



Como realizar un esfregaço cutâneo para a lepra

ILEP Guia de aprendizagem no 3

O que é um esfregaço cutâneo?

Um esfregaço de pele é um teste com base numa amostra de material tirado ao nível de uma pequena incisão feita na pele; esta amostra é em seguida corada para a pesquisa de *M. Leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente.

Porquê fazer um esfregaço cutâneo?

- Para confirmar um diagnóstico de Lepra multibacilar num suspeito.
- Para ajudar a diagnosticar uma recaída num doente multibacilar anteriormente tratado.
- Para ajudar a classificar casos novos.



Quem pode fazer um esfregaço cutâneo?

Toda a pessoa que for treinada e autorizada a fazer esfregaços cutâneos.

Atenção: A feitura de um esfregaço cutâneo é um procedimento invasivo. Lave as mãos, ponha luvas e use material esterilizado assim como uma lâmina de bisturi para cada paciente. Não fazer colheita sem necessidade absoluta.

Autores principais: Dr Guido Groenen e Dr Paul Sanderson pela ILEP Comissão Médico-Social.

Tradução e adaptação: Dr Alcino Ndeve(AIFO/ Moçambique)

Ilustrações: Brent Hawkins, a partir de originais de Sandy Patience

Foto créditos: Ida Baarsen 1i.iv; GLRA 1ii; TLMI 1iii; Geoff Crawford 2; Linda Lehman 3;WHO/TDR 5I,II.

Federação internacional das Associações contra a Lepra (ilep@ilep.org.uk) e

Associação Italiana Amici di Raoul Follereau (info@aifo.it)

Preparação do esfregaço

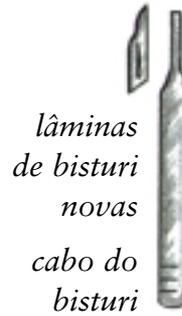
Material necessário para a colheita



luvas



algodão
e álcool



lâminas
de bisturi
novas
cabo do
bisturi



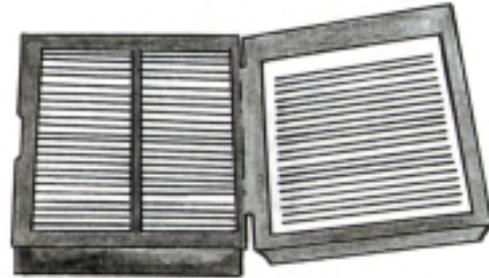
penso do ferida



recipiente
apropriado
para lâminas
usadas



lâmparina de
álcool



caixa de lâminas lâminas de microscópio novas

Coloque todo o material que vai precisar numa mesa limpa.

Vai precisar também de um lápis de diamante para lâminas e de uma requisição para o pedido da análise ao laboratório.



Explique ao paciente

Peça ao paciente para se sentar e ficar relaxado. Explique o que quer fazer e qual a razão da colheita. Responda às perguntas que o paciente fizer e peça autorização para a colheita. Complete os dados na requisição.

