COLORAÇÃO ZIEHL-NEELSEN

Finalidade:
Kit utilizado para realização da Coloração de Ziehl Neelsen em diversos materiais.

Registro ANVISA:
10097010-156

Apresentação:
620522- COLORACAO ZIEHL NEELSEN CONJ 3x100mL
620523 - COLORACAO ZIEHL NEELSEN CONJ 3x500mL
620475 - AZUL METILENO LOEFFLER – FR 500 mL
620513 - FUCSINA FENICADA ZIEHL -1% FR 500 mL

LB 170119
Rev. 12 – 11/2019

1. INTRODUÇÃO

A técnica de Ziehl-Neelsen foi desenvolvida por Franz Ziehl e posteriormente melhorada por Friedrich Neelsen, no final do século 19. Essa técnica de coloração é mais agressiva que a técnica de Gram, sendo usada em bactérias que são má coradas pela coloração de Gram, como por exemplo as bactérias do gênero *Mycobacterium* e *Nocardia*.
Existem bactérias que são resistentes à coloração, porém quando coradas, resistem fortemente à descoloração, mesmo quando submetidas a ácidos fortemente diluídos e ao álcool absoluto. Essas bactérias são denominadas de bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR).
A característica álcool-ácido-resistente é conferida a essas bactérias devido ao alto teor de lipídeos estruturais na parede celular, que causa uma grande hidrofobicidade, que dificulta a ação de corantes aquosos. Um exemplo de ácido graxo altamente presente na parede celular dessas bactérias é o ácido micólico.
Na técnica de Ziehl-Neelsen, após o processo de coloração da amostra, a fucsina de Ziehl irá corar todos os elementos celulares de vermelho, porém após a descoloração com o álcool, somente os bacilos álcool-ácidos-resistente irão continuar preservando a cor vermelha, os demais elementos celulares na amostra serão descorados. Então, para podermos visualizar os outros elementos celulares (descorados) na amostra, deve-se utilizar azul de metileno, que dará um contraste, deixando os elementos celulares em azul e os bacilos álcool-ácidos-resistentes continuarão em vermelho.
A pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em materiais clínicos pode constituir a primeira evidência de doença, permitindo assim o início de um tratamento, enquanto aguarda-se o resultado de cultura. O método de Ziehl-Neelsen se executado corretamente, desde a coleta e processamento da amostra até a baciloscopia, permite uma eficácia diagnóstica em 80% dos casos, e por esta razão não deve ser usado como único meio de diagnóstico laboratorial para a tuberculose.
Usa-se a característica de álcool-ácido resistência para a identificação de organismos patológicos, entre eles o *Mycobacterium leprae*.

2. COMPOSIÇÃO

Formulação da Fucsina Fenicada-Ziehl*	Concentração/L
Solução de Fucsina Fenicada	90mL
Água Deionizada Q.S.P.	1000mL

Formulação do Descorante de Zihel*	Quantidade
Ácido Clorídrico	30mL
Etanol Q.S.P.	1000mL

Formulação do Azul Metileno-Loeffler*	Concentração/L
Etanol	200 mL
Azul de metileno	2,3g
Solução de Hidróxido de Sódio	200 mL
Água Q.S.P.	1000 mL

* A formulação pode ser ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho do produto.

3. AMOSTRA

a- Tipos de amostras
- A metodologia de coloração de Ziehl-Neelsen pode ser aplicada a uma infinidade de materiais clínicos, tais como escarro, urina, fezes, LCR etc. Usualmente a principal amostra utilizada é o escarro.
- O laboratório deve estabelecer critérios de coleta, rejeição e conservação das amostras, conforme sua política da qualidade.

