



**Politécnico
Castelo Branco**

Escola Superior de Saúde
Dr. Lopes Dias

Avaliação da sensibilidade e especificidade do método de Ziehl-Neelsen para o diagnóstico de tuberculose no Serviço de Patologia Clínica da ULS Guarda

Bianca Maria Cardoso Almeida 20211482
4º ano de Licenciatura em Ciências Biomédicas Laboratoriais

Orientadores

Professora Doutora Carina Alexandra Pereira Valente

Artigo científico apresentado à Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciatura, realizada sob a orientação científica da professora Doutora Carina Valente, do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Junho 2025

Composição do júri

Presidente do júri

Professora Doutora, Marisa Regina Reduto Santos Barbeira
Professora Adjunta, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias

Vogais

Professor Doutor, Francisco José Barbas Rodrigues (arguente)
Professor Adjunto, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias

Professora Doutora, Carina Alexandra Pereira Valente (orientadora)
Professora Adjunta, Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias

Resumo

A tuberculose, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), afeta principalmente o trato respiratório e permanece uma das principais causas de morbidade e mortalidade por agente infeccioso no mundo. Embora tratável, o diagnóstico ainda depende maioritariamente da técnica de Ziehl-Neelsen, que, apesar de amplamente utilizada, apresenta limitações importantes, especialmente a sua baixa sensibilidade.

Em 2024, na Unidade Local de Saúde da Guarda (ULSG), foram observadas discrepâncias entre os resultados do Ziehl-Neelsen e os testes moleculares, evidenciando a necessidade de reavaliar sistematicamente a sensibilidade e especificidade desta técnica. O principal objetivo deste estudo consistiu na avaliação da especificidade e sensibilidade desta técnica por comparação com o método cultural (Gold Standard) e deteção molecular.

Realizou-se um estudo retrospectivo e quantitativo, no qual se utilizaram amostras respiratórias submetidas a pedido de pesquisa de *M. tuberculosis*, entre janeiro de 2020 e abril de 2025.

Recolheram-se os resultados para a técnica de Ziehl-Neelsen, método cultural e o teste de Biologia Molecular totalizando 1005 amostras. Para avaliação do desempenho do exame direto, foram determinados valores de sensibilidade, especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor Preditivo Negativo (VPN), assim como os respetivos Intervalos de Confiança (IC).

A avaliação da sensibilidade da técnica de Ziehl-Neelsen, comparativamente ao *Gold Standard*, revelou um valor reduzido de 58,78%, e em comparação com o método molecular uma sensibilidade ainda menor de 43,24% confirmando baixa capacidade de deteção de casos positivos pela técnica. Em termos de especificidade da técnica, em comparação com o método *Gold Standard* foi de 96,28% e em comparação com o método molecular de 98,67%.

Concluindo, este estudo confirmou a baixa sensibilidade da técnica de Ziehl-Neelsen aplicada na ULSG. Os resultados obtidos podem estar relacionados com diversos fatores, como a baixa concentração de bacilos nas amostras, a sua distribuição inadequada na lâmina durante a preparação do esfregaço ou falhas no processamento ou avaliação microscópica, sendo alguns passíveis de correção.

Palavras-chave

Técnica de Ziehl-Neelsen, Especificidade, Sensibilidade, *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculose

Abstract

Tuberculosis, caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), primarily affects the respiratory tract and remains one of the leading causes of morbidity and mortality from infectious agents worldwide. Although treatable, its diagnosis still largely relies on the Ziehl-Neelsen technique, which, despite being widely used, presents significant limitations—particularly its low sensitivity.

In 2024, at the Local Health Unit of Guarda (ULSG), discrepancies were observed between Ziehl-Neelsen results and molecular testing, highlighting the need to systematically reassess the sensitivity and specificity of this method. The main objective of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of the Ziehl-Neelsen technique compared with the cultural method (Gold Standard) and molecular detection.

A retrospective, quantitative study was conducted using respiratory samples submitted for *M. tuberculosis* testing between January 2020 and April 2025. Results from the Ziehl-Neelsen technique, culture method, and molecular biology test were collected, totaling 1,005 samples. To assess the performance of the direct smear, sensitivity, specificity, Positive Predictive Value (PPV), and Negative Predictive Value (NPV), along with their respective Confidence Intervals (CI), were determined.

The sensitivity of the Ziehl-Neelsen technique compared with the Gold Standard was found to be low, at 58.78%, and even lower when compared with the molecular method, at 43.24%, confirming a limited ability to detect positive cases. In terms of specificity, the technique achieved 96.28% compared with the Gold Standard and 98.67% when compared with the molecular method.

In conclusion, this study confirmed the low sensitivity of the Ziehl-Neelsen technique as applied at ULSG. The observed results may be attributed to several factors, such as low bacillary concentration in the samples, inadequate distribution on the smear slide, or issues in sample processing or microscopic evaluation—some of which can be addressed through improved laboratory practices.

