

OS BACILLOS DE HANSEN NOS TECIDOS: ASPECTO INTERESSANTE NA FIXAÇÃO PELO FORMOL (1)

DR. HUMBERTO. CERRUTI

Chefe de secção do Laboratorio Central da Santa Casa de São Paulo

E sabido em technica histo-pathologica quão difficil é a escolha de um methodo pare evidenciar bacilos alcool-acido resistentes nos *tecidos*, principalmente quando elles são pouco numerosos. Além desta difficuldade ha outra muito mais importante, em geral não bem esclarecida não só nos differentes tratados de technica histologica, como nos numerosos trabalhos especializados sobre o assumpto. Queremo-nos referir aos diversos fixadores, porquanto, se ha alguns que em nada prejudicam, ha outros mais numerosos, que lhe alteram a principal propriedade de evidencia-los, isto e, a sua alcool-acido resistencia.

Pudemos evidenciar o que acima affirmamos tomando alguns órgãos leprosos, ricos em bacilos de Hansen e fixando diversos fragmentos de cada órgão nos seguintes fixadores mais communs: alcool a 70 %, formol physiologico e neutralizado a 10 %, liquido de Zenker, Helly (Zenker-formol), Orth (Müller-formol) e Bouin.

Com o material fixado nos liquidos de Zenker, Orth e Bouin, nunca pudemos evidenciar um unico bacillo alcool-acido resistente, mesmo lançando mão de diversas technicas de coloração, inclusive a de engorduramento de J. Faraco, que reputamos a melhor, pois cora maior numero de bacillos, sendo a technica commumente usada na

(1) Trabalho apresentado na sessão de 19 de Dezembro de 1936 da Sociedade Paulista de Leprologia.

secção de Anatomia-Pathologica do Departamento da Lepra de São Paulo.
(1)

Os tecidos fixados no liquido de Helly revelaram em raros cortes e em rarissimos campos um ou outro bacillo alcool-acido resistente de Hansen, enquanto que estes tecidos fixados em outros fixadores mais proprios, como veremos mais abaixo, mostravam-se quasi que completamente cheios de bacillos.

As fixações com alcool a 70 % e com formol physiologico e neutralizado a 10 %, foram as que melhores resultados deram. O alcool a 70 %, quando a unica finalidade é evidenciar a alcool-acido resistencia dos bacillos, sem tomar em consideração as estruturas finas cellulares e as relações aos bacillos com estas, é fixador superior ao formol, porquanto não apresenta o inconveniente de produzir certos artefactos, principalmente nos órgãos mui vaccularisados.

O formol se bem que optimo fixador para os bacilos de Hansen, não é dos melhores para cytologia fina, porem bem superior ao alcool, de modo que nos casos em que se quer estudar as relações, bacillos e cellulas, é o melhor fixador que temos.

E' frequente nos cortes de tecidos fixados recentemente ou ha tempos no formol, observar-se finos precipitados crystallinos ou amorphos negros ou marron mui escuro, principalmente nas visceras muito vascularisadas ou ricas em sangue. Ainda mais esses precipitados conhecidos commumente com a denominação impropria de pigmentos de formol (melhor precipitados de formol, á se-

(1) Methodo de J. Faraco (assistente-technico do Instituto Biológico de São Paulo) para coloração de bacillos alcool-acido resistentes nos cortes em parafina: os cortes fixados nas laminas, sem retirar a parafina (melhor) ou apoz retirada pelo xylol, são engordurados com algumas gottas de banha de gallinha ou vaselina liquida (melhor a primeira) levando-os a chamma intermittenentemente ate sahida de vapores. Apoz o resfriamento enxugam-se com papel de filtro. Coram-se com fuchsina phenicada de Ziehl (solução alcoolica a 2 % de fuchsina basica 10 c.c. mais 90 c.c. de agua phenicada a 5 % a quente; sem ferver, durante 4 minutos. Lavam-se em agua e em seguida em sabão liquido puro, o tempo necessario para retirar o excesso de corante retido pela banha ou vaselina. Differeciam-se com acido sulfurico diluido ao quarto, ate que os cortes pela lavagem n'agua sejam de ar roseo claro. Lavagem prolongada, no minimo de 10 minutos, em agua corrente. Coloração de fundo pela solução acquosa de azul de methyleno a 2 % durante um minuto. Deshydratar, passar em xylol puro, não phenicado e montar em balsamo.

melhança com precipitados de sublimado, precipitados argenticos, etc.) são muito mais abundantes de accordo com Schwartz, nas cellulas do systema reticulo-endothelial em todos os casos em que ha unia reacção anticorpo antigenica como se da no schok anaphylatico nas molestias infecciosas, etc., inclusive na lepra. A composição deste precipitado não é ainda bem conhecida, entretanto a grande maioria dos tratadistas admittem a sua formação do seguinte modo: a hemoglobina pode-se transformar durante a fixação em metahemoglobina ou eventualmente em hematina, podendo-se diffundir e localizar-se nos nucleos ou outras partes das cellulas, difficultando o estudo dos pigmentos devido a estas precipitações artificiaes (Hueck, Weigert, Browicz).

