
**BACILOSCOPIA PARA TUBERCULOSE PULMONAR. ESTUDO
MULTICÊNTRICO DO ESFREGAÇO PARA BACILOSCOPIA DE ESCARRO
NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR SEGUNDO A
ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE E O MINISTÉRIO DA SAÚDE**

Heloisa da Silveira Paro Pedro,¹ Susilene Maria Tonelli Nardi,^{1e2} Maria Izabel Pereira Ferreira,¹ Maria do Rosário Assad Goloni,¹ Regina Ruivo Ferro e Silva,³ Dalva Cristina Girello Aily,⁴ Andréa Gobetti Vieira Coelho,⁵ Andréa R. Leite,⁶ Leonilda Chiari Galle,⁷ Maria de Lourdes M. Shikama,⁸ Cacilda Rosa Cardoso da Silva⁹ e Suely Yoko Mizuka Ueki¹⁰

RESUMO

A baciloscopia de escarro no diagnóstico da tuberculose pulmonar foi padronizada pela OMS quanto à preparação, coloração e leitura do esfregaço. O Ministério da Saúde (MS) adota esta padronização na coloração e leitura, mas o esfregaço é realizado na forma estendida em 2/3 da lâmina, diferentemente do formato elíptico da OMS. O objetivo deste trabalho foi comparar os dois tipos de esfregaços, avaliando sensibilidade/especificidade, tempo gasto na preparação e leitura e questões de biossegurança. Participaram do estudo oito laboratórios regionais do Instituto Adolfo Lutz. Durante três meses, foram preparadas duas lâminas com 356 amostras de escarro, uma segundo a OMS e outra de acordo com o MS. A leitura foi realizada pela contagem semiquantitativa em cruces, conforme o índice baciloscópico recomendado pelo MS/OMS. A sensibilidade no esfregaço elíptico foi de 97,0%, especificidade 97,5%, acurácia 97,2% e erro 2,8%. A concordância dos resultados de leitura em cruces foi de: 80,7% nos raros BAAR; 83,7% nos 1+; 89,8% nos 2+; 90,9% nos 3+ e 97,5% nos negativos (Kappa=0,87 valor-p<0,001). A confecção (valor-p=0,03) e a leitura do esfregaço (valor-p=0,01) mostraram-se mais rápidas pelo método da OMS e também mais apropriadas em relação à biossegurança. Este estudo demonstrou a viabilidade de se adotar no Brasil o esfregaço padronizado mundialmente pela OMS.

DESCRITORES: Diagnóstico. Tuberculose. Serviços de Saúde. Organização Mundial de Saúde.

INTRODUÇÃO

A baciloscopia de escarro é o método preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o diagnóstico da tuberculose pulmonar (TB),

1 Centro de Laboratórios Regionais(CLR), Instituto Adolfo Lutz (IAL), São José do Rio Preto, SP.

2 Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru-SP.

3 IAL Santo André; 4 IAL Rio Claro; 5 IAL Santos; 6 IAL Taubaté; 7 IAL Presidente Prudente; 8 IAL Sorocaba; 9 IAL Ribeirão Preto; 10 IAL São Paulo.

por tratar-se de um exame direto da amostra, não invasivo ao paciente, rápido e econômico (3, 9, 15). No programa de controle da tuberculose, ela é um instrumento eficiente para identificar e distinguir o indivíduo bacilífero para que tenha prioridade no tratamento (6).

A OMS preconiza um método padronizado para as diversas etapas da baciloscopia de escarro: preparação do esfregaço, coloração e leitura da lâmina. A recomendação para a confecção do esfregaço é que tenha formato elíptico, cujo tamanho (10 a 20mm X 20 a 30mm) possa assegurar uma contagem de 100 a 150 campos microscópicos em objetiva de imersão (1, 3, 11, 15).

No Brasil, a padronização da OMS é observada na coloração e na leitura da lâmina, contudo o esfregaço é feito na forma estendida em 2/3 da lâmina, como é descrito no Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias do Ministério da Saúde (MS) (7).

A padronização dos métodos apresenta vantagens, como a obtenção de resultados comparáveis entre regiões e países e avaliação da qualidade dos exames, além de facilitar a capacitação de profissionais e a realização de supervisão dos serviços (4, 13).

