

## Comparação entre três métodos de coloração a frio no diagnóstico primário de tuberculose: um estudo piloto\*

Comparison among three cold staining methods in the primary diagnosis of tuberculosis: a pilot study

Soham Gupta, Vishnu Prasad Shenoy, Indira Bairy, Sethumadhavan Muralidharan

### Resumo

**Objetivo:** Em países em desenvolvimento, a baciloscopia é a principal ferramenta para a identificação de casos de tuberculose pulmonar. O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia diagnóstica do método de coloração de Gabbett (MCG) e de um método modificado de coloração a frio (MMC), ambos em duas etapas, em comparação com a do método de coloração fluorescente (MCF), em três etapas, para a detecção de BAAR em esfregaços de escarro. **Métodos:** Nossa amostra consistiu de 260 amostras de escarro coletadas de casos suspeitos de tuberculose pulmonar no Kasturba Hospital, em Manipal, Índia. Os esfregaços foram preparados em triplicata, para cada um dos métodos: MCF, MMC e MCG. As lâminas foram numeradas aleatoriamente a fim de que o examinador fosse cegado quanto à identidade das amostras. **Resultados:** Das 260 amostras, 16 (6,15%), 15 (5,77%) e 13 (5,00%) foram positivas para BAAR com MCF, MMC e MCG, respectivamente. A sensibilidade de MCG e MMC em relação à de MCF foi de 81,25% e 93,75%, respectivamente. Houve boa concordância de MCG e MMC com MCF (0,988 e 0,996, respectivamente), e não houve diferenças estatísticas significativas. **Conclusões:** Embora MCG e MMC apresentaram menor sensibilidade que MCF, que é avaliado por microscopia de fluorescência, consideramos que os dois primeiros métodos sejam promissores no diagnóstico de tuberculose.

**Descritores:** Tuberculose pulmonar; Técnicas de diagnóstico e procedimentos; Microscopia de fluorescência; Escarro.

### Abstract

**Objective:** In developing countries, sputum smear microscopy is the main tool for pulmonary tuberculosis case finding. The objective of the present study was to evaluate the diagnostic efficacy of Gabbett's staining (GS) and modified cold staining (MCS), both of which are two-step methods, in comparison with that of fluorescent staining (FS), which is a three-step method, for the detection of AFB in sputum smears. **Methods:** Our sample comprised 260 sputum samples collected from individuals suspected of having pulmonary tuberculosis at Kasturba Hospital, in Manipal, India. Smears were prepared in triplicate: one each for FS, MCS, and GS. The smears were randomly numbered so that the examiner was blinded to the sample identities. **Results:** Of the 260 samples, 16 (6.15%), 15 (5.77%), and 13 (5.00%) showed positive AFB results with FS, MCS, and GS, respectively. The sensitivity of GS and MCS, in comparison with that of FS, was 81.25% and 93.75%, respectively. The concordance of GS and MCS with FS was good (0.988 and 0.996, respectively), and no statistically significant differences were found. **Conclusions:** Although MCS and GS were found to be less sensitive than was FS, which is evaluated under fluorescence microscopy, the first two are promising methods for the diagnosis of tuberculosis.

**Keywords:** Tuberculosis, pulmonary; Diagnostic techniques and procedures; Microscopy, fluorescence; Sputum.

---

\* Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia, Kasturba Medical College, Manipal, Índia.

Endereço para correspondência: Soham Gupta. Department of Microbiology, St. John's Medical College, Bangalore, 560034, Karnataka, Índia.

Tel 91 80 2206-5052. E-mail: soham.micro@gmail.com

Apoio financeiro: Nenhum.

Recebido para publicação em 23/1/2010. Aprovado, após revisão, em 10/5/2010.

## Introdução

A tuberculose é uma doença de grande importância em países em desenvolvimento, tais como a Índia, onde ela causa considerável morbidade e mortalidade. O controle da tuberculose é definido como a redução da transmissão, a qual reduz a morbidade e a mortalidade, e a identificação de cada caso é muito importante para a manutenção desse controle. A baciloscopia continua a ser a principal ferramenta para a identificação de casos em países em desenvolvimento.<sup>(1-6)</sup>

Na Índia, o método de Ziehl-Neelsen (Z-N) é o procedimento recomendado pelas diretrizes do *Revised National Tuberculosis Control Programme* (RNTCP, Programa Nacional Revisado de Controle da Tuberculose).<sup>(7)</sup> Entretanto, o método de Z-N é trabalhoso e acarreta vários problemas operacionais, uma vez que exige a aplicação de calor durante a coloração.<sup>(1,2,6)</sup>

