

*Valor do Método de Faraco para Coloração do Bacilo de Hansen em Cortes **

J. LOPES DE FARIA

Livre-docente.

Faraco apresentou um processo de coloração para o bacilo de Hansen, em cortes de parafina, que revelava maior número de bacilos que o método clássico de Ziehl-Neelsen. O seu processo é apenas uma modificação deste método. Consiste em tratar o corte, antes de corar pela fucsina, por uma substância gordurosa, ou oleosa, de natureza variada: gordura de galinha, parafina líquida ou diversos óleos (óleo "Singer" para máquinas, óleo de fígado de bacalhau, óleo de olivas). Pensava que, com este artifício, compensasse o desengorduramento do bacilo, produzido pelo álcool e xilol, no processo de inclusão. De fato, a ácido-resistência depende em parte dos lapides do bacilo, sendo a porção insaponificável de sua cera ácido-resistente (13) . Por isto, aconselha-se evitar, antes da coloração pela fucsina, tanto quanto possível, a ação de solventes de gordura (11) . Cerruti e Fite empregaram o método de Faraco e reconheceram o seu valor. Entretanto, tanto eles, como o autor original, não disseram qual a técnica adotada para avaliar o maior número de bacilos. Resolvemos experimentar o processo, comparando-o com o de Ziehl-Neelsen clássico.

Material e técnica — Em um ensaio preliminar (7) , empregamos o método de Faraco, em 36 casos de lepra, pobres em bacilos, assim distribuídos: lepra lepromatosa, 7; lepra tuberculóide, 11; reação leprótica tuberculóide, 1; lepra incaracterística, 17. Em cada caso, examinavam-se: a) um preparado corado segundo a técnica de Faraco, contando-se o número de bacilos existentes em todas as lesões, quando raras, ou em 20 a 40 campos microscópicos (objetiva de imersão), quando numerosas; b) um outro preparado, obtido segundo o método clássico de Ziehl-Neelsen, cujos corte eram próximos daqueles do preparado anterior e examinados do mesmo modo.

(*) Trabalho do Departamento, de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo e da Colônia Santa Isabel (Minas Gerais).

Ultimamente, usamos a técnica de Faraco em 8 lesões de 6 pacientes lepromatosos, num lepromatoso em transformação tuberculóide e em numerosas reações de Mitsuda, em tempos diversos de sua evolução, de 14 doentes de lepra tuberculóide (8). Neste trabalho, figuram somente os resultados da pesquisa de bacilos numa única reação de Mitsuda de 6 dos pacientes. (Em todas as demais reações, obtivemos resultado igual). Nestes e nos lepromatosos, examinavam-se os mesmos cortes, corados primeiramente pelo método de Ziehl-Neelsen e posteriormente, sem descoloração, pelo de Faraco, registrando, num e noutro processo, o grau de positividade com cruces (Tab. 1).

TABELA 1. Comparação entre o método de Ziehl-Neelsen e o de Faraco.

TABLE 1. Comparative results of the Ziehl-Neelsen and Faraco staining methods.

Biopsias n.os	Ziehl-Neelsen	Faraco	Lesão
163	0	++++	Lepra lepromatosa (1. ^a biopsia)
227	++	++++	Lepra lepromatosa (2. ^a biopsia)
173	+	++++	Lepra lepromatosa (1. ^a biopsia)
235	++	++++	Lepra lepromatosa (2. ^a biopsia)
180	+	++++	Lepra lepromatosa
223	+	++++	Lepra lepromatosa
225	++	++++	Lepra lepromatosa
242	+	++++	Lepra lepromatosa
122	0	++++	Reação de Mitsuda
207	+	++++	Reação de Mitsuda
213	++	++++	Reação de Mitsuda
221	+	++	Reação de Mitsuda
231	0	++++	Reação de Mitsuda
236	+	++++	Reação de Mitsuda
247	0	++	Lepra lepromatosa em transformação tuberculóide

Designações: 0 = nenhum bacilo; + = raros bacilos; ++ e +++ = moderada quantidade; ++++ = enorme quantidade de bacilos.

