

# BACTERIOSCOPIA

## 1. Considerações gerais:

Os exames bacterioscópicos resultam, amiúde, inúteis por terem sido colhidos e executados de forma incorreta.

Por exame bacterioscópico compreendemos o exame microscópico do material sob a forma de esfregaço corado.

## 2. Técnica para a feitura do esfregaço;

- Deve-se sempre usar lâminas limpas e desengorduradas.
- O material deve ser espalhado na superfície da lâmina em camada fina e tão uniforme quanto possível
- Deixar secar ao ar
- Passar a lâmina, com a face, onde se encontra o esfregaço, para cima, na chama da lâmpada de álcool ou bico de gás, "esmagando-se" a chama 2 a 3 vezes, rapidamente, com a face inferior da lâmina. Isso deve ser feito com certa rapidez, sem elevar demasiadamente a temperatura, de maneira que a lâmina possa ser suportada pelo dorso da mão
- Deixar esfriar, e corar.

## 3. Colheita do material:

Limpar a superfície da pele onde se localiza a mancha ou hansenoma, com algodão umedecido em álcool. Com o bisturi, incisar a pele que o operador fixa firmemente entre o dedo indicador e o polegar. Passar a sua lâmina ao longo dos bordos da incisão e, com o material obtido, realizar esfregaços finos e homogêneos em uma lâmina de vidro.

## 5. Método de coloração:

Método de Ziehl-Neelsen (modificado)

a — corar com fucsina de Ziehl aquecendo a lâmina até a emissão de vapores, durante 5 minutos. Não deixar ferver ou secar.

b - deixar escorrer o corante e lavar com álcool-ácido

c - lavar em água corrente

d - cobrir o esfregaço com solução de azul de metileno, esperar de 30 segundos a 1 minuto.

e - lavar em água corrente. Secar.

## 5. Preparo dos corantes:

Existem diversas técnicas, com pequenas variações, que são utilizadas para o preparo dos corantes utilizados no método de Ziehl-Neelsen. Citaremos a que temos utilizado em nosso serviço que vem dando excelentes resultados e é de fácil preparo.

### Fucsina fenicada

A - Fucsina básica ..... 10 g  
Álcool 95 ..... 100 ml

Dissolver em graal e deixar sob agitação constante até o dia seguinte. Filtrar e guardar em frasco âmbar.

B - Fenol puro..... 5 ml

Água destilada ..... 95 ml

Para usar, mesclar uma parte de A com 9 partes de B.

### Álcool-ácido

Álcool..... 700 ml

Água destilada .... 290 ml

Hcl concentrada .... 10 ml

### Azul de metileno

Azul de metileno ..... 3 g

Álcool 95 ..... 100g

Para usar, diluir uma parte do corante em 9 de água destilada.

## ÍNDICE BACTERIOLÓGICO

Para determinação do Índice Bacteriológico (IB) são colhidos 6 materiais das lesões mais ativas que o paciente apresentar. As lâminas são coradas pelo método de Ziehl-Neelsen de rotina, indicado anteriormente.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a determinação do Índice Bacteriológico deve ser feita examinando-se pelo menos 100 campos, com aumento de 800 x ou mais. A determinação se faz segundo a seguinte tabela:

Nenhum bacilo em toda a lâmina..	negativo = 0
De 1 a 10 bacilos em 100 campos .	+ = 1
De 1 a 10 bacilos em 10 campos ...	++ = 2
De 1 a 10 bacilos por campo.....	+++ = 3
De 10 a 100 bacilos por campo .....	++++ = 4
De 100 a 1000 bacilos por campo .	+++++ = 5
Mais de 1000 bacilos por campo ...	++++++ = 6

O Índice Bacteriológico será a soma dos valores obtidos divididos por 6.

Para o trabalho de campo, seria necessário um Índice Bacteriológico mais simples. Para a realização desse índice, deverão ser colhidos apenas 2 materiais das lesões mais ativas que o paciente apresentar. A leitura das lâminas será feita da seguinte maneira:

Nenhum bacilo em toda a lâmina.....	negativa = 0
Menos de 1 bacilo por campo em 100 campos pesquisados..+	= 1
De 1 a 10 bacilos por campo em 50 campos pesquisados....++	= 2
Mais de 10 bacilos por campo em 20 campos pesquisados ..+++	= 3

O Índice Bacterioscópico de uma dada lâmina será a soma dos valores obtidos, divididos por 2.

## ÍNDICE MORFOLÓGICO

Para determinação do Índice Morfológico (IM), usam-se as mesmas lâminas utilizadas para obtenção do Índice Bacteriológico.

Devido ao fato de muitos autores acharem que o aquecimento altera a morfologia bacilar; dever-se-ia dar preferência à seguinte técnica:

Fixação:

1.- Uma vez que o esfregaço tenha sido secado ao ar; deve-se fixar durante 3 minutos com vapores de formaldeído concentrado em copo de. Coplin, colocando as lâminas dentro e fechando-se o copo.

2.- Fixação delicada e rápida no calor.

3.-Nova fixação por 3 minutos em vapores de formalina.

Coloração:

Usa-se os mesmos corantes do método de Ziehl-Neelsen de rotina.