Para a implantação adequada de um programa de controle da tuberculose, assim como para superar os problemas associados ao método de Z-N, há muito se buscam melhorias e simplificações. Vários métodos de coloração a frio têm sido avaliados, e alguns mostraram resultados promissores.<sup>(1-6,8,9)</sup> O método de coloração de Gabbett (MCG) e, mais recentemente, o método modificado de coloração a frio (MMC) têm sido defendidos como técnicas de coloração alternativas, pois não exigem uma fonte de calor durante a coloração e eliminam a etapa da descoloração.<sup>(1,2,6,8,10)</sup> O método da coloração fluorescente (MCF, avaliado por microscopia de fluorescência), o qual também é um método de coloração a frio, é um método rápido e confiável para a detecção de BAAR e tem se mostrado mais sensível do que o método de Z-N.<sup>(3-5,11,12)</sup>

O objetivo do presente estudo foi avaliar comparativamente a eficácia diagnóstica desses três métodos de coloração a frio na detecção de BAAR.

## Métodos

Nossa amostra consistiu de 260 amostras de escarro coletadas de casos suspeitos de tuberculose pulmonar no Kasturba Hospital, localizado na cidade de Manipal, Índia. Os esfregaços foram preparados em triplicata, um para cada método: MCF, MCG e MMC.

Para a preparação dos esfregaços a serem submetidos ao MCF, as amostras de cada espécime foram secas ao ar e fixadas pelo calor. As lâminas foram então imersas em auramina-fenol (0,3 g de auramina e 3 mL de fenol em 97 mL de água destilada), filtrados na hora da utilização, por 7-10 min sem aquecimento. Os esfregaços foram lavados em água corrente e descorados com solução de álcool-ácido a 3% por 3-5 min. As lâminas foram lavadas em água corrente e contracoradas com solução de permanganato de potássio a 0,1% por 1 min, sendo em seguida lavadas e secas ao ar.<sup>(13)</sup>

Para a preparação dos esfregaços a serem submetidos ao MCG, as amostras de cada espécime foram secas ao ar e fixadas pelo calor. As lâminas foram então imersas em coloração de carbol-fucsina (10 g de fucsina básica, 100 mL de álcool metílico e 50 g de fenol), e adicionou-se água destilada para produzir um volume final de 1.000 mL. Isso foi deixado em repouso em temperatura ambiente por 10 min. Os esfregaços foram então lavados em água corrente e contracorados com azul de metileno de Gabbett (1 g de azul de metileno, 20 mL de ácido sulfúrico, 30 mL de álcool absoluto e 50 mL de água destilada) por 2 min. As lâminas foram então lavadas e secas ao ar.<sup>(1)</sup>

Para a preparação dos esfregaços a serem submetidos ao MMC, as amostras de cada espécime foram secas ao ar e fixadas pelo calor. As lâminas foram imersas em coloração de carbol-fucsina, como para o MCG, por 5 min. Os esfregaços foram então lavados em água corrente e contracorados com uma solução descolorante modificada (0,25 g de azul de metileno, 25 mL de álcool absoluto, 10 mL de glicerol, 0,01 g de hidróxido de potássio, 4,5 mL de ácido acético glacial e 3 mL de ácido clorídrico), e adicionou-se água destilada para produzir um volume final de 100 mL. Isso foi deixado em repouso em temperatura ambiente por 3 min. As lâminas foram então lavadas e secas ao ar.<sup>(6)</sup>

Os esfregaços em triplicata de cada espécime (esfregaços do MCF, MCG e MMC) foram numerados aleatoriamente a fim de que o examinador fosse cegado quanto à identidade das amostras, descartando assim o viés de seleção. Todos os esfregaços foram lidos por um examinador experiente, em microscópio com lente de imersão em óleo para o MCG e o MMC e em microscópio de fluorescência em objetiva

**Tabela 1** – Comparação entre o método de coloração de Gabbett e o método de coloração fluorescente em termos dos resultados da pesquisa de BAAR.

Método de coloração de Gabbett	Método de coloração fluorescente					
	3+	2+	1+	Esparso	Negativo	Total
3+	4	1	-	-	-	5
2+	-	6	-	-	-	6
1+	-	-	1	-	-	1
Esparso	-	-	-	1	-	1
Negativo	-	1	1	1	244	247
Total	4	8	2	2	244	260

40x para o MCF (Leica, Wetzlar, Alemanha). Os esfregaços foram lidos e classificados como 3+, 2+, 1+, esparso ou negativo, de acordo com as diretrizes do RNTCP.<sup>(7,13)</sup> Após a leitura dos esfregaços, os resultados foram documentados, e, no final do estudo, esses resultados foram decodificados e submetidos à comparação cruzada.

## Resultados

Entre as 260 amostras, 16 (6,15%), 15 (5,77%) e 13 (5,00%) foram positivas para BAAR pelo MCF, pelo MMC e pelo MCG, respectivamente. Como o MCF apresentou o maior número de resultados positivos, ele foi considerado o padrão ouro. Os esfregaços positivos foram confirmados recorrendo-se todos os esfregaços do MCF pelo método de Z-N. Os resultados da baciloscopia obtidos pelo MCG e pelo MMC foram comparados com os obtidos pelo MCF (Tabelas 1 e 2).