0 = no bacillus; + = scarce bacilli; ++ and +++ = a moderate number of bacilli; ++++ = an enormes number of bacilli.

A técnica de preparação dos cortes, foi a seguinte (Faraco):

- 1 - Fixação em formol a 10%. Inclusão em parafina segundo técnica usual. Cortes de 4 a 6 micra.
- 2 - Remoção da parafina do corte pelo xilol. Passagem nos alcoois e lavagem nágua.
- 3 - Tratamento pela vaselina líquida (*MERCK*), depositada sobre os cortes e aquecida intermitentemente, até a saída de vapores. Esperar esfriar.
- 4 - Enxugamento em papel de filtro, até que o corte se torne opaco.
- 5 - Coloração a quente com a fucsina (Ziehl-Neelsen).
- 6 - Lavagem em água.
- 7 - Lavagem em sabão líquido puro, ou pouco diluído.
- 8 - Lavagem em água abundante e passagem rápida em alcool a 70%.
- 9 - Lavagem em água e diferenciação em ácido sulfúrico a 25%, até a côr róseo-clara pela *lavagem em água* (Neste tempo, é necessário cuidado, porque é muito rápida a diferenciação, sendo preferível que o corte fique com mais tonalidade vermelha do que clara).
- 10 - Lavagem em água corrente, no mínimo 10 minutos.
- 11 - Coloração leve com azul de metileno, sendo preferível que o corte fique róseo-azulado e não só azul.
- 12 - Alcool absoluto. Xilol. Montagem em balsamo, de preferência neutro.

E' conveniente notar que a pesquisa de bacilos se fez nos 36 primeiros casos logo depois da biopsia, ao passo que nos demais foi feita no material incluído há 5 anos.

RESULTADOS

Nos 36 pacientes com lesões pobres em bacilos, a pesquisa dos mesmos foi positiva em 10 no método de Ziehl-Neelsen e em 14 no de Faraco. Quando havia positividade em ambos os processos, a técnica de Faraco, revelou maior número de bacilos que a de Ziehl-Neelsen. A tabela 1 apresenta os resultados nas lesões dos pacientes lepromatosos e nas reações de Mitsuda dos casos tuberculóides. (*Fig. 1 e 2*).

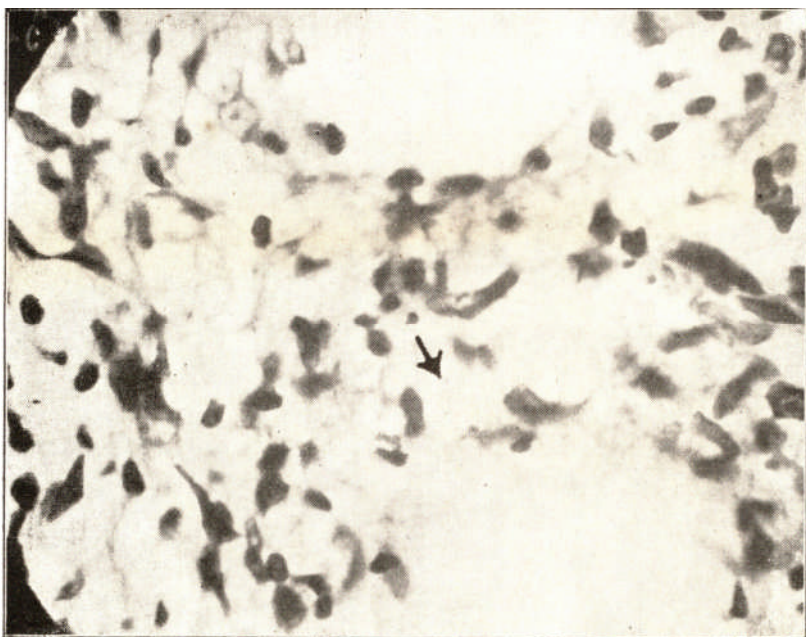
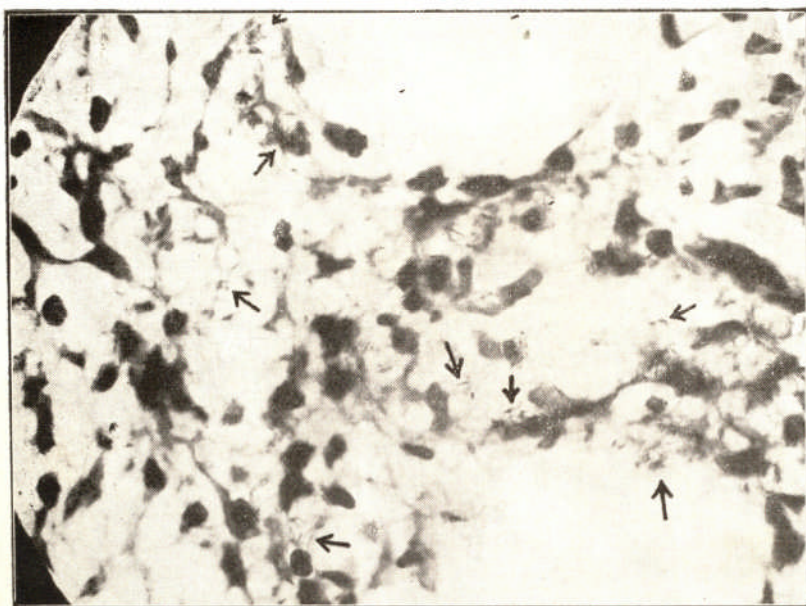


