



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**CORANTES ALTERNATIVOS PARA
USO NO DIAGNÓSTICO BACILOSCÓPICO DE
TUBERCULOSE**

LUCIANA BOTINELLY MENDONÇA FUJIMOTO

**Manaus – AM
27 de Outubro de 2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LUCIANA BOTINELLY MENDONÇA FUJIMOTO

**CORANTES ALTERNATIVOS PARA
USO NO DIAGNÓSTICO BACILOSCÓPICO DA
TUBERCULOSE**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, na área de concentração “Saúde”.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Júlia Ignez Salem

Co-Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio Veiga Junior

**Manaus – AM
27 de outubro de 2010**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Fujimoto, Luciana Botinelly Mendonça

F961c Corantes alternativos para uso no diagnóstico baciloscópico de tuberculose / Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto - Manaus: UFAM, 2010.

88 f.: il. color; 30 cm

Tese (Doutorado em Biotecnologia, área de concentração em Saúde) — Universidade Federal do Amazonas, 2010.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Júlia Ignez Salem

Co-Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio Veiga Junior

1. Tuberculose - Diagnóstico 2. Corantes no diagnóstico médico
I. Salem, Júlia Ignez (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas
III. Título

CDU 616.24-002.5(043.3)

LUCIANA BOTINELLY MENDONÇA FUJIMOTO

**CORANTES ALTERNATIVOS PARA
USO NO DIAGNÓSTICO BACILOSCÓPICO DA
TUBERCULOSE**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, na área de concentração “Saúde”.

Aprovada em 27 de outubro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Júlia Ignez Salem

Presidente, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - AM

Prof^ª. Dr^ª. Clarice Queico Fujimura Leite

Membro Externo, Universidade Estadual Paulista, Campus Araraquara - SP

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Orlandi Puccinelli Nogueira

Membro Interno, FioCruz, Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane - AM

Prof. Dr. José Odair Pereira

Membro Interno, Universidade Federal do Amazonas - AM

Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira

Membro Interno, Universidade Federal do Amazonas - AM

*Aos meus pais,
Myrthes Helena e João Luiz, e
À tia Teté,
que sempre estiveram ao meu lado
com amor, incentivo e compreensão.*

*Às minhas filhas Marisa e Victória,
luzes da minha vida e fontes de inspiração.*

*Ao meu marido Osamu,
pelo incentivo e paciência.*

*À amiga e orientadora Júlia Ignez Salem,
que há 20 anos tem sido minha
“mãe científica”.*

Agradecimentos

A Deus, por ter me inspirado coragem, determinação e perseverança para realizar este projeto.

*Aos meus pais, **Myrthes Helena e João Luiz**, e à tia **Teté**, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando, e desta forma, sendo a base sólida a todas as conquistas que realizei, e aos desafios futuros que espero realizar.*

*Às minhas filhas **Marisa e Victória** e ao meu marido **Osamu**, pela paciência, incentivo, compreensão e carinho sempre demonstrados.*

*À Profa. Dra. **Júlia Ignez Salem**, chefe do **Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)**, que há 20 anos me escolheu e acolheu como bolsista de Iniciação Científica de seu laboratório, acreditando que eu poderia ser uma pesquisadora, mesmo antes que eu soubesse o que este caminho representaria na minha vida pessoal e profissional.*

*À agência de fomento **Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM)** pelo financiamento parcial deste projeto.*

*À **Universidade Federal do Amazonas (UFAM)** e especialmente, aos **professores do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML)** – Drs. **Neila Falcone Bomfim, Jeconias Câmara, Luiz Ferreira, Dirceu Benedicto Ferreira, Joaquim Loureiro, Tatiana Libório dos Santos, Ricardo Alexandre Guimarães, Manoel Damasceno Melo, Lucileide Oliveira, Pricila Waleska, e Antônio Palhares**, pela liberação parcial e integral de minhas atividades docentes.*

*Aos professores do **Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia**, por todos os conhecimentos compartilhados.*

*Aos técnicos e amigos do **Laboratório de Micobacteriologia**, pelo incentivo e paciência, especialmente a **Francisco Farias de Carvalho, Sônia Rosa Barros Câmara, Mari Otsuka de Lima e Raimundo Bezerra do Nascimento**, pelo auxílio na preparação dos materiais e reagentes utilizados.*

*À Sra. **Maria de Fátima Barbosa**, técnica do **Laboratório de Patologia - UFAM**, pela disponibilização de 150 frascos âmbar para armazenamento de soluções corantes.*

*À Sra. **Socorrinha**, técnica do **Laboratório de Nutrição e Físico-Química de Alimentos – INPA**, e à profa. MsC **Maria Zeli Frota**, da **Faculdade de Farmácia – UFAM**, pela disponibilização de esfregaços bacteriológicos utilizados nos testes de especificidade.*

Ao Prof. Dr. **Valdir Florêncio Veiga Júnior**, professor do **Departamento de Química – UFAM**, e sua equipe, pela disponibilização de frações alcaloidicas e de alcalóides purificados, de espécies vegetais amazônicas, testados no presente trabalho.

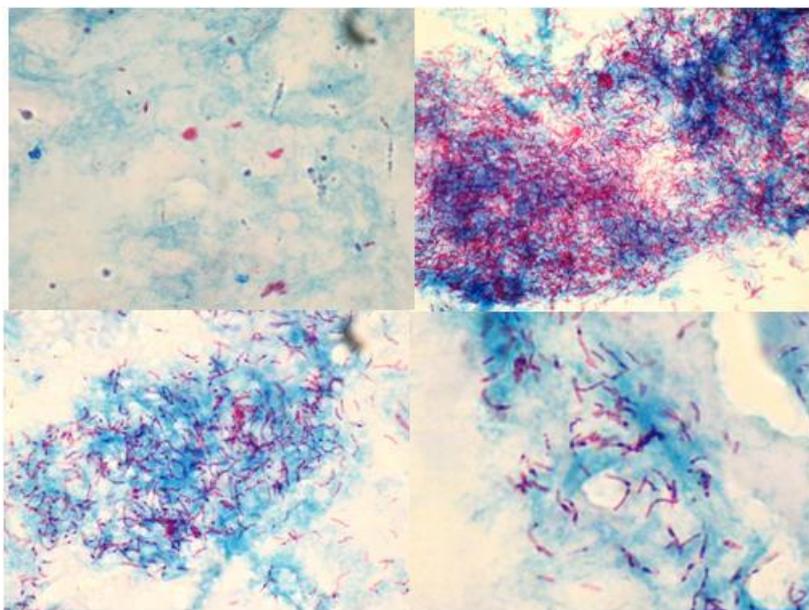
Ao Dr. **Jaime Paiva Lopes Aguiar**, pesquisador do **Laboratório de Nutrição e Físico-Química de Alimentos – INPA**, pela disponibilização de substâncias químicas utilizadas nos testes de otimização.

Aos meus **colegas de Doutorado**, pelo companheirismo e incentivo demonstrados, especialmente aos amigos **Clarice Maia Carvalho, Alita Moura Lima, e Maurício Morishi Ogusku**.

Aos amigos **Aya, João Vicente, Ana Cláudia, Eveleise Samira, Amélia, Ana Karla, e Antônio Luiz**, pelo apoio, amizade, paciência, e, é claro, pelas “risadas, berros e lanchinhos” compartilhados.

Às sras. **Laci Alves e Áurea Silva**, pelo auxílio nos cuidados com as minhas filhas e com a minha casa durante o período de realização deste projeto.

Aos **pacientes com Tuberculose**, cujas anônimas amostras, representadas pelas imagens baciloscópicas abaixo, permitiram a realização deste trabalho.



A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização desta tese, meus sinceros agradecimentos.

*“Tudo tem seu apogeu e seu declínio...
É natural que seja assim, todavia,
quando tudo parece convergir para o que supomos o nada,
eis que a vida ressurge, triunfante e bela!...
Novas folhas, novas flores, na infinita benção do
recomeço!...”*

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

Em quase todos os programas mundiais de controle da Tuberculose, a avaliação baciloscóptica é adotada como primeira opção de exame diagnóstico da doença. A Organização Mundial de Saúde estima que 150 milhões de pessoas, entre os anos de 2002 e 2020, adoecerão por Tuberculose, e este seria o número mínimo de baciloscopias a serem realizadas neste período. A coloração mais utilizada na baciloscopia é a de Ziehl-Neelsen, descrita há mais de 125 anos. Tem como princípio a propriedade que as micobactérias possuem, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis* – principal causador da Tuberculose, de reter uma solução corante composta por fucsina básica e fenol (carbolfucsina) em sua parede celular, mesmo após lavagem com solução álcool-ácida. Entretanto, a carbolfucsina é considerada indutora de tumores em roedores, quando introduzida em sua dieta, e há referência a perigo de grande dano para saúde humana em caso de exposição prolongada, com possíveis efeitos irreversíveis. É produto combustível, que em caso de aquecimento, como o recomendado para a execução da principal técnica de coloração, forma gases de combustão e vapores perigosos para inalação. Nenhuma opção de substituto menos tóxico que a carbolfucsina foi até o momento proposto. Desta forma, foi realizado estudo experimental de avaliação de doze corantes alternativos na execução de coloração baciloscóptica para micobactérias, visando aplicação em amostras clínicas submetidas ao diagnóstico laboratorial da Tuberculose. Para tanto, foram preparadas soluções dos corantes em teste - em diferentes concentrações e sem adição de fenol. Para os testes, baciloscopias positivas para BAAR, obtidas a partir de amostras de escarro e de isolado clínico de *M. tuberculosis*, foram coradas sem aquecimento, por 5 minutos, decoloradas com solução álcool-ácido por 1 minuto, e contra-coradas com azul de metileno, por 1 minuto. As leituras microscópicas foram realizadas em campo claro e em fluorescência (três filtros), objetiva de imersão (aumento de 100x). O corante mais promissor foi o alcalóide de espécie vegetal (AEV), o qual permitiu visualização bacilar, em microscopia de fluorescência, filtros azul e verde, sem agregação excessiva às células de fundo e/ou à secreção mucóide presente em amostras de escarro. Testes de sensibilidade de detecção bacilar, de especificidade, e comparativo com método bacteriológico tradicional confirmaram o potencial de utilização do AEV. Testes de otimização visando sua utilização para leitura em microscopia tradicional foram realizados, sem obter sucesso, fato que indica a realização de novos testes. Três alcalóides purificados e quatro frações alcaloídicas de possíveis fontes amazônicas do AEV foram testados e considerados como promissores para uso na coloração de micobactérias. Estes podem ao serem agregados ao AEV, propiciar o corante ideal para o diagnóstico da Tuberculose, permitindo visualização tanto à microscopia tradicional, quanto à de fluorescência.

Palavras-chave: tuberculose; diagnóstico; baciloscopia; corantes alternativos.

ABSTRACT

In almost all Tuberculosis control programs in the world, sputum smear analyze is the first choice diagnosis tool of the disease. The World Health Organization estimates that 150 million people, between the years 2002 and 2020, would have Tuberculosis, and this would be the minimum number of sputum smears to be performed during this period. The most widely stain used in smear staining is Ziehl-Neelsen's, described for over 125 years. This stain is based on the property that mycobacterias have, including *Mycobacterium tuberculosis* – main causing tuberculosis, to withhold a dye solution composed of fuchsin and phenol (carbofuchsin) in its cell wall, even after washing with acid-alcohol solution. However, carbofuchsin is recognized as a carcinogenic substance in rodents, when introduced into diet. There is reference to danger of great harm to human health by prolonged exposure, with irreversible consequences. It is flammable, but heating is recommended for implementation of main coloring technique, which releases combustion gases and vapors hazardous if inhaled. No other less toxic substance was proposed yet. Thus, experimental study of evaluation of twelve alternate dyes on coloring smears was carried out, aimed at implementing in clinical samples suspected of Tuberculosis. In-test dyes solutions were prepared, at different concentrations and without phenol addition. For testing, positive acid-fast bacilli sputum smears and clinical isolate of *M. tuberculosis* smears were stained without heating, for 5 minutes, bleached with alcohol-acid solution for 1 minute, and counterstained with methylene blue, for 1 minute. The microscopic readings were held in transmitted light and in fluorescence (three filters), at immersion objective (100 x). The most promising dye was the alkaloid from vegetable species (AEV), which allowed fluorescence reading, at green and blue filters, without excessive aggregation to background cells and/or to mucous material present in sputum samples. Sensitivity and specificity tests, and comparison with current bacteriological method confirmed the potential use of AEV. Optimization tests for traditional microscopy reading were made with no success, a fact that indicates other testing. Three purified alkaloids and four alkaloids fractions from amazonian plant species were tested and considered promising for use in mycobacterial stain. They could be added to AEV, providing the ideal dye for Tuberculosis diagnosis, allowing both traditional and fluorescence microscopy.

Key Words: tuberculosis; diagnosis; sputum smear; alternative dyes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Bacilos álcool-ácido resistentes (Coloração de Kinyoun, aumento 100x)	18
Figura 2	Parede celular do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
Figura 3	Pintura Rupestre: Nicho policrômico - Toca do Boqueirão da Pedra Furada, Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil	29
Figura 4	Fluxo de Atividades para Avaliação de corantes alternativos para detecção de micobactérias	37
Figura 5	Fotomicrografias de esfregaço concentrado de escarro corado pela coloração de Kinyoun, microscopia tradicional (A), e fluorescência filtro vermelho (B), mesmo campo (Objetiva 100x – imersão, zoom 4x)	51
Figura 6	Fotomicrografias de esfregaço de isolado clínico de <i>M. tuberculosis</i> , corado pela coloração de Kinyoun tradicional, na microscopia tradicional (A), e na de fluorescência – filtros azul (B), verde (C) e vermelho (D), mesmo campo (Objetiva de 100x - imersão, zoom de 4x)	52
Figura 7	Fotomicrografias de baciloscopia de escarro positivo para BAAR, sob a ação da solução álcool-ácida por 1 minuto, em fluorescência – filtros azul (A) e verde (B), mesmo campo (Objetiva de 100x - imersão, zoom de 4x)	55
Figura 8	Fotomicrografias de baciloscopia concentrada de escarro (A e B) e de esfregaço de <i>M. tuberculosis</i> (C e D), corados pela solução de AEV a 0,3%, utilizando microscopia de fluorescência, filtro azul (A e C) e filtro verde (B e D), correspondentes aos mesmos campos (Objetiva 100x - imersão, zoom 4x)	59
Figura 9	Fotomicrografias de esfregaço direto de escarro corado pela solução de AEV a 0,3%, em microscopia de fluorescência, filtro azul (A), e filtro verde (B), apresentando 2 bacilos ao centro do campo (Objetiva 100x - imersão, zoom 4x)	62
Figura 10	Fotomicrografias de esfregaço de isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i> (1), <i>M. gordonae</i> (2) e <i>M. fortuitum</i> (3), corados pela coloração do AEV a 0,3%, às fluorescências azul (A) e verde (B), mesmos campos (Objetiva de 100x - imersão, zoom de 4x)	63
Figura 11	Painel de fotomicrografias de esfregaços de <i>M. tuberculosis</i> , corados por diferentes soluções de AEV, em diferentes períodos de tempo, à fluorescência azul (Objetiva de 100x - imersão, zoom de 4x)	65
Figura 12	Painel de fotomicrografias de esfregaços de <i>M. tuberculosis</i> corados por solução de AEV a 0,3% por 5 minutos, e submetidos a diferentes tempos de descoloração com solução álcool-ácida, fluorescências azul e verde (Objetiva de 100x - imersão, zoom de 4x)	67

Figura 13	Painel de fotomicrografias de baciloscopias positivas para BAAR coradas por soluções de AEV a 0,3%, em diferentes pH, microscopia tradicional e fluorescências (Objetiva de 100x - imersão, zoom de 4x) .	68
Figura 14	Painel de fotomicrografias de baciloscopias positivas para BAAR coradas pelas colorações e solução padrão, e por substâncias naturais em teste, microscopia tradicional e fluorescências (Objetiva de 100x - imersão, zoom de 4x)	76

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Concentrações dos reagentes de soluções de três técnicas de coloração utilizadas no exame baciloscópico para micobactérias	24
Tabela 1	Detecção de bacilos em esfregaços direto de escarro, conforme resultados em coloração de Kinyoun e de AEV	61
Tabela 2	Resultados das leituras microscópicas de esfregaços de <i>M. tuberculosis</i> corados com soluções de AEV, em diferentes tempos	64
Tabela 3	Resultados dos esfregaços de <i>M. tuberculosis</i> corados por solução de AEV conforme os diferentes tempos de descoloração com solução álcool-ácida	66
Tabela 4	Resultados das leituras de esfregaços positivos para BAAR corados por soluções de AEV a 0,3%, em diferentes pH	68
Tabela 5	Resultados das Leituras de esfregaços positivos para BAAR corados por soluções de AEV a 0,3%, conforme a adição de substâncias para otimização de leitura microscópica tradicional	70
Tabela 6	Resultados de baciloscopias de escarro positivas para BAAR, conforme as leituras de coloração e recoloração	71
Tabela 7	Diagnóstico de Tuberculose, conforme os resultados de baciloscopia, cultivo e PCR	73
Tabela 8	Resultados de leituras de baciloscopias coradas pelas colorações e solução padrão, e por substâncias naturais em teste	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
'	Minutos
”	Segundos
=	Igual a
>	Maior que
μ	Micro
a.C.	Antes de Cristo
AEV	Alcalóide de Espécie Vegetal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAAR	Bacilo(s) álcool-ácido resistente(s)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
CPCS	Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde
CREPS	Centro de Referência Estadual em Pneumologia Sanitária (Cardoso Fontes)
CSIN	Corantes Sintéticos Idênticos Aos Naturais
CSMTF	Corantes Sintéticos Menos Tóxicos do que a Fucsina
d.C.	Depois de Cristo
EC	Esfregação após-concentração
ED	Esfregação Direto
FAPEAM	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas
FUMDHAM	Fundação Museu do Homem Americano
° C	Graus Celsius
° GL	Graus Gay Lussac
hab.	Habitantes
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IB	Índice baciloscópio
IC	Isolado Clínico
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
ISO	<i>International Standards Organization</i>
LACEN	Laboratórios Centrais
LJ	Meio de Löwenstein-Jensen
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIPT	Programa Integrado de Pesquisa Científica e Tecnológica

S	Escore de leitura para BAAR de acordo com Ministério da Saúde do Brasil
SAA	Solução álcool-ácida
SGQB	Sistema de Garantia de Qualidade em Baciloscopia
Tb	Tuberculose
Tb-MDR	Tuberculose multiresistente adroga
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFC	Unidade(s) Formadora(s) de Colônias
xg	Unidade de força centrífuga relativa
ZN	Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	A Tuberculose e o seu Diagnóstico Laboratorial	17
2.2	O Diagnóstico Baciloscópico	21
2.3	A Visão Colorida, as Cores e os Corantes Naturais	26
3	OBJETIVOS	34
4	METODOLOGIA	35
4.1	Modelo de Estudo	35
4.2	Universo de Estudo	35
4.2.1	Esfregaços Baciloscópicos	35
4.2.2	Corantes	36
4.3	Informações Éticas e de Financiamento	36
4.4	Organização do Experimento	37
4.5	Detalhes dos Procedimentos	37
4.5.1	Preparação das Baciloscopias	37
4.5.2	Preparação de Soluções	39
4.5.3	Coloração das Baciloscopias	40
4.5.4	Leitura Microscópica	44
4.5.5	Análises complementares em corante promissor	46
4.6	Análise dos Resultados	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
5.1	Análise das colorações tradicionais de Kinyoun e de Ziehl-Neelsen, e de suas modificações	51
5.2	Análise das soluções que compõem as colorações tradicionais de Kinyoun e de Ziehl-Neelsen, e de suas modificações	54
5.2.1	Com relação às soluções de fucsina	54
5.2.2	Com relação à solução álcool-ácida	55
5.2.3	Com relação à solução de azul de metileno	58
5.3	Análises com corantes	58
5.4	Análises Complementares com corante AEV	60
5.4.1	Reavaliação dos resultados iniciais	60
5.4.2	Análise de sensibilidade de detecção bacilar.....	61
5.4.3	Análise de especificidade com outros microrganismos	62
5.4.4	Otimização da solução de coloração	64
5.4.5	Análise de concordância com bacteriologia tradicional e exame molecular	72
5.5	Análise de fonte biológica amazônica do corante mais promissor	75
6	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
	APÊNDICES	86

1. INTRODUÇÃO

A avaliação baciloscóptica é adotada como primeira opção de exame diagnóstico para Tuberculose (Tb) em quase todos os programas mundiais de controle da doença (CDC, 2002). Esta atitude é justificada pelo fato de que, quando corretamente executada, a mesma permite a detecção de 70% a 80% dos casos de Tb pulmonar em uma comunidade, com especificidade em torno de 84% a 100% (DANIEL, 1990). Entretanto, dois problemas cruciais ao bom desempenho da mesma são destacados. O primeiro é referente à técnica de coloração atual – base para a interpretação diagnóstica, e que utiliza substâncias potencialmente cancerígenas. O segundo é referente à inexistência de mecanismo efetivo que garanta a proficiência dos diferentes profissionais, envolvidos na liberação de resultados de baciloscopias na rede de saúde básica, sem que o processo tenha o homem como padrão ouro (VIEIRA et al., 2008).

A coloração mais utilizada na baciloscopia é a de Ziehl-Neelsen (ZN), descrita em 1883 (SIQUEIRA et al., 1984). Esta tem como princípio a propriedade que as micobactérias possuem, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis* – principal agente causador da Tb, de reter uma solução corante composta por fucsina básica e fenol (carbolfucsina) em sua parede celular mesmo após lavagem com solução álcool-ácida. Entretanto, estes componentes, até hoje mundialmente utilizados, são considerados como potencialmente cancerígenos para seres humanos (BRASIL, 2005; SIGMA-ALDRICH, 2009; MERCK, 2010a).

Em trabalhos experimentais, a carbolfucsina apresenta-se como substância que induz frequentemente a formação de tumores de diferentes órgãos em roedores, quando a substância é introduzida em sua alimentação. Há referência indicando perigo de grande dano para saúde em caso de exposição prolongada, com possíveis riscos de efeito irreversível (SIGMA-ALDRICH, 2009). Trata-se de produto combustível, que em caso de aquecimento, como o recomendado para a execução da coloração baciloscóptica, propicia a formação de gases de combustão e de vapores perigosos para inalação. Infelizmente, informações quantitativas sobre os efeitos ecotóxicos do produto não são disponíveis (MERCK, 2010a).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 150 milhões de pessoas, entre os anos de 2002 e 2020, adoecerão por Tb (VEGA et al., 2005). Logo, este seria o número mínimo de baciloscopias a serem realizadas no mesmo período de tempo, sem considerar que o exame é geralmente realizado em duas ou três amostras de cada paciente suspeito de Tb, e por isto, não necessariamente só nos que estiverem realmente doentes.

Segundo o Sistema de Garantia da Qualidade da Baciloscopia (SGQB) para Tb (CDC, 2002), um dos mecanismos de controle de qualidade dos serviços laboratoriais prestados é a realização de teste de Proficiência. Este teste visa obter padrões de alta qualidade para microscopistas e é executado através de exame de painéis contendo esfregaços com diferentes índices de positividade através dos quais é estabelecida, inicialmente, a concordância intra-leitor e, posteriormente, a inter-leitor. No Brasil, estas atividades deveriam ser realizadas em cada Estado da Federação pelos LACEN – Laboratórios Centrais (BRASIL, 2002a), mas na prática ainda não foram efetivadas.

Em recente trabalho avaliando metodologias para a execução de testes de proficiência, Vieira et al. (2008) demonstraram que entre cinco profissionais considerados como Sênior em microscopia de Tb, cada um de uma região geográfica do Brasil, a média de concordância intra-leitor em esfregaços altamente positivos foi de 81,3% (intervalo de 76% a 88%). Este resultado demonstra as dificuldades práticas da arte de interpretar as baciloscopias, visto que a concordância esperada era próxima a 95% no referido grupo (CDC, 2002).

É possível que estes dois problemas sejam solucionados com o estabelecimento de uma nova coloração. Nesta, as substâncias utilizadas não possuiriam efeitos tóxicos e nem carcinogênicos aos seus manipuladores e/ou ao ecossistema. Poderiam também permitir a captura de imagens por programas computacionais direcionados ao diagnóstico microscópico de *M. tuberculosis*, visando reduzir a margem de erro relacionada à interpretação subjetiva dos microscopistas, eliminando-se assim o homem como padrão ouro de leituras.

Pelo exposto, analisou-se a capacidade de diferentes corantes como alternativos para o diagnóstico baciloscópico de Tuberculose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Tuberculose e o diagnóstico laboratorial

A OMS estima que um terço da população esteja infectada pelo Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* e *M. microti*), e que a Tb possa vir a se manifestar em 10% destas pessoas, ao longo da vida. Destes registros, 95% devem ocorrer em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil. Atualmente, a incidência no Brasil é de 38 casos/100.000 hab. (PMM, 2009). No Estado do Amazonas, segundo o Programa Nacional de Controle da Tuberculose, o coeficiente de incidência de 2008, para todas as formas de Tb, foi de 71,7/100.000 hab., correspondendo a 2.395 casos novos de todas as formas (BRASIL, 2009), e em Manaus – capital do Amazonas, foi de 96,7/100.000 hab. (PMM, 2009).