Todos os espécimes que foram positivos para BAAR pelo MCG e pelo MMC também foram positivos para BAAR pelo MCF, enquanto o número de amostras que foram positivas para BAAR pelo MCF, mas negativas pelo MCG e

pelo MMC, foi de 3 e 1, respectivamente. As 3 amostras lidas como negativas para BAAR pelo MCG foram classificadas, respectivamente, como 2+, 1+ e esparsa pelo MCF, enquanto a amostra lida como negativa para BAAR pelo MMC foi classificada como 1+ pelo MCF.

Na comparação cruzada do MCG e do MMC com o MCF, a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do MCG foram de 81,25%, 100,00%, 100,00% e 98,79%, respectivamente, enquanto os do MMC foram de 93,75%, 100,00%, 100,00% e 99,59%, respectivamente. A concordância geral do MCG e do MMC com o MCF foi boa (0,988 e 0,996, respectivamente). Não houve diferenças significativas entre esses métodos e o MCF.

Os resultados da baciloscopia obtidos pelo MCG e pelo MMC foram comparados. Dois esfregaços lidos como negativos pelo MCG foram lidos como positivos pelo MMC (esparso e 1+, respectivamente). A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do MCG, em relação aos do MMC, foram de 86,66%, 100,00%, 100,00% e 99,19%, respectivamente. Houve uma boa concordância geral entre os dois métodos (0,992), e não houve diferença estatística significativa.

**Tabela 2** – Comparação entre o método modificado de coloração a frio e o método de coloração fluorescente em termos dos resultados da pesquisa de BAAR.

Método modificado de coloração a frio	Método de coloração fluorescente					
	3+	2+	1+	Esparso	Negativo	Total
3+	3	-	-	-	-	3
2+	2	5	-	-	-	7
1+	-	2	-	-	-	2
Esparso	-	-	1	2	-	3
Negativo	-	-	1	-	244	245
Total	5	7	2	2	244	260

## Discussão

A tuberculose é um importante problema de saúde pública, e seu controle tornou-se um desafio em países em desenvolvimento, tais como a Índia.<sup>(14)</sup> A identificação dos casos é muito importante para o controle da doença e é realizada principalmente por meio da baciloscopia. A cultura, embora seja considerada o padrão ouro, precisa de instalações laboratoriais adequadas e leva mais tempo, o que torna seu uso impraticável em cenários com poucos recursos.

Na Índia, de acordo com as diretrizes do RNTCP, o método de Z-N é realizado em unidades primárias de saúde.<sup>(7)</sup> Entretanto, o método de Z-N acarreta problemas, tais como a necessidade de um suprimento regular de álcool/gás de petróleo liquefeito, o qual é utilizado para aquecimento. Também é um procedimento trabalhoso e pode ser perigoso. Existem várias tentativas de desenvolver uma técnica de coloração a frio para omitir a etapa que envolve o aquecimento de carbol-fucsina.<sup>(1,2,6)</sup>

No momento, a microscopia de fluorescência parece ser uma ferramenta efetiva, rápida e confiável para a identificação de casos, sendo mais sensível do que o método de Z-N. Também é mais fácil de ser realizada.<sup>(3-5,11,12)</sup> Entretanto, o custo-efetividade dessa técnica precisa ser considerado, pois ela tem altos custos de manutenção, incluindo o da lâmpada de mercúrio de ultra-alta pressão.

Vários métodos de coloração a frio em duas etapas, nos quais a etapa de aquecimento foi omitida e as etapas de descoloração e contracoloração foram combinadas, têm sido avaliados.<sup>(1,2,8,10)</sup> Entre essas técnicas, o MCG ganhou aceitação mundial, e o MMC apresentou resultados promissores em comparações com o Z-N.<sup>(6)</sup>

No presente estudo, avaliamos o MCG e o MMC, comparando-os com o MCF. Com o MCF, os BAAR aparecem como delgados bastões fluorescentes amarelo-cítricos, destacando-se claramente contra um fundo escuro. Com os outros dois métodos, os BAAR aparecem como imagens delicadas que representam mais de perto sua morfologia original, mas são mais fracas, o que pode explicar os resultados falso-negativos. Entretanto, não podemos ignorar a possibilidade de que o MCF também tenha produzido resultados falso-positivos, uma vez

que não foi realizada cultura. Portanto, para descartar os resultados falso-positivos do MCF, todos os esfregaços do MCF foram recorados pelo método de Z-N.

