

Artigo original

## Qualidade de amostras de escarro: análise comparativa da técnica de Gram e da contagem diferencial de células.

Sample quality of sputum: comparative analysis of the Gram and differential cell counting techniques.

Rosemeri Maurici da Silva<sup>1</sup>, Raida Ahmad Musa Mheisen Husein<sup>2</sup>, Maria Luiza Bazzo<sup>3</sup>, Mariana Chagas<sup>4</sup>.

### RESUMO

**Objetivo:** Estimar o grau de concordância entre a técnica de Gram e a contagem diferencial de células na avaliação da qualidade de amostras de escarro. **Metodologia:** Realizou-se um estudo prospectivo com delineamento transversal. Cada amostra foi avaliada pela técnica de Gram e pela contagem diferencial de células. Foi classificada como boa qualidade uma viabilidade celular maior que 40% e menos de 20% de células epiteliais, e pelo método de Gram as amostras com menor número de células epiteliais e maior número de leucócitos. **Resultados:** Avaliou-se consecutivamente 47 amostras de escarro. Através da contagem diferencial de células, 19 (40,4%) amostras foram de boa qualidade. A média de leucócitos absolutos foi de  $1,69 \times 10^6$  células/ml, de células viáveis foi de  $156,1 \times 10^6$  células/ml, e de células epiteliais foi de  $55,3 \times 10^6$  células/ml. Quando comparado o número absoluto de leucócitos com o número absoluto de células viáveis, o coeficiente de correlação de Pearson foi de 0,755. A correlação entre o número absoluto de células viáveis e o número absoluto de células epiteliais demonstrou um coeficiente de correlação de Pearson de -0,201. A qualidade das amostras de escarro avaliada pelo método de Gram demonstrou que 13 (27,7%) das amostras foram de boa qualidade. Não houve boa concordância quando comparados o método de Gram e a contagem diferencial de células (Kappa 0,35). **Conclusão:** A classificação das amostras de escarro pela técnica de Gram, com os critérios utilizados, não concorda com os resultados da contagem diferencial de células, não sendo adequada à sua substituição.

**Descritores:** Contagem diferencial de células, escarro, Gram.

### ABSTRACT

**Objective:** To estimate the level of agreement between the Gram technique and the differential cell count in the evaluation of the sputum sample quality. **Methodology:** A prospective cross sectional study was realized. Each sample was evaluated by the Gram and cell count techniques. Samples that presented cell viability higher than 40% and less than 20% of epithelial cells, and by the Gram method, less number of epithelial and higher number of leukocytes, were classified as good quality samples. **Results:** Forty seven consecutive sputum samples were evaluated. Through cell differentiation count, 19(40.4%) were good quality samples. The average of absolute leukocytes was  $1.69 \times 10^6$  cells/ml, and of epithelial cells,  $55,3 \times 10^6$  cells/ml. When compared the absolute number of leukocytes with the absolute number of viable cells, the Pearson correlation coefficient was 0.755. The correlations of the absolute number of viable cells and the absolute number of epithelial cells showed a negative Pearson correlation coefficient (-0.201). The quality of the sputum samples evaluated by the Gram technique demonstrated that 13 (27.7%) were good quality samples. There was poor agreement when the Gram and cell differentiation count techniques were compared (kappa 0.35). **Conclusion:** The classification of sputum samples as representative or not representative of the lower respiratory tract by the Gram staining technique, with the criteria considered and used here, not agree with the results obtained with the differential cells count. The Gram staining technique is not indicated to substitute the differential cells count to evaluate the sputum quality.

**Keywords:** Differential cells count, sputum, Gram staining.

1. Doutora em Medicina/Pneumologia. Professora do Curso de Medicina da Universidade do Sul de Santa Catarina (Unisul).

2. Acadêmica do Curso de Medicina da Universidade do Sul de Santa Catarina (Unisul).

3. Doutora em Microbiologia. Professora da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4. Bioquímica. Mestranda em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Trabalho realizado na Universidade do Sul de Santa Catarina (Unisul) e na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Não há conflito de interesse. Financiador da Pesquisa: Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica de Santa Catarina (FAPESC).