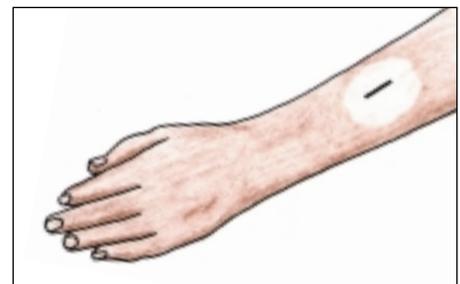
Selecione os sítios

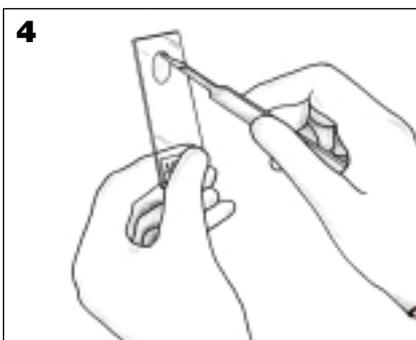
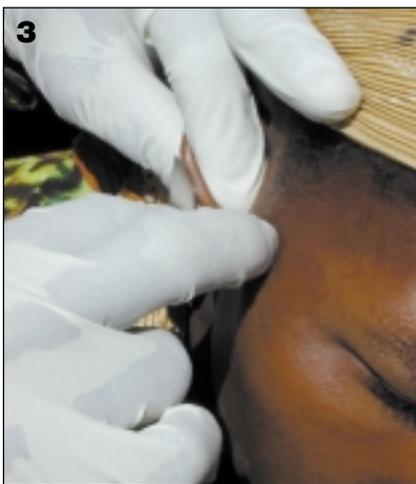
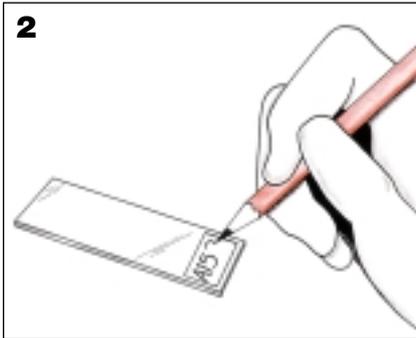
Só dois locais serão selecionados para o esfregaço:

1. O lóbulo da orelha.
2. uma lesão – Selecione a lesão que lhe parece mais activa, mas não situada na face. “Activa” significa elevada e avermelhada. Faça o esfregaço na parte mais activa da lesão (geralmente nos bordos).

Se não houver lesão cutânea característica, faça o segundo esfregaço no outro lóbulo da orelha ou num sítio onde existiram anteriormente lesões activas, ou onde foi feito anteriormente um esfregaço positivo.

Muitos programas têm a rotina de fazer esfregaços em quatro ou mesmo seis sítios, mas dois sítios são actualmente considerados adequados na maior parte dos casos.





Como fazer um esfregaço cutâneo?

- Lave as mãos (**1**) e calce as luvas.
- Pegue numa lâmina de microscópio limpa, nova, sem riscos. Com um lápis de diamante, escreva na extremidade da lâmina (**2**) a identificação do doente (ID). Este número deve estar também na ficha da requisição do laboratório.
- Desinfecte os sítios da pele com algodão embebido em álcool. Deixe secar.
- Acenda a lamparina de álcool.
- Coloque uma lâmina nova no cabo do bisturi. Se tiver de colocar o bisturi em qualquer local, faça-o de modo que a lâmina não toque em nada.
- Aperte firmemente a pele entre os dedos indicador e polegar; mantenha a pressão para afastar o sangue e diminuir a dor.
- Faça uma incisão na pele, com cerca de 5mm de comprimento e 2mm de profundidade (**3**). Mantenha os dedos apertados, para evitar o sangramento. Em caso de sangramento, limpe o sangue com algodão seco.
- Vire o bisturi 90° e ponha-o no angulo correcto em relação à incisão. Raspe dentro do corte uma ou duas vezes com o lado da lâmina, afim de recolher o líquido dérmico. A amostra não deve conter sangue, porque este pode alterar a coloração e a leitura da lâmina.
- Deixe de apertar a pele e estanque o sangramento com uma bola de algodão seco.
- Espalhe o material colhido fazendo movimentos circulares e uniformes numa área de cerca de 5 a 8 mm de diâmetro. Comece o esfregaço do lado onde colocou o número (ID).(**4**).
- Limpe o bisturi com algodão embebido em álcool. Passe a lâmina de bisturi pela chama, durante 3 a 4 segundos. Deixe arrefecer sem tocar em nada.
- Repita a mesma coisa em relação ao segundo sítio onde irá fazer o esfregaço. Faça o esfregaço próximo do primeiro, mas não toque nele.
- Deite fora a lâmina de bisturi, mas em local apropriado.
- Faça o penso da ferida e agradeça ao doente.
- Deixe a lâmina secar durante 15 minutos à temperatura ambiente, mas sem a luz directa do sol.
- Fixe o esfregaço, fazendo passar 3 vezes a lâmina pela chama (**5**). Não aquecer demasiado. A lâmina não deve estar tão quente a ponto de não se poder tocar.
- Ponha a lâmina numa caixa de lâminas e mande para o laboratório, juntamente com a requisição apropriada.

