

# **BACILLOS DE HANSEN E CORTES DE PARAFINA**

## **Methodo complementar para a pesquisa de bacillos de Hansen em cortes de material incluido em parafina**

**JOSÉ FARACO**

Auxiliar tecnico do Instituto Biologico

Ao sabermos dos resultados falhos que apresenta a pesquisa de bacillos de Hansen em cortes de material incluido em parafina, tivemos a oportunidade de nos valer de um conhecimento adquirido em 1927, no Laboratorio Central da Santa Casa de Misericordia, quando em ensaios para a coloração das granulações de Cardoso Fontes, nos affastavamos do methodo deste Autor, fazendo uso de substancias desengordurantes. Procuravamos nessa ocasião, distinguir com maior nitidez a electividade tinctorial dos elementos contidos nos bacilos de Koch, para o que, pudemos instituir uma technica que nos satisfez plenamente.

Nesses ensaios de coloração das granulações, empregavamos esfregaços de escarro contendo bacillos de Koch e usavamos como desengordurantes, o ether e o xylol.

No decorrer das tentativas, ao desejarmos obter bacillos corados pelo methodo de Ziehl-Neelsen e servindo-nos de um esfregaço utilizado previamente e sem resultado satisfactorio para a coloração de granulações, notamos com extranheza durante a pesquisa, a ausencia de bacillos alcool-acido resistentes.

Na analyse ligeira do succedido pudemos deduzir que esta negatividade podia ser attribuida a um desengorduramento dos bacillos, e no caso o desengordurante usado havia sido o xylol.

Com esta hypothese, pareceu-nos interessante e até certo ponto necessario comprovarmos tal presumpção, sendo que neste sentido fomos muito felizes logo ao primeiro ensaio, pois, procedendo a um engorduramento do esfregaço com um óleo existente no Laboratorio e seguindo estrictamente a technica de coloração pelo methodo de

Ziehl, pudemos observar na nova pesquisa, a volta aos bacillos dos seus caracteres colorativos pouco antes ausentes.

Ha cerca de trez anos fomos levados a applicar com interesse, por um facto decorrente de nossos serviços de auxiliar da Secção de Anatomia Pathologica do Instituto Biologico, o que haviamos aprendido com a observação feita anteriormente, a qual até então não tinha tido uma applicação util dada a diversidade de nossos serviços.

A proposito dos resultados falhos commumente obtidos na pratica, ao fazer-se a pesquisa de bacilos de Hansen em cortes histologicos contendo esses germens, foi-nos facil pelo que já expuzemos, deduzir que a causa desse inconveniente era o desengorduramento do material, occorrido durante o processo de inclusão em parafina, como nos foi dado comprovar.

Se para essa inclusão de material, temos a necessidade da sua passagem atravez de xylol e parafina — xylol aquecido — e esta apresenta o inconveniente de acarretar uma substancia fundamentalmente necessaria aos germens para a sua coloração, este meio de inclusão nos pareceu deixar muito a desejar. Dahi a realização dos nossos ensaios de engorduramento afim de julgarmos da conveniencia deste recurso como complementar ou mesmo como indispensavel á pesquisa de bacilos alcool-acido resistentes em se tratando de material suspeito e prejudicado pelo methodo de obtenção de cortes.

Este recurso nos apresentou vantagens e cremos ser de bõa pratica a sua applicação.

Considerando-se a diaphanisação e impregnação como extractoras, estes tempos da technica merecem especial cuidado, pois é da intensidade de seus effeitos que depende a variação dos resultados obtidos na pesquisa. Como a diaphanisação e impregnação dependem do tamanho, da consistencia e da fixação do material, torna-se difficil a apreciação dos resultados quer quando negativos quer quando positivos. Sabemos contudo que o minimo de permanencia em xylol e o minimo em temperatura durante a impregnação, diminuem o inconveniente ou seja a causa de erro, obtendo-se um material apenas diminuido na sua riqueza em bacillos corados.

Se a uma pesquisa positiva, o numero diminuido de bacillos encontrados pode não lhe alterar o valor, por ser feita apenas para evidencial-os, não se poderá dizer o mesmo quando a ella recorremos para uma apreciação quantitativa dos mesmos. Accresce ainda que uma pesquisa negativa, tanto pôde representar uma pobreza de bacillos cujos caracteres tinctoriaes tenham sido prejudicados no decurso da inclusão, como um material que contendo-os, mesmo em grande numero, tenha sido incluido em condições technicas desfavoraveis . Por esse motivo a razão de apresentarmos este methodo com a designação — "Methodo Complementar" .