Keywords

Ziehl-Neelsen Stain, Specificity, Sensitivity, *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis

Índice geral

Resumo	V
Abstract	VII
Índice geral	IX
Introdução	1
Metodologias	2
Resultados	4
Discussão	8
Conclusão	10
Referências Bibliográficas	10

Lista de tabelas

Tabela 1. Escala de quantificação de BAAR aplicada na ULSG (23).....	3
Tabela 2. Distribuição das amostras por método de diagnóstico, estratificadas por resultado (positivo/negativo).....	4
Tabela 3. Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do método de <i>Ziehl-Neelsen</i> (IC 95%), por tipo de amostra e total, em comparação com a o método <i>Gold Standard</i> (cultura).....	6
Tabela 4. Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do método de <i>Ziehl-Neelsen</i> (IC 95%), por tipo de amostra e total, em comparação com o método de detecção molecular.	6

Introdução

A tuberculose é uma infecção causada por *Mycobacterium tuberculosis*, que afeta principalmente o trato respiratório (1). Pode manifestar-se como tuberculose ativa, com sintomas, ou como tuberculose latente, sem sintomas, mas com presença da bactéria no organismo (1,2). Apesar de ser tratável, continua a ser uma das principais causas de morbidade e a segunda maior causa de morte por agente infeccioso no mundo. Em 2021, registaram-se 10,6 milhões de novos casos e 1,6 milhões de mortes (3). A transmissão dá-se por gotículas respiratórias expelidas por indivíduos infetados (1)

Mycobacterium tuberculosis é um bacilo álcool-ácido resistente de crescimento lento, com uma parede rica em lipídios, o que dificulta sua deteção (1,3,4). Por isso, o diagnóstico requer métodos específicos, como as técnicas de coloração para bacilos álcool-ácido resistentes (5).

Dada a forma de transmissão e as consequências da tuberculose, é essencial dispor de métodos diagnósticos primários que sejam rápidos, acessíveis, simples, específicos e sensíveis. (5). A sensibilidade e a especificidade medem, respetivamente, a capacidade do teste em identificar verdadeiros positivos e negativos, sendo avaliadas em relação a um método de referência, o chamado *Gold Standard*.(5,6).

No diagnóstico da tuberculose, este padrão é representado pela cultura, tanto em meio Löwenstein–Jensen como em meio líquido, por ser o método mais sensível e específico. Com o avanço das técnicas de Biologia Molecular, estas também têm sido utilizadas para confirmar os resultados obtidos pelo método de *Ziehl-Neelsen* (9–12).

Atualmente, o esfregaço de amostras respiratórias seguido de observação microscópica é a principal técnica para diagnóstico primário da tuberculose (5). Para isso, utiliza-se a coloração álcool-ácido resistente, como a técnica de *Ziehl-Neelsen*, que se baseia na resistência das micobactérias à descoloração por soluções alcoólicas e ácidas. Esta baseia-se utilização de dois corantes, intercalados com uma fixação por calor e descoloração com uma solução alcoólica e ácida. Como estas bactérias não sofrem esta descoloração, mantém a cor do corante primário, um rosa/vermelho que contrasta com o azul do corante secundário e permite uma identificação destas rápida e fácil (11-14).

A utilização desta técnica, contudo, apresenta algumas limitações associadas, entre as quais a baixa sensibilidade, que pode ou não advir de fatores externos (13).

Estudos mostram uma ampla variação na sensibilidade da técnica de *Ziehl-Neelsen*, com taxas entre 20% e 80%, frequentemente atribuída à baixa concentração de bacilos AAR nas amostras. Essa limitação é especialmente crítica em países com recursos limitados, onde a maior parte dos casos de tuberculose ocorre, favorecendo falsos negativos (15–19). Isso pode atrasar o tratamento, agravar a doença e aumentar o risco de transmissão (13)

A variabilidade da sensibilidade da técnica de *Ziehl-Neelsen* pode estar associada a fatores externos, como a espessura dos esfregaços, a concentração dos reagentes e a qualidade dos microscópios, bem como a fatores internos, como a quantidade mínima de

bacilos necessária para um resultado positivo — entre 5.000 a 10.000 bacilos por mililitro de expectoração. (13).

Em 2024, na Unidade Local de Saúde da Guarda (ULSG), foram observadas discrepâncias entre os resultados do *Ziehl-Neelsen* e os testes moleculares, evidenciando a necessidade de reavaliar sistematicamente a sensibilidade e especificidade desta técnica.

Assim, este estudo tem como objetivo avaliar a especificidade e sensibilidade da técnica de *Ziehl-Neelsen* executada no laboratório de patologia clínica na ULSG a partir de amostras respiratórias.

Metodologias

Desenho do estudo e amostragem

O estudo realizado foi de natureza retrospectiva e quantitativa. Utilizaram-se amostras respiratórias submetidas a pedido de pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), recebidas pelo Serviço de Microbiologia da ULSG entre janeiro de 2020 e abril de 2025. Todas as amostras processadas foram submetidas a exame direto para pesquisa de *M. tuberculosis* por avaliação da coloração de *Ziehl-Neelsen*, executada de acordo com os protocolos estabelecidos pelo laboratório de microbiologia do Serviço de Patologia Clínica.