Pelo estudo systematico de numerozo material leproso obtido por necropsias e fixado em formol a 10 %, pudemos constatar, sem entrar em cogitações sobre a natureza e modo de formação, estructuraes taes, principalmente no interior das cellulas de Virchow, quando localizadas nos órgãos ricos em sangue, como o bago e figado. O protoplasma destas cellulas, nos cortes fixados em alcool ou mesmo em formol, com coloração pela hematoxylina-eosina, quando não se trata de órgãos muito vascularizados, se mostra mais ou menos vacuolisado conforme o grau de riqueza de lipoides e bacillos no seu interior. O mesmo aspecto não se observa em preparados de bago e figado fixados em formol e corados pela hematoxylina-eosina, onde as cellulas de Virchow se mostram cheias de *pequenos bastonetes negros ou marrom mui escuro*, agglutinados ou esparsos, ligeiramente mais grossos ou com as mesmas dimensões dos bacillos de Hansen. Estes bastonetes ou melhor estes bacilos negros encontram-se acompanhados de bacillos alcool-acido resistentes de Hansen nos órgãos acima, quando a fixação se tenha feito algumas horas apóz a morte, tornam-se elles, entretanto, mais abundantes e únicos nas cellulas quanto maior for o tempo que medeia entre a morte e a fixação das peças.

Podemos affirmar que estes bastonetes ou bacilos negros não são senão os bacilos de Hansen completamente cobertos por precipitado de formol. Afim de comprovar esta affirmação vamos reproduzir em linhas geraes as pesquizas que fizemos.

Tomamos fragmentos de figado e de bago, cuja fixação em formol a- 10 %, havia sido feita muitas horas depois da morte e observamos quer nos cortes em congelação, quer nos cortes apoz inclusão em parafina, que não havia a presença de nenhum bacillo alcool-acido resistente, porém, exclusivamente, sob a forma de bacillos negros, quer pelo methodo do engorduramento de Faraco,

para os cortes em parafina, quer pelo methodo de Ziehl-Neelsen para os cortes em congelação. (1)

Além disso, os cortes em congelação e apóz inclusão em parafina, pela montagem em balsamo, sem tratamento previo por qualquer methodo de coloração, já mostravam a presença dos bacilos negros. Estes cortes foram tratados pela technica de Verocay (2), com a finalidade de affastar todo o precipitado de formol. Pelo exame demorado e minucioso desses preparados não pudemos entrever o menor vestigio de precipitado de formol nem de bacilos negros.

Aproveitamos, então estes cortes assim desprovidos de todo e qualquer precipitado e praticamos nos em congelação a coloração pela technica de Ziehl-Neelsen e no em parafina a technica do engorduramento de Faraco. Pudemos observar em ambos, a presença de bacillos alcool-acido resistentes, porém em numero menor e com a morphologia mais fina e delicada, comparativamente com os cortes obtidos pelos mesmos methodos (inclusão e coloração) mas fixados em alcool a 70 %. Neste particular encontramos até certo ponto a confirmação disto, no tratado de technica de Schmorl: "Quando se queiram fazer colorações de bacterias, especialmente com o methodo de Gram, devemos tomar cuidado em usar a mistura alcool-potassa, porque, segundo minha experiencia, a resistencia ao alcool das bacterias coradas pode ser, por ella muito alterada". Para confirmarmos os nossos achados e a opinião de Schmorl, lançamos mão, de cortes fixados em alcool (que haviam revelado, com a technica commum grande quantidade de bacillos alcool-acido resistentes, com os seus caracteres morphologicos nor-

(1) Methodo de Ziehl-Neelsen para cortes em congelação: apoz fixação dos fragmentos durante um ou mais dias em solução physiologica neutralizada de formol a 10 %, praticam-se cortes em congelarão, o duaes são collocados durante 10 minutos em agua phenicada a 5 %, permanecem, em seguida durante 24 horas na fuchsina phenicada de Ziehl (solução alcoolica a 2 % de fuchsina basica 10 c.c. mais 90 c.c. de agua phenicada a 5 %). Os córtes são lavados em agua e descorados durante uma hora mais ou menos no acido sulfurico a 25 %. Nova lavagem em agua, collocando-os depois durante uma hora na seguinte solução: azul de methyleno 2,0 grs., acido sulfurico 25 c.c. e agua distillada 75 c. c.. Deshydratar passar em xylol puro, não phenicado e montar em balsamo.