Como corar um esfregaço cutâneo

Core os esfregaços usando o método quente de Ziehl-Neelsen que vem descrito a seguir. Core com carbol-fucsina, que cora tudo a vermelho. Lave depois o esfregaço com 1% de álcool-ácido, que vai remover tudo do esfregaço excepto o *M. Leprae*. Core de novo a lâmina de vidro com azul de metileno a 2%. O bacilo da Lepra será visualizado como varetas vermelhas, (bastonetes) num fundo azul.

Material e reagentes necessários para a coloração

Tenha três frascos, contendo cada um deles o seguinte:

Solução de carbol-fucsina a 1%

Álcool-ácido a 1%

Solução de azul de metileno a 0,2%

Lamparina de álcool

Relógio (cronómetro)

Tabuleiro para coloração

Pipeta plástica de Pasteur de 3ml

2 varetas de coloração

Caixa para lâminas de vidro

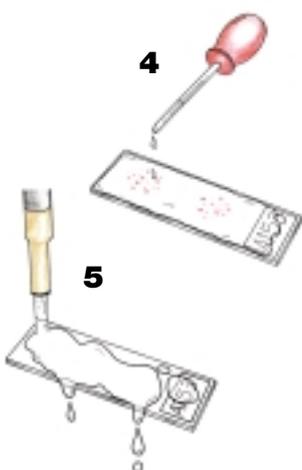
Papel de feltro

Luvas (um par)

- Registe a lâmina no registo do laboratório.
- Ponha a lâmina no suporte de coloração com a face do esfregaço virada para cima. Mais do que 10 lâminas podem ser coradas ao mesmo tempo. Faça os possíveis para que as lâminas não toquem umas nas outras.

Técnica de coloração pelo método de Ziehl-Neelsen

- Colocar as lâminas sobre um suporte.
- Cobrir na totalidade as lâminas com carbol-fucsina previamente filtrada N.B. É sempre bom filtrar a solução de carbol-fucsina, com papel de filtro directamente por cima da lâmina (1).
- Aquecer lentamente as lâminas até à formação de vapores, com a ajuda de uma bola de algodão embebida em álcool e inflamada, ou lamparina de álcool (2). Repita isto 3 vezes, durante um período de 5 minutos. Evite que a fucsina ferva. Se a fucsina secar, acrescente mais reagente e aqueça novamente. Deixar arrefecer durante 5 a 7 minutos.
- Lavar as lâminas (uma de cada vez) com água corrente (3) até que o excesso de corante seja removido. N.B.- Os esfregaços têm que ficar sempre bem corados.



Descoloração

- Cobrir as lâminas com ácido sulfúrico a 5%, durante 20 segundos, para descorar. Atenção: A descoloração é o momento crítico da técnica, pelo que se recomenda processar uma lâmina de cada vez, seguindo as seguintes recomendações:
- Lavar imediatamente com água corrente (5).
- Se o esfregaço se apresenta ainda muito vermelho e liberta ainda o corante, repetir a descoloração por um período de 10 segundos com a mesma técnica, até o esfregaço ficar de cor rosa-pálido.
- Se mesmo assim não descorar totalmente, repetir a descoloração várias vezes por tempos curtos, em vez de prolongar o tempo de descoloração.