Incluíram-se no estudo todas as amostras respiratórias processadas entre janeiro de 2020 e abril de 2025, de ambos os sexos e de todas as idades. Recolheram-se os resultados para a técnica de *Ziehl-Neelsen*, método cultural (*Gold Standard*) e o teste de Biologia Molecular de deteção por amplificação de ácidos nucleicos de *M. tuberculosis*, totalizando 1005 amostras.

Para garantir poder estatístico adequado, foi estimada a necessidade de cerca de 1900 amostras, assumindo uma taxa de positividade entre 10–15%). Todas as amostras rececionadas e processadas na ULSG no período definido e que cumpram os critérios de inclusão, foram incluídas no estudo.

Processamento de amostras

A técnica de *Ziehl-Neelsen* foi realizada manualmente, com base no protocolo estabelecido pela ULS, descrito na tabela 1. A avaliação das lâminas foi realizada através da observação ao microscópio, e quantificada tendo por base os valores estipulados de BAAR (Bacilos Álcool-Ácido Resistentes) por lâmina na ULSG, que se encontram na tabela 2.

Após a descontaminação das amostras respiratórias, realiza-se a separação de amostra para avaliação por BM e para realização do método cultural. A cultura é realizada em dois meios sólidos (Löwenstein-Jensen) e em um meio líquido através da pipetagem da amostra para os respetivos.

Realiza-se uma incubação posterior do meio líquido até que seja detetado o crescimento bacteriano, tendo em conta o crescimento expectável em dias de *M. tuberculosis* ou até findar o período máximo de 42 dias. O meio sólido é incubado a 37° durante um período de 60 dias com avaliações periódicas do crescimento (ao 12°, 30°, 45° e ao 60° dia).

A avaliação pelo método de BM é realizada utilizando dois sistemas de ensaio de PCR em tempo real, *ELITE InGenius®* e *GeneXpert® Instrument Systems* (20–22).

Tabela 1. Técnica de Ziehl-Neelsen aplicada na ULSG.

Reagente	Aplicação	Tempo
Reagente 1 (solução de carbol-fucsina)	- Cobrir completamente o esfregaço; - Aquecer cuidadosamente 3 vezes sobre o bico de Bunsen até à libertação de vapores, sem ferver.	5 minutos no total
Água corrente	- Lavar até esta se tornar límpida	
Reagente 2 (Ácido clorídrico em álcool)	- Cobrir completamente o esfregaço e permitir a reação	15 a 30 segundos (variando consoante a grossura do esfregaço)
Água corrente	- Lavar imediatamente	
Reagente 3 (Solução de azul de metileno)	- Contrastar - Cobrir completamente e permitir que reaja	30 segundos *
Água corrente	- Lavar cuidadosamente	
Secar ao ar <i>overnight</i> ou até	50°C em uma estufa	

* Ou um 1 minuto com uma diluição do reagente 3 (solução de azul metileno) (diluição: 1:10 (1+9) com água destilada)

Tabela 2. Escala de quantificação de BAAR aplicada na ULSG (23).

Nº de Bacilos Observados	Escala OMS (1000x)	Escala OMS (200 – 250x)
Nenhum	NBAAR*	NBAAR*
1-2/300 campos	1-2/300 campos (esfregaço a repetir)	1-2/300 campos (esfregaço a repetir)
1-9/100 campos	1-9/100 campos (esfregaço a repetir)	1-9/100 campos (esfregaço a repetir)
1-9/10 campos	1+	1-9/10 campos
1-9/campo	2+	1+
10-99/campo	3+	2+
≥ 100/campo	3+	3+

* NBAAR: Não detetados BAAR

Avaliação de desempenho da técnica

Para avaliação do desempenho do exame direto, foram determinados valores de sensibilidade, especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor Preditivo Negativo (VPN), assim como os respectivos Intervalos de Confiança (IC). Recolheu-se a informação relativa ao tipo de amostra em estudo (expectoração, lavado bronquioalveolares, etc.). Os cálculos foram realizados em comparação com o método *Gold Standard* (cultura microbiológica) e de biologia molecular. O teste de McNemar foi utilizado para comparar a concordância entre o método de *Ziehl-Neelsen* e os métodos de referência (cultura/teste molecular). Este teste avalia se as diferenças nas classificações de resultados positivos e negativos entre os dois métodos são estatisticamente significativas, considerando apenas os casos discordantes.

As comparações foram feitas de forma global e individualmente para cada tipo de amostra. Para a realização dos mesmos utilizou-se dois calculadores estatísticos, um para o cálculo do valor de p, utilizando o teste de McNemar (24) e o outro para o cálculo de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e IC, o qual utiliza como referência as seguintes fórmulas (25):

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Total de positivos}}{(\text{Total de positivos} + \text{Falsos negativos})} \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Total de negativos}}{(\text{Total de negativos} + \text{Falsos positivos})} \times 100$$

$$\text{Valor Preditivo Positivo (VPP)} = \frac{\text{Total de verdadeiros positivos}}{\text{Total de positivos}} \times 100$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo (VPN)} = \frac{\text{Total de verdadeiros negativos}}{\text{Total de negativos}} \times 100$$

Resultados

Descrição da amostra

Com a recolha dos dados relativos aos resultados da pesquisa de *M. tuberculosis*, construiu-se a Tabela 3, na qual se encontram os valores totais de pedidos, divididos por método, tipo de amostra e resultado (positivo e negativo).