Em nosso estudo, obtivemos mais resultados positivos com o MCF. Entretanto, um estudo realizado na Tailândia apresentou melhores resultados com o MCG do que com o MCF.<sup>(8)</sup> Embora o MMC tenha sido menos sensível do que o MCF, o MMC foi mais rápido (< 10 min) e apresentou melhor sensibilidade do que o MCG. Em termos de custo, há uma diferença insignificante entre o MCG e o MMC, mas o MCF é mais caro do que os outros dois métodos, em razão dos custos de manutenção e da lâmpada. Além disso, a preparação dos esfregaços pelo MMC mostrou ser de fácil realização; qualquer laboratório de referência pode preparar os reagentes e distribuí-los aos laboratórios periféricos. O MMC também é consideravelmente mais rápido do que o MCG e o MCF, permitindo mais tempo para o exame dos esfregaços.

A concordância entre os três métodos de coloração a frio aqui avaliados foi boa, e não houve diferenças estatísticas significativas. O MMC mostrou-se mais rápido, menos caro e mais fácil de ser realizado. Portanto, esse método pode ser considerado uma ferramenta promissora para a identificação de casos na pesquisa de campo. Novos estudos devem ser realizados para estabelecer e avaliar uma técnica confiável de coloração que seja adequada para uso em cenários com poucos recursos em países em desenvolvimento.

## Referências

1. Gokhale S, Qadir S, Nagra JS, Chakraborty AK. Efficiency of cold staining method of AFB in sputum - a comparison with Ziehl Neelsen Method under field condition. *Indian J Tuberc*. 1990;37(3):135-7.
2. Selvakumar N, Gomathi M, Rehman F, Narayanan PR. Evaluation of a two-reagent cold staining method for detection of acid-fast bacilli. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2002;6(8):728-31.
3. Uluhanligil M, Aslan G, Tasçi S. A comparative study on the different staining methods and number of specimens for the detection of acid fast bacilli. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95(6):855-8.
4. Ziaee M, Namaei M, Khazae M, Azarkar G. Comparison of the value of two different sputum staining for diagnosis of acid fast bacilli. *Iranian J Clin Inf Dis*. 2008;3(2):99-102.
5. Jain A, Bhargava A, Agarwal SK. A comparative study of two commonly used staining techniques for acid fast bacilli in clinical specimens. *Indian J Tuberc*. 2002;49(3):161-2.

6. Gupta S, Prasad V, Bairy I, Muralidharan S. Comparative evaluation of two cold staining methods with the Ziehl-Neelsen method for the diagnosis of tuberculosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2009;40(4):765-9.
7. TBC India [homepage on the Internet]. New Delhi: Ministry of Health and Family Welfare [cited 2008 Dec 3]. Manual for Laboratory Technicians. [Adobe Acrobat document, 76p.] Available from: <http://www.tbcindia.org/pdfs/Module%20for%20Laboratory%20Technician.pdf>
8. Tansuphasiri U, Kladphuang B. Evaluation of sputum staining by modified cold method and comparison with Ziehl-Neelsen and fluorochrome methods for the primary diagnosis of tuberculosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2002;33(1):128-35.
9. Rao KP, Naganathan N, Nair SS. A cold staining method for tubercle bacilli using chloroform. *Indian J Tuberc*. 1966;14:3-9.
10. Reuben J, inventor. Stain for acid-fast bacilli. United States patent US 4857459. 1989 Aug 15.
11. Kumar R, Agarwal M, Prasad M. Demonstration of acid fast bacilli in sputum. *Indian J Tuberc*. 1979;26(1):17-20.
12. Ba F, Rieder HL. A comparison of fluorescence microscopy with the Ziehl-Neelsen technique in the examination of sputum for acid-fast bacilli. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1999;3(12):1101-5.
13. TBC India [homepage on the Internet]. New Delhi: Ministry of Health and Family Welfare [cited 2009 Sep 29]. Manual for Sputum Smear Fluorescence Microscopy. [Adobe Acrobat document, 16p.] Available from: [http://www.tbcindia.org/pdfs/Flourescence\\_Microscopy%20Manual.pdf](http://www.tbcindia.org/pdfs/Flourescence_Microscopy%20Manual.pdf)
14. Rao V G. Tuberculosis control: Current status and challenges. *RMRCT Update*. 2007;4(2):1-4.

## ***Sobre os autores***

---

### ***Soham Gupta***

*Senior Research Fellow*. Departamento de Microbiologia, St. John's Medical College, Bangalore, Índia.

### ***Vishnu Prasad Shenoy***

*Selection Grade Lecturer*. Departamento de Microbiologia, Kasturba Medical College, Manipal, Índia.

### ***Indira Bairy***

*Chefe*. Departamento de Microbiologia, Kasturba Medical College, Manipal, Índia.

### ***Sethumadhavan Muralidharan***

*Chefe*. Departamento de Microbiologia, St. John's Medical College, Bangalore, Índia.