Assim como as demais doenças infecciosas, o diagnóstico de Tb é estabelecido a partir da detecção/isolamento do agente agressor em amostras clínicas, sejam estas pulmonares ou extra-pulmonares. De acordo com Vega et al. (2005), o gênero *Mycobacterium* é o único que pertence a família *Mycobacteriaceae* e à Ordem *Actinomycetales*. Está constituído por bactérias retas ou ligeiramente curvas (morfologia bacilar), medindo entre 0,2 e 0,7 µm de largura por 1 a 10 µm de comprimento, aeróbio, imóvel, não produtor de esporos, não encapsulado, e não flagelado. Semelhante às demais espécies pertencentes ao mesmo gênero, o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* possui a propriedade de álcool-ácido resistência, devido à capacidade de reter o corante carbolfucsina (fucsina básica misturada a fenol), mesmo após lavagem com solução álcool-ácida. Esta propriedade agregada à morfologia bacilar é o motivo pelo qual as micobactérias são denominadas de **bacilos álcool-ácido resistentes – BAAR**.

A propriedade de álcool-ácido resistência do Complexo *M. tuberculosis* é o princípio básico para o diagnóstico de Tb através da baciloscopia, ou seja, pesquisa dos BAAR em microscópio óptico, em objetiva de 100x, conforme apresentado na Figura 1.

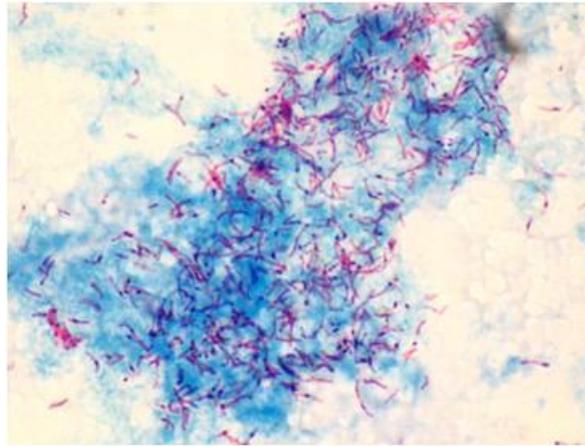


Figura 1. Bacilos álcool-ácido resistentes (Coloração de Kinyoun, aumento 100x).
Fonte: Laboratório de Micobacteriologia/CPCS/INPA

A álcool-ácido resistência provavelmente é conseqüente à presença de abundante quantidade de glicolípídios na parede bacilar (HARADA, 1976). Segundo Ryll et al. (2001) e Brennan (2003), esta parede apresenta estrutura complexa, conforme apresentado na Figura 2.

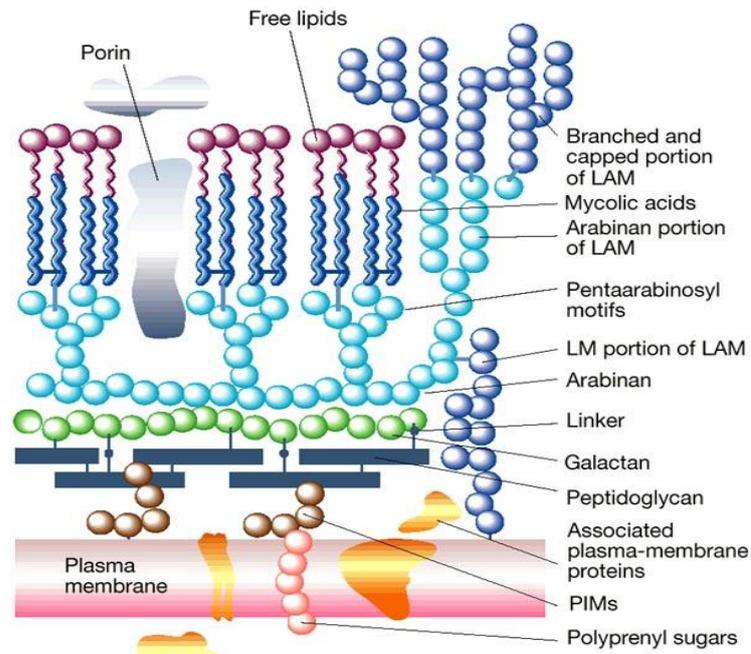


Figura 2. Parede celular do *Mycobacterium tuberculosis* (Porin=abertura da parede; free lipids=lipídeos livres; LAM=lipoarabinomananas; LM=lipomananas; PIM= manosídeos de fosfatidilinositol; Branched and capped portion of LAM= porções livres da LAM; Mycolic acids=ácidos micólicos; Linker=ligantes).

Fonte: Park; Bendelac (2000)

Os peptidoglicanos presentes na parede conferem rigidez e forma à bactéria. Os ácidos micólicos, ácidos graxos de cadeia longa com 60 a 90 átomos de carbono, são de grande importância taxonômica. Estes ácidos estão perpendicularmente orientados pelo plano da membrana na região apical, e compõem o fator corda, no qual o 6,6'-dimicolato- α -D-trealose é o tipo mais proeminente. Em conjunto, os constituintes da parede conferem escassa permeabilidade celular, sendo responsáveis pela álcool-ácido resistência, e pela ineficácia de múltiplos agentes antimicrobianos (VEGA et al., 2005).

O método de escolha para o diagnóstico da Tb pulmonar na rede pública é a baciloscopia, por detectar rapidamente a presença de BAAR e permitir a autorização imediata de início do tratamento específico. Entretanto, em torno de 30% dos portadores de Tb não expelem quantitativos de BAAR suficientes para serem detectados pela baciloscopia. Neste caso se faz necessário o uso do exame de cultivo das secreções para isolamento do agente etiológico (BRASIL, 2002b).

Em meios de cultivo clássicos, principalmente os sólidos a base de ovos ou de ágar, o isolamento do Complexo *M. tuberculosis* pode necessitar de até 2 meses devido o tempo de geração bacilar ser de 18 horas (DAVID, 1976). De acordo com as III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT, 2009), as situações em que o cultivo está recomendado são:

- ✓ Suspeita clínica de Tb e pesquisa de BAAR negativa;
- ✓ Suspeita de Tb pulmonar na radiografia torácica;
- ✓ Suspeita de Tb extrapulmonar e espécimes paucibacilares;
- ✓ Em populações vulneráveis (detentos, profissionais da área da saúde, moradores de rua e populações institucionalizadas em albergues, hospitais psiquiátricos e asilos);
- ✓ Em pacientes HIV positivos, mesmo com baciloscopia positiva, visando a identificação da espécie e a realização do teste de sensibilidade; e,
- ✓ Em pacientes com indicação de retratamento devido a suspeita de: falência ao esquema

padrão, Tuberculose multiresistente (Tb-MDR), recidiva da doença ou reinício de tratamento após abandono.

Em métodos automatizados, nos quais o isolamento e a identificação variam de 1-4 semanas (WHO, 2006), são mais utilizados meios líquidos, incrementados com substâncias reveladoras de crescimento e/ou úteis para a identificação de sensibilidade às drogas. Como exemplo de sistemas automatizados tem-se: TK MEDIA (SALUBRIS, Inc.), que utiliza meio sólido, e BACTEC 460 (Becton Dickinson), MGIT™ 960 (Becton Dickinson), MB/BacT (bioMérieux), SeptiChek-AFB™ (Becton Dickinson), ESP Culture II System (Trek Diagnostics), que utilizam meios líquidos (WHO, 2006). O uso destes sistemas envolve custos elevados, requer infraestrutura diferenciada, além da manutenção dos equipamentos, sendo a disponibilidade limitada a poucas cidades brasileiras.

De acordo com a OMS (WHO, 2006), podem ainda ser utilizados no diagnóstico laboratorial da Tb:

- ✓ métodos de amplificação de ácidos nucléicos, que apresentam custo elevado e maior complexidade de realização, menor especificidade por apresentarem elevado número proporcional de resultados falso-positivos,
- ✓ métodos sorológicos, que apresentam resultados limitados, pois não permitem distinguir doença tuberculosa ativa da infecção latente pelo *M. tuberculosis*, e *M. tuberculosis* de outras micobactérias, e,
- ✓ ensaios com bacteriófagos, avaliado apenas em amostras de escarro, e que requerem conhecimentos técnicos sofisticados.

A detecção de citocinas não é recomendada para avaliação de pacientes com suspeita de doença tuberculosa, mas é utilizada na detecção de casos de Tb latente. Requer amostras recém coletadas de sangue, é dispendiosa, e nela são utilizados kits comerciais, como os americanos Quanti-FERON®-TB (Cellestis), Quanti-FERON®-TB Gold (Cellestis), e o europeu, T SPOT-TB (Oxford Immunotec) (WHO, 2006).

Métodos que utilizam cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) podem ser utilizados na identificação do perfil de ácidos micólicos existentes em diferentes espécies micobacterianas (CDC, 1996). Entretanto, requerem suspensões micobacterianas obtidas de cultivos, não sendo utilizados de rotina na prática laboratorial, mas apenas em centros de pesquisa.

Kumar et al. (2004) descrevem um método de diagnóstico com base em um sistema biomicroeletromecânico, nanotecnológico, ainda sem dados suficientes para uso em larga escala.

Pelo exposto, compreende-se – quer pela complexidade de execução, quer pelos custos envolvidos em infraestrutura, treinamento de pessoal, manutenção de equipamentos, e aquisição de insumos, o porquê da baciloscopia permanecer como a primeira opção de exame diagnóstico para Tb pulmonar, em quase todos os programas mundiais de controle da doença (CDC, 2002).

2.2 O Diagnóstico baciloscópico

A baciloscopia consegue detectar 70 a 80% dos casos de Tb pulmonar em uma comunidade, com especificidade em torno de 84% a 100% (DANIEL, 1990). Essa positividade só não alcança índices superiores devido à necessidade de 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro de escarro, para a obtenção de um resultado positivo (WHO, 2006). Mesmo assim a baciloscopia é considerada como “a mais importante atividade do programa de controle da Tb instituído pelo Ministério da Saúde do Brasil, na busca e detecção dos casos bacilíferos de Tb” (BRASIL, 2005). Esta atividade possibilita o início do tratamento e a interrupção da cadeia de transmissão. Alguns grupos de pacientes são prioritários para a realização deste exame, e incluem pacientes sintomáticos respiratórios, com tosse e expectoração por duas ou mais semanas, pacientes submetidos a exame radiológico que

apresentem imagens suspeitas, e ainda aqueles que mantêm ou mantiveram contato familiar e/ou profissional com paciente tuberculoso que apresente tosse ou expectoração, imagem radiológica suspeita e/ou teste tuberculínico positivo.

A baciloscopia também pode ser empregada no controle da eficácia de tratamento quimioterápico em pacientes com Tb (BRASIL, 2001). Para que este controle ocorra é indispensável que ao final do 2º, do 4º e do 6º meses de tratamento, ou melhor, se possível ao final de cada um dos seis meses de tratamento, a mesma seja realizada. Isto permite a construção de uma curva baciloscópica, em que irregularidades na redução do índice baciloscópico podem sugerir ingestão incorreta dos medicamentos ou resistência dos bacilos às drogas utilizadas (BRASIL, 2001). A negatificação do escarro seguida de positividade pode indicar ainda falência de tratamento. Ou, se após um período sem tratamento, a baciloscopia tornar a ser positiva, poderá ter ocorrido uma recaída ou recidiva da lesão, indicando a reavaliação do caso, com provável reinício do tratamento. Além do exposto, este método apresenta as seguintes vantagens:

- ✓ Ser de rápida realização, na qual o resultado pode ser obtido desde alguns minutos após a chegada da amostra no laboratório, ou quando muito demorado, no dia seguinte,
- ✓ Específica o suficiente para indicar tratamento em países de alta prevalência de Tb,
- ✓ Quase sempre os BAAR visualizados são do Complexo *M. tuberculosis*, principalmente porque a pesquisa é realizada no escarro,
- ✓ A contagem dos bacilos, quando positiva, é diretamente proporcional à extensão da lesão e, embora semiquantitativa, fornece uma medida de eficácia da associação de medicamentos utilizados no tratamento,
- ✓ O equipamento necessário para sua realização é de baixo custo e de fácil transporte,
- ✓ Está mundialmente estabelecida.

Pode ainda ser aplicada a diferentes tipos de amostra: o mais comum é escarro, mas também podem ser analisados outros materiais, como urina, fezes, líquor, líquido pleural, lavado broncoalveolar, biópsias e secreções diversas (DAVID et al., 1989).

Suas limitações, de acordo com a OMS (WHO, 2006), incluem: requerer técnicos bem treinados e motivados, ser pouco sensível em casos de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, em crianças e em doença extra-pulmonar, não permitir distinção entre bactéria sensível ou resistente a drogas, e requerer amostras repetidas (duas ou três).

A coloração mais utilizada na baciloscopia é a de Ziehl-Neelsen (ZN), publicada em 1883 e a primeira a indicar a fucsina básica associada ao fenol (carbolfucsina) para coloração dos bacilos (SIQUEIRA et al., 1983; SIQUEIRA et al., 1984).

De acordo com Titford (2001; 2007), a fucsina básica foi sintetizada junto com uma série de pelo menos 17 substâncias corantes produzidas na Alemanha, entre 1880 e 1939, pelas firmas fundadas por George Grüber, farmacêutico alemão. Em 1880, Grüber iniciou as atividades da fábrica “Physiological-Chemical Laboratory”, e em 1897, as da “Dr. G.Grüber & Company, Dyes, Chemical Preparations for Microscopy and Bacteriology”, como resposta à demanda de corantes para uso em colorações biológicas. Utilizando métodos empíricos “secretos”, vários corantes foram obtidos, e a habilidade dos mesmos em colorir tecidos foi testada. Depois de definida a propriedade tintorial, estes corantes eram embalados e vendidos. Do grupo de corantes desenvolvidos por Grüber também fazem parte o azul de metileno e a auramina, esta com propriedades fluorescentes e utilizada em colorações para BAAR.

De acordo com Conn (1930), em 1881, após a publicação dos trabalhos de Paul Ehrlich, empregando azul de metileno como corante de bactérias, Robert Koch e o próprio Ehrlich fizeram modificações à coloração de bactérias, utilizada em tecidos e na bacteriologia. Em 1882, Ziehl introduziu a adição do fenol na então solução de coloração de metilvioleta (carbolmetilvioleta) para a demonstração dos bacilos da Tb. No ano seguinte, em 1883, Neelsen propôs a substituição da solução de carbolmetilvioleta pela de carbolfucsina, dando origem à solução de carbolfucsina de Ziehl-Neelsen.

Diversas modificações à coloração de ZN foram tentadas ao longo dos anos, sendo que

algumas destas ainda são amplamente utilizadas, como a coloração de Kinyoun, que utiliza a carbolfucsina, mas sem realizar aquecimento da solução corante (KINYOUN, 1915; DAVID et al., 1989; BRASIL, 2008). Outros substituíram a carbolfucsina por corantes fluorocrômicos, como a auramina-O, situação que necessita de posterior confirmação da positividade com a recoloração da lâmina pelo ZN ou Kinyoun (BRASIL, 2008). No Quadro 1 estão apresentadas as principais etapas e substâncias utilizadas nas colorações de ZN, Kinyoun e Fluorescência com auramina-O, de acordo com David et al. (1989) e com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2008).

Quadro 1

Concentrações dos reagentes de soluções de três colorações utilizadas no exame baciloscópico para micobactérias

Reagentes	Ziehl-Neelsen	Kinyoun	Fluorescente
Fucsina Básica	0,3%	3,3%	---
Auramina-O	---	---	0,1%
Álcool etílico na solução de fucsina ou auramina	9,5%	15,83%	9,79%
Fenol na solução de fucsina ou auramina	4,5%	6,67%	3,44%
Aquecimento/Tempo de coloração	Sim Três emissões de vapor, com permanência de 5 minutos após a primeira emissão	Não. Duração: 5 minutos	Não. Duração: 15 minutos
Solução álcool-ácida	92,15% álcool e 3,09% ácido clorídrico	(= ZN)	0,5% ácido-álcool (álcool 70% e ácido 0,5%)
Contra-coloração	Azul de metileno 0,3% por 30 segundos	Azul de metileno 0,3% por 4 minutos	1ª opção: Permanganato de potássio 2ª opção: Laranja de acridina

Mesmo nas publicações mais recentes não há questionamentos sobre a soberania da carbolfucsina, a não ser para alterar a sua concentração nas soluções, alteração no tempo de

permanência do esfregaço sob a ação do corante, ou ainda sobre outras questões operacionais (SELVAKUMAR et al., 2002; MURRAY et al., 2003; SELVAKUMAR et al., 2005; VAN DEUN et al., 2005; SELVAKUMAR et al., 2008; VAN DEUN et al., 2008; GORDON et al., 2009). Em outros, a eficiência do ZN é comparada a da auramina-O (ULUKANLIGIL et al., 2000; STEINGART et al., 2006; LIMA et al., 2008). Nenhum tentou oferecer outros corantes como real opção, visto que os corantes referidos são de alta toxicidade para o ser humano.

Com relação a novos equipamentos e/ou a programas computacionais de automatização de leitura microscópica, apenas recentemente foram publicados trabalhos que descrevem estas novas tecnologias. Novos microscópios têm sido desenvolvidos visando reduzir os custos da leitura em microscopia por fluorescência. Atualmente, este utiliza lâmpadas arco de vapor de mercúrio ou de xenônio, que tem vida útil restrita e custos elevados de manutenção/substituição a cada 200 a 300 horas.

Hänscheid et al. (2007), Hänscheid (2008) e Marais et al. (2008) descrevem suas experiências na utilização de um microscópio que utiliza diodos de luz emitida (LED) como fonte luminosa para leitura de esfregaços corados pela auramina-O. Esta fonte luminosa tem duração de 20.000 a 30.000 horas (HÄNSCHEID, 2008) ou superior a 50.000 horas (MARAIS et al., 2008), pode permanecer ligada por períodos longos com carga de bateria (HÄNSCHEID et al., 2007), e apresenta baixos custos de aquisição e/ou produção (HÄNSCHEID et al., 2007; HÄNSCHEID, 2008; MARAIS et al., 2008).

Sobre a implantação de equipamentos que realizem a leitura automatizada dos esfregaços baciloscópicos, poucos trabalhos têm sido publicados. Forero et al. (2004) descrevem técnica de processamento de imagens para detecção de *M. tuberculosis* em esfregaços de escarro corados pela auramina-O, baseado na forma e cor dos bacilos. Russell; Douglas (2007) descrevem a avaliação de algoritmos de autofocus para a microscopia da Tb, em esfregaços corados pelo ZN. A avaliação do autofocus é uma das etapas iniciais para o

desenvolvimento de programas de automatização de leitura, assim com a avaliação do limiar adaptativo e a análise de tamanho e forma por técnicas de segmentação bacilar.

Sadaphal et al. (2008), em um comunicado breve, relatam método de processamento de imagem que permite o diagnóstico eletrônico do *M. tuberculosis* em esfregaços corados pelo ZN. Em Manaus-AM, o grupo de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da UFAM, em conjunto com pesquisadores do Laboratório de Micobacteriologia do INPA, vem desenvolvendo as diferentes etapas de elaboração de um programa de leitura automatizada de esfregaços baciloscópicos, corados pelo Kinyoun, já com resultados publicados (SENA et al., 2008; COSTA et al., 2008; KIMURA JUNIOR et al., 2010).

Pelo exposto, verifica-se o quanto há para ser realizado na melhoria das condições de trabalho laboratorial, com eliminação de práticas perigosas como o aquecimento na coloração de ZN, e a substituição de produtos químicos tóxicos e/ou cancerígenos, como a carbolfucsina e a auramina-O, utilizados mundialmente na pesquisa de BAAR.

2.3 A Visão Colorida, as Cores e os Corantes Naturais

O mundo que nos rodeia é repleto de cores, percebidas com o sentido da visão. Esta é feita pelo cérebro, provavelmente no córtex occipital, onde os olhos funcionam como órgãos de conversão seletiva do estímulo luminoso em sinais elétricos. A luz, proveniente de um objeto de interesse, atravessa os meios transparentes do olho e se projeta sobre a retina. Nesta, a luz é convertida em impulsos elétricos, direcionados ao córtex cerebral através de nervos e vias ópticas, onde são decodificados na forma de impressão visual (FARIA-SOUSA, 1997).

De acordo com Kierszenbaum (2004) e Junqueira; Carneiro (2008), a retina, uma extensão do cérebro humano, contém uma camada estratificada de células nervosas organizada em duas camadas, que são o epitélio pigmentado da retina externo e a retina

sensorial interna. É nesta última que estão localizados os neurônios fotorreceptores, os bastonetes e os cones. Os bastonetes contêm o fotopigmento rodopsina, que opera durante a visão noturna, e é sensível predominantemente à luz, mas também à visão colorida. Existem três tipos de cones, que possuem pigmentos semelhantes à rodopsina, a iodopsina, que são sensíveis às cores. Estes fotopigmentos possuem diferentes absorbâncias e sensibilidade à luz azul (420 nm), à luz verde (535 nm) e à luz vermelha (565 nm). Uma estimulação igual aos três tipos de cone gera a sensação de cor branca. Logo, de forma simplificada, a sensação de visão depende do padrão de excitação deste conjunto de receptores, da transmissão da luz pelas estruturas oculares e, de sua decodificação no córtex cerebral, para que a interpretação da cor de um objeto, uma estrutura qualquer, seja compreendida. Portanto, como luz e cor se relacionam diretamente e através da natureza se revelam no sentido da visão, não se pode falar de cor sem considerar a pessoa que a observa (REVILLA, 2004).

De acordo com Revilla (2004) e Fraser; Banks (2005), vários pensadores em diferentes épocas da História, como Aristóteles, Leonardo da Vinci, Christiaan Huygens, Isaac Newton, James Maxwell, Wolfgang Goethe, e Rudolf Steiner, refletiram sobre a origem e o significado das cores. Para alguns, a avaliação dos fenômenos cromáticos tem como base princípios físicos, como Newton, em 1665, quando apresenta sua teoria sobre a óptica, projetando a luz através de instrumentos com lentes, em um ambiente artificial. Ele introduziu um conceito de coloração dos corpos que ocorre através da absorção e reflexão dos raios luminosos, e definiu as cores como propriedades permanentes dos corpos naturais, que prevalece até os dias de hoje.

Outros, como o naturalista e escritor Goethe referiu que “as cores são ações (atos) e paixões (sentimentos) da luz”, e classificou as cores segundo três padrões básicos: (1) cores fisiológicas – criadas pelos olhos, como um efeito óptico; (2) cores físicas – percebidas através dos efeitos da luz nos meios incolores (vidro, água e ar); e (3) cores de natureza

química – as que possuem longa duração e são percebidas pelos olhos como parte dos corpos e objetos, onde se incluem os corantes dos reinos mineral, vegetal e animal (REVILLA, 2004).

Ainda de acordo com Revilla (2004), Steiner – ao estudar os manuscritos de Goethe, afirma que os corantes vegetais são a essência viva e flutuante da cor sintetizada pela planta através da absorção de nutrientes e metais pela raiz, e metabolizadas por influência da luz do sol e dos planetas. Eles (os corantes vegetais) manteriam o ritmo próprio da planta que lhe deu origem, apresentando variações de tonalidade ao longo do dia, conforme a variação da luz.

Os corantes naturais são encontrados principalmente em vegetais (plantas, árvores, líquens), em alguns animais (insetos e moluscos), em minerais, e ainda como substância armazenada e/ou como produto de excreção de microrganismos (como fungos e bactérias) (REVILLA, 2004; ARAÚJO, 2005; SCHIOZER; BARATA, 2007; VOLP et al., 2009).

Um corante natural é uma substância extraída por processos físico-químicos (dissolução, precipitação, entre outros) ou bioquímicos (fermentação) de uma matéria-prima animal ou vegetal (ARAÚJO, 2005), pigmentos obtidos de minerais, além daqueles obtidos a partir de processos biotecnológicos aplicados a fungos e bactérias. De acordo com Revilla (2004), atualmente são conhecidos mais de 2.000 corantes naturais. Alguns continuam a ser extraídos de suas fontes naturais. Outros passaram a ser sintetizados a partir da identificação da estrutura química da substância (corante orgânico sintético idêntico ao natural).

A história de utilização destes pigmentos se confunde com a história da humanidade, e evoluiu por algum tempo de acordo com demandas pessoais, sociais, políticas e econômicas. Alguns destes pigmentos são conhecidos desde a antiguidade. De acordo com Jennings (2005) há mais de 15.000 anos o homem das cavernas utilizava a cor para decorar as paredes de sua morada. Eram pigmentos da terra e do carvão negro, o qual era obtido da combustão de gordura animal. Estes eram os elementos necessários para criar desenhos que retratavam

cenas do cotidiano, como, por exemplo, a caça, animais, descobertas, plantas, rituais, etc. As paredes das cavernas poderiam retratar também uma espécie de agenda, onde eram desenhadas algumas idéias ou mensagens, como podem ser contemplados na atualidade (FUMDHAM, 2009).