A comparação das metodologias preconizadas pela OMS e pelo MS na confecção do esfregaço da baciloscopia de escarro poderá sustentar uma proposta futura de padronização, no Brasil, da técnica utilizada mundialmente para o diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar.

O objetivo deste estudo foi comparar o tipo de esfregaço adotado pelo Ministério da Saúde do Brasil com o preconizado pela OMS, visando avaliar a sensibilidade/especificidade das técnicas, o tempo utilizado para confecção e leitura dos esfregaços, além de questões de biossegurança na sua preparação e exposição até a secagem dentro da cabine de segurança biológica.

METODOLOGIA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz sob o nº 005/2010.

Trata-se de estudo multicêntrico com a participação de profissionais de oito laboratórios regionais do total de 13 (LACEN - São Paulo-SP e 12 regionais) que compõem a *Rede de Laboratórios do Instituto Adolfo Lutz*: São José do Rio Preto, Rio Claro, Taubaté, Santo André, Sorocaba, Santos, Ribeirão Preto e Presidente Prudente.

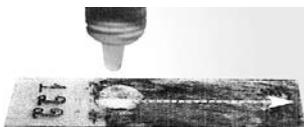
Os profissionais que foram selecionados para participar do estudo fazem parte da Rede de Laboratórios de Tuberculose do Instituto Adolfo Lutz, que é referência para o diagnóstico e controle de tratamento da doença no estado de São Paulo. Tais profissionais têm, em média, experiência de 10 anos de atuação na área de micobactérias e participam anualmente da *Avaliação Externa de Qualidade* (AEQ) com supervisão direta e indireta. Essas supervisões seguem as normas do

Sistema de Garantia da Qualidade (SGQ), segundo recomendações do Consenso Global que foi projetado para melhorar continuamente a confiabilidade e a eficácia dos serviços de laboratório (7). Este controle de qualidade vem sendo realizado anualmente nos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz.

A amostragem deste estudo constituiu-se de secreção pulmonar para o diagnóstico da tuberculose pulmonar, recebida pelos laboratórios participantes dos diversos serviços de saúde do município e região de sua área de abrangência. Durante o período de três meses, das amostras de escarro processadas em cada um dos oito laboratórios participantes, conforme a demanda de baciloscopias recebidas na rotina, aproximadamente 60% apresentaram resultado positivo e 40% negativo. As amostras foram processadas após conhecimento dos resultados das baciloscopias solicitadas.

Foram confeccionadas duas lâminas de cada amostra de escarro, sendo uma com esfregaço realizado de acordo com as normas da OMS e a outra, segundo o MS.

O esfregaço, segundo a técnica preconizada pelo Ministério da Saúde, foi confeccionado utilizando-se um aplicador de madeira e estendendo a amostra de escarro em aproximadamente 2/3 da lâmina, deixando 1/3 para a sua identificação. Realizou-se um esfregaço homogêneo, não muito fino, sem deixar espaços vazios, conforme se vê na Figura 1 (6, 7).



Fonte: Brasil, 2002.

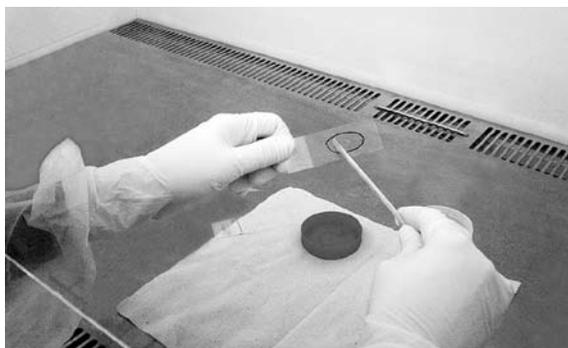
Figura 1. Esfregaço em 2/3 da lâmina, Ministério da Saúde.

O esfregaço, segundo a norma técnica da Organização Mundial da Saúde, foi confeccionado conforme descrito no manual da OMS: em formato elíptico e tamanho aproximado de 20x30mm. O escarro foi distribuído uniformemente na lâmina com auxílio de um aplicador de madeira, sendo fino o suficiente para se proceder a coloração e a leitura (3, 4, 15) (figuras 2, 3 e 4).