No total recolheram-se dados de cerca de 1005 pedidos, os quais foram submetidos a avaliação pelos métodos de *Ziehl-Neelsen* e *Gold Standard* (cultural). O método de Biologia Molecular aplicou-se a 412 destas amostras.

A coloração de *Ziehl-Neelsen* identificou 176 amostras como positivas, enquanto a cultura confirmou 726 resultados positivos.

Tabela 3. Distribuição das amostras por método de diagnóstico, estratificadas por resultado (positivo/negativo).

Tipo de amostra	<i>Ziehl-Neelsen</i>	Cultura	BM	Total
Total	1005	1005	412	1005
Positivo	176	726	37	
Negativo	829	279	375	
Aspirado-Brônquico	60	60	60	60
Positivo	3	4	10	
Negativo	57	56	50	
Aspirado Transbrônquico	1	1	1	1
Positivo	0	0	0	
Negativo	1	1	1	
Aspirado traqueal	22	22	22	22
Positivo	1	0	3	
Negativo	21	22	19	
Cultura	591	149	0	591
Positivo	155	254	NA	
Negativo	436	337	NA	
Expetoração	149	149	149	149
Positivo	16	18	15	
Negativo	133	131	134	
Lavado alveolar	44	44	44	44
Positivo	1	0	4	
Negativo	43	44	40	
Lavado bronco-alveolar	46	46	46	46
Positivo	0	3	3	
Negativo	46	43	43	
Líquido Pleural	92	92	90	92
Positivo	0	0	2	
Negativo	92	92	88	

BM, Biologia Molecular; NA, não aplicável.

Relativamente às amostras que foram testadas por métodos moleculares, a coloração de *Ziehl-Neelsen* identificou 176 positivos, enquanto 37 foram confirmados pelo método molecular. Em termos de negativos, a técnica de *Ziehl-Neelsen* identificou 829 amostras como negativas das quais 279 foram confirmadas por cultura como negativas e 375 por métodos moleculares.

Desempenho global da técnica de *Ziehl-Neelsen*

Em comparação com a cultura, o método de *Ziehl-Neelsen* apresentou uma sensibilidade de 58,78% (IC=52,76 - 64,62), especificidade de 96,28% (IC=94,63 - 97,54), VPP de 85,86% (IC=88,55 - 89,91) e VPN de 85,87% (IC=84,08 - 87,50) (Tabela 4).

Comparado com os testes moleculares, a sensibilidade e especificidade foram de 43,24% (IC=27,10 - 60,51) e 98,67% (IC=96,92 - 99,57), respetivamente, com um VPP de 76,19% (IC=55,41 - 89,18) e um VPN de 94,63% (IC=33,01 - 95,89) (Tabela 5).

Tabela 4. Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do método de *Ziehl-Neelsen* (IC 95%), por tipo de amostra e total, em comparação com a o método *Gold Standard* (cultura).

Amostra	Sensibilidade (IC a 95%)	Especificidade (IC a 95%)	VPP (IC a 95%)	VPN (IC a 95%)	Comparação (valor de p)
Total	58,78% (52,76 - 64,62)	96,28% (94,63 - 97,54)	85,86% (88,55 - 89,91)	85,87% (84,08 - 87,50)	0.0001
Aspirado - Brônquico	30,00% (6,67 - 65,25)	100,00% (92,89-100,00)	100,00% (29,24 - 100,00)	87,72% (82,64 - 91,47)	1.0000
Aspirado Transbrônquico	-	100,00% (2,59 -100,00)	-	100,00% (2,50 - 100,00)	-
Aspirado traqueal	0,00% (0,00 - 70,76)	94,74% (73,97 - 99,87)	-	85,71% (84,37 - 86,96)	1.0000
Cultura	59,16% (52,94 - 65,17)	100,00% (98,89-100,00)	100,00% (97,65 - 100,00)	75,46% (72,66 - 78,06)	0.0001
Expetoração	80,00% (51,91 - 95,67)	97,01% (92,53 - 99,18)	75,00% (52,52 - 89,06)	97,74% (94,03 - 99,17)	0.6171
Lavado alveolar	25,00% (0,63 - 80,59)	100,00% (91,19 -100,00)	100,00% (2,50 - 100,00)	93,02% (88,33 - 95,91)	1.0000
Lavado Bronco Alveolar	0,00% (0,00 - 70,76)	100,00% (91,78-100,00)	-	93,48% (93,48 - 93,48)	0.2482
Líquido pleural	0,00% (0,00 - 84,19)	100,00% (95,89-100,00)	-	97,78% (97,78 - 97,78)	-

IC: Intervalo de confiança; -: Cálculo impossível de realizar por ausência de valores passíveis de divisão

Tabela 5. Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do método de *Ziehl-Neelsen* (IC 95%), por tipo de amostra e total, em comparação com o método de detecção molecular.