No Brasil, de acordo com o portal da Fundação Museu do Homem Americano, na Serra da Capivara, no Piauí, há pinturas rupestres pré-históricas de cerca de 12.000 anos atrás, elaboradas com extrato retirado de plantas, árvores e frutos, sangue de animais, carvão, e rochas (FUMDHAM, 2009). Exemplo deste patrimônio histórico está ilustrado na Figura 3.

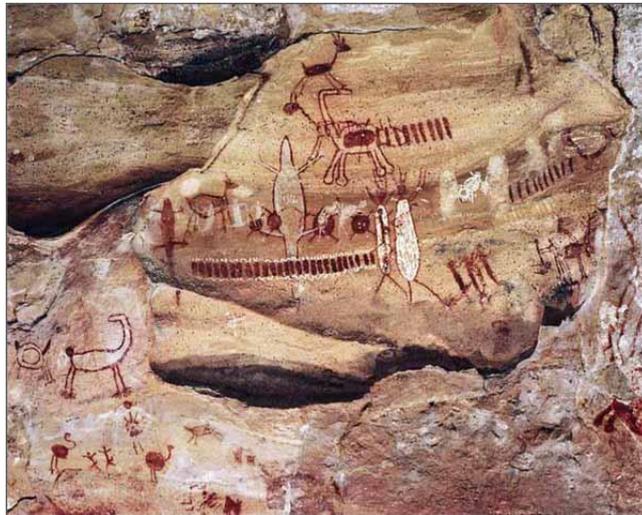


Figura 3. Pintura Rupestre: Nicho policrômico - Toca do Boqueirão da Pedra Furada, Parque Nacional Serra da Capivara, Piauí, Brasil.

Fonte: FUMDHAM (2009)

De acordo com Jennings (2005), existem provas que os egípcios ao redor do ano 4.000 a.C. fabricavam corantes. De acordo com Revilla (2004), há 3.000 a.C. os egípcios já utilizavam tinta para escrever suas informações e relatos em papiros, utilizando no início misturas de carvão com um tipo de cola. Os egípcios também desenvolveram tinturas vegetais, e ao mesmo tempo elaboraram uma forma de fixar o corante a um pó branco transparente, com o objetivo de produzir pigmento. Este processo se conhece como elaboração de lacas, e continua a ser utilizado na produção de diversas cores (JENNINGS, 2005).

Em 2.640 a.C. a seda foi descoberta pela imperatriz chinesa Hish-Ling-Shi, ocasionando o desenvolvimento de técnicas de tingimento desta fibra. E em 2.600 a.C. há o primeiro registro escrito conhecido sobre corantes naturais e sua utilização na China (ARAÚJO, 2005).

Entre 1.600 – 1.450 a.C., um pigmento púrpura era extraído em quantidades ínfimas das glândulas de um crustáceo do gênero *Murex*, encontrado no Mar Mediterrâneo, na ilha de Creta. Este corante, denominado como a “púrpura de Tiro”, foi sem dúvida o pigmento mais apreciado da História, e considerado como o de maior renome e o mais caro de todos os corantes antigos (REVILLA, 2004; ARAÚJO, 2005; FRASER; BANKS, 2005). A cada espécie do molusco correspondia uma variedade diferente de púrpura. Em Tiro, cidade fenícia no Mediterrâneo oriental, a púrpura mais apreciada era extraída da espécie *Murex brandaris*, enquanto em Sidon, a espécie *Murex trunculus* era fonte de uma púrpura cor de ametista. Naquela época, a cor púrpura era um símbolo de riqueza, distinção, poder e prestígio. Para produzir um grama do corante púrpura eram necessárias dez mil conchas de tal molusco, e é provável que por isto, o preço dos tecidos tingidos em púrpura era 20 vezes mais alto do que o preço dos mesmos não tingidos.

De acordo com Araújo (2005), a indústria da púrpura floresceu em Tiro durante séculos, tendo declinado quando esta cidade foi conquistada pelos árabes em 638 d.C.. Houve um recrudescimento na Idade Média, na Sicília e no Oriente, mas voltou a declinar com a introdução de corantes mais baratos como o quermes, tendo praticamente desaparecido com a conquista de Constantinopla pelos turcos em 1453.

Sobre os quermes, sabe-se que são pigmentos naturais vermelhos provenientes de insetos, assim como a cochinha. O quermes, ou grã, é um corante vermelho escarlata extraído das fêmeas grávidas do pulgão, *Kermes illici* (antes designado por *Kermococcus illici* ou *Coccus illici*), que vive sobre uma espécie de carvalho. Há indicações de que os fenícios

foram os primeiros a reconhecê-lo como corante e que era utilizado pelos antigos babilóneos (ARAÚJO, 2005). De acordo com Revilla (2004), quando os espanhóis chegaram à América, encontraram entre os Astecas, Maias e Incas, produtos têxteis de alta qualidade também tingidos com o vermelho extraído da conchonilha.

Egípcios alquimistas combinavam corantes com sais metálicos para usar como fixador, a fim de tornar suas cores permanentes. Há relatos de que tintas de ácidos tanínicos, quando combinadas com sais de ferro, proporcionavam uma cor azul, sendo amplamente utilizadas no século XI. Em 1.170 d.C. foi fundado o Grêmio dos Tintureiros, em Londres, Inglaterra. Galhos de *Quercus rubor* (carvalho), ricos em ácido gálico, eram esmagados e misturados com sulfato de ferro proporcionando corantes vermelhos. Em 1.400 iniciou-se o transporte regular de corantes da Ásia para a Europa por rotas terrestres. Vasco da Gama contornou a África por mar e chegou à Índia, consolidando a rota marítima do comércio de corantes naturais (REVILLA, 2004).

Na época do descobrimento do Brasil, a pintura corporal dos índios brasileiros foi uma das primeiras observações feitas pelos colonizadores portugueses. Pero Vaz de Caminha, em sua famosa carta ao rei D. Manoel I, já mencionava uns “pequenos ouriços que os índios traziam nas mãos e da nudeza colorida das índias”. Estes “ouriços” correspondiam a uma bixácea, *Bixa orellana*, conhecida como urucu. Outro corante também muito usado pelos indígenas era obtido da seiva do fruto de *Genipa americana* (jenipapo), incolor logo após a retirada, mas que após ser esfregada no corpo passa a escurecer, até ficar preta (PINTO, 2006). Também do Brasil foram obtidos outros corantes, como os da *Caesalpinia echinata* Lam. (pau brasil), de cor vermelha, a brasilina e a brasileína.

Outro exemplo de pigmento explorado pelos colonizadores europeus que chegaram à América do Sul foi o obtido da planta *Arrabidaea chica*, conhecido como carajura ou crajirú. Ele era utilizado antigamente como cosmético pelos nativos da região do rio Orinoco, na Venezuela, e foi por muitos anos exportado para a Europa (SCHIOZER; BARATA, 2007).

Em 1769, o inventor inglês James Watt introduziu a primeira máquina a vapor para corantes e o também inglês, James Cartwright introduziu o primeiro tear mecânico, o que possibilitou o avanço definitivo da indústria têxtil na Inglaterra. William Henry Perkin, um jovem estudante de química de 18 anos de idade, se deparou em suas inúmeras tentativas de síntese do quinino, num processo acidental, com aquele que foi o primeiro corante a ser sintetizado pelo homem: a malveína ou púrpura de anilina. Perkin também sintetizou a alizarina, obtida da *Rubia tinctorium*, com o qual prosperou financeiramente (MELO, 2006). A partir do início da síntese química de corantes idênticos aos naturais e de corantes essencialmente sintéticos – mais estáveis que os naturais e mais baratos, a obtenção de corantes naturais sofreu um declínio.

Entretanto, a partir de 1968, os movimentos ecológicos começaram a questionar o uso indiscriminado de corantes sintéticos e produtos químicos auxiliares. Estados Unidos, Inglaterra e França criaram leis proibindo o uso de corantes químicos para alimentos e cosméticos. Dinamarca, Japão, Estados Unidos e França investiram em produtos de corantes naturais para o uso nas indústrias de alimentos. Criou-se o sistema mundial de qualidade total, no qual se inclui o código ISO-14.000 para classificar produtos e processos de produção ecologicamente corretos (REVILLA, 2004).

No Brasil, resoluções do Ministério da Saúde foram publicadas, sendo a Resolução – CNNPA número 44, de 1977 (ANVISA, 1977) a que estabelece “as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos (e bebidas)”, a qual é regularmente atualizada (ANVISA, 2009).

Na área de diagnóstico laboratorial, de acordo com Coleman (2006), o carmine ou safron era utilizado para corar secções de tecidos até que as anilinas fossem sintetizadas por Perkin, em 1856. A alizarina sintética (obtida em 1869) ainda é utilizada na localização

histoquímica de cálcio. O índigo, corante natural sintetizado em 1878, foi utilizado como a base das técnicas de índigo em meados de 1950 para localizar atividade histoquímica de enzimas. A coloração histológica da Hematoxilina-Eosina, utilizada até hoje, foi primeiramente descrita entre 1875-1878 (COLEMAN, 2006). Nesta, a hematoxilina, cuja origem química é natural, a partir do tronco da árvore *Hematoxylon campechianum*, descoberta pelos exploradores espanhóis em Yucatan, em 1502 (TITFORD, 2005), é utilizada para caracterização da estrutura nuclear das células.

Outros corantes naturais ou corantes sintéticos idênticos aos naturais são utilizados como indicadores de pH, como a curcumina, obtida da *Curcuma longa* (REVILLA, 2004).

Toffoli et al. (2006) sugeriu a utilização de um complexo de hipericina (originária em insetos e em plantas do gênero *Hypericum*) e európio (íon lantanídeo) para o diagnóstico espectrofotométrico de substâncias como o colesterol e a glicose sérica, em soros humanos.

Na rotina de diagnóstico microbiológico geral e especificamente, na pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes, nenhum corante natural e/ou sintético idêntico ao natural é utilizado na atualidade. Com toda a certeza, o estudo dos corantes naturais é muito vasto, mas certamente a sua aplicabilidade clínica foi muito pouco explorada.

Mediante o exposto e visto as desvantagens que a carbofucsina apresenta, por ser substância tóxica e potencialmente cancerígena, propôs-se a avaliação de corantes alternativos para o diagnóstico baciloscópio da Tuberculose.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar corantes alternativos para uso no diagnóstico baciloscópico da Tuberculose.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Analisar isoladamente as soluções utilizadas nas colorações de Kinyoun e de Ziehl-Neelsen, visto a falta de informações disponíveis sobre a visualização microscópica quando da utilização isolada ou combinada das mesmas em microscopia tradicional e de fluorescência;
- 3.2.2 Verificar entre corantes sintéticos idênticos aos naturais e corantes sintéticos menos tóxicos que a fucsina, os que impregnam a parede de micobactérias, sem utilizar fenol e aquecimento, pela microscopia tradicional e de fluorescência.
- 3.2.3 Averiguar se a solução corante mais promissora possui especificidade para as espécies do gênero *Mycobacterium* pela análise em outros microrganismos.
- 3.2.4 Verificar se o corante que apresentar especificidade para as espécies do gênero *Mycobacterium* tem possibilidade de existir em fonte biológica amazônica.

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo de estudo

Tratou-se de estudo experimental no qual foram avaliados corantes alternativos na execução de coloração baciloscópicos para micobactérias, visando aplicação em amostras clínicas submetidas ao diagnóstico laboratorial da Tuberculose.

4.2 Universo de Estudo

Em esfregaços baciloscópicos preparados a partir de amostras de secreções do trato respiratório inferior (escarro) e de isolado clínico identificado como *M. tuberculosis*, foram analisadas por leitura microscópica tradicional e de fluorescência: a) as soluções que compõem as colorações de Kinyoun e de Ziehl-Neelsen; b) corantes sintéticos idênticos aos naturais (CSIN) e, c) corantes sintéticos menos tóxicos do que a fucsina (CSMTF).

4.2.1 Esfregaços Baciloscópicos

Foram realizados a partir de amostras de escarro de 35 doadores anônimos, sintomáticos respiratórios, submetidos à pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) no Centro de Referência Estadual em Pneumologia Sanitária Cardoso Fontes (CREPS Cardoso Fontes), principal ambulatório regional de atendimento a paciente com Tb e outras pneumopatias. O diagnóstico da amostra já havia sido entregue ao médico e/ou ao paciente antes da disponibilização da mesma.

Os esfregaços confeccionados com *M. tuberculosis* de espécime clínico e sem resistência medicamentosa foram preparados a partir de isolado depositado na Coleção de

Microrganismos de Interesse Médico, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

4.2.2 Corantes

Seis corantes sintéticos idênticos aos naturais (CSIN) e seis corantes sintéticos menos tóxicos do que a fucsina (CSMTF) foram selecionados para os testes de coloração. Deu-se preferência a corantes vermelhos, na tentativa de manter os padrões visuais de leitura baciloscópicos ora em uso, ou seja, bacilos corados em vermelho, com fundo corado em azul.

Entre os CSIN também foi dada preferência para aqueles cuja principal substância corante fosse originária de vegetais nativos e/ou já introduzidos na Região Amazônica. Para todos os corantes foi realizada análise prévia das fichas de segurança fornecidas pelo fabricante, e foram escolhidos apenas aqueles em que não houve referência a potencial tóxico e/ou cancerígeno para seres humanos, e ausência de dano ao meio ambiente. Assim, foram analisados os seguintes corantes:

- a) Sintéticos idênticos aos naturais: alizarina, antraquinona, curcumina, índigo carmim, vermelho natural e AEV (alcalóide de espécie vegetal).
- b) Sintéticos menos tóxicos que a fucsina: preto brilhante BN, murexida, vermelho neutro, amarelo poente FCF, verde brilhante e verde luz.

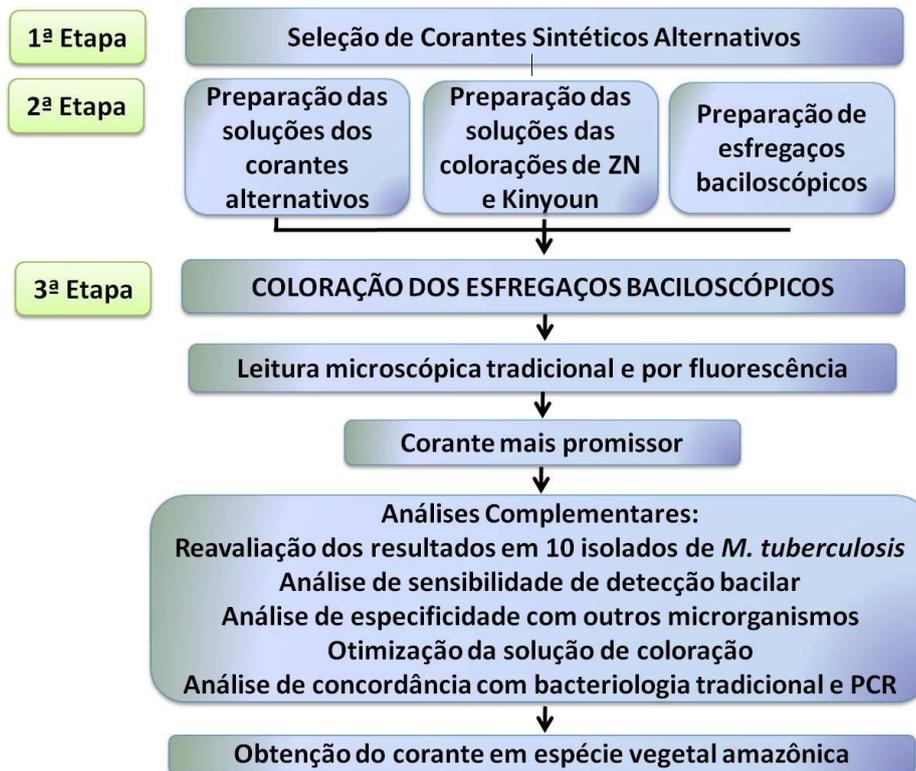
4.3 Informações Éticas e de Financiamento

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos – CEP, do INPA, e aprovado sem restrições, sob número de protocolo 186/08.

Obteve financiamento parcial da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, Edital n. 009/2007 – Programa Integrado de Pesquisa Científica e Tecnológica/PIPT, cuja liberação de recursos foi no valor de R\$19.980,00.

4.4 Organização do Experimento

O fluxo de etapas e atividades desenvolvidas está apresentado na Figura 4, e detalhado nas próximas secções.



ZN = Ziehl-Neelsen

Figura 4. Fluxo de atividades para avaliação de corantes alternativos para detecção de micobactérias.

4.5 Detalhes dos Procedimentos

4.5.1 Preparação das Baciloscopias

4.5.1.1 Baciloscopias de Amostras de Escarro

As 35 amostras de escarro disponibilizadas para a confecção dos esfregaços corresponderam às sobras do que já havia sido avaliado pelos técnicos do CREPS Cardoso Fontes. Trinta eram positivas para a presença de BAAR e cinco, negativas. Todos os laudos já

havia sido emitidos e entregues aos médicos e/ou pacientes antes da disponibilização das mesmas. Cada amostra disponibilizada recebeu um número de registro específico para o projeto e delas foram confeccionados esfregaços direto, de acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2008), e após concentração, de acordo com Salem et al. (1990).

A preparação dos esfregaços baciloscópicos diretos foi realizada conforme as seguintes etapas (BRASIL, 2008):

- a) Após a chama de um bico de Bunsen, um palito de madeira foi partido em dois, e suas extremidades farpadas auxiliaram na seleção da partícula mais espessa e/ou purulenta contida na amostra;
- b) A partícula selecionada foi distendida sobre uma lâmina de microscopia, nova e limpa, em movimentos de vai-e-vem até a obtenção de uma película homogênea, nem muito espessa e nem muito delgada;
- c) Após secar em temperatura ambiente, o esfregaço foi fixado com três passagens rápidas do verso da lâmina sobre a chama do bico de Bunsen, as lâminas então foram armazenadas até a utilização.

A confecção de esfregaço após concentração abrangeu as seguintes etapas (SALEM et al., 1990):

- a) A amostra de escarro foi transferida do frasco de coleta para um tubo de ensaio de 15 mL, ao qual foi adicionada solução de NaOH 4% estéril, na mesma proporção da quantidade de amostra (volume/volume);
- b) Após homogeneização em vórtex, a amostra ficou em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente;
- c) O volume foi completado para 15 mL com água destilada estéril e centrifugado a 3.500xg durante 15 minutos. Após esse período a amostra foi neutralizada com solução de ácido clorídrico a 4% estéril, com o auxílio do indicador azul de bromotimol;
- d) O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 1,5 mL de água destilada estéril;
- e) Duas gotas da suspensão foram depositadas, individualmente, sobre uma lâmina de microscopia previamente identificada com o número de registro do escarro no projeto;

f) A lâmina permaneceu em temperatura ambiente até completa secagem, fixada com três passagens de seu verso sobre a chama, e armazenada até utilização.

Um esfregaço aleatório de cada amostra de escarro processado foi corado pela coloração de Kinyoun para classificação do escore baciloscópico (BRASIL, 2008) e as demais de cada amostra foram armazenadas em laminários de plástico e/ou de madeira até a utilização.

4.5.1.2 Baciloscopias de isolado clínico de *M. tuberculosis*

Para a preparação dos esfregaços a partir de alíquotas de *M. tuberculosis*, subcultivada por 21 dias em meio de Lowenstein-Jensen, obteve-se em torno de ± 5 mg de bacilos com auxílio de uma alça. Estes foram transferidos para um tubo 20 x 150 mm contendo cerca de 10 pérolas de vidro e em seguida agitado em vórtex. Adicionou-se 5 mL de água destilada estéril e agitou-se em vórtex. Destes, 1 mL foi transferido para um novo tubo contendo 9 mL de água destilada, e a turbidez ajustada para o equivalente ao tubo nº 1 da escala de McFarland (DAVID et al., 1989). Duas alíquotas de 100 μ L foram retiradas e depositadas em lâmina de microscopia ótica, previamente limpa, deixando-se secar à temperatura ambiente. Após a secagem, as lâminas foram fixadas mediante aquecimento da face oposta sobre bico de Bunsen e armazenadas em laminários de plástico e/ou de madeira, até que fossem utilizadas.

4.5.2 Preparação de Soluções

A solução álcool-ácida e as dos corantes carbolfucsina, fucsina, e azul de metileno das colorações de Kinyoun e de ZN foram preparadas conforme as recomendações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008). Para tanto:

a) Solução álcool-ácida: adicionou-se, lentamente, 3 mL de ácido clorídrico em 97 mL de etanol.

- b) Carbolfucsina de Kinyoun: foram dissolvidos 4 g de fucsina básica em 20 mL de etanol a 90-95° GL, seguida da adição de 100 mL de solução aquosa de fenol a 8% (8 mL de fenol em 100 mL de água destilada). Deixou-se descansar por 24 a 48 horas antes de usar, e filtrou-se antes de verter a solução sobre os esfregaços.
- c) Carbolfucsina de ZN: foram preparadas em separado duas soluções, denominadas como A e B. Na solução A, 3 g de fucsina básica foram dissolvidas em 100 mL de etanol a 90-95° GL. Paralelamente, 5 mL de fenol foram adicionados em 100 mL de água destilada (solução B). Na solução de uso, misturou-se 10 ml da solução A a 90 ml da solução B. Deixou-se descansar por 24 a 48 horas antes de usar, e filtrou-se antes de verter a solução sobre os esfregaços.
- d) Soluções de Fucsina: foram preparadas soluções de fucsina a 0,3% (semelhante à concentração de fucsina na solução de ZN) e a 3,3% (semelhante à concentração de fucsina na solução de Kinyoun), sem acréscimo de fenol, mas tendo como base as etapas e proporções descritas anteriormente para as carbolfucsinas de Kinyoun e de ZN.
- e) Solução de azul de metileno: foram dissolvidos 0,3 g de azul de metileno em 100 mL de água destilada.

De cada um dos doze corantes em teste foram preparadas três soluções nas concentrações de 0,3%, 1% e 3%, utilizando como solventes o etanol, no percentual de 10%, e a água destilada. As concentrações dos corantes foram selecionadas com base nas utilizadas nas colorações para micobactérias de ZN e de Kinyoun (BRASIL, 2008), de 0,3% e 3,3%, respectivamente. A concentração de 1% foi escolhida por ser intermediária entre os dois extremos anteriormente relatados. Vale ressaltar que em nenhuma destas soluções foi acrescentado fenol.

4.5.3 Coloração das Baciloscopias

Para as análises de coloração com as soluções isoladas ou combinadas que compõem as colorações de Kinyoun e de ZN, as baciloscopias foram coradas de 18 formas diferentes,

conforme especificado a seguir:

- 1) Coloração de Kinyoun tradicional (DAVID et al.,1989), cujas etapas foram:
 - a) Coloração: após a colocação das lâminas em suporte metálico adequado, cobriu-se a totalidade da superfície do esfregaço com carbolfucsina de Kinyoun, previamente filtrada, por cinco minutos, sem aquecimento. Eliminou-se a fucsina, e reposicionou-se a lâmina sobre o suporte.
 - b) Descoloração: cobriu-se a superfície do esfregaço com solução álcool-ácida durante três minutos. Escorreu-se a solução e lavou-se sob jato d'água de baixa pressão. Repetiu-se a operação mais uma vez, rapidamente.
 - c) Contra-coloração: cobriu-se toda a superfície do esfregaço com solução de azul de metileno pelo período de 3 minutos. Escorreu-se o azul de metileno e lavou-se em jato d'água. Sacudiu-se levemente a lâmina para eliminar o excesso de água, e deixou-se para secar à temperatura ambiente.
- 2) Coloração de Kinyoun modificada: realizada da mesma forma que o descrito no item anterior, mas com solução de fucsina a 3,3%, não fenicada.
- 3) Coloração de ZN tradicional (BRASIL, 2008), cujas etapas foram:
 - a) Coloração: após posicionamento das lâminas em suporte metálico, a superfície do esfregaço foi coberta com solução de carbolfucsina de ZN, previamente filtrada. As lâminas foram aquecidas até emissão de vapor, por chama produzida com o auxílio de um chumaço de algodão embebido em álcool. Registrou-se o tempo de 5 minutos e voltou-se a aquecê-las por mais duas vezes.
 - b) Descoloração: após os 5 minutos, verteu-se a solução de fucsina e lavou-se cuidadosamente com jato d'água de baixa pressão até que a mesma fosse eliminada. Cobriu-se a superfície do esfregaço com solução álcool-ácida por 1 minuto, sendo então retirada sob jato d'água de baixa pressão. Repetiu-se a operação mais uma vez, rapidamente.