Para a padronização do esfregaço conforme a OMS, estabeleceu-se a utilização de um molde “vazado” de papel cartão, no formato elíptico (20X30mm), o qual foi utilizado para demarcar, com caneta para retroprojektor na parte inferior da lâmina, a área destinada à confecção do esfregaço (Figura 5).

O volume de escarro foi padronizado em aproximadamente 400µL em cada lâmina (OMS), de modo que fosse possível uma comparação adequada dos esfregaços realizados nos centros participantes do estudo.

Em ambas as técnicas, as amostras foram homogeneizadas previamente, dando-se preferência à partícula útil quando existente.



(Foto: Instituto Adolfo Lutz- São José do Rio Preto-SP).

Figura 2. Confeção do esfregaço elíptico (OMS).



Fonte: Fujiko, 2005.

Figura 3. Esquema com esfregaço elíptico 20x30mm.

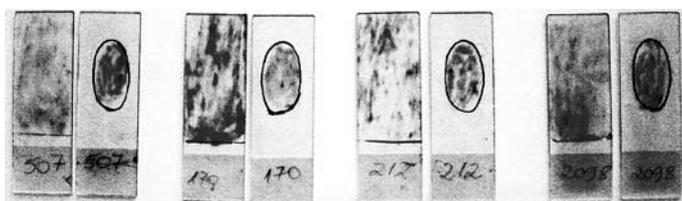


Foto: Instituto Adolfo Lutz- São José do Rio Preto-SP.

Figura 4. Lâminas confeccionadas no IAL- SJRP em formatos 2/3 e elíptico.

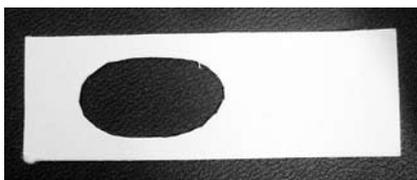


Foto: Instituto Adolfo Lutz- São José do Rio Preto-SP.

Figura 5. Molde em formato elíptico 20x30mm confeccionado em papel cartão.

Os esfregaços secaram em temperatura ambiente e foram fixados e corados pela técnica de Ziehl-Neelsen.

A pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), nos dois tipos de esfregaços, foi realizada com contagem semiquantitativa em cruces: negativo (não encontrado BAAR em 100 campos observados), raros (1 a 9 BAAR em 100 campos), 1+ (menos de 1 BAAR/campo em 100 campos), 2+ (1-10 BAAR/campo em 50 campos) e 3+ (mais de 10 BAAR/campo em 20 campos), conforme o recomendado pela OMS (7, 15).

A padronização foi realizada em um estudo piloto com um lote de 20 lâminas no Instituto Adolfo Lutz-Laboratório Regional de São José do Rio Preto. Esta amostragem não foi incluída na pesquisa.

Com o objetivo de comparar os dois métodos de confecção dos esfregaços para a baciloscopia de escarro, foram avaliados os seguintes parâmetros:

- a) tempo de confecção por esfregaço, contabilizado por *timer* e o resultado transcrito em minutos e segundos;
- b) tempo de leitura por esfregaço, contabilizado por *timer* e o resultado transcrito em minutos e segundos;
- c) resultado negativo e positivo em cruces.

Para a transformação dos segundos em minutos, aplicou-se a seguinte fórmula no programa Excel: $\text{INT}(\text{Valor}) + ((\text{Valor} - \text{INT}(\text{Valor})) / 0,6)$, ou seja, no caso de existência do valor inteiro para minutos, este foi mantido e somado ao valor após a vírgula (que estava em segundos) após ter sido multiplicado por 0,60.

A média do tempo gasto, o desvio padrão e a diferença dos dois métodos para confecção e leitura dos esfregaços foram obtidos utilizando-se o Teste-t pareado no programa estatístico Epi Info versão 3.5.1.

A análise de concordância entre métodos foi realizada pelo teste de Kappa de acordo com o proposto por Landis & Koch (5). Os resultados foram avaliados no programa estatístico Bioestat 5.0. Considerou-se significativo o valor- $p < 0,05$.

RESULTADOS

Foram processadas neste estudo 356 amostras de escarro e confeccionados 356 esfregaços de acordo com a metodologia da OMS e 356 segundo o MS, totalizando 712 esfregaços. As tabelas 1, 2 e 3 mostram os resultados obtidos.