**Endereço para correspondência:** Rosemeri Maurici da Silva. Rua Moçambique, 852, Rio Vermelho, CEP 88060415, Florianópolis, SC, Brasil. Tel.: (48) 99822796; e-mail: rosemaurici@hotmail.com.

Recebido em 09/11/2008 e aceito em 10/01/2009, após revisão.

## INTRODUÇÃO

O escarro é material expectorado, proveniente do trato respiratório inferior, usualmente trazido pela tosse e eliminado pela boca. Ao transitar pela orofaringe e boca, entretanto, ele se mistura com secreções desses locais e também com os que são aspirados da nasofaringe.<sup>1</sup>

A contaminação do escarro representa um fator de significativa relevância no resultado dos achados microbiológicos referentes a este tipo de exame, por isso reduzir essa contaminação torna-se necessário.

O Gram do escarro é uma ferramenta microbiológica barata, rápida e facilmente acessível. Em estudo realizado com 287 amostras de secreções de pacientes com fibrose cística, observou-se que o exame do escarro pelo Gram pode ter um valor adicional em realçar o controle de qualidade dos meios de cultura usados para o isolamento preliminar das bactérias específicas. A finalidade do estudo era avaliar a utilidade do Gram em determinar o grau de contaminação por saliva de secreções respiratórias dos pacientes com fibrose cística, e em prever a presença de patógenos específicos na cultura. Foi observado que o exame do Gram do escarro apresenta sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo comparáveis às culturas para identificar *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *S. aureus* e *H. influenza*, em amostras de boa qualidade.<sup>2</sup>

Segundo Bazzo e colaboradores, em estudo realizado com amostras de escarro, com o objetivo de relacionar a quantidade de células, a presença de leucócitos e outros elementos com a positividade da reação em cadeia da polimerase (PCR) para diagnóstico de micobacterioses, pôde-se observar que a qualidade do escarro influencia na positividade daquele exame. Por isso, a obtenção de um escarro de boa qualidade torna-se importante, uma vez que as amostras que apresentam muitas células epiteliais, bactérias e restos celulares, têm maior probabilidade de apresentarem resultados negativos na PCR.<sup>3</sup>

O escarro pode ser contaminado com bactérias comensais na cavidade oral, principalmente em pacientes hospitalizados, e também por patógenos oportunistas, criando assim dificuldade adicional na interpretação dos resultados.<sup>4</sup>

Em 1974, Bartlett propôs que a pureza das amostras de escarro avaliadas concorda com a concentração relativa de polimorfonucleares, células epiteliais escamosas e muco, na técnica de coloração pelo Gram.<sup>5</sup>

O exame de escarro traduz, muitas vezes de maneira bastante específica, a natureza da anormalidade presente nos pulmões, e pode contribuir de forma decisiva para o diagnóstico de um grande número de pneumopatias. Representa um exame simples, de execução fácil, e baixo custo.<sup>1</sup> Algumas das características observadas no exame do escarro são as seguintes: aspecto, coloração, quantidade, presença de sangue, odor e consistência.<sup>1</sup>

O paciente submetido ao exame do escarro precisa estar lúcido e cooperativo, com força suficiente para tossir. A higiene prévia da cavidade oral reduz a população bacteriana autóctone. A colheita deve ser repetida tantas vezes quanto for necessário, até que se obtenha uma boa amostra, tendo-se o cuidado de usar frascos diferentes em cada tentativa. A coleta matinal, de um modo geral, proporciona maior volume de secreção, mas não é exigência prioritária.<sup>6</sup>

O material adequadamente coletado deve ser enviado imediatamente ao laboratório e logo manipulado para exames. A lavagem do escarro retira a camada mais periférica da secreção, em que predomina saliva, o que faz aumentar o rendimento do exame. Retira-se uma porção do núcleo da expectoração, com a qual se faz um esfregaço. A lâmina corada pela técnica de Gram é examinada microscopicamente com pequeno aumento. A presença de macrófagos alveolares, polimorfonucleares e células do epitélio cilíndrico ciliado, em detrimento de células epiteliais escamosas, sugere que o material é representativo das vias aéreas inferiores, e com pouca contaminação das vias aéreas superiores.<sup>6</sup>