- c) Contra-coloração: após recolocação das lâminas sobre o suporte, suas superfícies foram cobertas pela solução de azul de metileno por 30 segundos, após o qual foi eliminado sob jato d'água de baixa pressão. As lâminas foram secas à temperatura ambiente.
- 4) Coloração de ZN modificada: com soluções idênticas ao tradicional, mas sem aquecimento na etapa de coloração. Demais procedimentos inalterados.
 - 5) Coloração de ZN modificada: utilizando solução de fucsina a 0,3%, não fenicada, mantendo o aquecimento na etapa de coloração. Demais procedimentos inalterados.
 - 6) Coloração de ZN modificada: utilizando solução de fucsina a 0,3%, não fenicada, e sem aquecimento na etapa de coloração. Demais procedimentos inalterados.
 - 7) Somente solução álcool-ácida por 1 minuto: conforme etapa de descoloração de ZN.
 - 8) Somente solução álcool-ácida por 3 minutos: conforme etapa de descoloração de Kinyoun.
 - 9) Solução álcool-ácida por 1 minuto + Solução de azul de metileno por 1 minuto: conforme foi proposto para este projeto, a superfície do esfregaço foi recoberta pela solução álcool-ácida durante 1 minuto, seguida de lavagem sob jato d'água de baixa pressão, repetindo-se a operação mais uma vez, de forma rápida. Então, adicionou-se solução de azul de metileno, por 1 minuto, seguida de lavagem sob jato d'água de baixa pressão.
 - 10) Solução álcool-ácida por 3 minutos + Solução de azul de metileno por 4 minutos: realizada de acordo com etapa de contra-coloração de Kinyoun.
 - 11) Somente solução de azul de metileno por 1 minuto: a superfície do esfregaço foi recoberta com a solução de azul de metileno por 1 minuto, seguida de lavagem sob jato d'água de baixa pressão.
 - 12) Somente solução de azul de metileno por 4 minutos: realizada conforme etapa de contra-coloração de Kinyoun.

- 13) Somente solução de carbolfucsina de Kinyoun por 5 minutos: realizada conforme etapa de coloração de Kinyoun.
- 14) Somente solução de fucsina a 3,3%, não fenicada, por 5 minutos: realizada conforme etapa de coloração de Kinyoun, mas com solução de fucsina a 3,3% não fenicada.
- 15) Somente solução de carbolfucsina de ZN, com aquecimento: realizada conforme etapa de coloração de ZN.
- 16) Somente solução de fucsina a 0,3%, não fenicada, com aquecimento: realizada conforme etapa de coloração de ZN, mas com solução de fucsina a 0,3% não fenicada.
- 17) Somente solução de carbolfucsina de ZN, sem aquecimento, por 5 minutos: a superfície do esfregaço foi recoberta pela solução de carbolfucsina de ZN por 5 minutos, após o qual a mesma foi removida sob jato d'água de baixa pressão.
- 18) Somente solução de fucsina a 0,3%, não fenicada, sem aquecimento, por 5 minutos: a superfície do esfregaço foi recoberta pela solução de fucsina a 0,3% não fenicada, após o qual a mesma foi removida sob jato d'água de baixa pressão.

Os procedimentos de coloração das baciloscopias pelos corantes em teste tiveram por base as três etapas comuns para as colorações de Kinyoun (DAVID et al., 1989) e de ZN (BRASIL, 2008), ou seja, coloração–descoloração–contra-coloração, conforme a seguir apresentado:

- a) Coloração: após posicionamento adequado das lâminas em suporte metálico sobre pia, durante cinco minutos a superfície do esfregaço permaneceu coberta pela solução corante, após filtração da mesma. Não houve aquecimento. Após este período, o corante foi vertido na pia;
- b) Descoloração: após reposicionamento das lâminas no suporte de metal, a superfície do esfregaço foi coberta com solução álcool-ácida, durante um minuto. O esfregaço foi então lavado com um jato d'água de baixa pressão, repetindo-se a operação mais uma vez, de forma rápida, até que todos os resíduos do corante tivessem sido removidos;

c) Coloração de Fundo: com as lâminas recolocadas no suporte metálico, a solução de azul de metileno foi vertida sobre as mesmas, recobrimdo o esfregaço por um minuto, tempo superior em 30 segundos ao executado no ZN e inferior aos quatro minutos do Kinyoun. Após este período, o esfregaço foi lavado com um jato d'água de baixa pressão, sendo levemente sacudido para retirada do excesso de água, e deixado à temperatura ambiente para secar. Esta etapa não foi realizada no caso da solução de corante em teste ser azul, violeta ou verde, para evitar falsas interpretações ocasionadas pela contra-coloração.

A cada grupo de lâminas corado, uma lâmina testemunha também foi corada pelo Kinyoun (DAVID et al., 1989), como controle de qualidade da quantidade e integridade dos bacilos presentes nas baciloscopias.

4.5.4 Leitura Microscópica

As leituras das baciloscopias foram realizadas em microscópio trinocular Zeiss Axioskop 40 – HBO 50, em campo claro e em (epi)fluorescência, com objetiva plano-acromática de 100x (imersão). O equipamento estava dotado de três conjuntos de filtros de fluorescência Zeiss, cujas características estão apresentadas a seguir (ZEISS, 2009):

- ✓ FS02: excitação G 365, *beam filter* FT 395, e emissão LP 420, denominado como filtro azul,
- ✓ FS06: excitação BP 436/10, *beam filter* FT 460, e emissão LP 470, denominado como filtro verde, e
- ✓ FS15: excitação BP 546/12, *beam filter* FT 580, e emissão LP 590, denominado como filtro vermelho.

Quando indicada, a fotodocumentação foi realizada em câmera digital Canon PowerShot A640, acoplada à saída trinocular do microscópio.

Para as baciloscopias obtidas de escarro (direto e/ou após concentração), a leitura

microscópica foi feita de acordo com a orientação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008), na qual:

- nenhum BAAR em 100 campos → negativo
- 1 a 9 BAAR em 100 campos → inconclusivo - especificar quantitativo
- 10 a 99 BAAR em 100 campos → positivo + ou 1+
- média de 1 a 10 BAAR em 50 campos → positivo ++ ou 2+
- média superior a 10 BAAR em 20 campos → positivo +++ ou 3+

Os esfregaços de isolado clínico de *M. tuberculosis* foram avaliados de forma descritiva, informando-se a negatividade ou a positividade de coloração dos bacilos.

Tanto para as baciloscopias de escarro como para as de isolado clínico, quando positivas foram agregadas informações sobre a avaliação subjetiva da intensidade da coloração e do brilho emitido pelos bacilos corados, conforme os seguintes parâmetros:

- ✓ Avaliação subjetiva de intensidade de coloração: como foi dada preferência a corantes/extratos vermelhos, esta foi considerada como a coloração padrão, a partir da qual a intensidade de coloração foi analisada, utilizando-se os números de 1 a 5, em ordem crescente de intensidade de coloração. Quando ocorreu mudança deste padrão, pelas características intrínsecas das substâncias testadas com cor diferente de vermelho, ao número do código foi acrescida a letra M, seguida da letra indicativa da cor para a qual a mudança aconteceu. Desta forma, os códigos utilizados foram:

- 1: Bacilos pouco delimitados, coloração muito clara
- 2: Bacilos melhor delimitados, coloração clara
- 3: Bacilos delimitados, coloração regular
- 4: Bacilos delimitados, coloração boa
- 5: Bacilos delimitados, coloração ótima
- M: Mudança de cor para (a) azul, (b) violeta, (c) verde, (d) amarelo, (e) laranja

- ✓ Avaliação subjetiva de intensidade de brilho: foram atribuídos os números de 1 a 4, em ordem crescente de intensidade do mesmo, em que: 1 – opaco, 2 – brilho fraco, 3 – brilho

moderado, e 4 – brilho acentuado.

Na tabulação dos dados, o número atribuído à intensidade de coloração foi separado do número atribuído à intensidade de brilho por ponto-e-vírgula, sendo ambos sobrescritos, como no exemplo, Pos^{4Ma;4}, que significa: coloração positiva para a presença de bacilos, com intensidade boa, mas em tom azul, e com brilho acentuado.

Todos os resultados obtidos foram catalogados em planilhas de dados específicas ao projeto e, posteriormente, analisados.

4.5.5 Análises Complementares em Corante promissor

Para confirmar a eficiência de um corante promissor foram executadas as seguintes atividades:

- a) Reavaliação dos resultados iniciais: executada em baciloscopias de dez isolados clínicos de *M. tuberculosis*, diferentes do utilizado nos testes iniciais, para confirmação da propriedade tintorial do corante em análise.
- b) Análise de sensibilidade de detecção bacilar: em uma amostra de escarro negativa para BAAR foram adicionados quantitativos conhecidos de unidades formadoras de colônia (UFC) de isolado clínico de *M. tuberculosis*. As concentrações testadas foram de 1 a 10⁷ bacilos por 0,1 mL de escarro, tendo como controle baciloscopias similares, coradas pela coloração de Kinyoun.
- c) Análise de Especificidade com outros microrganismos: abrangeu a realização de testes de coloração de esfregaços de diferentes microrganismos para verificação do comportamento tintorial dos mesmos frente ao novo corante. Os microrganismos foram:
 - ✓ Micobactérias de crescimento lento e de crescimento rápido – *Mycobacterium gordonae* (um isolado clínico) e *M. fortuitum* (dois isolados clínicos), respectivamente.
 - ✓ Espécie com álcool-ácido resistência ocasional – *Nocardia braziliensis* (BRENNAN; NIKAIDO, 1995);

- ✓ Espécie indicada como controle negativo de qualidade das colorações de ZN e Kinyoun - *Escherichia coli* (ATCC 13706) (ANVISA, 2004),
- ✓ Bacilos Gram-negativos - pertencentes aos Gêneros *Shigella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus*, e *Salmonella*,
- ✓ Bacilos Gram-positivos - *Bacillus cereus*,
- ✓ Cocos Gram-positivos – *Staphylococcus aureus*, e
- ✓ Cocos Gram-negativos - *Neisseria gonorrhoeae*.

Os esfregaços de *Nocardia braziliensis* e de *Neisseria gonorrhoeae* foram cedidos pela Prof^a. Maria Zeli Frota, da UFAM, e os de bacilos e cocos Gram-negativos e de bacilos Gram-positivos foram cedidos pelo Laboratório de Nutrição e Físico-Química de Alimentos, do INPA.

d) Otimização da solução de coloração: Foi realizada em duas etapas:

Na primeira, efetuou-se testes que visaram estabelecer a menor concentração de uso do corante, o melhor tempo de coloração, e o limite de tempo de descoloração com solução álcool-ácida, conforme descrito a seguir:

- ✓ Esfregaços de isolado clínico de *M. tuberculosis* foram corados com soluções recém preparadas às concentrações de 0,003%, 0,03%, 0,3%, 1% e 3%. Os tempos de permanência no corante foram de 1, 3, 5 e 10 minutos. Tempo superior a este foi considerado como inviável para a rotina microbiológica. Neste teste, o intervalo de permanência em solução álcool-ácida foi mantido fixo em um minuto, assim como o da contra-coloração com azul de metileno.
- ✓ Verificação da ação da solução álcool-ácida: para estabelecer o limite de permanência dos esfregaços de isolado clínico de *M. tuberculosis* sob a ação da solução álcool-ácida, o melhor tempo e a melhor concentração obtidos na etapa anterior foram aplicados, com variação do tempo de descoloração. Estes foram de 1, 3, 6, 9, 12 e 15 minutos. A

contra-coloração permaneceu fixa com solução de azul de metileno por um minuto.

Na segunda etapa foram realizados testes visando melhor qualidade de leitura à microscopia tradicional, os quais estão descritos a seguir:

- ✓ Verificação do efeito do ajuste de pH: Baciloscopias de escarro positivo para BAAR foram coradas por 5 minutos, com soluções à concentração de 0,3%, e com pH ajustado para as faixas de 4 (ácido), 7 (neutro) e 10 (básico). O intervalo de permanência em solução álcool-ácida foi mantido fixo em um minuto, assim como o da contra-coloração com azul de metileno.
- ✓ Adição de possíveis substâncias otimizadoras: Baciloscopias de escarro positivo para BAAR foram coradas com solução a concentração de 0,3% sem ajuste de pH, adicionada a possíveis substâncias otimizadoras de coloração. Entre estas substâncias, foram testadas separadamente a adição de 5% de ácido periódico, e de 2,5% de três substâncias contendo o elemento ferro em sua composição: ferro reduzido, sulfato ferroso amoniacal, e citrato férrico amoniacal. O ácido periódico foi selecionado por ser utilizado na coloração histopatológica para micobactérias de Nyka (GADELHA et al, 1982) como otimizador de coloração bacilar. A adição de substância contendo ferro foi baseada na produção de sideróforos pelas micobactérias (DAVID, 1976), e em trabalhos que agregam compostos contendo ferro à isoniazida (OLIVEIRA et al., 2004) ou a novos compostos químicos (TARALLO et al., 2010), alterando a conformação molecular, e facilitando a entrada/apresentação da medicação à célula bacteriana. A concentração de 2,5% foi determinada a partir do que é acrescido de citrato férrico amoniacal aos meios de cultivo de Löwenstein-Jensen ou de Ogawa-Kudoh, em prova de identificação de micobactérias (BRASIL, 2008). Em todos os testes o tempo de coloração foi mantido fixo em 5 minutos, o intervalo de descoloração em solução álcool-ácida foi de um minuto, assim como o da contra-coloração com azul de metileno.

- ✓ Recoloração de baciloscopias: consistiu na coloração inicial de baciloscopias de escarro positivas para BAAR pelas colorações de Kinyoun, de ZN e do corante promissor, seguida de leitura microscópica. Após, foi realizada descoloração das baciloscopias com solução álcool-ácida por 10 minutos, e segunda coloração por outra, sendo: baciloscopias inicialmente coradas pelo Kinyoun ou ZN foram recoradas pelo corante promissor, e baciloscopias inicialmente coradas pelo corante promissor, foram recoradas pelo Kinyoun ou pelo ZN. Após a segunda coloração, as lâminas foram submetidas à nova leitura microscópica, e seus resultados tabulados para posterior comparação.
- e) Análise de concordância com bacteriologia tradicional e exame molecular: a partir dos parâmetros obtidos nos testes anteriores, foram selecionadas 10 amostras clínicas para análise comparativa. Os resultados das baciloscopias, direta e após concentração, coradas pela solução do corante em teste foram comparados com os obtidos pela coloração de Kinyoun em esfregaços direto e após-concentração, assim como pelos resultados de cultivo em meio de LJ, realizado conforme David et al. (1989), e de análise pela reação em cadeia de polimerase (PCR) com iniciadores para a sequência de inserção *IS6110* (123pb), de acordo com Ogusku; Salem (2004).
- f) Análise de fonte biológica amazônica do corante mais promissor: após a definição do corante promissor, suas possíveis fontes amazônicas foram pesquisadas, e testes de coloração com soluções de sete extratos alcaloídicos, sendo três alcalóides purificados e quatro frações alcaloídicas não purificadas, foram realizados. Os sete extratos alcaloídicos testados foram obtidos e cedidos pela equipe do Prof. Dr. Valdir Florêncio Veiga Junior, co-orientador deste trabalho. Devido à reduzida quantidade disponível para teste (que variou de 1 a 6 mg), foram realizadas apenas colorações de microbaciloscopias diretas positivas para BAAR, obtidas de escarro, com soluções à concentração de 1% de alcalóide

purificado ou de fração alcaloídica. A permanência do corante sobre as microbaciloscopias foi de 5 minutos, e as das soluções álcool-ácida e do contra-corante azul de metileno por um minuto. Cada microbaciloscopia direta foi padronizada com diâmetro correspondente a uma gota de água destilada de 7,5 μL , previamente delimitado com lápis diamante, e suficiente para a contagem média de 120 campos microscópicos à objetiva de 100x (imersão).

4.6. Análise dos Resultados

Foi definido como corante promissor o que foi retido pela parede micobacteriana, em baciloscopias de escarro e em esfregaços de isolado clínico de *M. tuberculosis*, sem corar excessivamente as células e/ou secreção mucóide presente nas amostras de escarro, e que apresentou maior média bacilar por campo.

A análise dos resultados foi, prioritariamente, descritiva. Os resultados das soluções que compõem as colorações de Kinyoun e de ZN representaram a base para as análises dos corantes em teste.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Análise das colorações tradicionais de Kinyoun e de Ziehl-Neelsen, e de suas modificações

Os resultados gerais das leituras microscópicas de baciloscopias de escarro (direto e após concentração), com escore 3+ para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), e de isolado clínico de *M. tuberculosis*, coradas pelo Kinyoun e pelo Ziehl-Neelsen (ZN), tradicional e modificações, estão apresentados no Apêndice 1.

Nas colorações tradicionais de Kinyoun e de ZN, e em suas modificações, houve incontestável positividade quando as baciloscopias foram lidas pela microscopia tradicional, conforme era esperado e descrito na literatura. Houve positividade quando os mesmos esfregaços foram lidos pela fluorescência, nos filtros verde e vermelho, e negatividade ao filtro azul. No filtro verde, os bacilos foram visualizados em laranja, opacos ou com brilho fraco. No vermelho, os bacilos tiveram seu melhor resultado à fluorescência, apresentando coloração vermelha intensa, com brilho variando entre fraco a acentuado. Exemplos destes resultados estão apresentados nas Figuras 5 e 6.

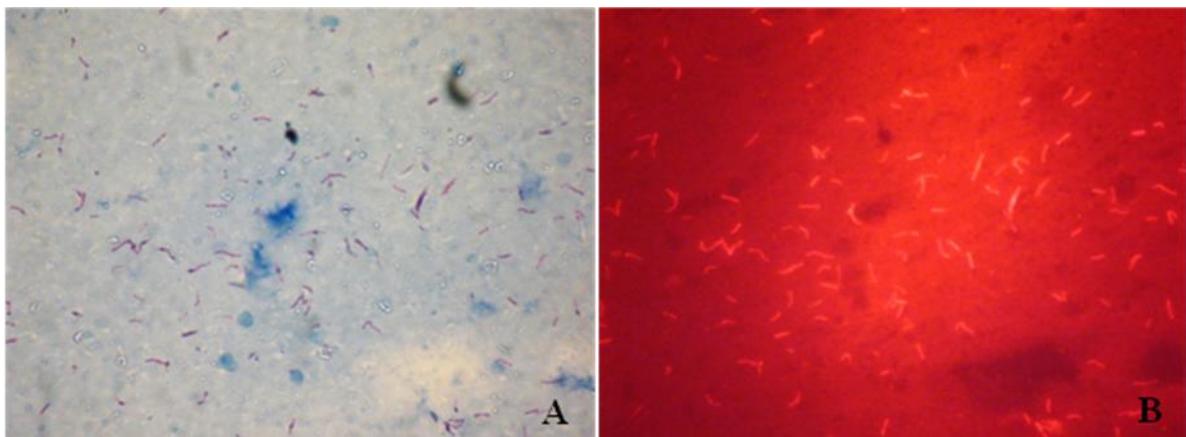


Figura 5. Fotomicrografias de esfregaço concentrado de escarro corado pela coloração de Kinyoun, microscopia tradicional (A), e fluorescência filtro vermelho (B), mesmo campo (Objetiva 100x – imersão, zoom 4x).

Fonte: Laboratório de Micobacteriologia/INPA

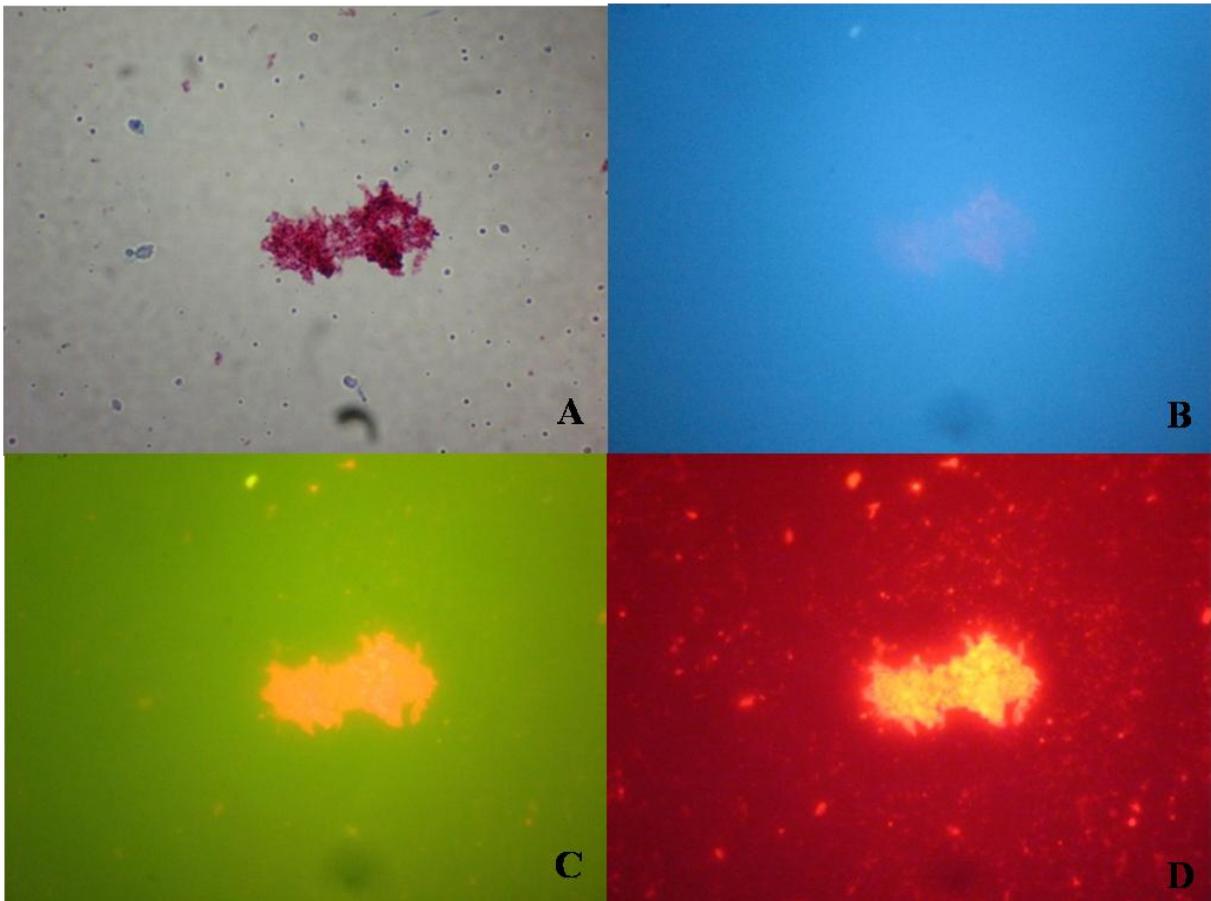


Figura 6. Fotomicrografias de esfregaço de isolado clínico de *M. tuberculosis*, corado pela coloração de Kinyoun tradicional, na microscopia tradicional (A), e na de fluorescência – filtros azul (B), verde (C) e vermelho (D), mesmo campo (Objetiva de 100x - imersão, zoom de 4x).
Fonte: Laboratório de Micobacteriologia/INPA

A fluorescência da fucsina na coloração de ZN empregada no diagnóstico do *M. tuberculosis* foi relatada pela primeira vez há dois anos atrás por Shapiro; Hänscheid (2008), que de forma semelhante a nossa, se mostraram surpreendidos com estes achados. Na nota publicada, os autores admitem sua limitada experiência, mas afirmam não terem visto tantos bacilos de *M. tuberculosis* na luz transmitida como quando utilizaram o microscópio de fluorescência. Sugerem a re-leitura de lâminas antigas coradas pelo ZN usando a radiação ultravioleta, como atividade que reduziria o número de casos negativos. Os autores sugerem ainda que, devido à semelhança com o padrão de fluorescência do *M. tuberculosis* à coloração pela auramina-O, o ponto de ligação provável da fucsina deva ser com ácidos nucleicos. Esta sugestão difere do que é tradicionalmente apresentado pela literatura, na qual a fucsina se

ligaria a lipídios presentes na parede celular das micobactérias, entre eles os ácidos micólicos, formando complexos que resistiriam à descoloração por solução álcool-ácida (BRASIL, 2008).

Outros autores, em anos anteriores a 2008, relataram a propriedade fluorescente da fucsina básica ou da carbolfucsina, em materiais não associados ao diagnóstico de Tb. Inicialmente tem-se Pihlman; Linder (1983) que a descreveram na solução ácida etanólica de fucsina (básica) aldeído de Gomori, ao detectar fibras elásticas, em cortes histológicos parafinizados e congelados. Relacionaram a aparente afinidade com a elastina e materiais associados à elastina.

Posteriormente, a fluorescência da solução de carbolfucsina de ZN também foi descrita por Varea et al. (1998), na identificação de oocistos de *Cryptosporidium*, *Isospora* e *Cyclospora*, e por Clavel et al. (1999), na identificação de elementos hidáticos (*Echinococcus granulosus*). Nos dois trabalhos, as lâminas foram fixadas em metanol, e os materiais permaneceram tempo igual ou superior a 10 minutos sob a ação da carbolfucsina. Varea et al. (1998) destacaram que a intensidade da fluorescência em oocistos de *C. parvum* foi inversamente proporcional aos oocistos visíveis à luz transmitida, situação não observada em oocistos de *I. belli* e de *C. cayetanensis*. Em nenhum destes trabalhos, os autores sugerem o possível local de ligação do corante aos microrganismos ou a seus constituintes.

Vale ressaltar que nos trabalhos de Pihlman; Linder (1983), Varea et al. (1998) e de Clavel et al. (1999), as condições de realização e materiais avaliados foram diferentes dos utilizados na presente pesquisa, na qual a fixação dos esfregaços foi a quente e o tempo de coloração foi de 5 minutos, nos seis diferentes testes realizados.