Amostra	Sensibilidade (IC a 95%)	Especificidade (IC a 95%)	VPP (IC a 95%)	VPN (IC a 95%)	Comparação (valor de p)
Total	43,24% (27,10 - 60,51)	98,67% (96,92 - 99,57)	76,19% (55,41 - 89,18)	94,63% (33,01 - 95,89)	0.0033
Aspirado - Brônquico	50,00% (6,76 - 93,24)	98,21% (90,45 - 99,95)	66,67% (18,51 - 94,63)	96,49% (91,16 - 98,65)	0.0233
Aspirado Transbrônquico	-	100,00% (2,50 - 100,00)	-	100,00% (2,50 - 100,00)	-
Aspirado traqueal	-	95,45% (77,16 - 99,88)	-	100,00% (83,89 - 100,00)	0.6171
Cultura	NA	NA	NA	NA	NA
Expetoração	83,33% (58,58 - 96,42)	99,24% (95,82 - 99,98)	93,75% (67,80 - 99,07)	97,74% (93,91 - 99,19)	1.0000
Lavado alveolar	-	97,73% (87,98 - 99,94)	-	100,00% (91,78 - 100,00)	0.2482
Lavado Bronco Alveolar	0,00% (0,00 - 70,76)	100,00% (91,78 - 100,00)	-	93,48% (93,48 - 93,38)	0.2482
Líquido pleural	-	100,00% (96,07 - 100,00)	-	100,00% (96,07 - 100,00)	0.4795

IC: Intervalo de confiança; NA: Não avaliado; -: Cálculo impossível de realizar por ausência de valores passíveis de divisão

Relativamente à avaliação da concordância entre os métodos observou-se que os valores entre ambos são concordantes, apresentando ambos reduzidas taxas de sensibilidade e elevadas taxas de especificidade para a técnica de *Ziehl-Neelsen*.

Desempenho da técnica de *Ziehl-Neelsen* por tipo de amostra

Ao estratificar os resultados por tipo de amostra, Tabela 4, observou-se que a sensibilidade do método *Ziehl-Neelsen*, comparando com o método *Gold Standard*, foi

maior em amostras de expetoração (80,00%, IC=51,91 – 95,67), com um VPP de 75,00% (IC=52,52 – 89,06) e menor para as de lavado broncoalveolar (0,00%, IC=0,00 – 70,76).

Para amostras de Aspirado Brônquico, a sensibilidade foi de 30,00% (IC=6,67 – 65,25), com um VPP de 100,00% (IC=29,24 – 100,00), valores ligeiramente inferiores aos obtidos para as amostras de cultura submetidas a um novo estudo para confirmação do resultado, que apresentam uma sensibilidade de 59,16% (IC=52,94 - 65,17) com um VPP de 100,00% (IC=97,65 – 100,00).

O valor de sensibilidade para lavados alveolares é de 25,00% (IC=0,63 – 80,59) com um VPP de 100% (IC= 2,50 – 100,00). Os restantes tipos de amostras (Aspirado Traqueal e Líquido Pleural) obtiveram uma sensibilidade de 0,00% enquanto que não foi possível efetuar o cálculo da sensibilidade para amostras de Aspirado Transbrônquico.

Os valores de especificidade para amostras de Aspirado-Brônquico, Aspirado Transbrônquico, cultura, Lavado Alveolar, Lavado Bronco Alveolar e Líquido Pleural foram de 100,00% com VPN variáveis, que se encontram na Tabela 4. As amostras de Aspirado Traqueal resultaram numa especificidade de 94,74% (IC= 73,97 – 99,87) com um VPN de 85,71% (IC=84,37 – 86,96) e as amostras de expetoração com 97,01% (IC=92,53-99,18) com um VPN de 97,74% (IC=94,03 – 99,17).

Em termos de sensibilidade da metodologia de *Ziehl-Neelsen* por comparação com o método de BM, Tabela 5, esta foi superior para amostras de expetoração, 83,33% (IC= 58,58 – 96,42) com um VPP de 93,75% (IC= 67,80 – 99,07), e menor para amostras de Lavado Bronco Alveolar, 0,00% (IC= 0,00 a 70,76), como se verificou em comparação com o método cultural.

Para as amostras de Aspirado Transbrônquico, Aspirado Traqueal, Lavado Alveolar e Líquido Pleural não foi possível obter-se taxas de sensibilidade.

A sensibilidade para Aspirados Brônquicos foi de 50,00% (IC=6,76 – 93,24) com um VPP de 66,67% (IC=18,51 – 94,63).

Relativamente aos valores de especificidade, em concordância com o método cultural, estes variam entre 95% e 100% para todos os tipos de amostra. Para as amostras de Aspirado Transbrônquico, Lavado Bronco Alveolar, e Líquido Pleural a especificidade é de 100,00%. Para os Aspirados Brônquicos a especificidade é de 98,21% (IC=90,45 – 99,95) com VPN de 96,49% (IC=91,16 – 98,65).