São consideradas representativas as amostras contendo menos de 10 células escamosas e mais de 25 polimorfonucleares por campo de pequeno aumento. Os macrófagos alveolares são, na verdade, os indicadores mais fiéis da origem da secreção. Uma vez avaliada a amostra, passa-se ao exame com maior aumento (1000 x). Deve-se dar preferência aos campos microscópicos com maior concentração de polimorfonucleares e macrófagos, abandonando-se os campos contendo apenas células escamosas.<sup>6</sup>

Um outro critério, descrito por Curione e colaboradores, fala que as amostras de escarro contendo pelo menos 10 leucócitos, muco e menos de 25 células epiteliais escamosas por campo em pequeno aumento (100 x) são consideradas apropriadas para cultura bacteriana.<sup>7</sup>

Murray e Washington usaram classificação similar, agruparam amostras de escarro em cinco grupos, contendo somente aqueles que se apresentavam com menos de 10 células epiteliais escamosas e, pelo menos, 25 leucócitos por campo. Além disso, menos do que 10 leucócitos com 10-25 células epiteliais também tiveram ligação com amostras rejeitadas, o que pode ter conseqüências no paciente neutropênico.<sup>4</sup> Todos esses critérios têm por finalidade identificar as amostras que são representativas e adequadas para a cultura bacteriana.

A coloração de Gram consiste em uma técnica de coloração onde a amostra é tratada com um corante secundário, a safranina. Ao microscópio, as bactérias Gram-positivas aparecerão coradas em violeta escuro e as Gram-negativas em vermelho ou rosa escuro. O Gram tem a capacidade de corar um largo espectro e classes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas,

além de demonstrar a presença de células epiteliais escamosas, e leucócitos polimorfonucleares.<sup>8</sup> O uso do exame de coloração de Gram para avaliar a qualidade das amostras de escarro tem recebido considerável atenção como meio para melhorar a confiabilidade da cultura do escarro.<sup>6</sup>

Uma outra maneira que pode ser usada para determinar a qualidade do escarro é por meio da técnica de contagem celular diferencial, que é usada para estimar a contagem diferencial de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, células do epitélio brônquico, além de considerar a viabilidade celular e a quantidade de células degeneradas, o grau de contaminação por células escamosas e a contagem celular total. A contaminação por células epiteliais escamosas deve ser relatada separadamente, e idealmente deve ser menor do que 20%. Se a viabilidade celular for baixa e a quantidade de células degeneradas alta, ou a contaminação por células escamosas for alta e a quantidade de escarro na amostra processada for baixa, a contagem diferencial pode ser inexata.<sup>9</sup> A correta execução da técnica de contagem diferencial de células necessita de treinamento especial para os profissionais que a realizam, além de ser mais cara e mais demorada do que a técnica de Gram.

Este trabalho tem como objetivo avaliar se a qualidade do escarro determinada pelo método do Gram é equivalente ao resultado de qualidade obtido com a técnica de contagem diferencial de células.

## MÉTODOS

Foi realizado um estudo com delineamento prospectivo. No período de janeiro e fevereiro de 2008, todas as amostras de escarro coletadas no Hospital Nereu Ramos em Florianópolis (SC), que fossem encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias da Universidade Federal de Santa Catarina, foram incluídas no estudo. As coletas foram realizadas após obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes que forneceram as amostras.

As amostras de escarro foram coletadas em jejum, no período da manhã, após orientação ao paciente para escarrar em um pote com tampa rosqueada, após uma inspiração profunda. Os pacientes foram orientados para enxaguar a boca com água antes da coleta do material, sem o uso de qualquer tipo de anti-séptico bucal.

Foram excluídos do estudo os pacientes que não apresentaram expectoração espontânea.

Após este procedimento, as amostras de escarro foram encaminhadas ao laboratório e processadas dentro de, no máximo, duas horas.

Foram realizadas duas análises em cada amostra, uma delas pela técnica de Gram e a outra através da contagem diferencial de células.