Na busca sobre informações quanto à propriedade fluorescente da fucsina básica nos sites dos laboratórios Sigma-Aldrich (SIGMA-ALDRICH, 2010) e Vetec (VETEC, 2010), constatou-se que não há citação sobre a mesma. Entretanto, esta é citada nos sites do laboratório Merck (MERCK, 2010b) e da empresa Olympus (OLYMPUS, 2010), mas atribuída à pararosanilina, um dos sinônimos da fucsina básica.

5.2 Análise das soluções que compõem as colorações tradicionais de Kinyoun e de Ziehl-Neelsen, e de suas modificações

Os resultados gerais das leituras microscópicas de baciloscopias de escarro (direto e após concentração), com escore 3+ para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e de isolado clínico de *M. tuberculosis*, coradas isoladamente por soluções que compõem as colorações tradicionais de Kinyoun e de ZN, e por modificações aplicadas às mesmas, também estão apresentados no Apêndice 1.

5.2.1 Com relação às soluções de fucsina

A grave retenção das soluções de fucsina pelas células e pela secreção mucóide, presentes nas amostras de escarros, induziu à falta de condições de leitura e conseqüente negatividade dos esfregaços direto, tanto pela microscopia tradicional, como pela microscopia de fluorescência, em todos os filtros utilizados.

Nos esfregaços após concentração somente a fucsina fenicada a 3,3% não forneceu resultado de positividade, seja na microscopia tradicional ou na de fluorescência, fato relacionado à dificuldade de retirada da mesma dos esfregaços apenas com jato d'água. As demais cinco soluções demonstraram resultados similares de positividade tanto na microscopia tradicional, quanto na fluorescência vermelha, onde os escores foram inferiores. Nestes casos a ação mucolítica do hidróxido de sódio utilizado na preparação dos esfregaços proporcionou a obtenção de películas mais delgadas, que retiveram ao fundo menos fucsina, utilizada em concentrações menores, com ou sem fenol e/ou aquecimento, permitindo a leitura dos mesmos.

Nos esfregaços de *M. tuberculosis*, os resultados foram semelhantes aos dos esfregaços após concentração. Entretanto, estes também apresentaram positividade à fluorescência verde, em quatro das seis variações realizadas. As duas variações negativas ocorreram quando foi aplicado aquecimento às soluções, o que sugere que a interferência neste grupo foi devida a esta situação, visto que as soluções de fucsina, fenicadas ou não, terem apresentado positivities similares entre si quando não aquecidas.

De forma geral, os resultados apresentados para o grupo de esfregaços corados por diferentes soluções de fucsina, em diferentes situações, corroboram com os resultados anteriormente apresentados para as colorações tradicionais, confirmando a propriedade fluorescente da fucsina básica, em variações não relatadas por Shapiro; Hänscheid (2008).

5.2.2 Com relação à solução álcool-ácida

Em esfregaços de escarro direto e após concentração, a leitura pela microscopia tradicional nas quatro variações testadas, permitiu a visualização de bacilos com positividade entre 1+ (0,13 bacilos/campo) e 2+ (4,34 bacilos/campo), com intensidade de coloração e brilho fracos (Apêndice 1). À fluorescência, as análises foram positivas no filtro azul e/ou no verde, quando a solução álcool-ácida (SAA) foi utilizada de forma isolada. Desta forma, o melhor resultado foi de 1+ (0,24 bacilos/campo) ao filtro verde, na amostra concentrada de escarro e com SAA por 3 minutos. Também ocorreram leituras inconclusivas, com visualização de 5 ou 9 bacilos, tanto em baciloscopias diretas, quanto nas após concentração, na SAA por 1 minuto, aos filtros azul e verde (Figura 7). Em nenhum esfregaço houve positividade ao filtro vermelho.

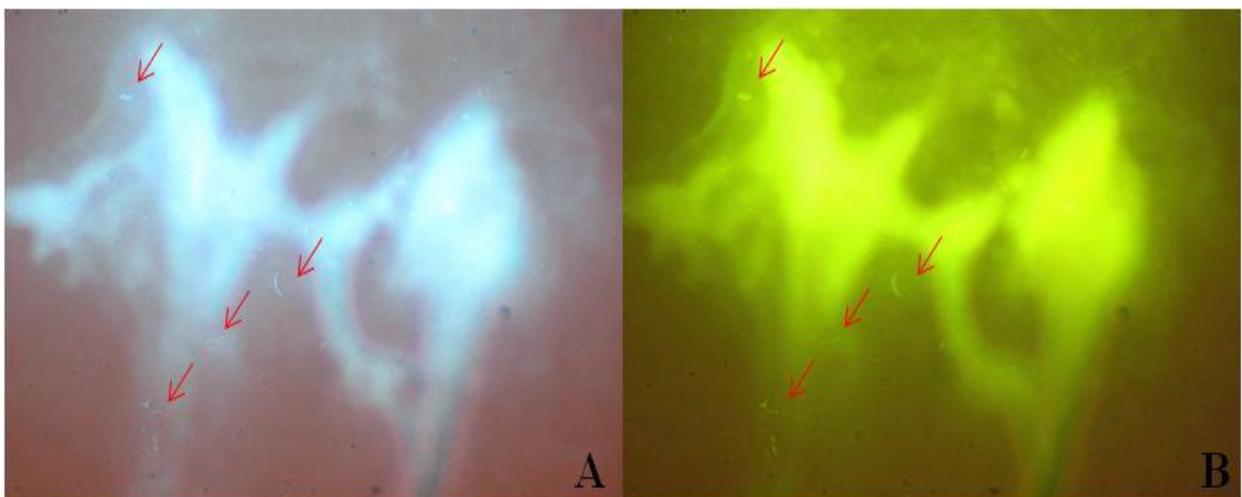


Figura 7. Fotomicrografias de baciloscopia de escarro positivo para BAAR, sob a ação da solução álcool-ácida por 1 minuto, em fluorescência – filtros azul (A) e verde (B), mesmo campo (Objetiva de 100x - imersão, zoom de 4x). As setas indicam a posição de bacilos.

Fonte: Laboratório de Micobacteriologia/INPA

Não há referência específica na literatura sobre os referidos achados, e no presente trabalho não foi possível explicar de forma definitiva o porquê da SAA permitir, quando utilizada isoladamente, visualização bacilar. Frente à falta de informações disponíveis, é certo que este tema deverá ser melhor explorado em pesquisas futuras. Entretanto, foram formuladas duas hipóteses na tentativa de explicar tais leituras. Ambas têm como base a interação química da SAA com constituintes micobacterianos, priorizando os resultados obtidos à fluorescência.

A primeira hipótese está relacionada à interação química da SAA com triptofano, que tem a capacidade de absorção de luz ultravioleta (NELSON; COX, 2004). O triptofano é um aminoácido que faz parte do metabolismo normal da micobactéria (DAVID, 1976), e participa da síntese de niacina na membrana plasmática micobacteriana. Embora a niacina seja produzida por todas as micobactérias (BRASIL, 2008), apenas algumas produzem quantidades suficientes para testes *in vitro*, entre as quais está o *M. tuberculosis*. É possível inferir que haja, então, diferentes quantidades “disponíveis” de niacina ou de áreas representativas de triptofano, na parede micobacteriana, e talvez, dependendo de sua quantidade, possam, em contato com a SAA, induzir fluorescência, e também permitir a leitura na microscopia tradicional, conforme o observado neste trabalho. Duas publicações corroboram com esta hipótese: Rost (1995), em capítulo relacionado à história da microscopia de fluorescência, cita diferentes autores, que a partir de 1950 relataram a indução de fluorescência por substância química não corante, o formaldeído, em contato com serotonina - amina derivada do triptofano, em amostras de tecido não fixadas; e Bhatta et al. (2006), que relatam a utilização de método de espectroscopia de fluorescência, baseado na região de emissão do triptofano, para a diferenciação de bactérias (não tuberculosas) e leveduras pelo perfil de autofluorescência observado.

A segunda hipótese, com raciocínio semelhante à anterior, é que a interação da SAA

com coenzimas tenha induzido a autofluorescência do *M. tuberculosis*. A autofluorescência ou fluorescência intrínseca é uma característica descrita em poucos microrganismos, como actinomicetos, algumas outras bactérias, e fungos (DARKEN, 1961; BHATTA et al., 2006), que permite a sua detecção sem a necessidade de corante fluorescente. Patiño et al. (2008) referem que foram os primeiros a descrever que as micobactérias, incluindo o *M. tuberculosis*, são capazes de emitir autofluorescência em ciano no espectro visível. No trabalho utilizaram micobactérias cultivadas, micobactérias introduzidas em macrófagos, e *M. tuberculosis* adicionado a escarro negativo para BAAR (submetido a processo rotineiro de descontaminação). Relatam que a fluorescência de células micobacterianas foi facilmente visualizada na observação direta da suspensão bacilar em microscópio fluorescente. Sugeriram que a autofluorescência estivesse relacionada à fluorescência emitida pela coenzima F₄₂₀ ou pelo seu metabólito intermediário, FO, descritos previamente em *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. bovis* BCG, *M. phlei*, e em *M. tuberculosis*. Ainda de acordo com os autores, F₄₂₀/FO exibem fluorescência azul-verde brilhante, e que o mecanismo de ação da F₄₂₀ é ainda pouco compreendido, mas relacionável à sobrevivência do *M. tuberculosis* sob anaerobiose.

Entretanto, Patiño et al. (2008) não foram os primeiros a relatar a autofluorescência de *M. tuberculosis*. De acordo com Wellmann; Teng (1962), o primeiro a descrever a fluorescência espontânea azul-esbranquiçada de suspensões de bacilos tuberculosos de humanos foi Kaiserling (1917). Em 1925, Arloing et al. (1925) também descreve a mesma observação. Posteriormente, Richards (1941) atribui a fluorescência relatada pelos autores anteriores, à fraca fluorescência observada isoladamente em ácidos micólicos.

Na literatura encontrada existe uma diversidade de possibilidades para explicar a autofluorescência do bacilo da Tb, induzindo que muitos outros estudos ainda devam ser realizados para elucidar essa constatação.

5.2.3 Com relação à solução de azul de metileno

Os esfregaços de escarro direto retiveram excesso de corante em sua superfície e não permitiram as leituras microscópicas, tradicional e de fluorescência, a semelhança do ocorrido com as soluções de fucsina.

Na microscopia tradicional, os esfregaços após concentração e os de *M. tuberculosis*, nos dois intervalos de tempo testados, permitiram contagem bacilar em azul, sendo as fluorescências negativas. Estes resultados eram esperados visto que o corante inicialmente utilizado para a detecção de bacilos da Tb era o azul de metileno, e não a carbolfucsina (CONN, 1930; BISHOP; NEUMANN, 1970).

Pelo conjunto de dados apresentados nesta análise das soluções que compõem as colorações de Kinyoun e de ZN, verificou-se que somente a SAA poderia causar alguma interferência às análises posteriores com as substâncias em teste. E, por este motivo, baciloscopias submetidas apenas à ação da SAA por 1 minuto foram incluídas como parâmetro na interpretação de resultados das análises com os corantes.

5.3 Análises com corantes

Os resultados das leituras dos esfregaços concentrados de escarro e de *M. tuberculosis*, corados com soluções de diferentes corantes à concentração de 0,3%, estão apresentados no Apêndice 2, e os resultados das análises de colorações de esfregaços de *M. tuberculosis*, com soluções às concentrações de 0,3%, 1% e 3%, estão apresentados no Apêndice 3.

Na análise conjunta dos dois apêndices, verificou-se que o único corante que atendeu aos parâmetros de corante promissor foi o alcalóide de espécie vegetal (AEV). Apesar de não haver boa qualidade de coloração na microscopia tradicional, na de fluorescência – filtros azul e verde, as baciloscopias de escarro positivas para BAAR e de esfregaços de isolado clínico de *M. tuberculosis*, coraram com excelente qualidade de cor e brilho. Além disso não exibiu

agregação excessiva às células e/ou secreção mucóide presente nas amostras de escarro, conforme ilustrado na Figura 8.

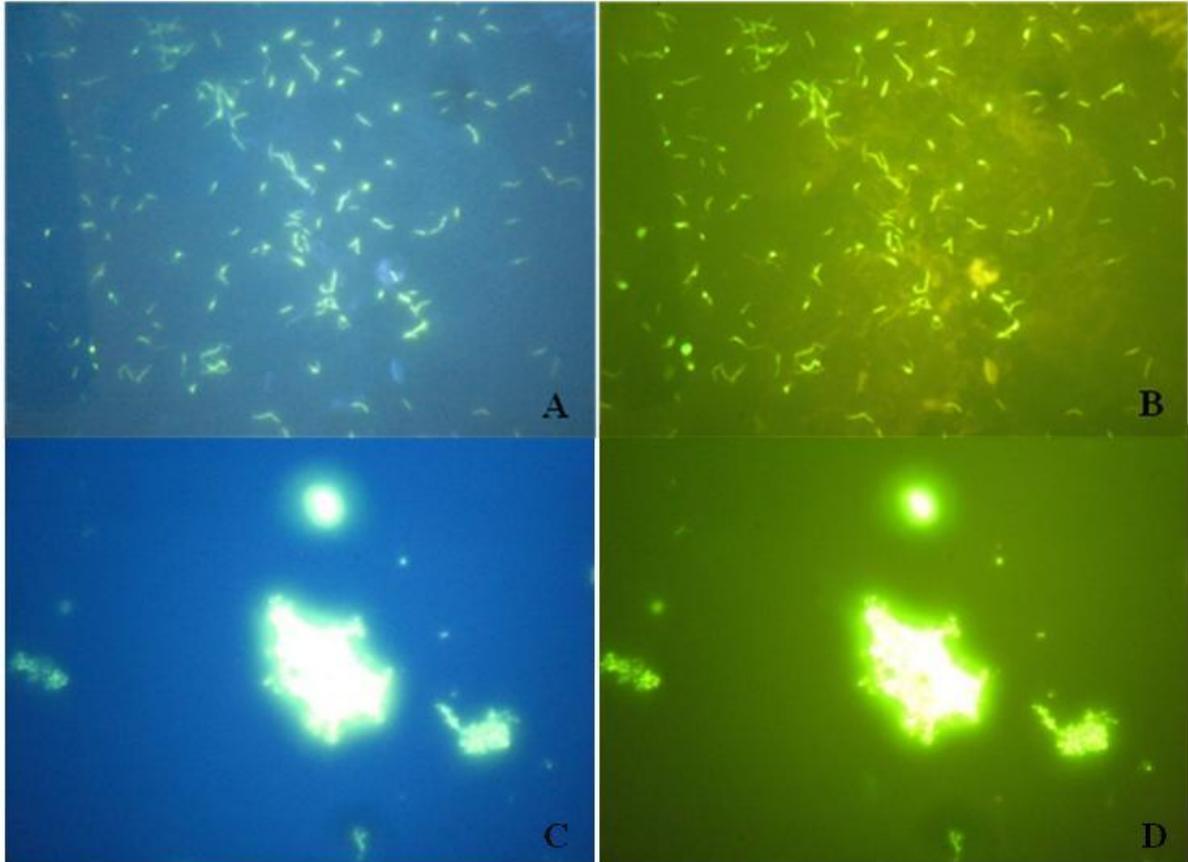


Figura 8. Fotomicrografias de baciloscopia concentrada de escarro (A e B) e de esfregaço de *M. tuberculosis* (C e D), corados pela solução de AEV a 0,3%, utilizando microscopia de fluorescência, filtro azul (A e C) e filtro verde (B e D), correspondentes aos mesmos campos (Objetiva 100x - imersão, zoom 4x).

Fonte: Laboratório de Micobacteriologia/INPA

Na Figura 8, em ambos os filtros, os bacilos apresentam brilho amarelado, em meio a fundo azul ou verde, de acordo com o filtro utilizado. Nas imagens referentes à baciloscopia de escarro (A e B), detalhes da morfologia bacilar puderam ser identificados, assim como a observação de formas em multiplicação. Entre os detalhes, destaca-se a observação, em alguns bacilos, de pontos mais brilhantes, que devem corresponder a grânulos de polifosfato, utilizados nas atividades energéticas e de multiplicação bacilar (BRASIL, 2008), os quais também podem ser observados em colorações pela carbolfucsina.

Tradicionalmente, a contra-coloração, em técnicas fluorescentes para detecção de

micobactérias, é feita com solução de permanganato de potássio a 0,5%, substância oxidante forte (SIGMA-ALDRICH, 2009), e de uso controlado pela Polícia Federal do Brasil para importação. Entretanto, na coloração pelo AEV, o fundo corado com solução de azul de metileno a 0,3% exibiu boa uniformidade nos três materiais testados, correspondente aos mesmos resultados quando se testou em paralelo o permanganato de potássio.

Pelo exposto, como o corante AEV foi considerado o mais promissor para uso no diagnóstico baciloscópico da Tuberculose, o mesmo foi submetido a testes complementares, utilizando como coloração de fundo o azul de metileno na concentração padrão de 0,3%. Também foi submetido a testes de otimização visando melhor qualidade de leitura na microscopia tradicional, pois o ideal de um corante para diagnóstico da Tb é que os BAAR possam ser visualizados tanto em microscópios de luz transmitida (campo claro), como em fluorescência. Tal fato tem relação com unidades de saúde que processam acima de 30 amostras/dia. Utilizando-se os corantes atualmente indicados – Auramina-O e/ou Rodamina, faz-se necessário que, após a detecção de BAAR pela coloração fluorescente, ocorra a descoloração do esfregaço e posterior coloração pela carbolfucsina para confirmação do achado (BRASIL, 2008). Assim, obter um único corante que propicie tal fato, exija menos atividades laboratoriais e ainda, que não seja tóxico ao organismo humano representaria um grande avanço na luta contra a Tb.

5.4 Análises Complementares com o corante AEV

5.4.1 Reavaliação dos resultados iniciais

A propriedade tintorial do corante AEV foi confirmada pela coloração de dez baciloscopias de *M. tuberculosis*, diferentes das utilizadas nos testes iniciais. Nestas estavam incluídas três cepas de *M. tuberculosis* disponibilizadas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL), de São Paulo-SP, das quais uma apresentava perfil de resistência para isoniazida, uma para isoniazida, rifampicina e etambutol, e outra, resistente a pirazinamida e etambutol. Não houve

diferença de leitura entre as referidas cepas e a dos sete isolados sem resistência medicamentosa, confirmando assim os resultados preliminares.

5.4.2 Análise de Sensibilidade de Detecção Bacilar

Os resultados de leitura bacilar, em esfregaços direto de escarro adicionado de concentrações conhecida de unidades formadoras de colônias de *M. tuberculosis*, e corados pelo Kinyoun e pelo AEV a 0,3%, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1

Detecção de bacilos em esfregaços direto de escarro, conforme resultados em coloração de Kinyoun e de AEV

Bacilos/ 0,1mL de escarro	Microscopia Tradicional		Microscopia de Fluorescência					
			Filtro Azul		Filtro Verde		Filtro Vermelho	
	Kin	AEV	Kin	AEV	Kin	AEV	Kin	AEV
10^7	> 30g	Neg	Neg	> 30g	> 30g	> 30g	> 30g	Neg
10^6	> 20g	Neg	Neg	> 20g	> 20g	> 20g	> 20g	Neg
10^5	2b + 1g	Neg	Neg	13b + 2g	Neg	3b + 5g	Neg	Neg
10^4	1b	Neg	Neg	2b	Neg	2b	Neg	Neg
10^3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
10^2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
10^1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Kin = coloração de Kinyoun; AEV = coloração pelo alcalóide de espécie vegetal a 0,3%; Neg = negativo; > = mais que; g = agregados bacilares; b = bacilos.

No teste realizado, a sensibilidade de detecção bacilar nas fluorescências azul e verde da coloração pelo AEV a 0,3% é equivalente ao da microscopia tradicional da coloração de Kinyoun, pois ambas forneceram resultados similares. Estes correspondem à presença de 10.000 bacilos em todo o esfregaço, do qual foram lidos apenas 100 campos. Segundo David et al. (1989), quando o escarro contem 30.000 bacilos/mL, a probabilidade é de 80% para se visualizar de 1 a 9 bacilos em 100 campos. Consequentemente, os resultados encontrados estão de acordo com o esperado.

Vale ressaltar que, na rotina de diagnóstico de pacientes paucibacilares (ausência ou no máximo 1 a 9 bacilos em 100 campos), dependendo da qualidade da coloração de Kinyoun ou de ZN, a escassez de bacilos pode gerar dúvidas ao microscopista mais experiente com indicativo de um resultado falso-negativo (CDC, 2002). De forma diferente, a positividade de dois bacilos pelas fluorescências azul ou verde do AEV, geram poucas interpretações contrárias, conforme ilustrado na Figura 9, apesar da resolução fotográfica não permitir a real observação de um bacilo paralelo ao outro.

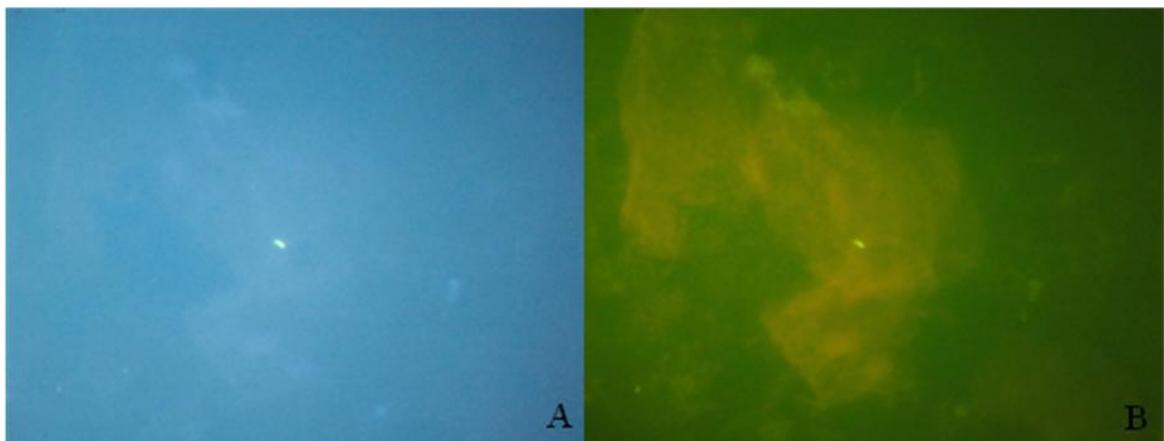


Figura 9. Fotomicrografias de esfregaço direto de escarro corado pela solução de AEV a 0,3%, em microscopia de fluorescência, filtro azul (A), e filtro verde (B), apresentando 2 bacilos ao centro do campo (Objetiva 100x - imersão, zoom 4x).

Fonte: Laboratório de Micobacteriologia/INPA

Verificou-se ainda que, na coloração de Kinyoun, apesar da leitura à microscopia tradicional estar em acordo com o esperado na literatura, as leituras pelas fluorescências verde e vermelha necessitaram de concentrações de bacilos cem vezes maior para suas detecções. Estes resultados se contrapõem aos de Shapiro; Häscheid (2008), os quais destacam que haveria equivalência, ou até superioridade, de visualização bacilar na microscopia de fluorescência do que na luz transmitida, em esfregaços corados pela carbolfucsina.

5.4.3 Análise de Especificidade com outros microrganismos

O corante AEV apresentou, no teste realizado, especificidade para bactérias do gênero *Mycobacterium*, sendo negativo na única amostra de microrganismo álcool-ácido resistente

ocasional testado, de *Nocardia braziliensis*, e nas demais bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Quando corados pelo AEV a 0,3%, os esfregaços de *M. gordonae* e *M. fortuitum* apresentaram perfil de positividade idêntico ao *M. tuberculosis*, conforme Figura 10.