b-Procedimento de coleta
Orientar o paciente a coletar o escarro pela manhã ao acordar, antes de escovar os dentes ou de fazer a higiene bucal. O material coletado deve conter a menor quantidade possível de saliva ou de outras secreções do trato aéreo superior.
A critério médico, pode-se coletar 3 amostras em diferentes dias, seguindo a indicação acima, e mantendo as amostras em geladeira até o encaminhamento ao laboratório.
Pode ser utilizada a inalação com soro fisiológico para ajudar na expectoração.

c- Armazenamento e estabilidadeda amostra
A amostra deve ser coletada em recipiente de boca larga e estéril, preferencialmente em frascos coletores plásticos descartáveis, e encaminhada ao laboratório com a maior rapidez possível. Manter o material em geladeira (2 a 8ºC) até o momento de seu processamento.

d-Precauções e cuidados especiais
- O escarro é um material infectante que pode transmitir uma série de doenças infectocontagiosas incluindo SIDA, devendo ser manipulado com extrema cautela;
- Ao final de sua manipulação, o material deverá ser descartado após sua autoclavação por 20 minutos a 1 atm de pressão, não devendo ser eliminado diretamente no meio ambiente;
- Após sua manipulação recomenda-se a assepsia das bancadas de trabalho que tiveram contato com o material.

4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO

a- Princípio
O material clínico fixado em uma lâmina nova (limpa e desengordurada) é submetido à ação da fucsina fenicada de Ziehl à quente. Nesta etapa todas as estruturas absorvem o corante. Em uma segunda etapa, a lâmina é submetida à ação do álcool-ácido, que descora todas as estruturas celulares, exceto os BAAR. Para facilitar a microscopia, faz-se uma coloração de fundo com azul de metileno Loeffler.

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

c- Precauções e cuidados especiais
- O produto é destinado apenas para o uso diagnóstico *in vitro*;
- Uso restrito por profissionais de análises clínicas;
- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso,

observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;
- Não inalar ou ingerir;
- Não utilizar produtocom sinais de contaminação, ressecamento ou com alterações de cor ou espessura;
- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;
- É comum aos corantes com o tempo formarem precipitados, neste caso, recomenda-se a filtração dos mesmos sempre que se perceber tal situação;
- Uso de lâminas arranhadas ou que tenham sido utilizadas anteriormente, podem simular bacilos pela deposição de corantes nas ranhuras;
- Descuido no aquecimento da Fucsina, permitindo que seque e cristalize no esfregaço;
- Descoramento insuficiente das lâminas pode deixar corados em vermelho outros bacilos, que assim confundem com o BAAR;
- Tempo de descoramento muito prolongado pode levar ao descoramento do BAAR;
- Evitar deixar os frascos abertos desnecessariamente, pois pode haver evaporação de solventes e consequente alteração na concentração dos componentes;
- Pelo fato de alguns corantes conterem ácido fênico (fenol) em sua formulação, deve-se evitar o contato acidental com pele e mucosas. O procedimento técnico deve ser executado em local dotado de boas condições de ventilação e exaustão, haja visto a volatilidade dos componentes. Não se recomenda a reutilização das embalagens usadas;
- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para “Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI® M29-A” para o manuseio seguro;
- Para acondicionamento e descarte do material usado, autoclavar a 121ºC por 20 minutos. Recomendamos o uso dos sacos Detrilab;
- Os procedimentos de manuseio referentes ao processamento e manuseio para o descarte deverá estar de acordo com a RDC 222, DE 28 DE MARÇO DE 2018 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

5. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)
- Alça bacteriológica;
- Bico de Bunsen;
- Lâminas para microscopia;
- Suporte para coloração;
- Óleo de imersão;
- Microscópio.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO
a- Preparar o esfregaço conforme procedimento estipulado pelo laboratório;
b- Colocar as lâminas em suporte apropriado, separadamente uma da outra;
c- Cobrir todo o esfregaço com a solução de fucsina fenicada de Ziehl-Neelsen, aquecer a lâmina durante 5 minutos, cuidando para que o líquido não entre em ebulição ou ainda que seque;
d- Retirar a lâmina do suporte e lavar rapidamente em água corrente sob baixa pressão;
e- Descorar os esfregaços usando a solução descorante, gotejando-a sobre a lâmina inclinada até que não remova mais corante;
f- Lavar a lâmina em água corrente sob baixa pressão.
g- Cobrir todo o esfregaço com azul de metileno Loeffler por 1 minuto;
h-Lavar em água corrente e deixar secar na posição vertical ao ar;
i- Levar ao microscópio e analisar usando a objetiva de imersão.

