

DEMONSTRAÇÃO DO *M. LEPRAE* EM CORTES EM 532 CASOS DE LEPRA

Estudo comparativo das técnicas de Ziehl-Klingmüller e Ziehl-Wade-Klingmüller *

R. D. AZULAY **

LYGIA M. C. ANDRADE ***

Aqueles que estão habituados aos trabalhos de rotina histopatológica em lepra, sabem das dificuldades que existem na demonstração do *M. leprae* em cortes. A dificuldade dessa pesquisa tornou-se ainda maior com os resultados do tratamento sulfônico; aliás, em trabalho com H. Portugal¹ demonstramos o valor do método de Gram-Weigert nessa pesquisa. Daí a necessidade de melhorar a técnica, que tem sido feito por vários autores ^{2, 3, 4, 5, 6 e 7.}

Não há dúvida de que a álcool-ácido-resistência dos germens do gênero *Mycobacterium* depende da presença de substâncias lipídicas na sua constituição. Sabe-se, também, que grande parte dessas substâncias lipídicas é extraída por produtos como o álcool, xilól, etc., usados na técnica histológica de rotina; esse fato tem sido responsabilizado pela perda total ou parcial da álcool-ácido-resistência do *M. leprae*, quando a sua pesquisa é feita em cortes em parafina. Para obviar esses inconvenientes há dois princípios fundamentais muito bem estudados recentemente por Wade ^{6.}

1 — *Princípio da restauração da álcool-ácido-resistência dos germens.* — A idéia de restaurar a álcool-ácido-resistência dos germens pertence a Faraco²; êste, em 1938, apresentou a sua técnica que visava reengordurar os germens pelo tratamento a quente com certas substâncias gordurosas, antes da coloração pela fuchsin. Baseado no mesmo princípio, surgiu em 1947 o método de Fite, Cambre e Turner ⁵, ao qual Lillie ⁸ chama de método de Fite-Faraco.

* Trabalho realizado no Instituto de Leprologia (Chefe: Dr. João B. Risi) do Serviço Nacional de Lepra (Diretor: Dr. Ernani Agrícola), Brasil. Apresentado ao VI Congresso Internacional de Leprologia, realizado em Madrid, 3-7 de outubro de 1953.

** Encarregado da T.A.P. do I.L., Docente-Livre de Clínica Dermatológica e Sifiligráfica nas Faculdades: Fluminense de Medicina (Prof. Paulo Parreiras Horta), Nacional de Medicina (Prof. F. E. Rabello) da Univ. do Brasil e de Ciências. Médicas (Prof. H. Portugal) da Univ. do Distrito Federal.

*** Técnico de Laboratório do Instituto de Leprologia.

2 — *Princípio da proteção da álcool-ácido-resistência dos germens.* — Wade ⁷ no seu recente artigo (1952), reivindica para si a prioridade desse princípio já usado por ele, porém não publicado, há mais de 25 anos. Consiste no uso de óleos essenciais (óleo de bergamota ou de oregão) para a desparafinização e para a desidratação e clarificação depois da coloração. Recentemente, a técnica histológica tem melhorado pela introdução de certos polietileno-glicóis que permitem uma inclusão com o mínimo de alteração possível. O lançamento desses produtos deve-se à Union Carbide and Carbon Corporation (30. E. 42nd. St. N.Y. 8, N.Y.) ; é conhecida como a técnica de Carbowax. Segundo Wade⁷ é essa uma técnica altamente protetora da álcool-ácido-resistência dos germens.

Aliás, segundo Wade ⁷, a técnica de Fite-Faraco é antes protetora do que restauradora. Recentemente Wade ⁷ recomendou uma técnica com a mesma finalidade.

A fim de verificar o valor dessa técnica, resolvemos fazer um estudo comparativo das técnicas de Ziehl-Klingmüller e Ziehl-Wade-Klingmüller.