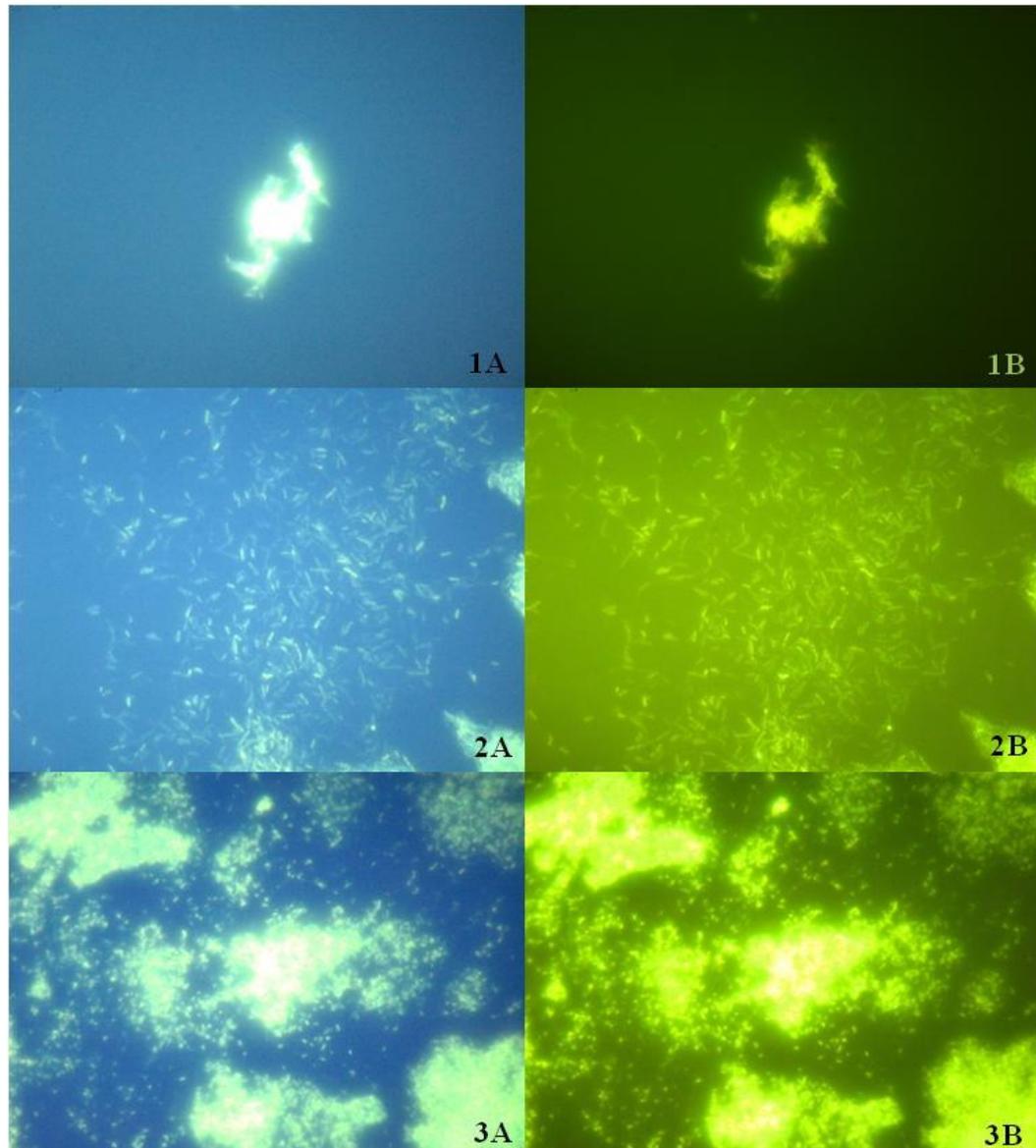


Figura 10. Fotomicrografias de esfregaço de isolados clínicos de *M. tuberculosis* (1), *M. gordonae* (2) e *M. fortuitum* (3), corados pela coloração do AEV a 0,3%, às fluorescências azul (A) e verde (B), mesmos campos (Objetiva de 100x - imersão, zoom de 4x).

Fonte: Laboratório de Micobacteriologia/INPA

Destaca-se que o isolado de *N. braziliensis* também foi negativo à microscopia tradicional, quando corado pelo Kinyoun. Em trabalhos futuros, será necessário ampliar o número de espécies álcool-ácido resistentes ocasionais a fim de verificar se a coloração pelo

AEV também poderá ser aplicada aos mesmos.

5.4.4 Otimização da solução de coloração

Conforme previsto na metodologia, a otimização foi executada em duas etapas. Assim, os resultados da 1ª etapa referente à determinação da menor concentração de uso do corante e melhor tempo de coloração, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2

Resultados das leituras microscópicas de esfregaços de *M. tuberculosis* corados com soluções de AEV, em diferentes tempos

Tempo de Coloração (minutos)	Tipo de Microscopia*	Concentrações das Soluções (%)				
		0,003	0,03	0,3	1	3
1	Tradicional	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Fluorescência Azul	Pos ^{2;1}	Pos ^{2;1}	Pos ^{3;2}	Pos ^{4;2}	Pos ^{4;3}
	Fluorescência Verde	Pos ^{2;1}	Pos ^{2;1}	Pos ^{3;2}	Pos ^{4;2}	Pos ^{4;3}
	Fluorescência Vermelha	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
3	Tradicional	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Fluorescência Azul	Pos ^{2;1}	Pos ^{3;2}	Pos ^{4;3}	Pos ^{4;3}	Pos ^{4;3}
	Fluorescência Verde	Pos ^{2;1}	Pos ^{3;2}	Pos ^{4;3}	Pos ^{4;3}	Pos ^{4;3}
	Fluorescência Vermelha	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
5	Tradicional	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Fluorescência Azul	Pos ^{2;1}	Pos ^{4;3}	Pos ^{5;4}	Pos ^{5;4}	Pos ^{5;4}
	Fluorescência Verde	Pos ^{2;1}	Pos ^{4;3}	Pos ^{5;4}	Pos ^{5;4}	Pos ^{5;4}
	Fluorescência Vermelha	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
10	Tradicional	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	Fluorescência Azul	Neg	Pos ^{4;4}	Pos ^{5;4}	Pos ^{5;4}	Pos ^{5;4}
	Fluorescência Verde	Pos ^{2;1}	Pos ^{4;4}	Pos ^{5;4}	Pos ^{5;4}	Pos ^{4;3}
	Fluorescência Vermelha	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Neg: Negativa; Pos; Positiva. *: Quando positiva, incluem dados referentes à avaliação subjetiva de Intensidade de coloração de bacilos = (1) delimitados, visíveis, mas muito claros; (2) claros; (3) regular; (4) boa; (5) ótima; e, Avaliação subjetiva de intensidade de brilho: (1) opaco; (2) fraco; (3) médio; (4) acentuado.

De acordo com a Tabela 2, verifica-se que a menor concentração utilizada, a de

0,003% corou fracamente os bacilos, mesmo no maior tempo de coloração. A concentração de 0,03% apresentou resultados intermediários de positividade quando nos intervalos de 5 e 10 minutos. As soluções a 0,3%, 1% e 3% apresentaram os níveis máximos de positividade a partir de 5 minutos. Desta forma, percebe-se que o tempo em que os melhores resultados passam a ocorrer é o de 5 minutos, e a menor concentração de corante é a de 0,3%. Dado adicional que corrobora com este é o fato de que as lâminas coradas com as soluções a 1 e a 3%, apesar de exibirem ótima positividade com 5 minutos, também apresentam precipitado grosseiro de corante na superfície dos esfregaços, e excesso de brilho de fundo. Imagens dos achados microscópicos estão apresentadas na Figura 11.

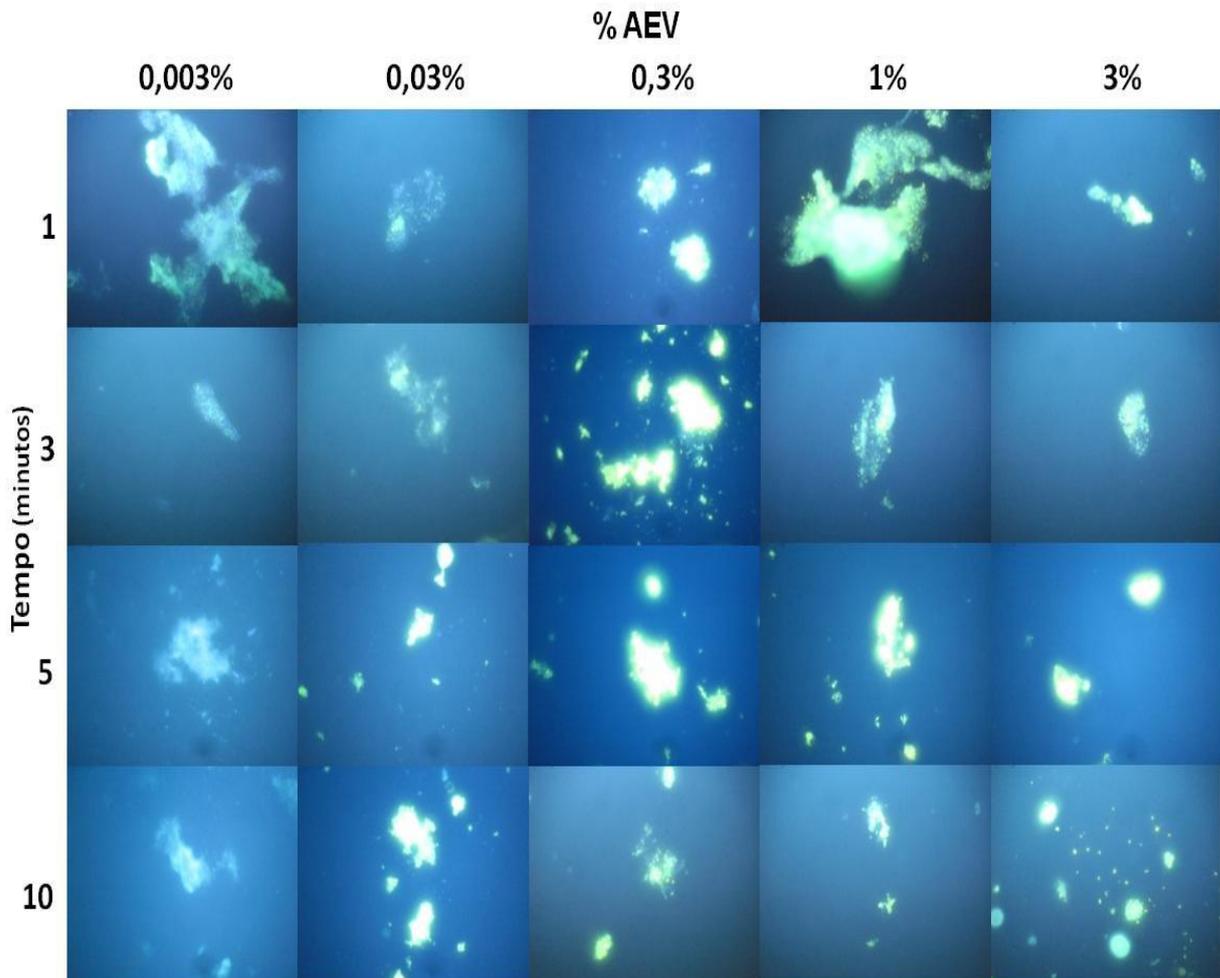


Figura 11. Painel de fotomicrografias de esfregaços de *M. tuberculosis*, corados por diferentes soluções de AEV, em diferentes períodos de tempo, à fluorescência azul (Objetiva de 100x - imersão, zoom de 4x).

Fonte: Laboratório de Micobacteriologia/INPA

Os resultados da 1ª etapa referente à verificação da ação descolorante da solução álcool-ácida, em diferentes intervalos de tempo, mantendo-se fixos a concentração de AEV em 0,3% por 5 minutos, e a contra-coloração com azul de metileno por 1 minuto, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3

Resultados dos esfregaços de *M. tuberculosis* corados por solução de AEV conforme os diferentes tempos de descoloração com solução álcool-ácida

Descoloração (minutos)	Tipo de Microscopia*			
	Tradicional	Fluorescência		
		Filtro Azul	Filtro Verde	Filtro Vermelho
1	Negativa	Positiva ^{5; 4}	Positiva ^{5; 4}	Negativa
3	Negativa	Positiva ^{5; 4}	Positiva ^{5; 4}	Negativa
6	Negativa	Positiva ^{4; 3}	Positiva ^{4; 3}	Negativa
9	Negativa	Positiva ^{3; 2}	Positiva ^{3; 2}	Negativa
12	Negativa	Positiva ^{3; 2}	Positiva ^{3; 2}	Negativa
15	Negativa	Positiva ^{2; 2}	Positiva ^{2; 2}	Negativa

*: Quando positiva, incluem dados referentes à avaliação subjetiva de Intensidade de coloração de bacilos = (1) delimitados, visíveis, mas muito claros; (2) claros; (3) regular; (4) boa; (5) ótima; e, Avaliação subjetiva de intensidade de brilho: (1) opaco; (2) fraco; (3) médio; (4) acentuado.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, observa-se que os bacilos permaneceram visíveis mesmo com o maior tempo de permanência sob o efeito da SAA. Com isto, verifica-se que o *M. tuberculosis* apresenta capacidade real de reter o corante AEV em sua parede, mesmo após 15 minutos de descoloração. Também se verifica que o intervalo de 1 minuto é o mais adequado aos procedimentos de descoloração, por permitir a manutenção da qualidade máxima de visualização bacilar à leitura microscópica de fluorescência, no menor intervalo de tempo, conforme apresentado na Figura 12.

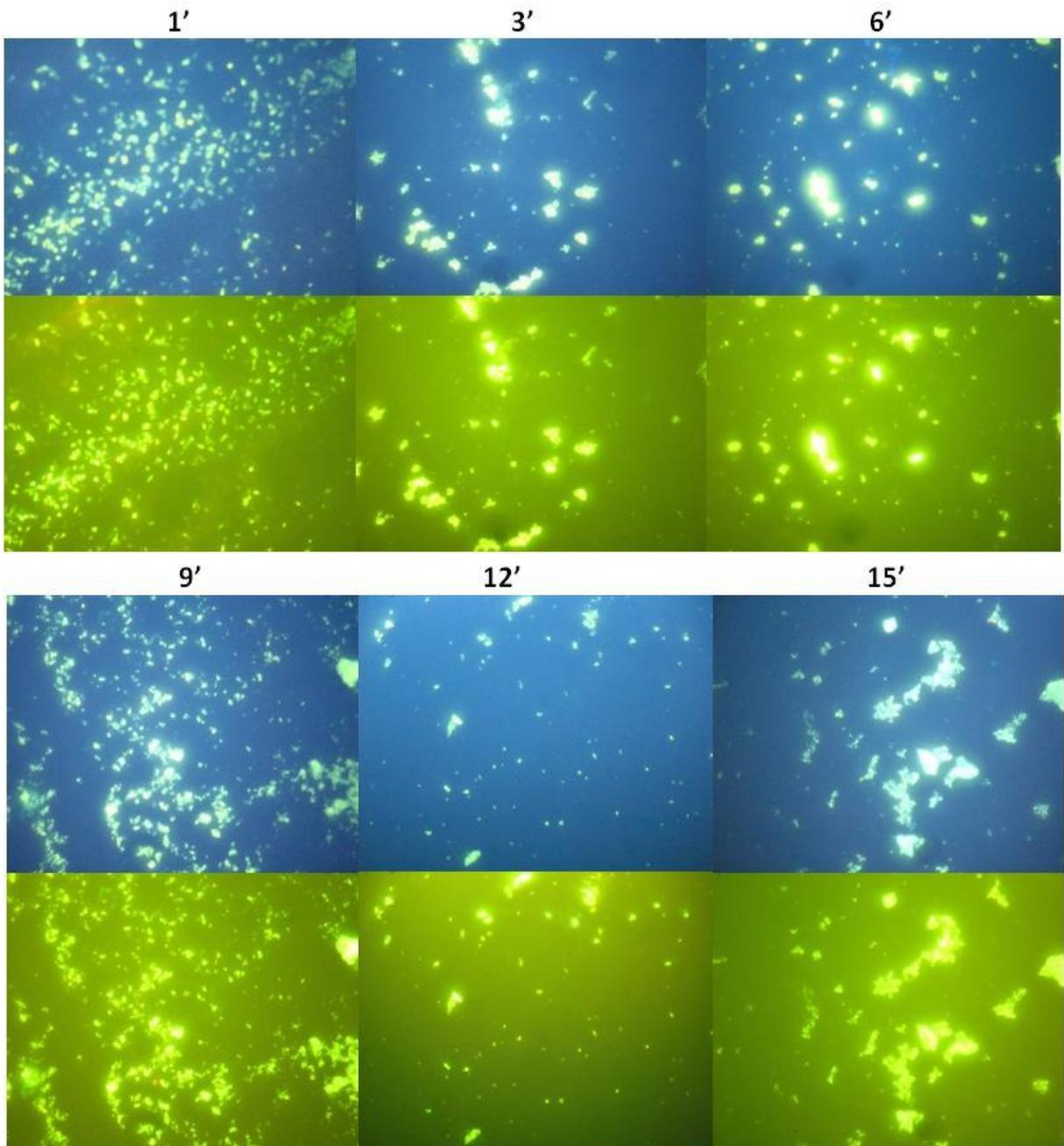


Figura 12. Painele de fotomicrografias de esfregaços de *M. tuberculosis* corados por solução de AEV a 0,3% por 5 minutos, e submetidos a diferentes tempos de descoloração com solução álcool-ácida, fluorescências azul e verde (Objetiva de 100x - imersão, zoom de 4x).

Fonte: Laboratório de Micobacteriologia/INPA

Com os resultados da 1ª etapa e na busca de melhorar a qualidade de visualização dos bacilos corados pelo AEV em leituras microscópicas tradicionais, analisou-se o efeito do ajuste de pH, como umas das fases da 2ª etapa de otimização da coloração. Assim, os resultados de leitura de baciloscopias positivas escore 3+ para BAAR coradas por soluções de

AEV a 0,3%, em diferentes pH, estão apresentados na Tabela 4 e ilustrados na Figura 13.

Tabela 4

Resultados das leituras de esfregaços positivos para BAAR corados por soluções de AEV a 0,3%, em diferentes pH

pH	Microscopia Tradicional*		Fluorescência*					
			Filtro Azul		Filtro Verde		Filtro Vermelho	
	S	IB	S	IB	S	IB	S	IB
4,0	1+ ^{2;1}	0,45	3+ ^{4;3}	>50	3+ ^{4;3}	>50	Neg	0
7,0	Inc	0,05	3+ ^{4;3}	>50	3+ ^{4;3}	>50	Neg	0
10,0	1+ ^{2;2}	0,72	3+ ^{4;3}	>50	3+ ^{4;3}	>50	Neg	0

S = escore; IB = índice bacilosκόpio; *: Quando positiva, incluem dados referentes à avaliação subjetiva de Intensidade de coloração de bacilos = (1) delimitados, visíveis, mas muito claros; (2) claros; (3) regular; (4) boa; (5) ótima; e, Avaliação subjetiva de intensidade de brilho: (1) opaco; (2) fraco; (3) médio; (4) acentuado; Neg = negativo.

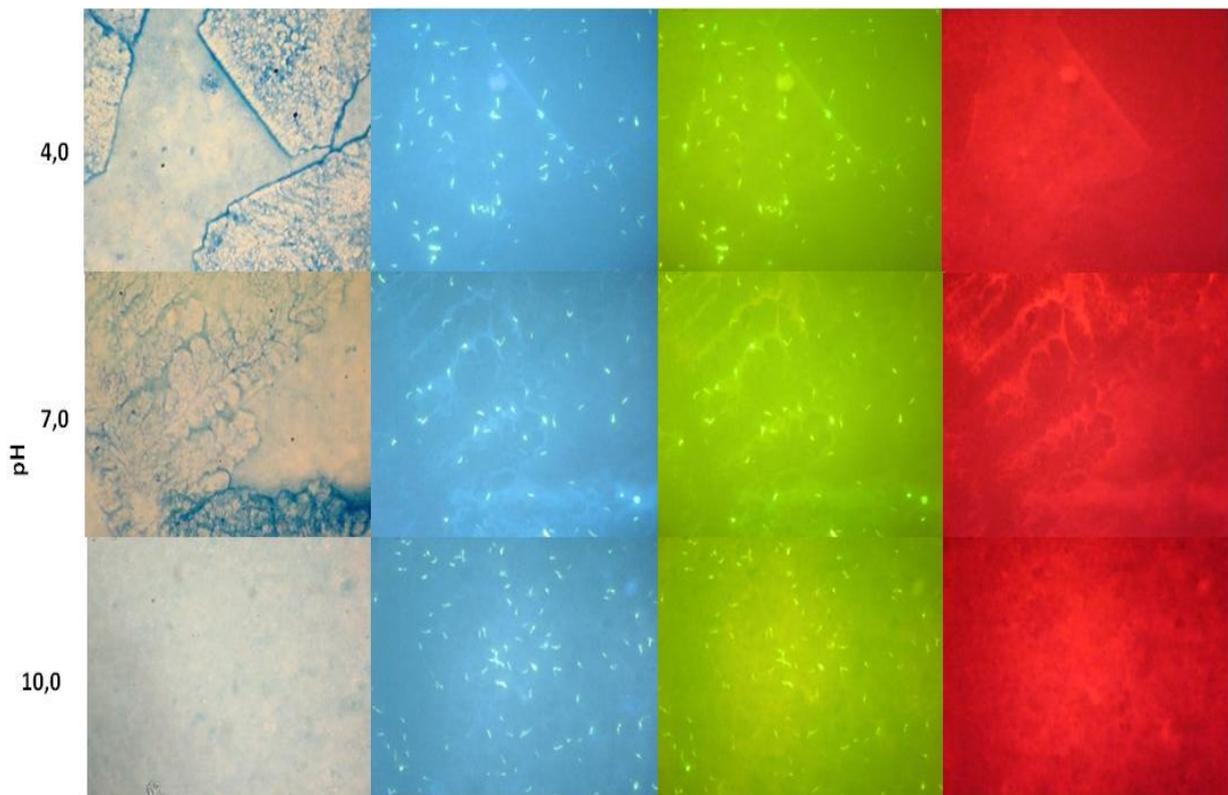


Figura 13. Painel de fotomicrografias de baciloscopias positivas para BAAR coradas por soluções de AEV a 0,3%, em diferentes pH, microscopia tradicional e fluorescências (Objetiva de 100x - imersão, zoom de 4x).

Fonte: Laboratório de Micobacteriologia/INPA

Conforme a Tabela 4 e a Figura 13, não houve alteração dos padrões de leitura microscópica tradicional, assim como em fluorescência, nos diferentes pH testados. A solução de uso do corante AEV a 0,3% tem pH não ajustado em torno de 4,9, enquanto o pH da água destilada de preparo das soluções foi de 5,8. A possibilidade de coloração por solução em pH ácido ou neutro é contrária ao que tradicionalmente é afirmado para as colorações utilizadas na detecção de micobactérias.

Conn (1930) e Bishop; Neumann (1970) referem que, Paul Erlich, em 1882, confirmou os achados de Robert Koch sobre a utilização de solução alcalina de azul de metileno na coloração dos bacilos, e introduziu o conceito de que a ação do corante estava relacionada à presença de camada de cobertura permeável apenas por álcalis. Naquele período, a carbolfucsina ainda não havia sido utilizada, e as soluções corantes eram; solução alcalina de azul de metileno, obtida com a adição de hidróxido de potássio – por Koch, ou adição de anilina aquosa à solução de um corante básico – por Erlich. Siqueira et al. (1984) referem em uma revisão histórica, que com o passar dos anos, foi evidenciado um denominador em comum ao gênero *Mycobacterium*, que seria a capacidade de assimilação de substâncias corantes básicas.

A capacidade do AEV permanecer retido pela micobactéria mesmo após lavagem com SAA, e independente do pH da solução, deve estar associada à natureza química intrínseca do corante, e de suas relações com os constituintes bacilares, em local diferente do que é atribuído à fucsina (básica). Como a solução de AEV é predominantemente aquosa, e tendo como base as informações do trabalho de Brennan; Nikaido (1995) sobre a permeabilidade da parede micobacteriana a solutos hidrofílicos, é possível que um dos constituintes envolvidos sejam as porinas.

Pelo apresentado, verifica-se que o ajuste de pH é desnecessário, e não resulta em alterações às leituras microscópicas, e que mesmo soluções corantes em pH ácido e neutro são retidas pela célula micobacteriana.

O 2º teste da segunda etapa foi a adição de possíveis substâncias otimizadoras na formulação do AVE. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5

Resultados das Leituras de esfregaços positivos para BAAR corados por soluções de AVE a 0,3%, conforme a adição de substâncias para otimização de leitura microscópica tradicional

Coloração	Tipo de Microscopia							
	Tradicional*		Fluorescência*					
			Filtro Azul		Filtro Verde		Filtro Vermelho	
	S	IB	S	IB	S	IB	S	IB
Colorações e solução padrão								
Kinyoun	3+^{5; 4}	>50	Neg	0	3+^{2Me; 1}	>50	3+^{5; 4}	>50
Somente SAA 1 min	2+^{1; 2}	3,7	Inc^{1; 1}	5b	Inc^{1; 1}	5b	Neg	0
AEV	3+^{2; 2}	19,05	3+^{5; 4}	>50	3+^{5; 4}	>50	Neg	0
Soluções em teste								
AEV + ácido periódico	Neg	0	Neg	0	Neg	0	Neg	0
AEV + ferro reduzido	Neg	0	3+^{5; 4}	>30	3+^{5; 4}	>30	Neg	0
AEV + sulfato ferroso amoniacal	Inc^{2; 1}	7b	Neg	0	Neg	0	Neg	0
AEV + citrato férrico amoniacal	2+^{2; 1}	2,7	3+^{3; 2}	>50	3+^{3; 2}	>50	Neg	0

S = escore; IB = índice baciloscópio; SAA = solução álcool-ácida; AVE= alcalóide de espécie vegetal; *: Quando positiva, incluem dados referentes à avaliação subjetiva de Intensidade de coloração de bacilos: (1) delimitados, visíveis, mas muito claros; (2) claros; (3) regular; (4) boa; (5) ótima; (M) mudança de cor para (a) azul, (b) violeta, (c) verde, (d) amarelo, (e) laranja; e, Avaliação subjetiva de intensidade de brilho: (1) opaco; (2) fraco; (3) médio; (4) acentuado.

Conforme se constata na Tabela 5, nenhuma das quatro substâncias adicionadas promoveu alterações na qualidade de leitura à microscopia tradicional. Entretanto, a adição de duas destas, ácido periódico e sulfato ferroso amoniacal, resultou em negatização das leituras à lâmpada de mercúrio, filtros azul e verde. É possível que ambas tenham se ligado ao grupo fluorocrômico, impedindo que este se ligasse à bactéria, ou vice-versa. Ou ainda, que a ligação, à bactéria ou ao corante, não permitisse a retenção do AVE após lavagem com solução álcool-ácida. A adição de ferro reduzido não inibiu a leitura em fluorescência, assim como o citrato férrico amoniacal.