Contra-coloração

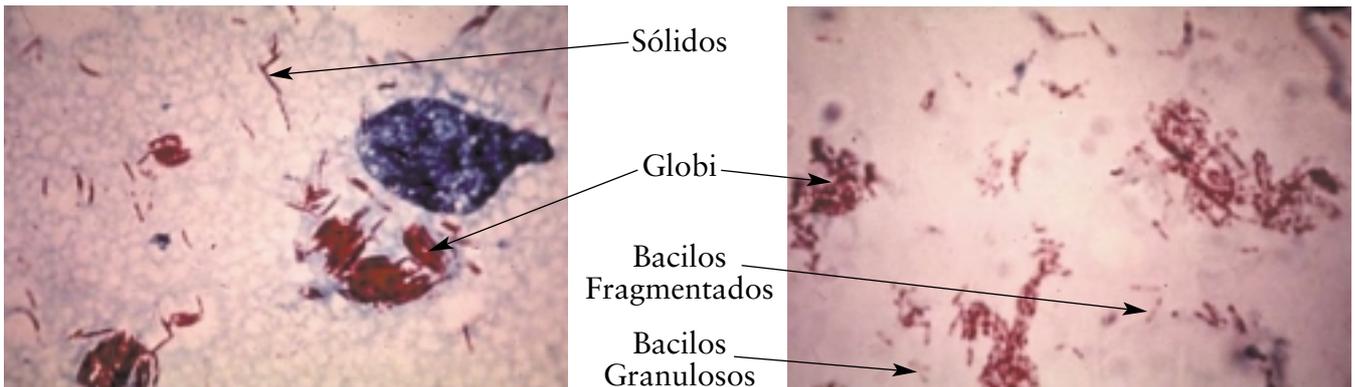
- Cobrir as lâminas com azul de metileno a 0,3%, durante 1 a 3 minutos (6).
- Lavar com água corrente e deixar secar ao ar livres no suporte de lâminas (7).
- A lâmina está pronta para ser lida. Se não puder lê-la, guarde numa caixa de lâminas (8).



Como ler un esfregaço cutâneo

Você precisa de um microscópio com as oculares 10x e objectivas 10x e 100x. Comece o exame usando a lente objectiva 10x.

- Coloque a lâmina sobre o microscópio e o número de identificação à esquerda
- Foque a imagem, usando a objectiva de 10x.
- Ponha uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço.
- Mude para a objectiva de 100x. Esta tocará o óleo de imersão. (se necessário regule o parafuso macrométrico de forma que a objectiva de 100 x toque o óleo de imersão).
- Abra completamente o diafragma e coloque o condensador na sua posição mais elevada.
- Foque correctamente o microscópio, usando o parafuso micrométrico.



Proucure os bacilos álcool-ácido resistentes. Eles aparecem sob a forma de bastonetes num fundo azul. Eles podem ser rectos ou ligeiramente curvos e a cor vermelha pode estar distribuída igualmente (bacilos sólidos) ou de forma desigual (bacilos fragmentados ou granulosos). Os bacilos em forma de cachos são chamados de “globi”. Os bacilos sólidos sugerem a presença de microorganismos viáveis e podem ser vistos nos casos novos, ainda não tratados ou nas recidivas.

Depois de ter examinado o primeiro campo, vá para o campo seguinte. Examine cerca de 100 campos por esfregaço.

- Se bacilos álcool-ácidos forem encontrados, quantifique a carga bacilar de acordo com com a seguinte escala logarítmica de RIDLEY para obter o índice bacteriológico (IB). Calcule em separado o IB para cada esfregaço.
- Escreva o resultado dos dois esfregaços na folha de registo do laboratório.
- Mergulhe a lâmina em xilol. Não raspe a lâmina.
- Guarde a lâmina numa caixa de lâminas para um futuro controle de qualidade.
- As lâminas que não forem guardadas para o controle de qualidade, serão deinfectadas, fervidas e lavadas para serem usadas de novo em exames de rotina (análises de fezes e urina, por exemplo). As lâminas não devem ser de novo usadas para esfregaços cutâneos ou para exames de expectoração para pesquisas de bacilos de Koch (BK).
- Dê o resultado ao clínico que solicitou o esfregaço de pele.

