

MÉTODOS TINTORIAIS UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DO *MYCOBACTERIUM LEPRAE*. REVISÃO HISTÓRICA

Luiz Fernando de Góes Siqueira*
Regina Gomes de Almeida**
Walter Belda*

SIQUEIRA, L. F. de G. et al. Métodos tintoriais utilizados na identificação do *Mycobacterium leprae*. Revisão histológica. Rev. Saúde públ., S. Paulo 18: 246 - 58, 1984.

RESUMO: Foi feita revisão histórica sobre métodos tintoriais utilizados na identificação baciloscóptica do *Mycobacterium leprae*. Ao lado da descrição de cada método, e suas variantes, é feita extensa revisão bibliográfica.

UNITERMOS: *Mycobacterium leprae*. Corantes. Bacilos, coloração.

INTRODUÇÃO

Os acontecimentos básicos da era científica da hanseníase se processaram na segunda metade do século passado. Em 1848, Danielssen e Boeck descrevem as células que, em 1864, Virchow, citado por Rotberg e Bechelli (1946), viria a identificar e denominar de "Leprazellen".

Segundo Ibars (1949), no interior dessas células, Hansen (1868) descreveria pela primeira vez, elementos pardos que ele mesmo, em 1871, coraria pelo ácido ósmico. Estas observações foram publicadas por Hansen em 1874 e, novamente, relatadas por Hansen e Looft (1895).

Segundo relatos históricos de Jeanselme (1934), Rotberg e Bechelli (1944) e Hallberg (1946), Neisser, em 1879, utiliza o cristal violeta na coloração do bacilo descrito por Hansen. No ano de 1882, Koch consegue, pela primeira vez, corar o bacilo da tuberculose com solução alcoólica de azul de metileno alcalinizada com potassa. Pouco tempo após, Erlich substitui a potassa pela anilina, que mais tarde, cederia o lugar, com vantagens, para a fucsina anilinada. Nesse mesmo ano de 1882 Ziehl demonstra as possibilidades do ácido fênico.

Em 1883 Ziehl e Neelsen citado por Hallberg (1946), publicam seu método, usando como descorantes o ácido nítrico e álcool. Cornil (1884) adota o procedimento de Erlich para a hanseníase.

Em 1887, Campana afirma a natureza basófila dos bacilos, em relação às substâncias corantes, e a superioridade das soluções corantes anilnadas ou alcalinizadas.

O correr dos anos evidenciou um denominador comum ao gênero *Mycobacterium* — a capacidade de assimilação de substâncias corantes básicas e menos intensamente, aquelas possuidoras de, pelo menos, dois grupos auxocromicos básicos.

Em publicação inicial (Siqueira e col. 1983) procurou não só identificar os corantes utilizados na coloração do *Mycobacterium leprae*, em termos de suas características químico-farmacêuticas, desde os precursores até os de uso atual, como reunir a bibliografia existente sobre suas aplicações.

Como soe acontecer, erros de impressão por vezes passam a ser repetidos em publicações e manuais. Tentando corrigir essas distorções e procurando contribuir para o estudo dos métodos tintoriais usados em hansenologia, neste relato, em seqüência histórica, descrevemos as técnicas originais, suas varia-

* Do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública USP — Av. Dr. Arnaldo, 715 - 01255 - São Paulo, SP - Brasil e Instituto de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde — Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 188 - 05403 - São Paulo, SP - Brasil.

** Da Divisão de Hansenologia e Dermatologia Sanitária do Instituto de Saúde da Secretaria de Estado da Saúde — Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 188 - 7º andar - 05403 - São Paulo, SP - Brasil.

ções, e reunimos a bibliografia existente.

De regra os processos tintoriais empregados tinham destino comum—corar bacilos álcool-ácido resistentes e, tradicionalmente, como na própria terapêutica, a coloração do bacilo de Hansen veio na esteira dos procedimentos empregados na identificação baciloscópica do *Mycobacterium tuberculosis*.