A comparação dos valores médios de tempo em minutos de confecção e leitura dos esfregaços está demonstrada na Tabela 3, tendo sido estas duas atividades realizadas em tempo menor pela técnica da OMS.

Considerando a técnica de preparação dos esfregaços segundo o MS como padrão ouro, a sensibilidade da baciloscopia, segundo a OMS, foi de 97,0% (IC95%: 94,0% – 98,5%), a especificidade de 97,5% (IC95%: 93,0% – 99,2%), a acurácia de 97,2% (IC95%: 94,9% – 98,6%) e o erro de 2,8% (IC95%: 1,4% – 5,1%).

A concordância dos resultados de leitura em cruces encontrada foi: 80,7% nos resultados com raros BAAR; 83,7% com 1+; 89,8% com 2+; 90,9% com 3+ e 97,5% nos negativos (Kappa=0,87 valor-p<0,001).

Sob análise percentual, do total de 356 amostras avaliadas, a confecção do esfregaço foi mais rápida pelo método da OMS em 217 (61%) e pelo método do MS em 112 (31,5%); em 27 (7,6%), o tempo para confecção foi igual nas duas metodologias.

A leitura foi mais rápida pelo método da OMS em 181 (50,8%) esfregaços e pelo método do MS em 134 (37,6%). Em 41 (11,6%), o tempo para leitura foi igual nas duas metodologias.

Tabela 1. Resultados das baciloscopias com esfregaços segundo a OMS e o MS e leitura em escala semiquantitativa em cruces

Resultado	MS					Total Geral
	negativo	raros	1+	2+	3+	
OMS						
negativo	119	5	2			126
raros	1	46	4			51
1+	2	6	62	2		72
2+			6	53	4	63
3+				4	40	44
Total Geral	122	57	74	59	44	356

Kappa = 0,87; p<0,001. **Nota: Legendas:** **MS:** Ministério da Saúde. **OMS:** Organização Mundial da Saúde. **negativo** (não encontrado BAAR em 100 campos observados). **raros** (1 a 9 BAAR em 100 campos). **1+** (menos de 1 BAAR/campo em 100 campos). **2+** (1-10 BAAR/campo em 50 campos). **3+** (mais de 10 BAAR/campo em 20 campos)

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade das baciloscopias segundo esfregaços realizados pelos métodos da OMS e do MS

Resultado	MS		Total
	LP	LN	
OMS			
LP	227	3	230
LN	7	119	126
Total	234	122	356

Kappa = 0,94; p<0,001. **Notas: Legendas:** **MS:** Ministério da Saúde. **OMS:** Organização Mundial da Saúde. **LP:** lâmina positiva (raros BAAR, 1+, 2+, 3+). **LN:** lâmina negativa (não encontrado BAAR em 100 campos)

Tabela 3. Comparação dos valores médios de tempo em minutos para confecção e leitura dos esfregaços de acordo com as técnicas da OMS e do MS

	OMS	MS
CONFECÇÃO	1,12 (dp 0,78)	1,34 (dp 1,10)
Intervalo de confiança (95%)	0,99 – 1,24	1,18 – 1,50
Diferença	0,22 (dp 0,68)*	
	Valor-p=0,03 (T-test)	
LEITURA	6,38 (dp 3,68)	6,64 (dp 3,45)
Intervalo de confiança (95%)	5,67 – 7,10	5,94 – 7,34
Diferença	0,25 (dp 2,02)*	
	Valor-p=0,01 (T-test)	

Notas: * em favor da OMS. **Legendas:** MS: Ministério da Saúde. OMS: Organização Mundial da Saúde. dp: desvio padrão

DISCUSSÃO

A baciloscopia de escarro pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN), embora seja uma técnica de baixa sensibilidade, é ainda o método mais utilizado mundialmente para o diagnóstico da tuberculose. Sua importância baseia-se na capacidade de identificar e distinguir os casos com prioridade de tratamento no programa de controle da doença (8) principalmente em países de recursos limitados (1, 10). Segundo a Organização Panamericana de Saúde (9), a baciloscopia é a técnica mais apropriada para ser utilizada em todos os laboratórios da América Latina por ser recomendada pela OMS, por assegurar resultados reprodutíveis, por ser mais econômica e realizada em laboratórios de baixa complexidade.