O 3º teste da segunda etapa foi a recoloração de baciloscopias, por diferentes colorações, cujos resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6

Resultados de baciloscopias de escarro positivas para BAAR, conforme as leituras de coloração e recoloração

Coloração/ Recoloração	Microscopia Tradicional*		Microscopia de Fluorescência*					
			Filtro Azul		Filtro Verde		Filtro Vermelho	
	S	IB	S	IB	S	IB	S	IB
Kinyoun	3+^{5;4}	>50	Neg	0	3+^{2Me;1}	>50	3+^{5;4}	>50
Recolor. pelo AEV	3+^{5;4}	>50	Neg	0	3+^{2Me;1}	>50	3+^{5;4}	>50
ZN	3+^{5;3}	>50	Neg	0	3+^{2Me;1}	>50	3+^{5;4}	>50
Recolor. pelo AEV	3+^{5;3}	>50	Neg	0	3+^{2Me;1}	>50	3+^{5;4}	>50
AEV	Neg	0	3+^{5;4}	>50	3+^{5;4}	>50	Neg	0
Recolor. pelo Kinyoun	3+^{5;4}	>50	Neg	0	3+^{2Me;1}	>50	3+^{4;4}	>50
AEV	Neg	0	3+^{5;4}	>50	3+^{5;4}	>50	Neg	0
Recolor. pelo ZN	3+^{5;4}	>50	Neg	0	3+^{2Me;1}	>50	3+^{4;4}	>50

ZN = Ziehl-Neelsen; AEV= alcalóide de espécie vegetal; S = escore; IB = índice baciloscópico *: Quando positiva, incluem dados referentes à avaliação subjetiva de Intensidade de coloração de bacilos: (1) delimitados, visíveis, mas muito claros; (2) claros; (3) regular; (4) boa; (5) ótima; (M) mudança de cor para (a) azul, (b) violeta, (c) verde, (d) amarelo, (e) laranja; e, Avaliação subjetiva de intensidade de brilho: (1) opaco; (2) fraco; (3) médio; (4) acentuado.

Nos dados apresentados na Tabela 6, verifica-se que não há alteração dos padrões de leitura, quer seja à microscopia tradicional ou à de fluorescência, quando foi realizada recoloração pelo AEV em baciloscopias previamente coradas pelo Kinyoun e pelo ZN. Quando a situação foi invertida, não foi possível leitura à fluorescência, filtro azul, e no verde, ocorreu a perda da coloração amarelada e do brilho acentuado, permutados pela coloração alaranjada opaca, observada quando dos testes com a fucsina (Apêndice 1).

A coloração pela fucsina, independente de sua concentração, foi mais estável, visto não se ter obtido nenhum ganho na visualização dos bacilos após a recoloração pelo AEV. Na situação contrária, a fucsina pode ter deslocado a ligação do AEV nos constituintes bacilares e/ou a sobreposto em sua intensidade. Como a superfície micobacteriana é rica em lipídios,

entre eles os ácido micólicos (BRENNAN; NIKAIDO, 1995), e altamente permeável a solutos lipofílicos, haveria maior número de áreas disponíveis para ligação química com a fucsina. Desta forma, estes dados corroboram com a hipótese de que os locais de ligação de ambos sejam distintos, conforme discutido anteriormente.

Três outros testes, realizados em paralelo, confirmaram as análises acima descritas. Para tanto, baciloscopias positivas para BAAR foram coradas, separadamente:

- 1) com solução AEV/ carbolfucsina de Kinyoun (3,3%), em volumes iguais e por 5 minutos, descoradas e contra-coradas;
- 2) com AEV por 5 minutos e eliminação posterior, seguida por carbolfucsina de Kinyoun, pelo mesmo tempo, descoradas e contra-coradas;
- 3) com solução de AEV/ carbolfucsina a 0,4%, por 5 minutos, descoradas e contra-coradas.

O tempo de descoloração com SAA foi de 1 minuto, assim como o da contra-coloração por azul de metileno. Todos os testes resultaram no predomínio do padrão de coloração da carbolfucsina sobre o do AEV, à semelhança dos testes de recoloração.

Pelo exposto, a recoloração de baciloscopias pela carbolfucsina apenas confirma as leituras microscópicas obtidas com o AEV. Além disso, a carbolfucsina não deve ser acrescida ao AEV por anular seu padrão de visualização na microscopia de fluorescência.

5.4.5 Análise de concordância com bacteriologia tradicional e exame molecular

Destaca-se que para esta análise, cada uma das variáveis foi realizada de forma independente, sem que um observador soubesse dos resultados do outro, e até que todo o período necessário ao cultivo e identificação fosse concluído. Além disto, optou-se pela leitura em fluorescência, filtro azul (AEV), pois a mesma foi a que apresentou menor interferência de leitura com a SAA, nos testes iniciais. Assim, os resultados obtidos com a análise comparativa pelos métodos tradicionais de identificação de micobactérias, pela PCR com *IS6110* (123pb) e pela leitura de esfregaços corados com solução de AEV a 0,3% ao filtro azul, em 10 amostras clínicas, de diferentes materiais, estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7

Diagnóstico de Tuberculose, conforme os resultados de baciloscopia, cultivo e PCR

Registro do paciente no INPA	Tipo de amostra	Baciloscopia				Cultivo	PCR	
		Direta		Concentrada			IS6110	β-act
		Kin	AEV	Kin	AEV			
055/04	Esc	Neg	Inc (2b)	Neg	1+ (31b)	<i>M.tuberculosis</i>	Pos	Pos
131/07	Esc	Neg	Neg	Neg	Inc (1b)	Neg	Pos	Pos
064/09	Esc	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos
095/09	Esc	Neg	Inc (2b)	Neg	1+ (24b)	Neg	Pos	Pos
099/09	Esc	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
098/09	LB	Neg	Inc (3b)	Neg	1+ (26b)	<i>M.tuberculosis</i>	Pos	Pos
092/09	LP	Neg	Inc (3b)	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos
093/09	SecPral	Neg	Neg	Neg	1+ (11b)	Neg	Pos	Pos
097/09	MO	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
100/09	Bióp	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos

Kin = coloração de Kinyoun; AEV = coloração por alcalóide de espécie vegetal; β-act = beta actina; Esc = escarro; LB = lavado brônquico; LP = líquido pleural; MO = medula óssea; SecPral = secreção perianal; Bióp = biópsia cutânea; Pos = resultado positivo; Neg = resultado negativo; Inc = resultado inconclusivo; b = bacilos.

Na análise de sensibilidade descrita anteriormente (tópico 5.4.2), Kinyoun e AEV haviam obtido idênticos limites de detecção bacilar, tendo sido destacado a possibilidade de achados falso-negativos no Kinyoun, quando pequeno número de bacilos estava presente na amostra. A análise havia sido feita em escarro acrescido de número estimado de UFC. Entretanto, a situação se repetiu quando foi executada em amostras de pacientes (Tabela 7). Assim, confirma-se o exposto de que a escassez de bacilos pode gerar dúvidas ao microscopista mais experiente, com indicativo de um resultado falso-negativo (CDC, 2002). Por outro lado, mesmo com pequeno quantitativo bacilar, o AEV, e apenas ele, permitiu identificar 6 amostras positivas para BAAR, sendo três tanto em baciloscopias diretas como concentradas (duas confirmadas por cultivo), uma apenas na direta e duas apenas na após-concentração (todas sem confirmação do cultivo). Vale ressaltar que todas as referidas amostras tiveram PCR positivo para *M. tuberculosis*. Por esse motivo foi analisada a questão

clínica dos pacientes que não tiveram total correspondência entre os resultados do AEV e os demais exames.

O caso 131/07, com baciloscopia direta e cultivo negativos, apresentava alteração radiológica, e foi submetido a tratamento para Tb devido a forte suspeita clínica da doença. A indicação de tratamento corrobora com os resultados de positividade na baciloscopia após-concentração e na PCR para *M. tuberculosis*. O caso 064/09, com apenas a PCR positiva para *M. tuberculosis*, tinha antecedente de Tb tratada em 2007. Assim, é possível que a PCR positiva indique apenas resíduos de DNA micobacteriano, motivo pelo qual não teve positividade no AEV e nem no cultivo. O caso 095/09, com baciloscopias e PCR positivas, estava em tratamento para Tb há 30 dias antes da coleta da amostra. Assim, tem-se uma justificativa da negatividade do cultivo e uma indução de que o paciente era realmente portador de Tb.

O caso 092/09 tinha 80 anos e suspeita de Tb pleural. Apresentou apenas baciloscopia direta e PCR positivas. Trata-se de forma da doença naturalmente paucibacilar e com grande dificuldade de diagnóstico, principalmente quando acomete pacientes idosos. O caso 093/09, com apenas a baciloscopia concentrada e PCR positivas, apresentava PPD de 15 mm (reator forte) e cômjuge com antecedente de Tb. Nesse caso, como a exposição ao descontaminante em amostras anais é executada em tempo superior ao do processo de cultivo, é possível que o mesmo tenha proporcionado a inviabilidade bacilar no mesmo.

Mediante o exposto, o AEV corrobora a suspeita clínica de Tb, mesmo na existência de 2 a 3 bacilos em 100 campos examinados, fato esse não detectado na coloração pela carbolfucsina e em alguns casos pelo cultivo das amostras clínicas.

Os resultados apresentados na Tabela 7 propiciam o uso do AEV no diagnóstico da Tuberculose. Entretanto, é necessário que sejam executadas as próximas etapas de validação de um novo método de diagnóstico laboratorial que, de acordo com WHO (2004), incluem:

- ✓ Fase I - Desenvolvimento e Padronização, referente à interação entre pesquisa básica e clínica, que corresponde a fase executada nesta pesquisa;

- ✓ Fase II - Validação interlaboratorial (teste de Proficiência), e Estimativa de acurácia, envolvendo indivíduos doentes e saudáveis (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, reprodutibilidade);
- ✓ Fase III - Eficácia Clínico Laboratorial; e
- ✓ Fase IV - Estimativa de custo efetividade (Rede Saúde).

5.5 Análise de fonte biológica amazônica do corante mais promissor

Os resultados de leitura das microbaciloscopias de escarro coradas com as soluções obtidas de extratos alcaloídicos de espécies vegetais amazônicas, comparativamente aos obtidos com a coloração de Kinyoun, da SAA por 1 minuto e da solução de AEV a 0,3%, estão apresentados na Tabela 8 e ilustrados na Figura 14.

Tabela 8

Resultados de leituras de baciloscopias coradas pelas colorações e solução padrão, e por substâncias naturais em teste

Solução	Caracterização	Tipo de Microscopia							
		Microscopia Tradicional*		Microscopia de Fluorescência*					
				Filtro Azul		Filtro Verde		Filtro Vermelho	
S	IB	S	IB	S	IB	S	IB		
Colorações e solução padrão									
Kinyoun	Kinyoun padrão	3+^{4;4}	15,52	Neg	0	2+^{1Me;1}	2,72	3+^{4;4}	16,71
SAA 1'	SAA por 1 min	2+^{2;3}	9,53	2+^{2;1}	2,20	2+^{2;1}	3,62	Neg	0
AEV	AEV a 0,3%	2+^{1;2}	4,12	3+^{3;2}	13,67	3+^{3;2}	9,77	Neg	0
Soluções de substâncias naturais em teste									
Sol. 113	Alc. pur. GAA46	2+^{2;2}	1,61	Inc^{2;2}	6b	1+^{2;2}	0,18	Neg	0
Sol. 116	Alc. pur. "D"	3+^{3;4}	18,10	Neg	0	Neg	0	Neg	0
Sol. 117	Alc. pur. "R"	3+^{3;4}	11,13	Neg	0	Neg	0	Neg	0
Sol. 114	Fração alc. AGFO	3+^{3;4}	33,15	Neg	0	Neg	0	Neg	0
Sol. 115	Fração alc. AGGG	2+^{3;4}	8,00	Neg	0	Neg	0	Neg	0
Sol. 118	Fração alc. AGGG	2+^{1;2}	6,65	Neg	0	Neg	0	Neg	0
Sol. 125	Fração alc. AGFO	2+^{1;2}	3,38	Neg	0	Neg	0	Neg	0

SAA = solução álcool-ácida; AEV= alcalóide de espécie vegetal; Alc. pur. = alcalóide purificado; S = escore; IB = índice baciloscópico; *Quando positiva, incluem dados referentes à avaliação subjetiva de Intensidade de coloração de bacilos: (1) delimitados, visíveis, mas muito claros; (2) claros; (3) regular; (4) boa; (5) ótima; (M) mudança de cor para (e) laranja; e, Avaliação subjetiva de intensidade de brilho: (1) opaco; (2) fraco; (3) médio; (4) acentuado.

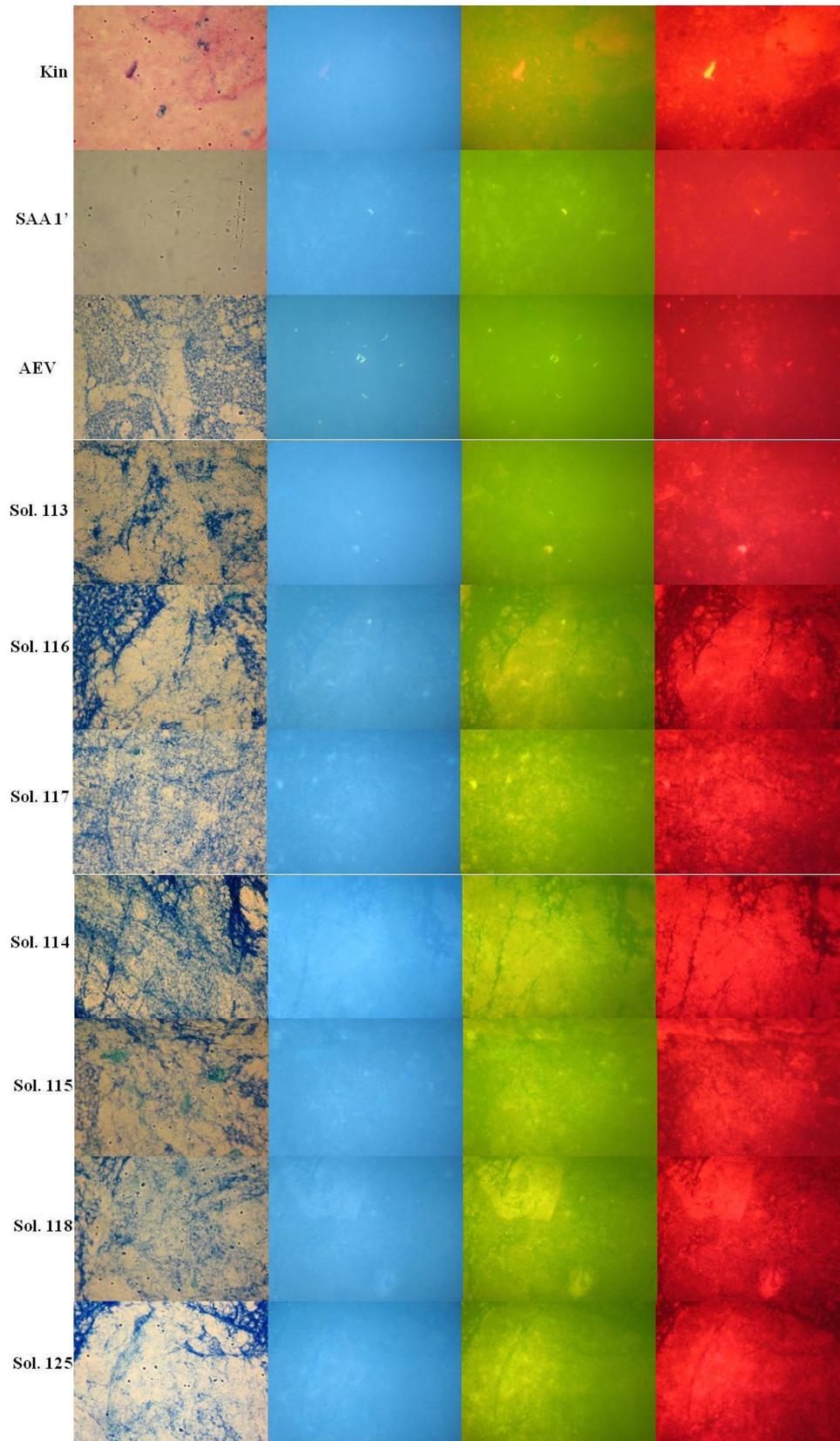


Figura 14. Pannel de fotomicrografias de baciloscopias positivas para BAAR coradas pelas colorações e solução padrão, e por substâncias naturais em teste, microscopia tradicional e fluorescências (Objetiva de 100x - imersão, zoom de 4x).

Fonte: Laboratório de Micobacteriologia/INPA

Conforme os dados da Tabela 8, apenas a solução 113 apresentou pequeno número de bacilos à microscopia de fluorescência, filtros azul e verde, em padrão semelhante ao da SAA. Entretanto, as soluções 116, 117 e 114 apresentaram padrão de leitura microscópica tradicional compatível com a coloração de Kinyoun.

Os resultados apresentados demonstram que os alcalóides e as frações alcaloídicas das espécies vegetais amazônicas testadas possuem boas perspectivas a serem exploradas. De forma isolada ou combinada ao AEV, tais substâncias poderiam se aproximar do corante ideal, o qual proporcionaria visualização de BAAR em campo claro e, se necessário, em fluorescência, otimizando a execução do diagnóstico baciloscópico de Tb, sem o risco de toxicidade para seres humanos e meio ambiente.

6. CONCLUSÕES

- 6.1 Bacilos corados pela fucsina básica apresentam positividade à microscopia de fluorescência, filtros verde e vermelho, independente de aquecimento e/ou da adição de fenol.
- 6.2 Bacilos submetidos à ação exclusiva de solução álcool-ácida apresentam positividade à leitura microscópica tradicional e à de fluorescência, filtros azul e verde, fato que pode estar relacionado à interação da solução com um ou mais constituintes bacilares, e que deverá ser melhor avaliado em trabalhos futuros.
- 6.3 O corante AEV, sem adição de fenol e sem aquecimento, foi o mais promissor por ter sido retido pela célula micobacteriana, mesmo após lavagem com solução álcool-ácida, em baciloscopias de escarro positivas para BAAR e em esfregaços de isolado clínico de *M. tuberculosis*.
- 6.4 Entre as 15 espécies bacterianas testadas, inclusive *Nocardia braziliensis*, o corante AEV somente corou as unidades formadoras de colônias do gênero *Mycobacterium*, indicando preliminar especificidade para o gênero;
- 6.5 O AEV apresentou melhor perfil de positividade à microscopia de fluorescência, azul e verde, sendo necessários testes complementares visando a otimização da leitura à microscopia tradicional;
- 6.6 Espécies vegetais amazônicas possuem alcalóides e frações alcaloídicas promissoras para uso na coloração de micobactérias, podendo as mesmas, ao serem agregadas ao AEV, propiciar o corante ideal para o diagnóstico da Tuberculose - visualização tanto à microscopia tradicional, quanto à de fluorescência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução – CNNPA número 44, de 1977**. Diário Oficial da União, secção I, 01/02/1978 e 24/04/1978. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/44_77.htm>. Acesso em: 01 set. 2010.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Deteção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica** – módulo VI, 2004.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Consulta a Legislação em Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/home.php>>. Acesso em: 25 nov. 2009.

ARAÚJO, M.E. **Corantes naturais têxteis – da antiguidade aos tempos modernos**. Texto de apoio ao Curso de Mestrado em Química Aplicada ao Patrimônio Cultural, DQB, FCUL, 2005. Disponível em: <http://www.dqb.fc.ul.pt/docentes/earaujo/Corantes_Naturais_texteis-Texto_Apoio.pdf>. Acesso em: 28 set. 2010.

ARLOING, F.; POLICARD, A.; LANGERON, L. Aspects offerts par diverses cultures microbiennes sous l’action des radiations émises par la lampe a arc au mercure après filtration par des écrans de Wood (lumière de Wood). **Comptes Rendus Société de Biologie**, v. 92, p. 261-263, 1925.

BHATTA, H.; GOLDYS, E.M.; LEARMONTH, R.P. Use of fluorescence spectroscopy to differentiate yeast and bacterial cells. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 71, p. 121-126, 2006.

BISHOP, P.J.; NEUMANN, G. The history of the Ziehl-Neelsen Stain. **Tubercle**, v. 51, p. 196-206, 1970.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tuberculose – diagnóstico laboratorial – baciloscopia**. Brasília: Série TELE-LAB, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. COORDENAÇÃO GERAL DE LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA. CENTRO DE REFERÊNCIA PROFESSOR HÉLIO FRAGA. **Fortalecimento da rede de laboratórios para o diagnóstico da tuberculose no Brasil**. Julho, 2002a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE POLÍTICAS DE SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA. **Manual técnico para o controle da tuberculose: cadernos de atenção básica**. 6^a. ed. rev. e ampl. Brasília: Ministério da Saúde, 2002b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. CENTRO DE REFERÊNCIA PROF. HÉLIO FRAGA. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 3^a Ed. Comemorativa, Rio de Janeiro: Centro de Referência Prof. Hélio Fraga, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Visita de Monitoramento ao Estado do Amazonas, 2009**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manaus: Ministério da Saúde, 2009. Apresentação em PowerPoint.

BRENNAN, P.J. Structure, function and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 83 (1-3), p. 91-7, 2003.

BRENNAN, P.J.; NIKAIDO, H. The Envelope of Mycobacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 23-63, 1995.

CDC – US Department of Health and Human Services/ Public Health Service/ Center for Disease Control and Prevention. **Standardized Method for HPLC Identification of Mycobacteria**. Washington, DC: DHHS, 1996.

CDC - Association of Public Health Laboratories/Centers of Disease Control and Prevention. **External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy**. Washington, DC: APHL, 2002. Disponível em: <http://wwwn.cdc.gov/dls/ila/document/eqa_afb.pdf>. Acesso em 01 set. 2010.

CLAVEL, A.; VAREA, M.; DOIZ, O.; LÓPEZ, L.; QUÍLEZ, J.; CASTILLO, F.J.; RUBIO, C.; GÓMEZ-LUS, R. Visualization of hydatid elements: comparison of several techniques. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1561-1563, 1999.

COLEMAN, R. The long-term contribution of dyes and stains to histology and histopathology. **Acta Histochemica**, v. 108, p. 81-83, 2006.

CONN, H.J. The history of staining – the development of bacteriological staining methods. **Stain Technology**, v. 5, n. 2, p. 39-48, 1930.

COSTA, M.G.F.; COSTA-FILHO, C.F.F.; SENA, J.F.; SALEM, J.; LIMA, M.O. Automatic identification of *Mycobacterium tuberculosis* with conventional light microscopy. **30th Annual International IEEE-Engineering in Medicine and Biology Society Conference Management System**, p. 382-385, 2008.

DANIEL, T.M. Rapid diagnosis of tuberculosis: a selective review. **Journal of Laboratory Clinical Medical**, v. 116, p. 277-282, 1990.

DARKEN, M.A. Natural and Induced Fluorescence in Microscopic organisms. **Microbiological Process Report**, v. 9, p. 354-360, 1961.

DAVID, H.L. **Bacteriology of the Mycobacterioses**. Atlanta: Center of Disease Control, 1976.

DAVID, H.L.; LÉVI-FRÉBAULT, V.; THOREL, M.F. **Méthode de Laboratoire pour Mycobacteriologie Clinique**. Paris: Institut Pasteur, 1989, 87p.

FARIA-SOUSA, S.J. Fisiologia e Desenvolvimento da Visão. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 30, p. 16-19, 1997.

FORERO, M.G. ; SROUBEK, F. ; CRISTÓBAL, G. Identification of tuberculosis bacteria based on shape and color. **Real-Time Imaging**, v. 10, p. 251-262, 2004.

FRASER, T.; BANKS, A. **Color - la guía más complete**. China: Evergreen, 2005.

FUMDHAM - Fundação Museu do Homem Americano, Serra da Capivara, Piauí, Brasil. **Pinturas Rupestres**. Disponível em: <<http://www.fumdhm.org.br/pinturas.asp>>. Acesso em: 11 nov. 2009.

GADELHA, A.R.; IHÁRA, L.T.; MARÓJA, M.F.; SALEM, J.I. Um novo método de coloração para micobactérias. **Anais do Hospital da Siderúrgica Nacional**, v. 6, n. 4, p. 16-18, 1982.

GORDON, C.; VAN DEUN, A.; LUMB, R. Evaluating the performance of basic fuchsin for the Ziehl-Neelsen stain. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 13, n. 1, p. 130-135, 2009.

HÄNSCHEID, T.; RIBEIRO, C.M.; SHAPIRO, H.M.; PERLMUTTER, N.G. Fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 236-237, 2007.

HÄNSCHEID, T. The future looks bright: low-cost fluorescent microscopes for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Coccidia*. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 520-521, 2008.

HARADA, K. The nature of mycobacterial acid-fastness. **Stain Technology**, v. 51, n. 5, p. 255-60, 1976.