Observação
- O aquecimento excessivo do material durante a coloração pode apresentar precipitações na lâmina;
- Observar cuidadosamente a etapa de descoloração, pois qualquer excesso pode induzir à resultados falsamente negativos, e a insuficiênciaà resultados falsamente positivos;
- Não deixar secar o material durante o processo de coloração;
- Mesmo após a coloração, a lâmina com o material deve continuar sendo considerada como material infectante, pois os BAAR podem eventualmente se manter viáveis após o processo;
- Após a baciloscopia adotar medidas de assepsia do microscópio, como a limpeza da platina com álcool 70% e das objetivas com material apropriado;
- Descartar as lâminas conforme procedimento adotado para materiais contaminados.

7. RESULTADOS
Os BAAR (Bacilos Álcool-Ácido Resistentes) coram-se em vermelho contra um fundo azul, conforme tabela abaixo:

Estrutura	Resultado esperado
Micobactérias	Células finas em formato de bastão coradas em vermelho
Cocos gram positivo	Células esféricas coradas em azul
Bacilos gram negativo	Células em formato de bastão coradas em azul
Células Epiteliais	Tonalidade azulada
Coloração de Fundo	O fundo da lâmina apresenta-se límpido e isento de sujidades ou precipitados

O resultado deve obedecer ao seguinte critério:

Número de Bacilos	Informação
Nenhum	Não foram visualizados BAAR na amostra analisada
1 e 2 em todo esfregaço	Reportar no laudo e solicitar nova amostra
3 a 9 em todo o esfregaço	+
>= 10 em todo o esfregaço	++
1 ou mais por campo	+++

Observação
- Um exame baciloscópico negativo não exclui a possibilidade de doença. Este exame não substitui a cultura para BAAR.

8. LIMITAÇÕES DO MÉTODO
(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 36/2015)
Os resultados falsamente aumentados ou diminuídos, riscos associados à instabilidade, que poderiam levar a resultados errôneos, danos relacionados ao usuário, podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:
- Congelar algum dos componentes.
- Após abertos, os componentes tornam-se suscetíveis a contaminações químicas ou microbianas que podem inviabilizar sua utilização.
- Manter os frascos dos padrões sempre fechados de maneira a evitar alterações em concentrações.
- Os reagentes se destinam ao uso diagnóstico *in vitro*, não devendo ser ingeridos ou entrar em contato com a pele e mucosas;
- Utilização de reagente vencido, contaminado ou em condições inadequadas.
- Não aguardar para que os reagentes atinjam a temperatura ambiente no momento do uso.
- Erro na conservação dosreagentes.
- Deve-se evitar o uso de materiais que possam contaminar os reagentes.
- Interpretação equivocada de resultados.
- O tempo de coloração inferior ao recomendado pode levar a não coloração das estruturas a serem observadas, bem como a coloração por tempo superior pode levar a não descoloração em processos posteriores gerando resultados divergentes.
- O uso da solução descolorante em tempo superior ao preconizado pode levar a descoloração de estruturas que deveriam manter suas colorações visíveis gerando resultados imprecisos.
- Armazenamento ou transporte de amostra inadequado.

- Todas as amostras devem ser manipuladas com extrema cautela, pois podem veicular diversas doenças infectocontagiosas (hepatite, SIDA etc.).

