

CONJUNTO PARA COLORAÇÃO DE ZIEHL GABBET



Finalidade:

Kit utilizado para coloração de BAAR pelo método de Ziehl Gabbet em materiais biológicos, principalmente para pesquisa de *Mycobacterium leprae* em linfa. Método de coloração a frio.

Registro ANVISA:

10097010156

Apresentação:

900099 - AZUL METILENO GABBET FR 500mL
900100 - FUCSINA FENICADA GABBET FR 500mL

LB 172189
Rev. 05 – 08/2024

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa, crônica, granulomatosa e de evolução lenta, causada pelo *Mycobacterium leprae* (bacilo de Hansen). Esse bacilo é capaz de infectar grande número de pessoas (alta infectividade), mas poucos adoecem (baixa patogenicidade). As manifestações clínicas da hanseníase são bastante variáveis e estão relacionadas com a imunogenicidade do bacilo e com o sistema imunológico do hospedeiro. A associação desses fatores é responsável pelo alto potencial incapacitante da doença e esta, sem dúvida, é uma das principais razões para que ela seja de notificação compulsória e investigação obrigatória. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda, para fins terapêuticos, a classificação operacional baseada no número de lesões cutâneas. Os casos com até cinco lesões são considerados Paucibacilares (PB) e aqueles com mais de cinco lesões são os Multibacilares (MB). O diagnóstico laboratorial da hanseníase é importante para auxiliar no diagnóstico diferencial com outras doenças dermatoneurológicas, casos suspeitos de recidiva e na classificação para fins de tratamento. Nestes casos, o exame bacilosκόpio do raspado intradérmico (baciloscopia) é o método comumente utilizado por ser de fácil execução, pouco invasivo e de baixo custo. O diagnóstico das Micobactérias patogênicas (*Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*), por bacterioscopia direta é feito através dos métodos de coloração, os quais utilizam a característica destas bactérias de possuírem paredes celulares com alto teor de lipídeos (cerca de 60%, principalmente de Ácido micólico), que quando tratadas pelo corante Fucsina fenicada, coram-se de vermelho e persistem ao descoramento subsequente por uma solução de Álcool-ácido forte (diferenciador). É por isto que são conhecidas por Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR). As outras bactérias, que não possuem tais paredes celulares ricas em lipídeos, têm a sua coloração pela Fucsina descorada pela solução de álcool-ácido e coram-se em azul pela coloração de fundo do azul de metileno (contra-corante).

2. COMPOSIÇÃO

Formulação do Azul Metileno Gabbet	Concentração/L
Ácido Sulfúrico	200mL
Azul de Metileno	10g
Álcool Etilíco	300mL
Água Deionizada	500mL

Formulação da Fucsina Fenicada Gabbet	Concentração/L
Fenol	80g
Surfactante	7,5mL
Água Deionizada	1000mL
Fucsina Básica	40g

Álcool Etilíco	200mL
----------------	-------

A formulação pode ser ajustada e/ou suplementada, conforme necessário, para cumprir os critérios de desempenho.

3. AMOSTRA

a- Tipos de amostras

- A metodologia de Ziehl-Gabbet pode ser utilizada em diversos materiais biológicos, como escarro, urina, fezes, raspados, LCR etc. Usualmente a principal amostra utilizada é a linfa.

b- Preparo do paciente

- Acomodar o paciente confortavelmente;
- Explicar o procedimento que será realizado. No caso de criança, explicar também para a pessoa responsável;
- Observar indicações dos sítios de coleta na solicitação médica.
- Manusear a lâmina pelas bordas evitando colocar os dedos no local onde a amostra será distribuída;
- Identificar a lâmina com as iniciais do nome do paciente, número de registro e a data da coleta;
- No momento da coleta fazer antisepsia com álcool a 70%, dos sítios indicados na solicitação médica;
- Com auxílio da pinça de Kelly, fazer uma prega no sítio de coleta, pressionando a pele o suficiente para obter a isquemia, evitando o sangramento. Manter a pressão até o final da coleta tomando cuidado de não travar a pinça;
- Fazer um corte na pele de aproximadamente 5 mm de extensão por 3 mm de profundidade. Colocar o lado não cortante da lâmina do bisturi em ângulo reto em relação ao corte e realizar o raspado intradérmico das bordas e do fundo da incisão, retirando quantidade suficiente e visível do material. Se fluir sangue no momento do procedimento (o que não deverá acontecer se a compressão da pele estiver adequada) enxugar com algodão;
- Desfazer a pressão e distribuir o material coletado na lâmina, fazendo movimentos circulares do centro para a borda numa área aproximadamente de 5 – 7 mm de diâmetro, mantendo uma camada fina e uniforme;
- O primeiro esfregaço deverá ser colocado na extremidade mais próxima da identificação do paciente (parte fosca), e o segundo próximo ao primeiro observando uma distância, de pelo menos 0,5cm entre cada amostra e assim sucessivamente. Os esfregaços devem estar no mesmo lado da parte fosca da lâmina;
- Entre um sítio e outro de coleta, limpar a lâmina do bisturi e a pinça utilizada com algodão ou gaze embebido em álcool 70%, para que não ocorra a contaminação entre eles;
- Fazer curativo compressivo e nunca liberar o paciente se estiver sangrando.