FIG. 1 — Caso de lepra lepromatosa (n.º 242). Notar um único bacilo corado (seta). Ziehl-Neelsen. 950 x.
 A lepromatous case (n.º 242). Notice only one stained bacillus (arrow). Ziehl-Neelsen staining. x 950.



FIG" 2 — O mesmo campo da figura 1, após coloração pelo método de Faraco. Observar o grande número de báculos corados, isolados e em globias 950 x.
 The same field of the last figure, stained with the Faraco's procedura. Observe a large number of stained bacilli, isolated and in globi. x 950

DISCUSSÃO

Faraco e os autores que empregaram o seu método não discutiram por que mecanismo atuaria a gordura ou o óleo para revelar maior número de bacilos corados. Muito provavelmente a sua ação não é química, uma vez que a substância empregada pode ser de natureza diferente e não substitue os lípidos removidos do bacilo pelos solventes das gorduras, usados na técnica de inclusão. É mais provável que atue por mecanismo físico ou físico-químico, porque a ácido-resistência depende também da estrutura física do bacilo, desaparecendo pela simples trituração em geral (12). Também, bactérias não ácido-resistentes adquirem a ácido-resistência pelo contacto com substâncias gordurosas (2, 10). Um outro fator que influe na ácido-resistência é a idade dos bacilos, sendo o bacilo jovem ou velho pouco ácido-resistente (13). É possível por isto que o método de Faraco seja mais efetivo em certos casos que dá melhores resultados nas lesões lepromatosas idosas, onde existem bacilos não ácido-resistentes (11), cuja ácido-resistência é estabelecida pelo engorduramento (2, 10). Apóia esta afirmativa o fato, verificado em nosso material: a perda da ácido-resistência de muitos bacilos em material conservado em bloco de parafina há 5 anos, usando-se o método de Ziehl-Neelsen (Tab. 2) e a falta de alteração desta propriedade pelo emprego da técnica de Faraco. Isto significa que os bacilos tornados não ácido-resistentes recuperaram esta qualidade pela ação da vaselina líquida.

Na tabela 2, está registrado um outro fato, não constante, verificado por nós (8) — a conservação da ácido-resistência dos bacilos em cortes feitos há 5 anos, colados em lâmina com gelatina e não corados; no mesmo material, porém, mantido em bloco de parafina, muitos bacilos perderam a ácido-resistência, como há pouco referido. Não sabemos qual a causa da conservação da ácido-resistência nos cortes antigos e a sua perda no material conservado em bloco. A luz solar não interferiu (5), porque tanto os cortes antigos, como os blocos de parafina ficaram em caixas fechadas, ao abrigo de luz.