As amostras de Aspirado Traqueal apresentam uma especificidade relativamente inferior, com 95,45% (IC=77,16 – 99,88) e VPN de 100,00% (IC=83,89-100,00).

A especificidade para amostras de Expetoração e Lavado Alveolar é 99,24% (IC=95,82 – 99,98) e 97,73% (IC=87,98-99,94) respetivamente, com VPN de 97,74% (IC=93,91 – 99,19) e 100,00% (IC=91,78 – 100,00).

As amostras resultantes da segunda testagem de cultura não foram submetidas a avaliação por BM.

Discussão

Os resultados obtidos demonstram que a comparação entre a técnica de *Ziehl-Neelsen* e os métodos cultural e de Biologia Molecular (BM) é estatisticamente significativa, reforçando a pertinência desta análise para avaliar o desempenho diagnóstico da técnica de *Ziehl-Neelsen*. No entanto, quando analisadas individualmente, apenas uma das amostras apresentou valor de p inferior a 0,05 na comparação com o método de cultura (*Gold Standard*) e com o método molecular, sendo esta a amostra de aspirado brônquico. A avaliação da sensibilidade da técnica de *Ziehl-Neelsen*, comparativamente ao *Gold Standard*, revelou um valor reduzido de 58,78% (IC95%: 52,76–64,62), o que confirma a baixa capacidade de detecção de casos positivos pela técnica. Apesar disso, o valor preditivo positivo (VPP) foi elevado, atingindo 85,86% (IC95%: 88,55–89,91%), o que indica que, quando o teste é positivo, há alta probabilidade de se tratar de um verdadeiro caso de tuberculose.

Por outro lado, os resultados em comparação com a BM revelaram uma sensibilidade ainda menor, de 43,24% (IC95%: 27,10–60,51) e um VPP de 76,19% (IC95%: 55,41–89,18%), o que reforça a limitação da técnica de *Ziehl-Neelsen* na identificação de casos positivos, especialmente em comparação com métodos mais sensíveis.

Com base nesses dados, conclui-se que a sensibilidade da técnica de *Ziehl-Neelsen* aplicada às amostras respiratórias processadas no serviço de Patologia Clínica da ULSG é baixa. Isso implica um risco aumentado de falsos negativos, o que pode atrasar o início do tratamento, aumentar a transmissão da tuberculose e agravar o quadro clínico dos pacientes não diagnosticados.

Em relação à especificidade, os resultados obtidos foram elevados: 96,28% (IC95%: 94,63–97,54%) para o método cultural e 98,67% (IC95%: 96,92–99,57%) para o método molecular. O valor preditivo negativo (VPN) também foi satisfatório — 85,87% (IC95%: 84,08–87,50) para o método cultural e 94,63% (IC95%: 83,01–95,89) para o método molecular — embora este último apresente um intervalo de confiança bastante amplo, refletindo o número limitado de amostras. Com uma especificidade considerável, a técnica aplicada no serviço de patologia clínica da ULSG como método de diagnóstico, permite que a maioria dos resultados negativos sejam identificados como negativos, evitando a submissão desnecessária de pacientes a tratamentos demorados e dolorosos.

A análise por tipo de amostra revelou que, como esperado, a sensibilidade foi consistentemente inferior à especificidade em todas as categorias. Contudo, a interpretação desses resultados é limitada devido ao pequeno tamanho amostral em alguns grupos, o que inviabilizou o cálculo de certos parâmetros ou gerou estimativas pouco confiáveis. Por exemplo, taxas de sensibilidade de 0,00% foram observadas para amostras de aspirado traqueal, lavado bronco alveolar e líquido pleural com o método de cultura, e em lavados bronco alveolares com o método molecular. A amostra com melhor desempenho em termos de sensibilidade foi a de expectoração: 80,00% com o método cultural e 83,33% com o método molecular. Isso é condizente com a literatura, já que a expectoração representa a principal amostra respiratória utilizada na investigação da tuberculose e, portanto, é frequentemente mais representativa. Para culturas positivas submetidas a uma segunda sementeira (avaliadas apenas em relação ao método de

cultura), a sensibilidade foi de 59,16% e o VPP de 100%. No entanto, novamente, o baixo poder amostral limita a confiança nesses resultados.

Considerando uma taxa estimada de positividade de 10–15%, seriam necessárias cerca de 1900 amostras para garantir 95% de confiança com sensibilidade prevista de 80%. No presente estudo, foram utilizadas apenas 1005 amostras para o método de cultura e 412 para BM, indicando que os dados devem ser interpretados com cautela.

Baseando a estimativa do número de amostras na taxa de positividade alcançada com os dados recolhidos, que seria de cerca de 17,5%, para que os resultados apresentassem 95% de confiança e considerando uma sensibilidade prevista de 80%, seriam necessárias cerca de 1406 amostras, que permanece como sendo um valor de amostras superior ao conseguido para a realização do estudo, embora mais próximo do valor alcançado.