A técnica difere quanto à exposição à fucsina, a qual é deixada sobre o esfregaço durante 20 minutos sem aquecimento. O restante é igual à técnica de rotina.

Devido às dificuldades técnicas que esse método acarreta, deve-se utilizar a coloração de rotina do Ziehl-Neelsen

A determinação do Índice Morfológico consiste em verificar a porcentagem de bacilos típicos ( íntegros) encontrados no esfregaço. Para isso, são contados 100 bacilos e anotados quantos são típicos.

O Índice será a média dos valores encontrados. É considerado bacilo típico somente aquele que esteja uniformemente corado, com bordos lisos e regulares e que não apresente zonas de diferente intensidade de cor. Devem ser examinados, com especial atenção, as extremidades do bacilo para ver se não apresentam zonas de descoloração.

Antes de começar a classificação de típicos e granulados, deve ser feita uma revisão geral da lâmina para se estudar o tipo de bacilo, ver se a coloração é uniforme em todo o esfregaço e procurar zona onde se encontre maior número de bacilos.

Somente serão considerados os bacilos que estejam isolados, porque quando estão formando grupos de 2 ou mais, é impossível determinar se são típicos ou não.

#### TÉCNICA PARA CONTAGEM DE BACILOS EM LÂMINAS

Deve-se utilizar lâminas com círculo impresso, ou imprimir um círculo de 1 cm de diâmetro com auxílio de um lápis de diamante.

Para se fazer a contagem, inicialmente deve-se contar quantos campos existem ao longo do diâmetro do círculo impresso na lâmina de acordo com as objetivas e oculares de cada microscópio.

A seguir, conta-se a quantidade de bacilos que se observa em cada campo e anota-se a quantidade de bacilos e de campos contados, sempre contando ao longo do diâmetro médio do círculo.

Para se calcular quantos bacilos existem na amostra utiliza-

se o seguinte procedimento:

1. Calcula-se a área do círculo, usando a regra  $A = r^2 \times 3,14$ . Como conhecemos o diâmetro podemos calcular o raio e logo a área total, em função do número de campos.
2. A seguir, calcula-se o número de bacilos por campo, dividindo o número total de bacilos contados pelo número de campos contados.
3. Multiplica-se o número de bacilos por campo pelo total de campos.
4. Como conhecemos o volume do material contado (10 litros = 10l) para se obter a quantidade de bacilos por mililitro, multiplicamos pela diluição, ou seja, por 100.

Exemplificando:

Supondo que tenhamos contado 80 campos ao longo do diâmetro e que ao fazer a contagem bacilar tenhamos encontrado 720 bacilos em 30 campos

$$A = r^2 \times 3,14$$

$$A = 40 \times 40 \times 3,14 = 5024$$

$$N^\circ \text{ de bacilos/ campo} = 720/ 30 = 24$$

$$N^\circ \text{ de bacilos/ ml} = 5024 \times 24 \times 100 = 12.057.600$$

Este método de contagem pode ser utilizado para contar qualquer tipo de células, bactérias, etc., usando-se a coloração e fixação adequadas.

#### ANTÍGENO DE MITSUDA INTEGRAL

O preparo do antígeno para a reação de Mitsuda é feito a partir de material humano ou de material obtido de tatus infectados com o *Mycobacterium leprae*. Verificou-se que não há nenhuma diferença entre as respostas obtidas com material humano e o proveniente de tatus.

Técnica de preparação

1. Se as biópsias estiverem em formol, deve-se lavá-las durante 24 horas em soro fisiológico, que é trocado várias vezes.
2. Colocam-se os pedaços de tecido em uma placa de Petri e com auxílio de pinça e bisturi separa-se a epiderme que é eliminada.
3. Pesa-se o material e anota-se a quantidade.
4. O material é colocado em um frasco de precipitação e se agrega pequena quantidade de soro fisiológico e esteriliza-se em autoclave a 125°C durante 15 minutos.
5. O material esterilizado é macerado, adicionando-se pequena quantidade de soro fisiológico.
6. Quando todo o material estiver macerado, deixa-se sedimentar durante uma hora, separa-se o sobrenadante e volta-se a macerar o sedimento. O material deve ficar bem homogêneo.
7. Do material macerado toma-se uma amostra, que é diluída a 1: 10, 1:100 e 1:1000. Com essas diluições é feita uma contagem bacilar para ajustar o antígeno à concentração bacilar desejada.
8. Ao fazer a diluição final, agrega-se fenol concentrado para uma concentração final do antígeno de 0,4%.

9. Acondicionar em frascos pequenos (tipo penicilina) e tinalizar em autoclave durante 20 minutos a 125°C, três dias seguidos.

O antígeno padrão deve conter uma concentração de  $160 \times 10^6$  bacilos por ml. No entanto, grande parte do antígeno que se utiliza atualmente na rotina, varia entre 20 a  $40 \times 10^6$  bacilos por ml.

Em nosso Instituto, utilizamos o antígeno preparado em nosso laboratório e que contém  $60 \times 10^6$  bacilos por ml, com o qual temos obtido resultados satisfatórios.