No entanto, há diferenças no comportamento tintorial entre o *Mycobacterium leprae* e as demais micobactérias. De modo geral, o bacilo de Hansen assume todos os corantes mais rapidamente que o bacilo de Koch, assim como é mais sensível à descoloração.

Estas diferenças têm suportado tentativas de se estabelecer técnicas que objetivam diferenciar as duas principais micobactérias. Tenta-se também a diferenciação entre o bacilo viável do não viável, como se propõe colorações específicas para granulações e formas bacilares não ácido-resistentes.

Na prática, tais procedimentos ainda não se tem mostrado satisfatórios. Justifica-se assim, o prosseguir contínuo de investigações nesta área, de modo a oferecer-se aos profissionais envolvidos nos programas de controle da endemia, processos simples e efetivos de identificação laboratorial do *Mycobacterium leprae*.

MÉTODOS DE COLORAÇÃO BACILAR

Método de Cornil (1884):

Imergir os esfregaços em líquido de Erlich corado com fucsina ou violeta B de metila de Bâle.

Após 24 h, descorar rapidamente dentro de uma solução de ácido nítrico a 1:3.

Corar com azul de metileno se os bacilos estiverem corados de vermelho e, com eosina ou carmim borato, se os bacilos estiverem corados em azul.

Método da Borofucsina, Lubinoff (1888b):

Imergir a lâmina em borofucsina (0,5g de ácido bórico em 15 ml de álcool absoluto e adicionar 20 ml de água destilada. Após

homogeneização, adicionar 0,5g de fucsina) e aquecer.

Descorar com solução de ácido sulfúrico a 1:15 e lavar em álcool.

Imergir em solução alcoólica de azul de metileno. Lavar em água.

Método de Ziehl-Neelsen e suas modificações:

Cobrir a lâmina com carbolfucsina (1g de fucsina básica, 100ml de fenol a 5% e 10ml de álcool absoluto).

Aquecer a lâmina até emissão de vapores, continuar o aquecimento por um minuto evitando ebulição.

Lavar o excesso de corante com água em agitação e descorar com ácido sulfúrico a 10%.

Lavar o excesso de ácido com água em agitação e contracorar com azul de metileno de Loeffler.

Lavar em água até que não saia mais corantes.

Modificações do método:

— Balthazard e col. (1907) afirmam ser eficiente a modificação feita por Hansen; corar com o método de Ziehl a quente por 5 min. Lavar. Descorar com ácido láctico a 5% em água destilada e, depois, submeter ao álcool absoluto até descoloração. Lavar. Corar o fundo com solução de azul de metileno aquosa (técnica descrita por Poiré e Carranza, 1925).

— Argañaraz (1927) recomenda corar a preparação com solução fenicada de Ziehl por 6 min, descorar rapidamente com solução de ácido nítrico a 10%, e contracorar com solução aquosa de azul de metileno a 1%, por 10 segundos.

— Rudel (1928) afirma que a coloração adquire um aspecto luminoso quando a carbolfucsina é diluída em 1:4 ou 1:2 em água.

— Wade (1928) afirma que a melhor diluição para a carbolfucsina é 10g em 100ml de álcool a 95% (concentração aproximadamente igual a 8,5%).

— Segundo Manalang (1937) a coloração deve ser procedida a frio, através do método de Culion, mantendo desta forma a carbol-

fucsina por 7 a 8 min; diferindo ainda no processo de descoloração, onde é usada solução de ácido nítrico a 15%, por 20 a 30 segundos. A contracoloração é feita com azul de metileno de Loeffler diluído a 1:40.

— Em sua modificação Van Breuseghem (1937) mergulha a lâmina, previamente fixada pelo calor em fucsina fenicada, à temperatura ambiente, (variando de 23 a 26°C) durante 2 h no mínimo. Lavar em água e descorar com álcool sulfúrico (9:1) durante 20 segundos. Tornar a lavar e recorar com azul de metileno de Loeffler por 30 segundos. O autor afirma ser a coloração a frio mais eficiente, deixando o bacilo com uma cor mais viva e mais espessa.