Material e técnicas — O material usado é representado por 532 fragmentos de pele de doentes não tratados e em tratamento pelas sulfonas; a fixação foi feita em sôro fisiológico formolado a 10%. A inclusão foi feita em parafina pela técnica comum de histologia. As técnicas de coloração usadas no nosso laboratório, foram as seguintes:

I — TÉCNICA DE ZIEHL-KLINGMÜLLER

- 1 — Xilól — 2 vezes até completa desparafinização.
- 2 — Álcoois: 100° — 90° — 70°.
- 8 — Lavagem em água corrente.
- 4 — Fuchsina de Ziehl — a frio — 25' a 30'.
- 5 — Lavagem em água corrente.
- 6 — Descoloração pelo ácido sulfúrico a 5%.
- 7 — Lavagem em água corrente.
- 8 — Coloração pela hematoxilina de Carrazi — 5' a 10'.
- 9 — Água — 10'.
- 10 — Álcoois: 70° — 90° — 100°; xilól.
- 11 — Fechar com bálsamo do Canadá.

II — TÉCNICA DE ZIEHL-WADE-KLINGMÜLLER

- 1 — Desparafinização com uma mistura em partes iguais de vaselina líquida e essência de terebentina pura.
- 2 — Enxugar com papel de filtro.
- 3 — Lavagem em água corrente.
- 4 — Fuchsina de Ziehl — a frio — 25' a 30'.
- 5 — Lavagem em água corrente; enxugar com papel de filtro.
- 6 — Descoloração pelo ácido sulfúrico a 20%.
- 7 — Lavagem em água corrente.

8 — Coloração pela hematoxilina de Carrazzi — 5' a 10'.

9 — Água. — 10'.

10 — Enxugar com papel de filtro e secar na estufa a 56°.

11 — Fechar com bálsamo do Canadá.

Para Wade⁷ essa técnica é antes de proteção do que de restauração; aos interessados recomenda-se a leitura do referido trabalho.

A tabela anexa mostra os resultados obtidos.

RESULTADOS DA PESQUISA DO *M. LEPRAE* PELAS TÉCNICAS DE ZIEHL KLINGMÜLLER E ZIEHL-WADE-KLINGMÜLLER EM MATERIAL INCLUIDO EM PARAFINA

Técnicas usadas	Resultados	
	Nº de casos	Percentual
Ambas positivas e quantitativamente iguais	80	15,00%
Ambas negativas	237	44,53%
Ambas positivas, porém Z.W.K. numericamente maior que Z.K.	115	21,6 %
Ambas positivas, porém Z.K. numericamente maior que Z.W.K.	9	1,69%
Z.W.K. positivo e Z.K. negativo	88	16,54%
Z.K. positivo e Z.W.K. negativo	3	0,56%
Total	532	99,93%

O estudo estatístico feito com esses dados demonstra que realmente as diferenças são significativas.

A parcela que mais nos interessa é a que corresponde à do Z.W.K. (+) e Z.K. (—) ; repetimos duas ou mais vezes a pesquisa pelo Z.K. em 19 dos 88 casos; obtivemos a positivação de apenas 3 casos, porém, 1 de positivo no primeiro exame, tornou-se negativo nos demais.

O estudo detalhado desses 88 casos, mostra:

- a) 2 eram Z.W.K. (+++) e Z.K. (—) ; a repetição forneceu Z.K. (+) e Z.K. (++) respectivamente nos dois exames subsequentes.
- b) 6 eram Z.W.K. (++) e Z.K. (—) ; a repetição mostrou em 1 caso a mudança de Z.K. (—) para Z.K. (+) e em outro caso de Z.W.K. (++) para Z.W.K. (+++), permanecendo negativo o Z.K.; interessante é referir que o esfregaço deste caso foi positivo.

- c) 80 eram Z.W.K. (+) e Z.K. (—) ; em 38 destas foi feita a técnica do esfregaço com o fragmento da biópsia cujo resultado foi: 9 (+) e 27 (—).

Dos 3 casos cujo primeiro exame foi Z.K. (+) e Z.W.K. (—), temos:

- a) 1 tornou-se Z.W.K. (+) com a repetição;
b) 1 manteve o mesmo resultado anterior;
c) 1 só revelou raríssimos b.a.a.r. em um filete nervoso que foi atingido pelo corte do Z.K.