- Sugestões de coleta de raspado intradérmico:

Em pacientes com lesões cutâneas visíveis ou áreas com alteração de sensibilidade, a coleta deverá ser feita em lóbulo auricular direito

(LD), lóbulo auricular esquerdo (LE), cotovelo direito (CD) e lesão (L), conforme figura 1. Nas lesões planas, coletar no limite interno. Nos nódulo, tubérculos e placas eritematosas marginadas por microtubérculos, coletar no centro.

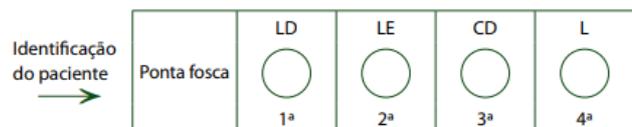


Figura 1. Coleta em pacientes com lesões cutâneas visíveis ou áreas com alteração de sensibilidade.

Em pacientes que não apresentam lesões ativas visíveis, colher material do lóbulo auricular direito (LD), lóbulo auricular esquerdo (LE), cotovelo direito (CD) e cotovelo esquerdo (CE), conforme figura 2:

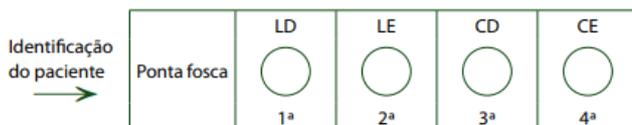


Figura 2. Coleta em pacientes que não apresentam lesões ativas visíveis.

c- Fixação

As lâminas contendo raspados intradérmicos devem permanecer em superfície plana e à temperatura ambiente, durante cinco a dez minutos até estarem completamente secos. Após essa etapa os esfregaços devem ser fixados passando-se as lâminas duas a três vezes, rapidamente, na chama d uma lamparina ou bico de Bunsen, com esfregaços voltados para cima;

Evitar o aquecimento da lâmina durante a fixação, para que não haja alteração das características morfológicas do bacilo. Em locais ou dias em que o ar esteja mais úmido, o tempo de secagem do esfregaço poderá ser maior.

d- Armazenamento e estabilidade

Após a fixação, acondicionar as lâminas em porta-lâminas de plástico rígido para evitar quebras, exposição à poeira e insetos, a fim de serem transportadas, no prazo máximo de 24 horas.

Os porta-lâminas deverão ser acondicionados em caixas resistentes, devidamente identificadas e fechadas, conforme normas de biossegurança.

e- Critérios de rejeição

Cabe ao laboratório a decisão de receber ou rejeitar a amostra conforme cada caso.

4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO

a- Princípio

O material clínico fixado em uma lâmina nova (limpa e desengordurada) é submetido à ação da fucsina fenicada. Após lavagem, mergulhada no azul de metileno, utilizado como corante de fundo.

b- Armazenamento e estabilidade

Para fins de transporte e armazenamento, o produto pode permanecer em temperatura ambiente, condições em que se mantém estáveis até a data de vencimento expressa em rótulo, desde que isento de contaminação de qualquer natureza. Recomenda-se manter o produto protegido de incidência direta de luz (natural ou artificial) e evitar grandes variações de temperatura até a utilização.

c- Precauções e cuidados especiais

- O produto é destinado apenas para o uso diagnóstico *in vitro*;
- Uso restrito por profissionais;
- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso, observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;
- Não inalar ou ingerir;
- Não utilizar produto com sinais de contaminação, ressecamento ou com alterações de cor ou espessura;

- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;
- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para “Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI® M29-A” para o manuseio seguro;
- Para acondicionamento e descarte do material usado, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Recomendamos o uso dos sacos DetriLab;
- Os procedimentos de manuseio referentes ao processamento e manuseio para o descarte deverá estar de acordo com a RDC 222, DE 28 DE MARÇO DE 2018 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

5. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)

- Bico de Bunsen;
- Lâminas;
- Alça bacteriológica;
- Microscópio.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO

- a- Preparar um esfregaço homogêneo e deixar secar a temperatura ambiente, fixando-o pelo calor.
- b- Cobrir o esfregaço com Fucsina de Gabbet deixando agir por 20 minutos.
- c- Lavar cuidadosamente em água corrente.
- d- Cobrir o esfregaço com Azul de Metileno de Gabbet deixando agir por 3 minutos.
- e- Lavar cuidadosamente em água corrente.
- f- Deixar secar na posição vertical em temperatura ambiente.
- g- Levar ao microscópio utilizando objetiva de imersão para leitura da lâmina;
- h- Começar a examinar o esfregaço na porção superior ou inferior, sistematicamente, em zig-zag em 100 campos representativos, conforme esquema a seguir:



Figura 3. Esquema para examinar o esfregaço

7. RESULTADOS

Bacilos Álcóol Ácido Resistente (BAAR) coram-se em vermelho. No caso de *Mycobacterium leprae* é possível a visualização de globias.

Determinação do índice baciloscópico:
(Escala de Ridley & Jopling)

Índice	Nº de bacilos
0	0 / 100 campos
1	1 a 10 / 100 campos
2	1 a 10 / 10 campos
3	1 a 10/ campo
4	10 a 100/ campo
5	100 a 1000/ campo
6	> 1000 / campo

Para índices de 0 a 3+ devem ser examinados 100 campos microscópicos; de 4+ a 6+, a leitura poderá ser realizada em 25 campos.

O índice baciloscópico será a soma dos valores obtidos em cada esfregaço divididos pelo número de locais coletados, conforme exemplo a seguir:

LOD = 4 +	$IB = \frac{17}{4} = 4,25$
LOE = 3 +	
CE = 4 +	
LESÃO = 6 +	

8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 830/2023)

Os resultados falsamente aumentados ou diminuídos, riscos associados à instabilidade, que poderiam levar a resultados

errôneos, danos relacionados ao usuário, podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- Congelamento de algum dos componentes.
- Após abertos, os componentes tornam-se suscetíveis a contaminações químicas ou microbianas que podem inviabilizar sua utilização.
- Manter os frascos dos padrões sempre fechados de maneira a evitar alterações em concentrações.
- Os reagentes se destinam ao uso diagnóstico *in vitro*, não devendo ser ingeridos ou entrar em contato com a pele e mucosas;
- Utilização de reagente vencido, contaminado ou em condições inadequadas.
- Erro na conservação dos reagentes.
- Deve-se evitar o uso de materiais que possam contaminar os reagentes.
- Interpretação equivocada de resultados.
- Tempo excessivo ou insuficiente de coloração.
- Armazenamento ou transporte de amostra inadequado.
- Não utilizar a proporção amostra reagente sugerida na técnica.
- Todas as amostras devem ser manipuladas com extrema cautela, pois podem veicular diversas doenças infectocontagiosas (hepatite, SIDA etc.).
- Mesmo após a coloração, a lâmina com o material deve continuar sendo considerada como material infectante, pois os BAAR podem eventualmente se manter viáveis após o processo.
- Após a baciloscopia adotar medidas de assepsia do microscópio, como a limpeza da platina com álcool 70% e das objetivas com material apropriado.
- Descartar as lâminas conforme procedimento adotado para materiais contaminados.
- Um exame baciloscópico negativo não exclui a possibilidade de doença.
- Executando-se rigorosamente a técnica como descrito, a sensibilidade diagnóstica da mesma é de cerca de 50% e especificidade de 100%.

9. CONTROLE DA QUALIDADE

- *Materiais necessários*

Cepas padrão: ATCC® (*American Type Culture Collection*) ou derivadas).

- *Controle de qualidade recomendado:*

Parâmetro	Resultado esperado
Micobactérias Células finas	Formato de bastão coradas em vermelho
Cocos Gram Positivos	Células esféricas coradas em azul
Bacilos Gram Negativos	Células em formato de bastão coradas em azul
Células Epiteliais	Tonalidade azulada
Coloração de Fundo	O fundo da lâmina apresenta-se límpido e isento de sujidades ou precipitados
Corante não utilizado	Fucsina fenicada: solução bordô escuro, livre de partículas visíveis Azul de metileno: solução azul, livre de partículas visíveis.