Para coloração pelo Gram foram preparados esfregaços em lâminas previamente identificadas. Os esfregaços foram feitos por distensão de uma partícula de

escarro diretamente sobre a lâmina e deixados secar a temperatura ambiente. Para a coloração, as lâminas foram colocadas em um suporte e inicialmente cobertas com o corante violeta de metila (violeta de metila 1% em 100 ml de metanol absoluto e 100 ml de etanol absoluto, adicionado de 1% de oxalato de amônia em 400 ml de água destilada), e ficaram em repouso por aproximadamente 15 segundos. Em seguida, foi adicionada água, em igual quantidade do corante, sobre as lâminas, que permaneceram em repouso por mais 45 segundos. As lâminas foram lavadas em um filete de água corrente e cobertas com lugol, diluído a 1/20 no momento de uso (1% iodeto de potássio, 0,67% iodo metálico em água destilada). As lâminas permaneceram com lugol por cerca de 1 minuto, em seguida foram lavadas em um filete de água corrente, descoradas com álcool etílico absoluto e lavadas novamente em um filete de água corrente. A coloração de fundo foi feita cobrindo-se as lâminas com safranina (safranina 1% em etanol 95%) por 30 segundos. Em seguida foram lavadas em água corrente e secas ao ar. A leitura foi feita em microscópio óptico com aumento de 1000 x. Foram avaliados 20 campos e realizada a contagem de células epiteliais, polimorfonucleares, mononucleares e leucócitos totais, estimando-se o número médio de cada tipo celular por campo. As amostras foram agrupadas em três categorias distintas de acordo com o número de leucócitos: a) (+) quando em número de 1 a 30; b) (++) quando em número de 31 a 100; e c) (+++) quando em número maior o que 100. Da mesma forma, foram agrupadas em três categorias distintas de acordo com o número de células epiteliais: a) (+) quando em número de 0 a 10; b) (++) quando em número de 11 a 25; e c) (+++) quando em número maior do que 25. Foram consideradas de boa qualidade as amostras que apresentassem classificação de (+) para células epiteliais e (+++) para leucócitos.<sup>10,11</sup>

Para a realização da contagem diferencial de células, uma alíquota de escarro foi tratada com aproximadamente 4 volumes de DTT (ditiotreitól), mais 4 volumes de PBS (tampão fosfato) e filtrada após homogeneização. Vinte microlitros do filtrado foram misturados com 20µl de tripan blue a 4%. Esta mistura foi colocada em câmara de Neubauer onde foram contadas, em microscópio de campo claro, com aumento de 400 x, as células vivas e mortas. A percentagem de células viáveis foi resultante da equação: número de células vivas/número total de células X 100. A presença de macrófagos alveolares foi determinada pela contagem diferencial dos leucócitos presentes no filtrado da amostra de escarro. Os filtrados foram concentrados pela técnica de *citospin*, e as lâminas coradas pela técnica de May-Grünwald/Giemsa e visualizadas em microscópio de campo claro com aumento de 1000 x. Foram determinados a percentagem e o número absoluto de células epiteliais escamosas, células epiteliais brônquicas, eosinófilos, linfócitos, macrófagos e leucócitos po-

limorfonucleares. Foram consideradas de boa qualidade as amostras que apresentassem viabilidade celular maior do que 40%, e menos de 20% de células epiteliais escamosas.<sup>9</sup>

Os dados foram anotados em uma ficha de inclusão e posteriormente digitados em um banco de dados, e analisados com o auxílio do software SPSS 16.0®.

Os resultados foram descritos como porcentagem e média, e foi avaliado o índice de concordância Kappa para amostras de boa ou má qualidade entre os dois métodos utilizados. Valores de Kappa maiores ou iguais a 0,75 foram considerados relevantes. Foi ainda estimado o coeficiente de correlação de Pearson entre as contagens celulares realizadas. Os valores do coeficiente de correlação de Pearson foram considerados como: 1 = perfeito positivo, 0,5 a 0,9 = forte positivo, 0,1 a 0,4 = fraco positivo, 0 = neutro, -0,1 a -0,4 = fraco negativo, - 0,5 a -0,9 = forte negativo, e -1 = perfeito negativo.

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Unisul.

**RESULTADOS**

Foram avaliadas, consecutivamente, 47 amostras de escarro no período de janeiro a fevereiro de 2008.