Da análise dos nossos dados conclui-se que:

- 1 — A técnica de Ziehl-Wade-Klingmüller dá um melhor rendimento da pesquisa do *M. leprae* do que a técnica de Ziehl-Klingmüller.
- 2 — A repetição dos exames mostrou que, na grande maioria dos casos, os resultados conservaram-se os mesmos, o que demonstra que realmente a positividade está na dependência de fatores inerentes ao próprio método.
- 3 — O fato de haver 38 casos com Z.W.K. (+) e Z.W. (—) dos quais apenas 9 foram positivos à técnica do esfregaço corado pelo Ziehl-Gabbet sugere que o novo método proposto por Wade não é exclusivamente de proteção mas também de restauração da álcool-ácido-resistência do *M. leprae*.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Depois de fazer algumas considerações sobre a perda da álcool-ácido-resistência do *M. leprae*, pelo tratamento sulfônico, os autores fazem um estudo comparativo dos métodos de Ziehl-Klingmüller e Ziehl-Wade-Klingmüller, em 532 casos de lepra.

A tabela mostra os valores encontrados, os quais, do ponto de vista estatístico, são significativos. Da análise detalhada dos dados, os autores concluem:

- 1 — A técnica de Ziehl-Wade-Klingmüller dá um melhor rendimento da pesquisa do *M. leprae* do que a de Ziehl-Klingmüller.
- 2 — A repetição dos exames mostrou que, na grande maioria dos casos, os resultados conservaram-se os mesmos, o que demonstrou que realmente a positividade está na dependência de fatores inerentes ao próprio método.

- 3 — O fato de haver 38 casos com Z.W.K. (+) e Z.W.K. (—) dos quais apenas 9 foram positivos à técnica do esfregaço corado pelo Ziehl-Gabbet sugere que o novo método proposto por Wade⁷ não é exclusivamente de proteção, mas também de restauração da álcool-ácido-resistência do *M. leprae*.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The authors comment on the loss of alcohol-acid-resistance of *M. leprae* with sulphone treatment, and go on to make a comparative study of the Ziehl-Klingmüller and Ziehl-Wade-Klingmüller methods in 532 cases of leprosy.

The table shows values found, which are significant from a statistical point of view. After detailed analysis of data, the authors conclude:

1 — The Ziehl-Wade-Klingmüller technique gives better results in investigation of *M. leprae* than does the Ziehl-Klingmüller technique.

2 — Successive tests showed that in most cases results remained the same, thus demonstrating that positivity actually depends on factors inherent in the method itself.

3 — The fact that there were 38 cases with Z.W.K. (+) and Z.K. (—), of which only 9 were positive to the Ziehl-Gabbet technique of stained smear, suggests that the new method proposed by Wade⁷ is not exclusively one of protection but also of restoration of the alcohol-acid-resistance of *M. leprae*.

BIBLIOGRAFIA

1. Portugal, H. e Azulay, R. D. — Vantagem de coloração pelo método de Gran-Weigert dos cortes de lesões lepromatosas. Rev. Bras. de Leprol., 18:206, 1950.
2. Faraco, J. — Bacilos de Hansen em cortes de parafina. Método complementar para a pesquisa de bacilos de Hansen em cortes de material incluído em parafina. Rev. Bras. de Leprol., 6:177-180, 1938.
3. Fite, G. L. — The staining of acid-fast bacilli in paraffin sections. Ann. J. Path., 14:491-507, 1938.
4. Fite, G. L. — The fuchsin-formaldehyde method of staining acid-fast bacilli in paraffin sections. J. Lab. & Clin. Med., 25:743-744, 1940.
5. Fite, G. L. — Cambre, P. J. e Turner, M. H. — Procedure for demonstration of lepra bacilli in paraffin sections. Arch. Path., 43:624-625, 1947.
6. Blanco, Leon F. and Fite, G. L. — Silvering of lepra bacilli in tissues. Arch. Path., 46:542-549, 1948.
7. Wade, H. W. — Demonstration of acid-fast bacilli in tissue sections. The Ann. J. of Path., 28:(1)157-170, 1952.,
8. Lillie, R. D. — Histopathologic technic. Blakiston Co., Philadelphia, pg. 217, 1948.