9. CONTROLE DA QUALIDADE

- Materiais necessários

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

- Controle de qualidade recomendado:

Parâmetro	Resultado esperado
Mycobacterium tuberculosis ATCC® 25177	Bacilos finos com coloração vermelha
Escherichia coli ATCC® 25922	Bacilos com coloração azul
Staphylococcus aureus ATCC® 25923	Cocos com coloração azul
Aspecto Corantes	Fucsina Fenicada de Ziehl Nelseen: solução bordô escuro, livre de partículas visíveis. Descorante: solução ligeiramente salmão, livre de partículas visíveis. Azul de metileno Loeffler: Solução azul escura.

- Periodicidade

Testar a cada novo lote recebido ou em periodicidade estabelecida pelo próprio laboratório.

- Análise dos resultados

As cepas coradas pelo material devem apresentar características de coloração esperadas. Caso se constate algum problema ou diferença, os resultados de amostras clínicas não devem ser liberados até que as causas tenham sido apuradas devidamente e os problemas constatados sanados.

- Sensibilidade

Executando-se rigorosamente a técnica como descrito, a sensibilidade diagnóstica da mesma é de cerca de 80%;

A sensibilidade deste método é baixa, visualizando-se 1 BAAR por campo em aumento de 1000x, estima-se que a amostra contenha cerca de $5x10^5$ BAAR por mL.

10. GARANTIA DA QUALIDADE

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

- que o usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;
- que os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas;
- que os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza.

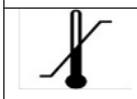
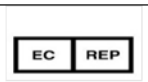
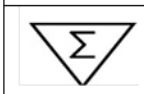
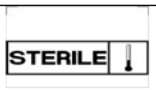
Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente conforme calendário estabelecido pela empresa até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser obtidos no site www.laborclin.com.br. Em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, entrar em contato com o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-410027 ou pelo e-mail sac@laborclin.com.br. Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

11. REFERÊNCIAS

1.BARON S, editor.; Medical Microbiology. 4th edition.; David N. McMurray.; Chapter 33 *Mycobacteria* and *Nocardia*; Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
2. DAVID, H. Bacteriology of the mycobacteriosis. US Public Health Serv. 76-8316. CDC, Atlanta-Ga, 1970.
3. EDWARDS, L.B. et al. Identification of mycobacterial infections. Bull. W.H.O. 33:405-412, 1965.
4.KENNETH James Ryan, C. George Ray, John C. Sherris. Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases, 4th ed, 2004.
5. KONEMAN, Elmer; *et al.* Diagnostic Microbiology. Lippincott, USA, 6 ed., 2009.
6.KRASNOW, I. & Waune, L.G. Comparison of methods for tuberculosis bacteriology. Apl. microbiology 18:915-917, 1969.
7.MACFADDIN, J. F. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical bacteria. Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1985.
8. MADDISON B. Application of stains in clinical microbiology. 2001.
9.MAHON, Connie, Manuselis, George Jr. Diagnostic Microbiology. Saunders, USA, 1995.
10. MARTIN Gengenbacher, and Stefan H. E. Kaufmann; Mycobacterium tuberculosis: Success through dormancy; FEMS Microbiol Rev. 2012.
11. MURRAY, P.R. *et al*. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed, American Society for Microbiology 1999.
12. OPLUSTIL, C. P. et al. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 3. ed. São Paulo, 2010.
13. RUNYON, E.H. et al. Manual of clinical microbiology, p.141-174, Washington DC, Am. Soc. Mic., 1974.
14. TRABULSI, L. R; et al. Microbiologia. 3ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda
CNPJ 76.619.113/0001-31
Insc. Estadual 1370012926
Rua Casimiro de Abreu, 521
Pinhais/PR CEP 83.321-210
Telefone 041 36619000
www.laborclin.com.br
Responsável Técnico:
Ana Lucia Monteiro – CRF/PR-5972
Serviço de Assessoria ao Cliente
SAC 0800-410027
sac@laborclin.com.br

ANEXO 1 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

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

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Segunda edição (28.07.2015)