JENNINGS, S. **Manual del color para el artista**. Barcelona: Blume, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008, p. 452-465.

KAISERLING, C. Über die unterscheidung von Tuberkelbazillen im luminiszenzmikroskop. **Zeitschr Tuberkulose**, v. 27, p. 156-161, 1917.

KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e Biologia Celular – uma introdução à Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, p. 243-266.

KIMURA JUNIOR, A.; COSTA, M.G.F.; COSTA-FILHO, C.F.F.; FUJIMOTO, L.B.M.; SALEM, J.I. Evaluation of autofocus functions of conventional sputum smear microscopy for Tuberculosis. **32nd Annual International IEEE-Engineering in Medicine and Biology Society Conference Management System**, p. 3041-3044, 2010.

KINYOUN, J.J. A note on Uhlenhunts method for sputum examination, for tubercle bacilli. **American Journal of Public Health**, p. 867-870, 1915.

KUMAR, S.; BAJPAI, R.P.; BHARADWAJ, L.M.; Diagnosis of tuberculosis based on BioMEMS, **International Conference on Intelligent Sensing and Information Processing**, p. 237-242, 2004.

LIMA, S.S.S.; CLEMENTE, W.T.; PALACI, M.; ROSA, R.V.; ANTUNES, C.M.F.; SERUFO, J.C. Métodos convencionais e moleculares para o diagnóstico da tuberculose pulmonar: um estudo comparativo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 12, p. 1056-1062, 2008.

MARAIS, B.J.; BRITTLE, W.; PAINCZYK, K.; HESSELING, A.C.; BEYERS, N.; WASSERMAN, E.; VAN SOOLINGEN, D.; WARREN, R.M. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 203-207, 2008.

MELO, J.S.S. de. Moléculas com história (foto)química. **Química**, n. 100, p. 57-61, 2006.

MERCK. **Fucsina (C.I. 42510)** Disponível em: <<http://www.merck-chemicals.com/brazil/fucsina-c-i-42510/>>. Acesso em: 15 set. 2010a.

MERCK. **Tinturas de Fluorescência.** Disponível em: <<http://www.merck-chemicals.com.br/tinturas-de-fluorescencia/>>. Acesso em: 26 ago. 2010b.

MURRAY, S. J.; BARRETT, A.; MAGEE, J. G.; FREEMAN, R. Optimisation of acid fast smears for the direct detection of mycobacteria in clinical samples. **Journal of Clinical Pathology**, v. 56, p. 613-15, 2003.

NELSON, D.L.; COX, M.M. (Eds) **Lehninger Principles of Biochemistry**, 4th Ed., New York: W.H.Freeman and Company, 2004.

OGUSKU, M.M.; SALEM, J.I. Análise de diferentes primers utilizados na PCR visando ao diagnóstico da tuberculose no Estado do Amazonas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 4, p. 343-349, 2004.

OLIVEIRA, J.S.; SOUZA, E.H.S.; BASSO, L.A.; PALACI, M.; DIETZE, R.; SANTOS, D.S.; MOREIRA, I.S. An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-*trans*-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemical Communications**, v. 3, p. 312-313, 2004.

OLYMPUS. **Fluorescence Microscopy.** Disponível em: <<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/anatomy/anatomyhome.html>>. Acesso em: 15 set. 2010.

PARK, S-H.; BENDELAC, A. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. **Nature**, v. 406, p. 788-92, 2000.

PATIÑO, S.; ALAMO, L.; CIMINO, M.; CASART, Y.; BARTOLI, F.; GARCÍA, M.J.; SALAZAR, L. Autofluorescence of mycobacteria as a tool for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical and Microbiology**, v. 46, n. 10, p. 3296-3302, 2008.

PIHLMAN, K.; LINDER, E. Fluorescence microscopical visualization of elastic fibres using basic fuchsin. **Histochemistry**, v. 79, p. 157-165, 1983.

PINTO, A.C. Corantes Naturais e Culturas Indígenas. **Histórias Interessantes de Produtos Naturais.** Disponível em: <<http://www.sbgq.org.br/PN-NET/causo9.htm>>. Acesso em: 24 out. 2006.

PMM – PREFEITURA MUNICIPAL DE MANAUS. PROGRAMA DE CONTROLE DA TUBERCULOSE. **Plano de Ação e Programação Anual 2009**. Manaus: Secretaria Municipal de Saúde, 2009.

REVILLA, J. **Corantes Naturais**. Manaus: SEBRAE: INPA, 2004.

RICHARDS, O.W. The staining of acid-fast tubercle bacteria. **Science**, v. 93, n. 2408, p. 190, 1941.

ROST, F.W.D. **Fluorescence Microscopy**. New York: Cambridge University Press, p. 183-192, 1995.

RUSSELL, M.J.; DOUGLAS, T.S. Evaluation of autofocus algorithms for tuberculosis microscopy. **Proceedings of the 29th Annual International Conference of the IEEE EMBS**, p. 3489-3492, 2007.

RYLL, R.; KUMAZAWA, Y.; YANO, I. Immunological Properties of Trehalose Dimycolate (cord factor) and other Mycolic Acid-Containing Glycolipids – A Review. **Microbiology and Immunology**, v. 45, n. 12, p. 801-11, 2001.

SADAPHAL, P.; RAO, J.; COMSTOCK, G.W.; BEG, M.F. Image processing techniques for identifying *Mycobacterium tuberculosis* in Ziehl-Neelsen stains. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 12, n. 5, p. 579-582, 2008.

SALEM, J.I.; MAROJA, M.F.; CARVALHO, F.F.; LIMA, M.O.; LITAIFF, L.R.L.L.; CARDOSO, M.S.L.; BRIGLIA, M.F.S.; DAVID, H.L. Valor relativo do exame direto, após concentração e por cultivo de escarro no diagnóstico bacteriológico da tuberculose pulmonar no Amazonas. **Jornal de Pneumologia**, v. 16, n. 3, p. 133-136, 1990.

SBPT – Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 10, p. 1018-1048, 2009.

SCHIOZER, A.L.; BARATA, L.E.S. Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal. **Revista Fitos**, v. 3, n. 2, p. 6-24, 2007.

SELVAKUMAR, N.; RAHMAN, F.; RAJASEKARAN, S.; NARAYANAN, P. R.; FRIEDEN, T. R. Inefficiency of 0,3% carbol fuchsin in Ziehl-Neelsen Staining for detecting Acid-Fast Bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 3041-43, 2002.

SELVAKUMAR, N.; SEKAR, M. G.; RAHMAN, F.; SYAMSUNDER, A.; DURAIPANDIAN, M.; WARES, F.; NARAYANAN, P. R.. Comparison of variants of carbol-fuchsin solution in Ziehl-Neelsen for detection of acid-fast bacilli. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 9, n. 2, p. 226-9, 2005.

SELVAKUMAR, N.; KUMAR, V.; GOPI, P.G.; SIVAGAMASUNDARI, S.; NARAYANAN, P.R. Pot method for storage & detection of acid-fast bacilli from sputum samples. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, p. 765-768, 2008.

SENA, J. F.; COSTA, M.G.F.; COSTA-FILHO, C.F.F.; SALEM, J.I.; LIMA, M.O. Identificação do *Mycobacterium tuberculosis* através da utilização de limiar global adaptativo. In: XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2008, Salvador. **Anais**. 2008.

SHAPIRO, H.M.; HÄNSCHEID, T. Fuchsin fluorescence in *Mycobacterium tuberculosis*: The Ziehl-Neelsen stain in a new light. **Journal of Microbiological Methods**, v. 74, p. 119-120, 2008.

SIGMA-ALDRICH. **Catálogo de Produtos**. Disponível em: <<http://sigmaaldrich.com/catalog/>>. Acesso em: 20 out. 2009.

SIGMA-ALDRICH. **Pararosaline hydrochloride**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail>>. Acesso em 15 set. 2010.

SIQUEIRA, L. F. G.; ALMEIDA, R. G.; BELDA, W. Comportamento tintorial do *Mycobacterium leprae*. Revisão histórica. **Revista de Saúde Pública**, v. 17, n. 4, 1983.

SIQUEIRA, L. F. G.; ALMEIDA, R. G.; BELDA, W. Métodos tintoriais utilizados na identificação do *Mycobacterium leprae*. Revisão Histórica. **Revista de Saúde Pública**, v. 18, p. 256-58, 1984.

STEINGART, K.R.; HENRY, M.; NG, V.; HOPEWELL, P.C.; RAMSAY, A.; CUNNINGHAM, J.; URBANCZIK, R.; PERKINS, M.; AZIZ, M.A.; PAI, M. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 570-581, 2006.

TARALLO, M.B.; URQUIOLA, C.; MONGE, A.; COSTA, B.P.; RIBEIRO, R.R.; COSTA-FILHO, A.J.; MERCADER, R.C.; PAVAN, F.R.; LEITE, C.Q.F.; TORRE, M.H.; GAMBINO, D. Design of novel iron compounds as potential therapeutic agents against tuberculosis. **Journal of Inorganic Biochemistry**, em publicação, 2010.

TITFORD, M. Comparison of historic Grüber dyes with modern counterparts. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 76, n. 1, p. 23-30, 2001.

TITFORD, M. The long history of hematoxylin. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 80, n. 2, p. 73-78, 2005.

TITFORD, M. Comparison of historic Grüber dyes with modern counterparts using thin layer chromatography. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 82, n. 4-5, p. 227-234, 2007.

TOFFOLI, D. J.; COURROL, L.C.; TARELHO, L. V. G.; GOMES, L.; VIEIRA JUNIOR, N. D. Estudo do Complexo Hipericina: Európio para uso em diagnóstico clínico. **Boletim Técnico da Faculdade de Tecnologia de São Paulo**, v. bt20, p. 32-4, 2006.

ULUKANLIGIL, M.; ASLAN, G.; TASÇI, S. A comparative study on the different staining methods and number of specimens for the detection of acid fast bacilli. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 6, p. 855-58, 2000.

VAN DEUN, A.; HAMID SALIM, A.; AUNG, K. J.; HOSSAIN, M. A.; CHAMBUGONJ, N.; HYE, M. A.; KAERIA, A.; DECLERCQ, E. Performance of variations of carbolfuchsin staining of sputum smears for AFB under field conditions. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 9, n. 10. p. 1127-33, 2005.

VAN DEUN, A.; HOSSAIN, M.A.; GUMUSBOGA, M.; RIEDER, H.L. Ziehl-Neelsen staining: theory and practice. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 12, n.1, p.108-110, 2008.

VAREA, M.; CLAVEL, A.; DOIZ, O.; CASTILLO, F.J.; RUBIO, M.C.; GÓMEZ-LUS, R. Fuchsin fluorescence and autofluorescence in *Cryptosporidium*, *Isospora* and *Cyclospora* oocysts. **International Journal of Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 1881-1883, 1998.

VEGA, F. A. F. (coord); MORENO, J. E.; MARTÍN, J. G.; GUTIÉRREZ, J. J. P. **Procedimientos em Microbiologia Clínica – recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clínica**, 9^a Micobactérias, Emília Cercenado Y Rafael Cantón (eds), 2005.

VETEC. **Pararosanilina (para fucsina) C.I. 42500**. Disponível em: <<http://www.vetecquimica.com.br/home/detalhes/4003/>>. Acesso em: 15 set. 2010.

VIEIRA, F.D.; SALEM, J.I; RUFFINO-NETO, A.; CAMARGO, S.A.; SILVA, R.R.F.; MOURA, L.C.C.; SILVA, J.V. Metodologia para caracterização de proficiência em leitura de resultados baciloscópicos para diagnóstico da tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 5, p. 304-311, 2008.

VOLP, A.C.P.; REHNE, I.R.T.; STRINGUETA, P.C. Pigmentos Naturais Bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

WELLMANN, K. F.; TENG, K.P. Demonstration of Acid-fast bacilli in tissue sections by fluorescence microscopy: a study with clinical and histopathological correlations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 87, p. 837-841, 1962.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections** – Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), 2004. Disponível em: <http://www.who.int/std_diagnostics/publications/mapping_landscape.pdf>. Acesso em: 05 out. 2010.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diagnostics for Tuberculosis** – Global demand and market potencial, 2006. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9241563303.eng.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2009.

ZEISS. **Filter Assistant**. Disponível em: <<https://www.microshop.zeiss.com/>>. Acesso em: 13 nov. 2009.

APÊNDICE 1 - Resultados de leitura de esfregaços de escarro (direto e concentrado) e de isolado clínico de *M. tuberculosis* pela microscopia tradicional e pela microscopia de fluorescência (filtros azul, verde e vermelho) corados pelas colorações de Kinyoun e de Ziehl-Neelsen tradicionais e, de forma individual ou combinada, pelas soluções que as compõem.

Coloração ou Solução	Soluções utilizadas e descrição sumária das etapas realizadas	MICROSCOPIA TRADICIONAL*										MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA*					
		MICROSCOPIA TRADICIONAL*			Filtro Azul			Filtro Verde			Filtro Vermelho						
		ED	EC	IC	ED	EC	IC	ED	EC	IC	ED	EC	IC				
Kinyoun tradicional	Coloração padrão de Kinyoun, fucsina fenicada a 3,3%	3+ (>50) ^{5;3}	3+ (>50) ^{5;3}	Pos ^{5;3}	Neg	Neg	1+ (0,16) ^{1Me;1}	3+ (>50) ^{2Me;1}	Pos ^{3Me;1}	1+ (0,41) ^{1;1}	3+ (>50) ^{5;4}	Pos ^{5;4}					
Kinyoun modificado	Coloração pelo Kinyoun, fucsina não fenicada a 3,3%	2+ (5,5) ^{5;3}	3+ (>50) ^{5;3}	Pos ^{4Me;3}	Neg	Neg	2+ (1,46) ^{1Me;1}	3+ (>50) ^{4Me;2}	Pos ^{3Me;2}	3+ (15,45) ^{5;3}	3+ (>50) ^{5;3}	Pos ^{5;4}					
Ziehl-Neelsen tradicional	Coloração padrão de Ziehl-Neelsen, fucsina fenicada a 0,3% com aquecimento	3+ (>50) ^{5;3}	3+ (>50) ^{5;3}	Pos ^{5;3}	Neg	Neg	Inc (4 b) ^{1Me;1}	2+ (3,72) ^{1Me;1}	Pos ^{2Me;1}	1+ (0,67) ^{1;1}	3+ (>50) ^{5;4}	Pos ^{3;3}					
Ziehl-Neelsen modificado 1	Coloração pelo Ziehl-Neelsen, fucsina fenicada a 0,3%, sem aquecimento	3+ (>50) ^{5;3}	3+ (>50) ^{5;3}	Pos ^{5;3}	Neg	Neg	1+ (0,54) ^{1Me;1}	3+ (>50) ^{4Me;1}	Pos ^{2Me;1}	3+ (10,15) ^{2;2}	3+ (>50) ^{5;4}	Pos ^{3;3}					
Ziehl-Neelsen modificado 2	Coloração pelo Ziehl-Neelsen, fucsina não fenicada a 0,3%, com aquecimento	3+ (>50) ^{5;3}	3+ (>50) ^{5;3}	Pos ^{5;3}	Neg	Neg	Inc (2 b) ^{1Me;1}	3+ (>50) ^{4Me;2}	Pos ^{2Me;2}	1+ (0,12) ^{2;2}	3+ (>50) ^{4;3}	Pos ^{3;2}					
Ziehl-Neelsen modificado 3	Coloração pelo Ziehl-Neelsen, fucsina 0,3% não fenicada, sem aquecimento	3+ (>50) ^{4;3}	3+ (28,85) ^{4;3}	Pos ^{5;3}	Neg	Neg	2+ (5,36) ^{2Me;1}	3+ (>50) ^{4Me;2}	Pos ^{2Me;2}	3+ (13,2) ^{2;1}	3+ (>50) ^{4;3}	Pos ^{3;2}					
Fucsina	apenas solução fenicada a 3,3%, sem aquecimento	Neg#	Neg#	Pos ^{5;2}	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos ^{1Me;1}	Neg	Neg	Pos ^{1;1}					
Fucsina	apenas solução não fenicada a 3,3%, sem aquecimento	Neg#	3+ (31,9) ^{3;1}	Pos ^{5;1}	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos ^{2Me;2}	Neg	2+ (5,54) ^{1;1}	Pos ^{3;3}					
Fucsina	apenas solução fenicada a 0,3%, com aquecimento	Neg#	3+ (11,4) ^{3;1}	Pos ^{5;2}	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	2+ (5,36) ^{1;1}	Pos ^{1;1}					
Fucsina	apenas solução fenicada 0,3%, sem aquecimento	Neg#	3+ (>50) ^{4;1}	Pos ^{5;1}	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos ^{1Me;1}	Neg	2+ (3,38) ^{3;2}	Pos ^{2;2}					
Fucsina	apenas solução não fenicada 0,3%, com aquecimento	Neg#	3+ (>50) ^{4;2}	Pos ^{4;2}	Neg	Neg	Neg	1+ (0,19) ^{2Me;1}	Neg	Neg	2+ (3,36) ^{2;2}	Pos ^{2;2}					
Fucsina	apenas solução não fenicada a 0,3%, sem aquecimento	Neg#	3+ (20,0) ^{2;1}	Pos ^{2;2}	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos ^{1Me;1}	Neg	2+ (2,67) ^{2;1}	Pos ^{2;2}					
SAA 1	Somente solução álcool-ácida 1'	2+ (1,94) ^{1;2}	2+ (3,70) ^{1;2}	Neg	Inc (5 b) ^{1;1}	Neg	Inc (9 b) ^{1;1}	Inc (5 b) ^{1;1}	Neg	Neg	Neg	Neg					
SAA 3	Somente solução álcool-ácida 3'	2+ (2,18) ^{1;2}	2+ (3,80) ^{1;2}	Neg	Neg	Neg	Neg	1+ (0,24) ^{1;1}	Neg	Neg	Neg	Neg					
SAA 1 + AM 1	Solução álcool-ácida 1'+ azul de metileno 1'	1+ (0,47) ^{2;2}	2+ (4,34) ^{2;2}	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg					
SAA 3 + AM 4	Solução álcool-ácida 3'+ azul de metileno 4'	1+ (0,13) ^{1;2}	1+ (0,43) ^{1;2}	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg					
AM 1	Somente azul de metileno 1'	Neg#	2+ (2,02) ^{2Ma;1}	Pos ^{4Ma;1}	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg					
AM 4	Somente azul de metileno 4'	Neg#	2+ (1,83) ^{2Ma;1}	Pos ^{4Ma;1}	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg					

*: ED = esfregaço direto; EC = esfregaço concentrado; IC = isolado clínico; Pos = Positiva, Neg = Negativa, > = maior que, # = excesso de corante retido no esfregaço impossibilita leitura microscópica. Quando positiva, incluem dados referentes à avaliação subjetiva de Intensidade de coloração de bacilos = (1) delimitados, visíveis, mas muito claros; (2) claros; (3) regulares; (4) boa; (5) ótima; (M) mudança de cor para (a) azul, (b) violeta, (c) verde, (d) amarelo, (e) laranja; e, Avaliação subjetiva de intensidade de brilho = (1) opaco; (2) fraco; (3) médio; (4) acentuado. Escore de Leitura baciloscópica de esfregaços de escarro de acordo com padronização do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008) no qual Neg = nenhum bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) em 100 campos; Inc = inconclusivo, especificar quantitativo - 1 a 9 BAAR em 100 campos; 1+ = Positivo +, 10 a 99 BAAR em 100 campos; 2+ = Positivo ++, média de 1 a 10 BAAR por campo em 50 campos; 3+ = Positivo +++, média superior a 10 BAAR por campo em 20 campos. Número entre parênteses indica média de bacilos por campo.

APÊNDICE 2 - Resultados de leitura pela microscopia tradicional e pela microscopia de fluorescência (filtros azul, verde e vermelho) esfregado baciloscópico de amostra concentrada de escarro, com escore 3+ para BAAR, e de isolado clínico de *Mycobacterium tuberculosis* corados por diferentes soluções à concentração de 0,3%, tendo como controles lâminas coradas pelo Kinyoun, pelo Ziehl-Neelsen, e somente com solução álcool-ácida por 1 minuto.

Tipo de Microscopia	Microscopia Tradicional *						Microscopia de Fluorescência *								
	Filtro Azul			Filtro Verde			Filtro Azul			Filtro Verde			Filtro Vermelho		
	EC	IB	IC	S	IB	IC	S	IB	IC	S	IB	IC	S	IB	IC
COLORAÇÕES TRADICIONAIS E SOLUÇÃO DERIVADA DAS MESMAS															
Kinyoun	3+ ⁵ ;3	46	Pos ⁵ ;3	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	0	Pos ^{3Me} ;1	2+ ⁵ ;4	4,18	Pos ⁵ ;4	
Ziehl-Neelsen	3+ ⁵ ;3	34,95	Pos ⁵ ;3	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	0	Pos ^{2Me} ;1	Neg	0	Pos ³ ;2	
Somente SAA 1'	3+ ¹ ;2	30,4	Neg	Neg	0	Neg	2+ ¹ ;1	7,74	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	
CORANTES SINTÉTICOS IDÊNTICOS AOS NATURAIS															
Alizarina	2+ ² ;2	1,48	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	
Antraquinona	2+ ² ;2	7,44	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	
Curcumina	2+ ¹ ;1	6,46	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	0	Pos ³ ;3	Neg	0	Neg	
Indigo Carmim	2+ ¹ ;2	3,76	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	
Vermelho Natural	2+ ¹ ;2	1,92	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	
AEV	3+ ¹ ;3	13	Neg	3+ ⁵ ;4	11,55	Pos ⁵ ;4	2+ ⁵ ;4	5,12	Pos ⁵ ;4	2+ ⁵ ;4	Neg	Neg	0	Neg	
CORANTES SINTÉTICOS MENOS TÓXICOS QUE A FUCSINA															
Preto Brilhante	2+ ¹ ;2	3,4	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	
Murexida	3+ ⁴ ;2	18,05	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	
Vermelho Neutro	2+ ² ;2	2,94	Pos ² ;2	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	0	Pos ³ ;2	Neg	0	Pos ³ ;2	
Amarelo poente	2+ ³ ;2	6,02	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	
Verde brilhante	1+ ¹ ;2	0,9	Pos ² ;2	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	
Verde Luz	2+ ¹ ;2	1,56	Neg	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	0	Neg	Neg	0	Neg	

*: EC= amostra concentrada de escarro; IC = isolado clínico de *M. tuberculosis*; S = Escore de Leitura baciloscópica de acordo com padronização do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008); Quando positiva, incluem dados referentes à avaliação subjetiva de Intensidade de coloração de bacilos: (1) delimitados, visíveis, mas muito claros; (2) claros; (3) regular; (4) boa; (5) ótima; (M) mudança de cor para (a) azul, (b) violeta, (c) verde, (d) amarelo, (e) laranja; e, Avaliação subjetiva de intensidade de brilho: (1) opaco; (2) fraco; (3) médio; (4) acentuado; IB = índice baciloscópico; SAA = solução álcool-ácida; AEV = alcaóide de espécie vegetal.

APÊNDICE 3 - Resultados de leitura pela microscopia tradicional e pela microscopia de fluorescência (filtros azul, verde e vermelho) de esfregaços de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*, corados por 12 diferentes soluções corantes às concentrações de 0,3%, 1% e 3%.

TIPO DE MICROSCOPIA	MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA*												
	MICROSCOPIA TRADICIONAL*			Filtro Azul			Filtro Verde			Filtro Vermelho			
	% da Solução	0,3	1	3	0,3	1	3	0,3	1	3	0,3	1	3
CORANTES SINTÉTICOS IDÊNTICOS AOS NATURAIS													
Alizarina	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Antraquinona	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Curcumina	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos ^{2;2}	Neg	Neg	Pos ^{3;3}	Pos ^{3;3}	Pos ^{3;3}	Pos ^{3;3}	Neg	Neg
Indigo Carmim	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Vermelho Natural	Neg	Pos ^{1;1}	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
AEV	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos ^{5;4}	Neg	Neg						
CORANTES SINTÉTICOS MENOS TÓXICOS QUE A FUCSINA													
Preto Brilhante	Neg	Pos ^{1Ma;2}	Pos ^{1Ma;1}	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Murexida	Neg	Pos ^{1Ma;1}	Pos ^{1Ma;1}	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Vermelho Neutro	Pos ^{2;2}	Pos ^{2;2}	Pos ^{2;2}	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos ^{3;2}					
Amarelo Poente	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Verde Brilhante	Pos ^{1Ma;2}	Pos ^{1Ma;2}	Pos ^{1Ma;2}	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Verde Luz	Neg	Pos ^{1Ma;2}	Pos ^{1Ma;2}	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

% = concentração da solução; AEV = alcalóide de espécie vegetal; *: Pos = Positiva. Neg = Negativa. Se positivo, contém dados referentes à Avaliação subjetiva de Intensidade de coloração de bacilos = (1) delimitados, visíveis, mas muito claros; (2) claros; (3) regular; (4) boa; (5) ótima; (M) mudança de cor para (a) azul, (b) violeta, (c) verde, (d) amarelo, (e) laranja, e à Avaliação subjetiva de intensidade de brilho = (1) opaco; (2) fraco; (3) médio; (4) acentuado.