Toman (12) afirma que os valores de sensibilidade e especificidade devem se apresentar num intervalo entre 95% e 100% para que o método seja considerado aceitável. Neste estudo, a acurácia entre os métodos foi de 97,2%, maior que os 93% descritos por Toman, cujo estudo comparou a concordância de resultados de baciloscopia entre diferentes microscopistas (2).

De acordo com Frieden (2), a acurácia é importante quando o diagnóstico da tuberculose pulmonar for baseado somente na baciloscopia. Os resultados negativos e 3+ nos dois métodos tiveram uma concordância elevada, 97,5% e 90,9% respectivamente; resultados maiores que os descritos por Vieira (14), que encontrou 92% de concordância em resultados negativos, e os de Toman – 75% nos negativos e 68% nos de 3+ (2).

As discordâncias em relação às lâminas positivas e negativas corroboram os resultados encontrados por Toman (2). O autor argumenta que discordâncias no caso de lâminas negativas com raros BAAR, 1+ e mesmo discordâncias de resultados em cruces podem ocorrer por causa da deficiência na preparação, coloração ou leitura do esfregaço. A própria seleção da partícula útil é essencial

para a preparação do esfregaço e deve receber especial atenção durante o preparo; também lâminas insuficientemente fixadas podem perder parte do material durante o processo de lavagem. As discrepâncias de resultados são mais frequentes pelas deficiências do material e preparo do esfregaço do que por erros de leitura.

O fato de o esfregaço da OMS ser menor que os 2/3 da lâmina propugnados pelo MS não interferiu na sensibilidade da baciloscopia (detecção de BAAR em objetiva de imersão), uma vez que um esfregaço de 10x20mm corresponde a aproximadamente 100 campos microscópicos e, nessa avaliação, o esfregaço sugerido foi maior, com aproximadamente 20x30mm, mas obedecendo ao formato elíptico, que foi o objeto do nosso estudo (3, 11).

Considerando o total de amostras avaliadas, o tempo gasto para confecção e leitura foi menor pelo método preconizado pela OMS.

A habilidade com uma nova técnica laboratorial adquire-se com o tempo e não imediatamente à sua implantação. Portanto, mesmo considerando que os técnicos apresentavam maior habilidade com o método do MS do que com o método da OMS, este apresentou maior rapidez no tempo médio de confecção e leitura dos esfregaços. Acredita-se que, com a adoção da metodologia na rotina laboratorial e com a prática, esse tempo poderá reduzir ainda mais.

Com relação à biossegurança, a técnica da OMS mostrou-se mais apropriada, pois com o esfregaço elíptico o escarro não atinge as bordas da lâmina diminuindo o risco de contaminação do técnico que a manipula em todas as etapas subsequentes à sua confecção (fixação, coloração e leitura). Além disso, o tempo de confecção do esfregaço é menor e a secagem é mais rápida; conseqüentemente, diminui a geração de aerossóis dentro da cabine de segurança biológica, minimizando o risco de contaminação.

CONCLUSÃO

O método preconizado pela OMS foi mais rápido no que diz respeito à confecção e à leitura da lâmina e mais apropriado em relação à biossegurança.

Os percentuais encontrados de sensibilidade e especificidade da baciloscopia foram de 97% e 97,5%, respectivamente, considerados dentro do intervalo aceitável pela literatura, o que sugere a possibilidade de adoção do método da OMS no Brasil.

Estratégias para facilitar a realização das baciloscopias e a melhoria da qualidade técnica dos laboratórios que as realizam precisam ser adotadas e a padronização do método é altamente recomendável.

Este estudo demonstra a viabilidade da substituição da técnica de baciloscopia atualmente utilizada em nosso país por técnica recomendada e utilizada mundialmente e sugere que o programa de controle da tuberculose no Brasil deveria rever as recomendações estabelecidas pela OMS.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as sugestões e o apoio das pesquisadoras do Instituto Adolfo Lutz Daisy Nakamura Sato, Maria Alice da Silva Telles e Maria Conceição Martins durante a realização deste trabalho e à bibliotecária Rosângela Kavanami, pela revisão das referências bibliográficas.