Diversos estudos referem as reduzidas taxas de sensibilidade da técnica de *Ziehl-Neelsen* como método de diagnóstico para a tuberculose, comprovada com os resultados obtidos com a execução deste estudo.

A bibliografia relativa à avaliação da sensibilidade e especificidade da técnica de *Ziehl-Neelsen* comparativamente ao método cultural e a BM é extremamente reduzida.

Um estudo de Roswidianah et al. para avaliação destes parâmetros para a técnica de *Ziehl-Neelsen* em comparação com dois métodos entre os quais o método cultural reportou uma sensibilidade de 60% (26). De entre os poucos autores que realizaram estudos comparativos para a avaliação destes parâmetros, apenas 2 realizaram um teste comparativo da técnica para o diagnóstico de tuberculose pulmonar. De entre esses dois estudos, a sensibilidade para *Ziehl-Neelsen* foi identificada como sendo de 72,1% (27) e 54,2% (28) em comparação com o método *Gold Standard*.

Um estudo de 2019 relativo a tuberculose genital, identificou ainda uma taxa de sensibilidade para o diagnóstico de tuberculose por *Ziehl-Neelsen* de 14,29% (29).

Diversos fatores são descritos como possíveis causas da baixa sensibilidade da técnica de *Ziehl-Neelsen*, incluindo a baixa concentração de bacilos álcool-ácido resistentes (BAARs), presença de fibrina mucoide nas amostras de expectoração, qualidade dos esfregaços, observação microscópica inadequada e concentração insuficiente do corante Carbol-fucsina. A literatura recomenda estratégias para melhorar esses aspetos, como o tratamento prévio da amostra com agentes mucolíticos para facilitar a visualização dos BAARs (30).

De modo a eliminar a fibrina como possível interferente, alguns autores aconselham o aumento de submissão da amostra de expectoração ao produto que pretende dissolver o muco. A qualidade dos esfregaços e a observação dos mesmos, bem como a concentração da solução de Carbol-fucsina são outros fatores descritos como potenciais causadores desta diminuição da sensibilidade da técnica (30,31).

Conclusão

Em suma, a técnica de *Ziehl-Neelsen*, embora altamente específica, apresenta sensibilidade limitada, o que reduz sua eficácia como ferramenta diagnóstica isolada para a tuberculose, especialmente em contextos clínicos nos quais a detecção precoce é essencial. A implementação de técnicas complementares, como os métodos moleculares, é recomendada para reduzir a ocorrência de falsos negativos e melhorar o rastreamento da doença, particularmente em contextos de alta carga endêmica.

A diminuição da taxa de sensibilidade da técnica de *Ziehl-Neelsen* na ULSG confirma-se e poderá advir de diversos fatores, desde a concentração de bacilos na amostra, à disseminação dos mesmos pela lâmina na execução do esfregaço, ao processamento ou à avaliação microscópica da mesma.

A aplicação de medidas que permitam solucionar ao máximo esta problemática é essencial. Visto que a falta de complexidade do estudo não permitiu a demonstração das causas, as medidas a considerar deverão ser generalistas e se necessário deverá se prosseguir com a execução de um estudo com maior complexidade que permita a determinação das causas e, desse modo, a sua correção.

Referências Bibliográficas

1. Alsayed SSR, Gunosewoyo H. Tuberculosis: Pathogenesis, Current Treatment Regimens and New Drug Targets. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 8;24(6):5202.
2. Palanivel J, Sounderrajan V, Thangam T, Rao SS, Harshavardhan S, Parthasarathy K. Latent Tuberculosis: Challenges in Diagnosis and Treatment, Perspectives, and the Crucial Role of Biomarkers. *Curr Microbiol.* 2023 Dec 27;80(12):392.
3. Villar-Hernández R, Ghodousi A, Konstantynovska O, Duarte R, Lange C, Raviglione M. Tuberculosis: current challenges and beyond. *Breathe.* 2023 Mar;19(1):220166.
4. Chai Q, Zhang Y, Liu CH. Mycobacterium tuberculosis: An Adaptable Pathogen Associated With Multiple Human Diseases. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018 May 15;8.
5. Dzodanu EG, Afrifa J, Acheampong DO, Dadzie I. Diagnostic Yield of Fluorescence and Ziehl-Neelsen Staining Techniques in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: A Comparative Study in a District Health Facility. *Tuberc Res Treat.* 2019 Apr 10;2019:1–6.
6. Swift A, Heale R, Twycross A. What are sensitivity and specificity? *Evidence Based Nursing.* 2020 Jan;23(1):2–4.