No método de contagem diferencial, a média de leucócitos absolutos encontrados nas amostras foi de  $1,69 \times 10^6$  células/mL, tendo como valor mínimo zero, e valor máximo  $10,3 \times 10^6$  células/mL

O número de células viáveis apresentou uma média de  $156,1 \times 10^6$  células/mL, tendo zero como valor mínimo, e  $988 \times 10^6$  células/mL como valor máximo.

A média encontrada para células epiteliais foi de  $55,3 \times 10^6$  células/mL, apresentando valor mínimo de zero, e máximo de  $938 \times 10^6$  células/mL.

Pelo método de contagem diferencial de células, observou-se que 19 (40,4%) das amostras foram de boa qualidade, e 28 (59,6%) foram de má qualidade.

Quando comparado o número absoluto de leucócitos encontrados nas amostras pelo método de contagem diferencial com o número absoluto de células viáveis, o coeficiente de correlação de Pearson obtido foi de 0,755, demonstrando haver uma boa correlação entre a viabilidade celular e o número de leucócitos encontrados nas amostras (Figura 1). A correlação entre o número absoluto de células viáveis e o número absoluto de células epiteliais, demonstrou um coeficiente de correlação de Pearson negativo (-0,201), indicando que quanto menor o número de células epiteliais, maior a viabilidade celular da amostra (Figura 2). A distribuição dos leucócitos encontrados nas amostras pelo método do Gram e sua graduação em cruces está demonstrada na Tabela 1. A maior parte das amostras (87,3%) foi classificada como (++) ou (+++).

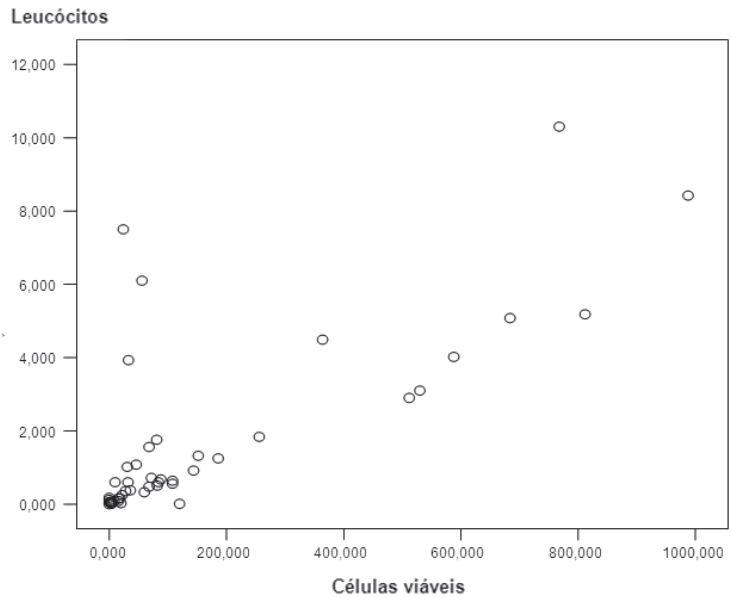


Figura 1 – Correlação entre número absoluto de leucócitos e número absoluto de células viáveis nas amostras de escarro por expectoração espontânea (r = 0,755).

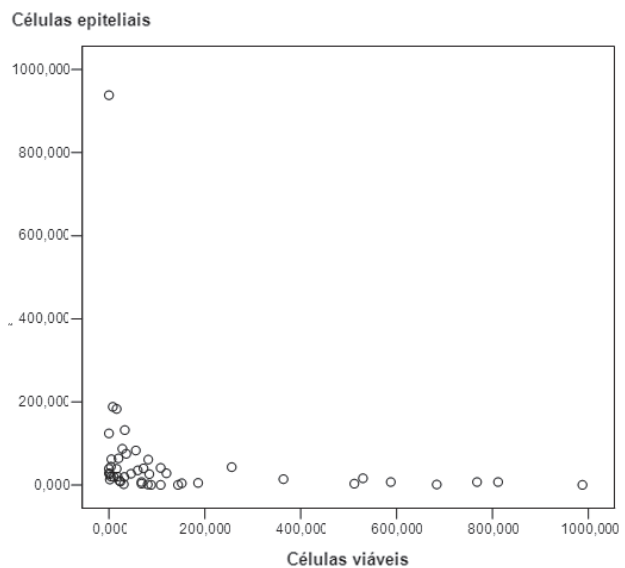


Figura 2 – Correlação entre número absoluto de células epiteliais e número absoluto de células viáveis nas amostras de escarro por expectoração espontânea (r = - 0,21).