	Índice bacteriológico (IB)
0	nenhum bacilo em 100 campos
1+	de 0,01 até 0,09
2+	de 0,10 até 0,99
3+	de 1 até 9,9
4+	de 10 até 99,9
5+	de 100 até 000,9
6+	1000 ou mais

Nota: Lembre-se que é preciso observar sempre um mínimo de 25 campos nos esfregaços com muitos bacilos. Fazer a soma de todos os bacilos encontrados nos vários campos observados e dividir o número de bacilos encontrados pelo número de campos observados. O resultado dá o valor a procurar na escala de RIDLEY, correspondendo ao índice bacteriológico (I.B.) Se houver poucos bacilos, procurar num total de 100 campos.

N.B. Se o valor da média encontrado não chega a 1 (ex:0,87), voltar a contar até 100 campos.

Preparação dos reagentes

Material e reagentes necessários: Material necessário para prepara os reagentes:

<i>Pó de fucsina básica</i>	<i>Água destilada</i>
<i>Álcool etílico a 95% *</i>	<i>Proveta de 1000ml</i>
<i>Cristais de fenol</i>	<i>Pipeta de 10 ml</i>
<i>Ácido sulfúrico concentrado</i>	<i>Três frascos castanhos de 1L</i>
<i>Pó de azul de metileno</i>	<i>Balança</i>

**Se não houver Álcool metílico poderá ser usado álcool desnaturado*

Solução de Carbol-fucsina

Solução “A” ou solução STOCK (a ser preparada a nível provincial): Carbol-fucsina 5gr e Álcool metílico 100ml; Adicione devagar os 5 gr de Carbol-fucsina a 100ml de Álcool metílico. Dissolva e rotule: “Solução A”

Solução “B” ou Fenol a 5%(a ser preparada a nível provincial): Fenol 50gr e Água destilada 950ml; Tome 50gr de Fenol e misture com 950ml de água destilada. Misture bem e rotule: “Solução B”

Atenção: O Fenol é um produto químico altamente corrosivo e tóxico. Deve-se manipular com muito cuidado e, para evitar algum derramamento corrosivo na balança, deve-se remover o copo cada vez que se adicionar ou substituir o produto.

Solução de trabalho Para se preparar a solução de trabalho de Carbol-fucsina procede-se da seguinte forma: Tomar 10ml da : “Solução A” e 90ml da : “Solução B” e misture bem.

Outra forma de preparar a solução de Carbol-fucsina: Fucsina básica 5,0gr, Fenol cristais 25,0 gr, Etanol a 95% e Água destilada 500ml

Deitar a Fucsina num balão. Dissolver os cristais de Fenol mais ou menos 2000ml de água destilada. Juntar a Fucsina misturar tudo e pôr em banho Maria. Adicionar a restante Água destilada e depois o álcool.

Solução de descoloração

Ácido-Sulfúrico a 5%: Medir 5,0ml de Ácido-Sulfúrico concentrado e adicionar lentamente a 95ml de água destilada, misturar e rotular, ácido-Sulfúrico a 5%. Atenção: deitar sempre ácido sobre água.

Preparação de Ácido-sulfúrico a 5% a partir da solução de Ácido-sulfúrico a 20%, usada par BK: Ácido-sulfúrico a 20% 25ml, Água destilada 75ml

Solução de contraste

Azul de metileno a 0,3%: Azul de metileno 3gr e Água destilada 1000ml ; Dissolver e rotular (Azul de metileno a 0,3%)

Nota: Por cada preparação dos corantes é sempre bom testá-los, corando uma lâmina de uma amostra positiva com controle de qualidade do reagente. Nos rótulos dos reagentes deve constar a data da preparação. Conserve em frascos castanho-escuros.