Ao entrarmos em detalhes da technica de coloração com engorduramento, devemos dizer que empregamos durante os ensaios, gorduras de varias procedencias a saber: Oleo Singer para machinas, oleo de olivas, gordura de gallinha, oleo grosso para motores, oleo de capivára e oleo de ligado de bacalhão e nas seguintes condições:

1) - Remoção da parafina do corte por meio de xylol. 2) - Substituição completa do xylol por meio da gordura renovada. 3) - Aquecimento moderado e intermitente da gordura sobre o corte. 4) - Resfriamento. 5) - Escoamento e remoção do excesso de gordura com auxilio de matta-borrão ou papel de filtro liso até que o corte se torne opaco. 6) - Coloração a quente pelo methodo de Ziehl. 7) - Lavagem em agua. 8) - Retirada do excesso de corante devido a gordura retida pelo corte, em sabão liquido puro ou pouco diluido. 9) - Lavagem em agua abundante e diferenciação em alcool a 70%. 10 - Lavagem em agua e diferenciação em acido sulphurico a 25%. 11) - Lavagem em agua corrente e contraste com azul de methyla ou azul de methyleno de Loeffler diluido. 12) - Deshydratação com alcool absoluto, alcool absoluto-xylol, xylol puro. 13) - Montagem em balsamo do Canadá de preferencia neutro.

Lembramos que a gordura emprestada aos bacillos para a sua coloração, é acarretada durante a diaphanisação em xylol e montagem em Balsamo, não permittindo por isso o posterior aproveitamento do corte para melhorar uma coloração par qualquer motivo fracassada. Para tanto é necessario um reengorduramento.

Procuramos na coloração com engorduramento, eliminar tanto quanto possivel o excesso de gordura de corte, o que preferimos fazer em duas vezes e de maneira a não comprometter a eficiencia deste artificio. Assim é que procedemos a uma retirada mechanica logo de inicio e a outra após a coloração, por meio de sabão, fugindo aos desengordurantes energeticos como sejam: alcool-ether, ether, etc. que, conquanto possam fornecer preparados de melhor aspecto microscopico, nos pareceram pouco seguros.

Os ensaios feitos de accordo com a technica acima descripta forneceram os seguintes resultados:

- a) Material suspeito de lepra, negativo á pesquisa de bacillos de Hansen pelo methodo classico de Ziehl-Neelsen. A pesquisa após engorduramento revelou a presença de numerosos bacillos.
- b) Material francamente positivo á pesquisa de bacilos de Hansen pelo methodo commum. Após engorduramento, a pesquisa revelou maior riqueza de bacillos.
- c) Material positivo á pesquisa pelo methodo commum, rico em bacillos. Este material foi obtido nas melho-

res condições técnicas possíveis (tempo mínimo de diaphanização e temperatura mínima durante a impregnação). Estufa 57°C. Ponto de fusão da parafina 56-58°C. Procedendo-se ao engorduramento verificou-se uma positividade mais intensa, havendo também uma modificação no aspecto, resultante da distribuição topográfica dos bacilos.

Como testemunho dos resultados satisfatórios do método adoptado, referimos a opinião emitida por H. Cerruti, do Laboratorio de Anatomia Pathologica do Departamento da Lepra de São Paulo (1) .

NOTA: Este trabalho teve a sua realização, graças a contribuição do Dr. Humberto Cerruti que com solicitude e estímulo nos forneceu todo o material que necessitámos e do Dr. J. R. Meyer cuja dedicada orientação permittiu a sua publicação.

Aos dignos cientistas, apresentamos portanto, reconhecidamente gratos, o nosso esforço.

(1) **H. Cerruti:** Os bacilos de Hansen nos tecidos. Aspecto interessante na fixação pelo formol. - Revista Brasileira de Leprologia - V. IV - p. 441, 1936.

### **ABSTRACT**

The author recommend a complementary method to research Hansen bacilli in histological sections obtained from embedded paraffin material.

He could observe that the clearing material through xylol and the molten paraffin bath at the thermostat takes out the fat compounds of numerous bacilli. In this manner they become no acid and alcohol fast and consequently the amount of bacilli showed by Ziehl-Neelsen stain can not represent estimative results.

The method that has rendered the best results, depends upon a greasing of the sections before staining as so on the paraffin is removed. This greasing is obtained as follows:

- 1) - Removing of the paraffin of sections with xylol.
- 2) - Entire substitution of xylol by several drops of olive oil or others grease as "Singer oil, heavy engine oil, etc."
- 3) - Heating the sections with the covering oil, moderately and intermittingly.
- 4) - Renewing of the oil and heating two or three times.
- 5) - Cooling and complete removal of the oil with smooth blotting of filter-paper until the sections becomes opacus.
- 6) - Stain at warm with Ziehl-Neelsen carbol-fuch-sin.
- 7) - Washing in tuning water and removal of the stain retained by the excess of oil through dilute or pure liquid soap.
- 8) - Rinsing in water and 70% alcohol.
- 9) Rinsing in water and treatment with 25 per cent sulfuric add.
- 10) - Washing in water and counterstaining with dilute Loeffler methylen blue or methyl blue.
- 11) - Drying with filter paper.
- 12) - Deshydratation in 95% alcohol, absolute alcohol, in a mixture of equal parts of absolute alcohol and xylol, pure xylol and mounting in neutral Canada Balsam.