7. Monaghan TF, Rahman SN, Agudelo CW, Wein AJ, Lazar JM, Everaert K, et al. Foundational Statistical Principles in Medical Research: Sensitivity, Specificity, Positive Predictive Value, and Negative Predictive Value. *Medicina (B Aires)*. 2021 May 16;57(5):503.
8. Parikh R, Mathai A, Parikh S, Chandra Sekhar G, Thomas R. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian J Ophthalmol*. 2008;56(1):45.
9. Che-Engku-Chik CEN, Yusof NA, Abdullah J, Othman SS, Said MHM, Wasoh H. Detection of tuberculosis (TB) using gold standard method, direct sputum smears microscopy, PCR, qPCR and electrochemical DNA sensor: A mini review. *Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology*. 2016 Dec 30;4(2):16–21.
10. Aslan G. Diagnosing Tuberculosis: Traditional and New Methods Against an Old Enemy. *Journal of Clinical Practice and Research*. 2024;431–43.
11. Campelo TA, Cardoso de Sousa PR, Nogueira L de L, Frota CC, Zuquim Antas PR. Revisiting the methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis*: what has the new millennium brought thus far? *Access Microbiol*. 2021 Aug 26;3(8).
12. Wang WH, Takeuchi R, Jain SH, Jiang YH, Watanuki S, Ohtaki Y, et al. A novel, rapid (within hours) culture-free diagnostic method for detecting live *Mycobacterium tuberculosis* with high sensitivity. *EBioMedicine*. 2020 Oct;60:103007.
13. Vilchèze C, Kremer L. Acid-Fast Positive and Acid-Fast Negative *Mycobacterium tuberculosis*: The Koch Paradox. *Microbiol Spectr*. 2017 Mar 10;5(2).
14. Bhumbra U. Ziehl-Neelsen's Staining. In: *Workbook for Practical Microbiology*. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.; 2018. p. 66–66.
15. Laifangbam S, Singh H, Singh N, Devi K, Singh N. A comparative study of fluorescent microscopy with Ziehl-Neelsen staining and culture for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Kathmandu University Medical Journal*. 1970 Jan 1;7(3):226–30.
16. Saeed M, Rasheed F, Iram S, Hussain S, Ahmad A, Riaz S, et al. False Negativity Of Ziehl-neelsen Smear Microscopy: Is The Scale-up The Worth It In Developing Countries? *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*. 2018 Mar 16;28(3):201–5.
17. Agrawal M. Comparative Study of GeneXpert with ZN Stain and Culture in Samples of Suspected Pulmonary Tuberculosis. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. 2016;
18. Dzodanu EG, Afrifa J, Acheampong DO, Dadzie I. Diagnostic Yield of Fluorescence and Ziehl-Neelsen Staining Techniques in the Diagnosis of Pulmonary

Tuberculosis: A Comparative Study in a District Health Facility. *Tuberc Res Treat.* 2019 Apr 10;2019:1–6.

19. Abdelaziz MM, Bakr WMK, Hussien SM, Amine AEK. Diagnosis of pulmonary tuberculosis using Ziehl–Neelsen stain or cold staining techniques? *Journal of the Egyptian Public Health Association.* 2016 Mar;91(1):39–43.

20. Xpert MTB/RIF Ultra. 2017.

21. MDR MTB EliTech.

22. Instructions for use reagentes para PCR em tempo real do ADN MTB EXTRA ELITe MGB ® Kit.

23. OMS, Lumb Richard, Van Deun Armand, Bastian Ivan, Fitz-Gerald Mark. Laboratory diagnosis of tuberculosis by sputum microscopy : the handbook. *SA Pathology*; 2013. 84 p.

24. McNemar test calculator [Internet]. [cited 2025 Jun 16]. Available from: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/mcnemar1/>

25. MedCalc's Diagnostic test evaluation calculator [Internet]. [cited 2025 Jun 16]. Available from: https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php

26. Roswidianah E, Diana S, Anggreni D. COMPARISON OF THE SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF THE ZIEHL-NEELENSEN METHOD WITH THE MOLECULAR RAPID TEST METHOD IN THE EXAMINATION OF BTA IN THE SPUTUM OF PATIENTS SUSPECTED OF PULMONARY TUBERCULOSIS. *INTERNATIONAL JOURNAL OF NURSING AND MIDWIFERY SCIENCE (IJNMS)* [Internet]. 2025 Jan 6 [cited 2025 Jun 17];8(3):407–14. Available from: <https://ijnms.net/index.php/ijnms/article/view/637>

27. Elbrolosy AM, El Helbawy RH, Mansour OM, Latif RA. Diagnostic utility of GeneXpert MTB/RIF assay versus conventional methods for diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. *BMC Microbiol.* 2021 Dec 13;21(1):144.

28. (PDF) Conventional and molecular techniques in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a comparative study [Internet]. [cited 2025 Jun 17]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/23960386_Conventional_and_molecular_techniques_in_the_diagnosis_of_pulmonary_tuberculosis_a_comparative_study

29. Agrawal M, Roy P, Bhatia V, Dutt S, Gaur R. Role of microbiological tests in diagnosis of genital tuberculosis of women with infertility: A view. *Indian Journal of Tuberculosis.* 2019 Apr;66(2):234–9.

30. Makaen J, Maure T. Bleach Processed Smear for Acid Fast Bacilli Staining in Papua New Guinea. *Lab Med.* 2014 Nov;45(4):e140–1.

31. Kurup R, Chester K. Comparative Evaluation of Ziehl Neelsen Staining and KAP of Laboratory Personnel in Relation to Ziehl Nielsen. West Indian Medical Journal. 2014 Apr 10;