtre, em funil com papel de filtro, diretamente em um frasco âmbar de 1.000 ml já rotulado com as seguintes informações:

Azul de metileno a 0,3%

Datas: preparação validade

FILTRE ANTES DE USAR

Atenção: este corante pode ser usado até 12 meses após a preparação.

**g)** armazene a solução de azul de metileno ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.

# Referências bibliográficas


AKIKO, Fujiki. TB Microscopy. Japan: Jinnou Co., 1998. 48 p.

CÉLIZ, J. P. Control de Calidad de Baciloscopias en el Perú - Año 1997. Tuberculosis en el Perú. Informe 1997. 61-66 p.

CHILE, Ministerio de Salud. Instituto de Salud Publica de Chile. Evaluación del Funcionamento y Actividades de la Red Nacional de Laboratorios de Bacteriología da la Tuberculosis Chile 1997. Santiago, 1997. 10 p.

Collins, D.H.; Grange, J.M.; Yates, M.D. Organization and Practice in Tuberculosis Bacteriology. in Butterworths-Heinemann, Oxford, 1997. 139 p.

David, H.; Brum, L.; Prieto, E. Manual de micobacteriologia em Saúde Pública: Princípios e Métodos. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Departamento de Microbiologia. Laboratório de Micobactérias. Lisboa. 1994. 85 p.

David, H.; Lévy-Frebault, V.; Thorel, M.F.. Méthodes de Laboratoire pour Mycobacteriologie Clinique. Institut Pasteiur. 1989. 87 p.

INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS LUNG DISEASES. The Public Health Service National Tuberculosis Reference Laboratory and the National Laboratory Network: minimum requirements, role and operation in a low-income country. France, 1998.112 p.

Kent, PT; Kubica, G.P. Public Health Mycobacteriology. A guide for the Level III Laboratory. Centers for Disease Control. Atlanta. 1985. 185 p.

Kubica GP & Wayne LG. The Mycobacteria: a sourcebook Part A. Marcel Dekker, Inc. New York. 1984. 680 p.

Medeiros, EAS. Precauções e isolamento de pacientes com doenças de transmissão aérea no ambiente hospitalar. Bol Soc Bras Infect. 2001:4-9.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Controle de Qualidade Interno de Testes Sorológicos. Brasília Série TELELAB. 1999. 88 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. FNS.CENEPI. CNPS. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 2 ed. Rio de Janeiro, 1994. 115 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Saúde Pública. Departamento Nacional de Profilaxia e Controle de Doenças. Divisão Nacional de Tuberculose. Normas para os Laboratórios de Bacterioscopia da Tuberculose. Rio de Janeiro: Coordenação da Rede Nacional dos Laboratórios de Bacteriologia da Tuberculose e OPAS/OMS, 1973. 45 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. Divisão de Pneumologia Sanitária. Campanha Nacional Contra a Tuberculose. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. 4 ed. Brasília: Linha gráfica, 1991. 155 p.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE/OMS. Guia para el Diagnóstico de La Tuberculosis por el Examen Microscopio. Publicación Científica Nº.277. Washington, D.C., 1973. 29 p.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE/OMS. Metodos de Control de La Tuberculosis. Publicación científica No.346. Washington D.C., 1977. 30 p.

VALENZUELA H. P.; LEPE L. R. et alli. Programa de Evaluacion Externa de Calidad en Micobacterias 1997. Chile: ISP, 1997. 7 p.

VALENZUELA H. P.; LEPE L. R. et alli. Evaluación indirecta en bacteriología da la Turbeculosis. Bol. Inst. Bact. Chile Vol. 17, nos 1-2, 1975. 15-20 p.

Van Soolingen D, Hoogenboenzem T, de Haas PEW, Hermans PWM, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Bestra GS, Portaels F, Top J, Schouls LM, van Embden JDA; A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int J Syst Bacteriol. 47:1236-1245. 1997.

Van Soolingen D, van der Zanden AGM, de Haas PEW, Noordhoek GT, Kers A, Foudraine NA, et al. Diagnosis of Mycobacterium microti infections among humans by using novel genetic markers. J Clin Microbiol 1998; 36(7):1840-1845.

WORD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory Services in Tuberculosis Control: Part I organization and Management. Geneva, 1998.63 p.

WORD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory Services in Tuberculosis Control: Part II microscopy. Italy: Word Health Organization, 1998. 61 p.

# Créditos e autoria

MINISTÉRIO DA SAÚDE

**Lilian Amaral Inocêncio**
Assessora Técnica da Unidade de Laboratório do PN DST/AIDS - MS

**Autores:**

Creusa Lima Campelo
Francisco Duarte Vieira
Júlia Ignez Salem
Maria Alice da Silva Telles
Rosália Maia
Susana Beatriz Vianna Jardim
Wanir José Barroso
Maristela Arantes Marteleto (pedagogia)

**Colaboradores:**

Ademir Albuquerque Gomes
Daisy Nakamura Sato
Maria Lúcia Fernandes Penna
Maria Madileuza Carneiro Neves
Moisés Palaci
Heloísa da Silveira Paro Pedro

**Eliana Cardoso Vieira**
Coordenação de Política Nacional de Sangue e Hemoderivados

**Miriam Franchini**
Coordenadoras do Projeto TELELAB - Série 3

**Simone Monzani Vivaldini**
**Cláudia Beatriz Oliveira**
Coordenadoras do TELELAB - Revisão