RESUMO

O autor fez um estudo comparativo entre o método clássico de Ziehl-Neelsen e o de Faraco, para a coloração do bacilo de Hansen em cortes de parafina. Empregou o seguinte material: 36 casos de lepra pobres em bacilo; 8 lesões lepromatosas ricas em bacilo e lesões de grande número de reações de Mitsuda. Nos 36 primeiros pacientes; a pesquisa de bacilo foi positiva em 10 no método de

TABELA 2. Pesquisa de bacilos pelo método de Ziehl-Neelsen clássico, em cortes antigos e recentes de material incluído há 5 anos.

TABLE 2. Search for Hansen bacillus which the classical Ziehl-Neelsen's method in old and in recent sections taken from material emhedded 5 years ago.

Biopsias n.os	Ziehl-Neelsen	Faraco	Lesão
117	++	++++	Lepra lepromatosa
159	++++	+++	Lepra lepromatosa
226	++++	+++	Lepra lepromatosa
232	++++	+++	Lepra lepromatosa
122	+	0	Reação de Mitsuda
188	++++	++	Reação de Mitsuda
211	++++	+	Reação de Mitsuda
200	++++	++	Reação de Mitsuda
210	+++	+	Reação de Mitsuda
217	+++	+	Reação de Mitsuda
218	++++	+	Reação de Mitsuda

Quanto à indicação dos sinais, ver a tabela 1.

For the meaning of the signs, see table 1.

Ziehl-Neelsen e em 14 no de Faraco. A tabela 1 apresenta os resultados nos casos lepromatosos e em algumas lesões das reações de Mitsuda, mostrando a positividade muito maior com o processo de Faraco (Fig. 1 e 2) . Reconhece maior valor neste processo, admitindo, porém, que seja mais efetivo nas lesões lepromatosas idosas. Nestas existem muitos bacilos não ácido-resistentes (11) , cuja ácido-resistência é restabelecida pelo engorduramento (2, 10). Acha que a ação da substancia gordurosa, ou oleosa, no processo de Faraco, seja por mecanismo fisico ou fisico-químico.

O autor observou, empregando o método clássico de Ziehl-Neelsen, a perda da ácido-resistência de vários bacilos em material conservado em bloco de parafina há 5 anos (Tab. 2) ; e inalteração desta propriedade nos cortes do mesmo material, não corados, pegados em lâmina, feitos na ocasião da inclusão. Com o processo de Faraco, porém, não notou alteração da ácido-resistência, apresentando igual número de bacilos corados tanto os cortes antigos, como os recentes do material conservado em bloco. (Ambos os cortes foram tomados de pontes próximos do bloco).

CONCLUSÕES

- 1 — E' preferível o processo de Faraco ao de Ziehl-Neelsen, para a coloração de bacilos de Hansen em cortes de parafina, porque revela maior número de bacilos.
- 2 — Fica por esclarecer o mecanismo de ação da substância gordurosa, ou oleosa, no método de Faraco. Deve ser física ou fisico-químico.
- 3 — No método de Ziehl-Neelsen, em material conservado em bloco de parafina há 5 anos, ocorre a perda da ácido-resistência de muitos bacilos, a qual se conserva em cortes não curados. Com o método de Faraco, não se observa esta alteração da ácido-resistência.

VALUE OF THE FARACO'S METHOD FOR THE STAINING OF THE HANSEN BACILLUS IN PARAFFIN SECTIONS. SUMMARY.