(2) Methodo de Verocay: os cortes são collocados durante 10 minutos na seguinte solução: 1 c.c. de potassa caustica fundida ou em pastilhas em solução acquosa a 1 % mais 25 c.c. de alcool a 80 %. Lavam-se por duas vezes em agua, 5 minutos de cada vez e passam-se para o alcool a 80 %, durante 5 minutos. Nova lavagem demorada em agua.

maes) e os tratamos pelo methodo de Verocay e em seguida os coramos pela technica de Faraco. Pudemos observar, comparativamente com os anteriores, que nestes os bacillos se apresentavam em menor numero e com os seus caracteres morphologicos não muito bem conservados.

Considerando, finalmente, o que encontramos no tratado de Schmorl: "Assim tambem, as vezes não se obtem a coloração dos bacillos tuberculosos com o methodo de Ziehl, em preparados que tenham permanecido por muito tempo na formalina ou na mistura de Kaiserling. Parece, em geral que a este respeito as diversas marcas de fabrica da formalina se comportam diversamente. Segundo Fahr a formalina de Schering não prejudica a coloração dos bacillos tuberculosos. As indicações do autor, considerando a acção nociva da formalina sobre a coloração dos bacillos tuberculosos, se estriba sobre experiencias feitas com o uso de formalina de Gehe", podemos encontrar nos bacillos negros a explicação dos numerosos insuccessos, porquanto estamos habituados a pesquisar bacillos alcool-acido resistentes e não bacillos enegrecidos pelo precipitado do formol.

RESUMO

O autor considera que os liquidos de Zenker, Bouin, Orth-Müller e Helly são maus fixadores, quando se quer estudar os bacillos nos tecidos, O alcool a 70 % e o formol physiologico neutralisado a 10 % são os melhores fixadores para manter a propriedade alcool-acido resistente dos bacillos. Resalva, entretanto, que a fixação por este ultimo, quando feita em órgãos mui vascularizados como no figado e baço, a grande maioria dos bacillos se mostram negros ou marron muito escuro, devido a serem envoltos pelo precipitado de formol. Estes bacillos negros são tanto mais numerosos quanto maior fôr o tempo que medeia entre a morte do paciente e a fixação das peças.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus seinen Untersuchungen schliesst der Verfasser, daas die Fixierungs-methoden nach Zenker, Bonin, Orth-Müller und Helly fuer den nachfolgenden Bazillennachweis im Gewebe nicht zweckmaessig sind. Alkohol (70 %) und Formol in physiologischer, neutralisier-ter 10%iger Lösung stellen dagegen ausgezeichnete Fixierungsmittel dar, welche am besten die sauresten Eigenschaften der Bazillen erhalten. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass bei der Fixierung mit Alkohol oder Formol in sehr gefaess- und blut-reichen Organen (z. B. Leber und Milz) zahlreiche Bazillen sch-

warz bzw. dunkelbraun erscheinen, da sie sich leicht mit Formalinpigment impraegnieren. Diese Schwarzfaerbung der Bazillen wird um so haufiger beobachtet, je laengere Zeit zwischen Tbd and Fixierung des Gewebes vergangen ist.

SUMMARY

The author believes that Zenker's, Bouin's, Orth-Müller's, and Helly's fluids are bad fixators when it is desired to study the bacilli in the tissues. Alcohol at 70% or neutral physiologic formol at 10% are the best in maintaining the alcohol-acid resisting character of the bacilli. It is to be noted, however, that in fixation by the latter, when in vascular organs such as liver or spleen, the great majority of bacilli appear black or very dark brown (bacillos negros) due to their being enveloped by the formol precipitate. The greater the interval between the death of the patient and the fixation of the specimens, the greater the number of bacilli that appear.

Nova!

NÃO HA MAIS DUVIDAS EM
CASOS DE SEPTICEMIA!

○ novo quimioterapico

PRONTOSIL

revelou resultados surpreendentes em todos os acessos febris provocados por infecções estreptococicas e estafilococicas.

Indicações: Septicemia, cistites e pielites, poliartrites, angina, escarlatina, erisipela, septicemia post-partum e post-abortum.



A Chimica »Bayer«

Embalagem original:

Tubo com 20 comprimidos de 0,30 gr.

Caixa com 5 ampolas de 5 cc. da sol. a 2,5%

Para
a calcioterapia por via oral

SELVORAL

Sal calcico do citrato de glucohexite.

PREPARADO DE CALCIO,
insipido, facilmente soluvel, de rapida
absorção e ótimo aproveitamento.

Vidros de 50 e 100 grs.



A Chimica »Bayer«



CALCIOPANI

= GOTTAS =

FORMULA:
 Cada 40 gottas (dose para adultos) contem:

Clorureto de calcio	0.40	centigr.
Lacto-phosphato de calcio	0.27	centigr.
Arseniato de sodio	0.0007	decimil.
Extracto de glandulas tyroide	0.0007	decimil.
Extracto de bago	0.017	milligr.
Glycerina	q.s.p.	centigr.
Vanilina	q.s.p.	arom.
Agua distillada	q.s.p.	XI gottas

SOC. DE PROD. PHARMACEUTICOS

PAN L^{TD}A

TELEPHONE: 2-7433

CAIXA POST. 1874