Tabela 1 – Distribuição das amostras de acordo com a contagem de leucócitos pelo método de Gram, estratificada em cruces.

Leucócitos	n	%
(+)	6	12,8
(++)	20	42,6
(+++)	21	44,7
Total	47	100

Fonte: Primária.

A distribuição das células epiteliais encontradas nas amostras coradas pelo método do Gram e sua graduação em cruces está demonstrada na Tabela 2. A maior parte das amostras (80,9%) foi classificada como (+) ou (++)

Tabela 2 – Distribuição das amostras de acordo com a contagem de células epiteliais pelo método de Gram, estratificada em cruzes.

Células epiteliais	n	%
(+)	21	44,7
(++)	17	36,2
(+++)	9	19,1
Total	47	100

Fonte: Primária.

A qualidade das amostras de escarro avaliada pelo método de Gram, demonstrou que 13 (27,7%) das amostras foram de boa qualidade, enquanto que 34 (72,3%) apresentaram qualidade ruim.

Não houve boa concordância na avaliação da qualidade das amostras de escarro quando comparados o método de Gram e o método de contagem diferencial de células. O índice de concordância Kappa foi de 0,35, sendo assim, considerado insatisfatório. A distribuição da qualidade das amostras segundo os dois métodos encontra-se demonstrada na Tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição da qualidade das amostras de acordo com o método de Gram e da contagem diferencial de células.

Contagem diferencial de células	Boa		GRAM Ruim		Total	
	n	%	n	%	n	%
Boa	9	19,1	10	21,3	19	40,4
Ruim	4	8,5	24	51,1	28	59,6
Total	13	27,6	34	72,4	47	100

Fonte: Primária.

## DISCUSSÃO

A análise de escarro é o método menos invasivo disponível para obter o diagnóstico de algumas afecções pulmonares, em especial as doenças infecciosas, e pode ter seu rendimento diagnóstico incrementado quando interpretada de acordo com critérios específicos de seleção da amostra. Sabe-se que o trato respiratório inferior é virtualmente estéril, porém quando o indivíduo expectora, este material entra em contato com secreções orofaríngeas, nasais e orais, tornando-se potencialmente contaminado com microorganismos da microbiota residente.<sup>12</sup> Isto é particularmente problemático para análise da presença de bactérias piogênicas. Os microorganismos presentes no material salivar são oriundos principalmente das gengivas, da placa dentária e das tonsilas palatinas.<sup>13</sup> Este problema pode ser minimizado, se a coleta do material for supervisionada e se forem adotados critérios de representatividade de vias aéreas inferiores e de ausência de contaminação significativa com o material do trato respiratório superior. Portanto, avaliar a qualidade de uma amostra de escarro é imperativo para que o rendimento diagnóstico de sua análise seja maximizado. Al Balloshe e colaboradores afirmam que o escarro ao passar pela cavidade oral e contaminar-se com bactérias locais dificultará a interpretação dos resultados en-

contrados, principalmente no que diz respeito à infecção ou contaminação.<sup>4</sup> Howard e colaboradores falam da importância do uso da técnica de Gram para avaliar a qualidade do escarro, e conseqüentemente melhorar a confiabilidade da cultura.<sup>14</sup>

Um escarro que apresenta muita contaminação com células e microorganismos da orofaringe tem maior probabilidade de apresentar resultados negativos para a pesquisa de agentes etiológicos dos processos infecciosos pulmonares.<sup>3</sup> Portanto, qualificar uma amostra de escarro se faz necessário, pois impediria que amostras de má qualidade fossem analisadas sem sucesso, diminuindo assim os custos e o tempo gasto com uma nova coleta e análise. A retirada mecânica da maior quantidade de saliva possível, associada à lavagem vigorosa da boca e mobilização de secreções nasofaríngeas previamente à coleta, minimizam este problema. Outra forma de diminuir este viés é a análise microscópica da amostra. Sabe-se que a chave do “verdadeiro” escarro é a presença de macrófagos alveolares e a pequena quantidade de células epiteliais.<sup>15</sup> A sensibilidade da microscopia aumenta com amostras de boa qualidade e também quando elas são encaminhadas rapidamente ao laboratório.<sup>16</sup>