ABSTRACT

Bacilloscopy for pulmonary tuberculosis. Multicenter study of bacilloscopy sputum smears in the diagnosis of pulmonary tuberculosis according to the World Health Organization and Brazilian Ministry of Health

In the diagnosis of pulmonary tuberculosis, sputum bacilloscopy was standardized by the WHO for slide preparation, staining, and reading the smear. The Brazilian Ministry of Health adopted this standardization for staining and reading, but the smear was extended to 2/3 of the slide, different to the elliptical format recommended by the WHO. This study aimed at comparing the two smear techniques by evaluating the sensitivity and specificity, preparation and reading times, and biosafety issues. Eight regional laboratories of the Adolfo Lutz Institute participated. Over three months, slides were prepared for 356 sputum samples using the two techniques. Reading of slides employed semi-quantitative counts using bacilloscopy index scale as recommended by the WHO and Brazilian Ministry of Health. The sensitivity of the elliptical smear was 97.0%, specificity 97.5%, accuracy 97.2%, and error 2.8%. Agreement of classification according to the scale was: 80.7% for rare BAAR, 83.7% for 1+, 89.8% for 2+, 90.9% for 3+ and 97.5% for negative cases (Kappa=0.87 $p < 0.001$). Preparing ($p = 0.03$) and reading ($p = 0.01$) the smear were faster by the WHO method and better in relation to biosafety. This study demonstrated the viability of adopting the smear technique standardized throughout the world by the WHO.

KEY WORDS: Diagnosis. Tuberculosis. Health Services. World Health Organization.

REFERÊNCIAS

1. Dhingra VK, Aggarwal N, Rajpal S, Aggarwal JK, Gaur SN. Validity and reliability of sputum smear examination as diagnostic and screening test for tuberculosis. *Indian J Allergy Asthma Immunol* 17: 67-69, 2003.
2. Frieden T. *Toman's Tuberculosis: case detection, treatment, and monitoring – questions and answers*. 2nd ed. World Health Organization, Geneva, 2004.
3. Fujiki A. *AFB Microscopy Training*. The Research Institute of Tuberculosis. Tokyo, 2005.
4. Kantor IN, Kim SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Norval P-Y, Rieder H, Valenzuela P, Weyer K. *Laboratory services in tuberculosis control*. World Health Organization, Geneva, 1998.
5. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174, 1977.

6. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas da Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Manual técnico para o controle da tuberculose*. Cadernos de Atenção Básica n. 6. Ministério da Saúde, Brasília, 2002.
7. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual Nacional de Vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde, Brasília, 2008.
8. Naganathan N, Ganapathy KT, Rajalakshmi R. Evaluation of sputum smears prepared by different methods. *Indian J Med Res* 69: 893-900, 1979.
9. Organización Panamericana de la Salud. *Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis*. Normas y guía técnica, parte 1: baciloscopia. OPS, Washington, 2008.
10. Ridderhof JC, Van Deun A, Kam KM, Narayanan PR, Aziz MA. Roles of laboratories and laboratory systems in effective tuberculosis programmes. *Bull World Health Organ* 85: 354-359, 2007.
11. Rieder HL, Van Deun A, Kam KM, Kim SJ, Chonde TM, Trébuçq A, Urbanczik R. *Priorities for tuberculosis bacteriology services in low-income countries*. 2nd ed. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Paris, 2007.
12. Toman K. Sensitivity, specificity and predictive value of diagnostic tests. *Bull Int Union Tuberc* 56: 19-30, 1981.
13. Van VA, Fitzgerald D, Kabuya G, Deun AV, Tabala M, Jarret N, Behets F, Bahati E. Sputum smear microscopy: evaluation of impact of training, microscope distribution, and use of external quality assessment guidelines for resource-poor settings. *J Clin Microbiol* 43: 913-915, 2005.
14. Vieira FD, Salem JI, Ruffino-Neto A, Camargo AS, Ferro e Silva RR, Moura LCC, Vilaça MJ, Silva JV. Metodologia para caracterização de proficiência em leitura de resultados baciloscópicos para o diagnóstico da tuberculose. *J Bras Pneumol* 34: 304-311, 2008.
15. World Health Organization. *Global Tuberculosis Programme*. WHO laboratory services in tuberculosis control, part II: microscopy. WHO, Geneva, 1998.