

## Anexo 8

### Microscopia por fluorescência com Auramina O (Smithwick Modificado)

A microscopia por fluorescência, também chamada de **método da auramina**, assim com o de Ziehl-Neelsen, baseia-se na propriedade de álcool-ácido resistência das micobactérias. Esse método é utilizado para triagem de lâminas, em laboratórios que realizam mais de 50 baciloscopias por dia. O esfregaço deve ser preparado e fixado conforme descrito no manual **Baciloscopia- preparação do esfregaço**.

#### Coloração do esfregaço:

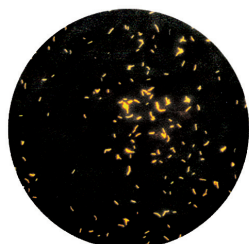
1. providencie os materiais necessários para corar os esfregaços. Organize tudo em cima da pia;
2. coloque as lâminas já fixadas no suporte para corar lâminas;
3. cubra com a auramina, o esfregaço de todas as lâminas;
4. deixe o corante em contato com o esfregaço por 15 minutos;
5. derrame o corante na pia;
6. **lave** as lâminas num filete de água corrente. **Deixe** o filete de água cair em cima do número da lâmina, para que escorra suavemente sobre a película corada do esfregaço até eliminar todo o corante;
7. coloque a lâmina novamente no suporte com o esfregaço voltado para cima;
8. cubra completamente todas as lâminas com a solução de álcool-ácido;
9. deixe a solução descorante em contato com o esfregaço por 2 minutos;
10. derrame a solução de álcool-ácido na pia e **lave** a lâmina num filete de água corrente para eliminar o álcool-ácido;
11. verifique se os esfregaços ficaram descorados. **Considera-se** descorado o esfregaço que apresentar coloração transparente ou levemente amarelada. **Se algum esfregaço** ainda **não** estiver descorado, você deve executar os seguintes procedimentos:
  - cubra novamente toda a lâmina com álcool-ácido;
  - pegue a lâmina com a pinça 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 amarelada, lave a lâmina de acordo com os procedimentos do **passo 6**. Se o esfregaço ainda não estiver descorado, descarte a lâmina e prepare um novo esfregaço.

#### Coloração de fundo:

1. cubra com o permanganato todo o esfregaço de cada uma das lâminas. Espere **2 minutos**;
2. derrame o permanganato de potássio na pia e lave a lâmina;
3. coloque as lâminas em pé, em uma estante de tubos, para secar. Deixe ao abrigo da luz, pois a fluorescência do corante é sensível à luz.

## Leitura do esfregaço com microscópio de fluorescência:

1. prepare a lâmina para leitura e coloque-a no microscópio de fluorescência;
2. ajuste o foco, utilizando a objetiva de 10X, **passe** para a objetiva de 40X e **faça** a leitura;
3. faça a interpretação dos resultados:



- **positivo** para BAAR = bacilos emitindo fluorescência amarelo-alaranjada, sobre fundo escuro
- **negativo** para BAAR = apenas campos com fundo escuro sem nenhuma emissão de fluorescência, após a leitura completa de todo o esfregaço. **Sem necessidade de confirmação.**



### Atenção

As lâminas **positivas**, pelo método fluorescente, devem ter seu resultado **confirmado** pelo método de Ziehl-Neelsen, para que seja feita a contagem dos bacilos e classificação do resultado em cruces. A coloração com a fucsina é feita por cima do esfregaço já corado com a auramina, de acordo com os procedimentos descritos no manual **Baciloscopia - Coloração pelo método de Ziehl-Neelsen.**