Existem inúmeros critérios de classificação das amostras de escarro em representativas das vias aéreas inferiores (ou de boa qualidade) e não representativas das vias aéreas inferiores (ou de má qualidade). Skerret e colaboradores classificam o material como de boa qualidade quando a amostra contém menos de 10 células epiteliais escamosas, e mais de 25 neutrófilos por campo de grande aumento, além da presença de macrófagos alveolares.<sup>17</sup> Segundo Curione e colaboradores, uma amostra de escarro de boa qualidade apresenta número de leucócitos maior ou igual a 10 e menos que 25 células epiteliais.<sup>7</sup> Murray e colaboradores utiliza uma classificação semelhante, em que consideram de boa qualidade se apresentar menos que 10 células epiteliais e um número maior ou igual a 25 de leucócitos, não considerando como Skerret a presença de macrófagos alveolares.<sup>7</sup> Spanevello e colaboradores consideraram adequadas somente as amostras que apresentavam uma viabilidade celular maior que 50% e menor que 20% de células escamosas.<sup>18</sup> O presente estudo classificou como sendo de boa qualidade a amostra que apresentasse uma viabilidade celular maior que 40% e menos de 20% de células epiteliais, e pelo método de Gram as amostras com menor número de células epiteliais e maior número de leucócitos. Critérios mais ou menos rígidos na classificação do Gram poderiam interferir com o grau de concordância entre os dois métodos utilizados, porém os autores julgaram mais adequada a classificação proposta, por diminuir a possibilidade de inclusão de amostras não representativas das vias aéreas inferiores.

A avaliação da qualidade das amostras de escarro utilizando parâmetros citológicos requer experiência e qualificação além de tempo e custo.<sup>19</sup> Das amostras



totais encaminhadas para o laboratório, as que apresentaram boa qualidade pelo método de contagem diferencial foram 40,4% do total, e as de boa qualidade observadas pelo Gram foram 27,6%. De acordo com Skerret, aproximadamente 25% das amostras de escarro encaminhadas aos laboratórios para cultura não são adequadas, o que acarreta grande variabilidade nos resultados e pouca confiabilidade, resultados estes inferiores aos observados neste estudo.<sup>17</sup> Resultados mais próximos aos encontrados neste estudo foram relatados por Chuard e colaboradores, que afirmam que aproximadamente 45% das amostras encaminhadas aos laboratórios são amplamente contaminadas por saliva, e portanto de má qualidade.<sup>20</sup>

A média de leucócitos absolutos encontrada foi de  $1,69 \times 10^6$  células/mL, sendo maior quando comparada com outro estudo onde a média total de leucócitos em indivíduos saudáveis foi de  $0,97 \times 10^6$ .<sup>9</sup> As amostras coletadas para este estudo não eram de indivíduos saudáveis, ou seja, eram de pessoas com suspeita de tuberculose pulmonar, o que pode ser responsabilizado pelo maior número de leucócitos em relação à população normal. O grande número de leucócitos observado na técnica da contagem diferencial, corrobora o maior número de amostras avaliadas pelo Gram com três cruces de leucócitos.

Os resultados desse estudo mostraram boa correlação entre viabilidade celular e o número de leucócitos, apresentando um índice de correlação de Pearson de 0,755. Esse resultado indica que quanto maior a quantidade de leucócitos encontrada em uma amo-

tra de escarro, maior também será a viabilidade celular. Segundo Efthimiadis, o escarro deve ser processado o mais cedo possível porque a viabilidade celular diminui após quatro horas, e se a viabilidade celular for baixa e a quantidade de células degeneradas alta, a contagem diferencial pode ser inexata.<sup>9</sup> Quando comparada a viabilidade celular com o número de células epiteliais, observou-se que não houve concordância, verificando-se um valor negativo para o índice de correlação Pearson, ou seja, quanto menor o número de células epiteliais em uma amostra, maior a viabilidade celular. Talvez a avaliação isolada das células epiteliais pudesse determinar as amostras de boa ou má qualidade, necessitando assim de estudos com maior número de amostras para confirmar ou refutar esta hipótese.