Parâmetro	Resultado esperado
<i>Micobacterium tuberculosis</i> ATCC® 25177	Bacilos curtos e longos cor-de-rosa em fundo azul
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Bacilos corados em azul
<i>S. aureus</i> ATCC® 25923	Cocos gran negativos, células esféricas coradas em azul

10. GARANTIA DA QUALIDADE

A Laborclin obedece ao disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário que:

- O usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;
 - Os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas;
 - Os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza.
- Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente conforme calendário estabelecido pela empresa até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser obtidos no site www.laborclin.com.br. Em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, entrar em contato com o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-0410027 ou pelo e-mail sac@laborclin.com.br. Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

11. REFERÊNCIAS

1. BAPTISTA, I.M.F.D et al. Guia de conduta para realização do exame baciloscópico. Hansen Int. 31(2): 39-41, 2006.
2. BIER, O. Bacteriologia e imunologia. São Paulo, Melhoramentos. 22a. Led.. 1982.
3. FLEMING, D. O. et al. Laboratory Safety: Principles and Practices, 2ªed. American Society for Microbiology. Washington, DC.
4. Guia de procedimentos técnicos Baciloscopia em Hanseníase – Ministério da Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.
5. GUPTA, S. et al. Comparação entre três métodos de coloração a frio no diagnóstico primário de tuberculose: um estudo piloto. J Bras Pneumol. 2010.
6. KONEMAN, Elmer; *et al.* Diagnostic Microbiology. Lippincott, USA, 5 ed., 1997.
7. KRASNOW, I. & Waune, L.G. Comparison of methods for tuberculosis bacteriology. Apl. microbiology, 1969.
8. LEIKER, D.L. & McDOUGALL, A.C. Guia técnico, Baciloscopia da hanseníase. Wurzburg, Telmilep, 2a. ed., 1987.
9. LENNETTE, E.H. Manual de microbiologia clínica., Buenos Aires, Panamericana, 4a. ed. 1985.
10. LIMA, O. A.; Soares J.B; Greco J.B. Galizzi; Cançado J.R: Métodos de laboratório aplicados à clínica; 1992.
11. LIU, W: A simplified cytologic staining technic. Am J Clin Pathol 54:767, 1970.
12. Manual de Bacteriologia da Tuberculose – Ministério da Saúde / FNS / CENEPI / CNPS / Centro de Referência Prof. Hélio Fraga – 2ª Edição Revisada e Ampliada – 1994.
13. MAHON, Connie, Manuselis, George Jr. Diagnostic Microbiology. Saunders, USA, 1995.
14. MURRAY, P. R. *et al.* Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington, DC: ASM Press, 2007.
15. OPLUSTIL, C. P. *et al.* Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 3. ed. São Paulo, 2010.
16. PELCZAR Jr, M. J.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R.; Microbiology: concepts and applications; McGrawHill. 1993.
17. RIBEIRO, M. C.; Soares, M. M. S. R.; Microbiologia prática: roteiro e manual; Atheneu; 1993.
18. STANER, R. Y.; Dourdoroff, M & Adelberg, E. Metodos de coloraciones in. Microbiologia. 2ªed. Madrid, 1977.
19. STANLEY S. Raphael: Lynch: Técnicas de laboratório; 1986.
20. TRABULSI, L. R; *et al.* Microbiologia. 3ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.



Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda
CNPJ 76.619.113/0001-31
Insc. Estadual 1370012926
Rua Casimiro de Abreu, 521

Pinhais/PR CEP 83.321-210
 Telefone (41) 3661-9000
www.laborclin.com.br
Responsável Técnico:
 Maire Wakamori – CRF/PR-20176
 Serviço de Assessoria ao Cliente
 SAC 0800-0410027
sac@laborclin.com.br

ANEXO 1 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

	Código do produto		Número de lote
	Número de série		Fabricante
	Consultar instruções para utilização		Validade
	Temperatura de armazenagem (limite de temperatura)		Produto para saúde para diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada		Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Quantidade suficiente para <n> ensaios		Frágil, manusear com cuidado
	Esterilizado utilizando técnicas assépticas de processamento		Esterilização utilizando óxido de etileno
	Esterilização utilizando irradiação		Esterilizado utilizando vapor ou calor seco.
	Risco biológico		Cuidado. Importante consultar instruções de uso.
	Controle		Controle Negativo
	Controle Positivo		Manter seco
	Manter afastado da luz solar e longe do calor		Somente para avaliação de desempenho
	Não utilizar		Não reesterilizar

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Terceira edição (24.08.2022)