The author has made a comparative study between the Ziehl-Neelsen's and the Faraco's methods for the staining of the Hansen's bacillus in paraffin sections. He employed the following material: 36 leprosy cases with few bacilli; 8 lepromatous lesions with many bacilli and lesions of a large number of Mitsuda's reactions. In the first series of patients, the search for the bacillus was positive in 10 out of 36 cases using the Ziehl-Neelsen's method; using the Faraco's method a positivity was evidenced in 14 out of the 36 cases. Perusal of table 1 shows a much greater positiveness with the Faraco's technic in the lepromatous cases and in a few representative lesions of Mitsuda's reactions (Fig. 1 and 2). The author recognizes the greater value of the Faraco's method, believing, however, that it is more efficacious in old lepromatous lesions. These lesions contain many no acid-fast bacilli (11), the acid-fastness of which is reestablished by their greasing (2,10). He admits that the fatty or oil substance used in the Faraco's technic acts through physical or physicochemical mechanismus.

Using the classical Ziehl-Neelsen method, it was observed that, in a material kept embedded in a paraffin block during 5 years, many acid-fast bacilli had lost their acid-fastness. The same material, however, kept during the same period, but already sectioned and attached to the slide, showed its acid-fastness unchanged. With the Faraco's technic even the tissue kept in the paraffin block remained unaltered. (Table 2).

CONCLUSIONS

1 — The Faraco's method for the staining of the Hansen's bacilli in paraffin sections, is preferable to the Ziehl-Neelsen's technic, because it reveals a larger number of bacilli.

2 — It remains to be cleared up the acting mechanismus of the fatty or oily substance used in the Faraco's technic. It may be physical or physicochemical.

3 — With the Ziehl-Neelsen's method, it was observed a loss of the acid-fastness of many bacilli in a material kep embedded in a paraffin block during 5 years; in the unstained sections of the same material, however, the acid-fastness remained unchanged. With the Faraco's technic, the acid-fastness was always present.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ANDERSON, R. J.: **The chemistry of the lipolds of tubercle bacilli**, *Physiol. Rev.* 12:166, 1932.
- 2 — CABELL, L.K.: **On the production of acid-fastness in non acidfast bacilli**, *Am. Rev. Tuberc.* 11:450, 1925.
- 3 — CERRUTI, H.: **Os bacilos de Hansen nos tecidos: aspecto interessante na fixação pelo formol**, *Rev. brasil. de leprol.* 4:441, 1936.
- 4 — DARZINE, E.: **Recherches sue les bacilles paratuberculeux de Moeller et de Grassberger**, *Ann. Inst. Pasteur* 49:743, 1932.
- 5 — DHARMENDRA e MUKERJEE, N.: **Effect of sunlight on the staining properties of the leprosy bacillus**, *Internat. J. Leprosy* 16:298, 1948.
- 6 — FARACO, J.: **Bacilos de Hansen e cortes de parafina. Método complementar para a pesquisa de bacilos de Hansen em cortes de material incluído em parafina**, *Rev. brasil. de leprol.* 6:177, 1938.
- 7 — FARIA, J. L. de: **Sôbre coloração do bacilo de Hansen em corte de material incluído em parafina. Ensaio comparativo entre o método de Ziehl-Neelsen e o método complementar de Faraco**. (Trabalho comunicado na Sociedade Mineira de Leprologia, em 17 de Julho de 1943).
- 8 — FARIA, J. L. de: **Contribuição ao conhecimento da natureza da reação de Mitsuda**. (No prelo) .
- 9 — FITE, G. L.; CAMBRE, P. J. e TURNER, M. H.: **Procedure for demonstrating lepra bacilli in paraffin sections**, *Arch. Path.* 43: 624, 1947.
- 10 — HOLMAN, W. L.: **An error in acid-fast and Gram staining due to petrolatum**, *Arch. Path.* 1:390, 1926.
- 11 — KLINGMÜLLER, V.: **Die Lepra**, *Handb. d. Haut- u. Geschlechtskrankh.*, J. Jadassohn, Berlin, Julius Springer, X. Band, 2. Teil, 1930, pag. 16 e 95.
- 12 — RICH, A. R.: **The pathogenesis of tuberculosis**, *Spring-field, Illinois*, Charles C. Thomas, 1944, pag. 13.
- 13 — WELLS, H. G. e LONG, E. R.: **The chemistry o ftuberculosis**, ed. 2, *The Williams e Wilkins Company, Baltimore*, pag. 122-139, 1932.