A comparação entre os resultados obtidos na avaliação da qualidade das amostras de escarro realizadas pelo método do Gram e pelo método de contagem diferencial demonstraram um índice de concordância Kappa de 0,35, o que significa que não há boa concordância.<sup>21</sup>

Dessa forma, a classificação das amostras de escarro em representativas ou não representativas das vias aéreas inferiores pela técnica de Gram, com os critérios aqui propostos e utilizados, não concorda com os resultados encontrados na contagem diferencial de células, não sendo adequada a substituição da técnica de contagem diferencial de células pela técnica de Gram.

Estudos adicionais com maior número de amostras e outros pontos de corte devem ser realizados para avaliar de forma mais consistente esta observação.

## REFERÊNCIAS:

1. Silva LCC. Condutas em Pneumologia. Revinter 2001; 1:367-80.
2. Sadeghi E, Matlow A, Maclusky L, Karmali MA. Utility of Gram stain in evaluation of sputa from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32(1):54-8.
3. Bazzo ML, Ferreira LAP, Silva RM, Scheffer M, Chagas M. Relação entre a qualidade de amostras de escarro e o diagnóstico de micobacteriose por PCR. *Arq Cat Med* 2004; 33(3):23-7.
4. Al Balooshe N, Jamsheer A, Botta GA. Impact of introducing quality control/quality assurance (QC/QA) guidelines in respiratory specimen processing. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9:810-5.
5. Mizrache HH, Valenstein PN. Randomized trial interpreting sputum quality in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1987; 25(12):2327-9.
6. Tarantino AB. Doenças Pulmonares. Guanabara Koogan 2002; 5:524-35.
7. Curione CJ, Kaneco Jr GS, Voss JL, Hesse F, Smith RF. Gram stain evaluation of the Quality of sputum specimens for mycobacterial culture. *J Clin Microbiol* 1977; 5(3):381-2.
8. Microbiology Working Group. Guideline for quantitative interpretation of Gram stains. 2004.
9. Efthimiadis A, Pizzichini E, Pizzichini MMM, Hargreave FE. Sputum examination for Indices of airway inflammation: laboratory procedures. Astra Draco AB: Lund, Sweden, 1997.
10. Mangels JI, Cox ME, Lindeberg LH. Methanol fixation: an alternative to heat fixation of smears before staining. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1984; 2:129.
11. Douglas SD. Microscopy. In: Lenete EH (ed). *Manual of Clinical Microbiology*, 4ª ed. Washington D.C: American Society of Microbiology; 1985.
12. Yeager H. Tracheobronchial secretions. *Am J Med* 1971; 50:493-509.
13. Bazzo ML, Jong BB. Indigenous flora from human saliva. *Applied Microbiology* 1968; 16:428-9.
14. Mizrachi HH, Valenstein PN. Randomized trial interpreting sputum quality in a clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology* 1987; 25(12):2327-9.
15. Epstein MRL. Constituents of sputum: a simple method. *Ann Intern Med* 1972; 77:259-65.
16. Baselski V, Mason K. Pneumonia in the immunocompromised host: the role of bronchoscopy and newer diagnostic techniques. *Sem Respir Infect* 2000;15: 144-61.
17. Skerret JS. Diagnostic testing for community-acquired pneumonia. *Clin Chest Med* 1999; 20:531-48.
18. Spanevello A, Confalonieri M, Sulotto F, Romano F, Balzano G, Migliore GB, et al. Induced sputum cellularity reference values and distribution in normal volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1172-4.
19. Gal-oz A, Kassis I, Shprecher H, Beck R, Bentur L. Correlation between rapid strip test and quality of sputum. *Chest* 2004; 126:1667-71.
20. Chuard C, Fracheboud D, Regamey C. Effect of sputum induction by hypertonic saline on specimen quality. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 39:211-4.
21. Sackett DL, Haynes RB. Evidence base for clinical diagnosis. The architecture of diagnostic research. *BMJ* 2002; 324:539-41.