— Wilkinson (1951) propõe tratamento prévio do esfregaço com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 5 min para restituir o oxigênio extraído pela ação redutora das sulfonas. Lavar em água corrente abundante e executar a técnica de Ziehl-Neelsen clássica. Afirma o autor que tal tratamento melhora a positividade em pelo menos 68,4%.

— Ogden (1952) afirma conseguir 100% de positividade aquecendo a carbolfucsina por 10 min incidindo a chama sobre o corante e não sob a lâmina como refere a literatura. Escorrer o corante sem lavar, descorar com solução de ácido hidrocloreídrico a 3% em álcool 70 a 80% por 3 a 5 min, lavar em água corrente e contracorar com azul de metileno de Loeffler por 3 min.

— Martinez e Calero (1956) afirmam ser mais eficiente, sem que haja necessidade de aquecimento, a coloração tradicional pelo método de Ziehl-Neelsen adicionando-se 2 gotas de propileno glicol para 15ml da solução de fucsina (fucsina-tensio-ativa).

— Rhodes-Jones (1959) relata melhor eficiência utilizando o método de Ziehl-Neelsen por imersão (em jarra de Coplin) e a temperatura ambiente por 20 min. Após lavagem em água corrente, o material é descorado com ácido sulfúrico a 5% por 5 min (também por imersão). Procedem-se nova lavagem, seguida de contracoloração com solução de azul toluidina a 0,1% por um min.

— Davison (1960) contesta Rhodes-Jones (1959) alertando para o perigo de uma des-

coloração inadequada pela utilização do ácido sozinho, por certo período de tempo. Indica a coloração a quente por 10 min e descoloração com uma solução a 3% de ácido clorídrico em álcool a 95°GL, por 15 min, e contracoloração usual com azul de metileno.

— Chasles (1962) recomenda a utilização de substâncias tensio-ativas em método de Ziehl-Neelsen modificado. Cobrir o esfregaço com solução de carbolfucsina adicionada de 15 gotas de Tween 80 ou Terpol para cada 100ml, por 10 min, a temperatura ambiente. Lavar e cobrir a lâmina com uma solução de álcool absoluto, ácido sulfúrico concentrado e solução de azul de metileno a 1%, nas respectivas proporções 4:1:7, por um minuto, lavar e secar ao ar.

— Padma (1963), após investigação das modificações propostas por Rhodes-Jones (1959) e Davison (1960), propõe a seguinte alteração da técnica de Ziehl-Neelsen: corar com carbolfucsina à temperatura ambiente por 20 min, lavar rapidamente em água, descorar com solução de ácido clorídrico a 3% em álcool a 95°GL, por 5 min. Lavar e contracorar com azul de metileno em solução aquosa a 1%, por um minuto.

— Wheeler e Draper (1980) sugerem modificação da fase de contracoloração com objetivo de melhor visualizar partículas de tecidos, contrastando melhor com as bactérias ácido-resistentes. Utiliza solução aquosa de azul solúvel (CI nº 42.755) a 1%, por 5 min ou a 0,05%, por 10 min.

— Siqueira e col. (1982) propõem alteração técnica denominada de "alcalinização concomitante" que, basicamente, consiste em, na etapa de contracoloração, cobrir a lâmina com solução aquosa de azul de metileno a 1%, adicionada de 4 a 6 gotas de solução de hidróxido de sódio a 1:500, no momento da coloração. A mistura deve ser homogeneizada, provocando deslocamentos de ar sobre o líquido, utilizando-se de uma pipeta vazia (ou outro objeto similar). Deixar agir por um minuto. Lavar em fino fio de água corrente incidindo fora do esfregaço. Secar a temperatura ambiente.

Método de Erlich:

— Primeiro procedimento, citado por Balthazard e col. (1907):

Corar a preparação a frio com violeta anilina de Erlich, por 12 h ou aquecendo até emissão de vapores, durante 5 min. Lavar em água abundante. Descorar durante vários segundos com ácido nítrico a 1:3 e lavar. Ativar a descoloração com álcool absoluto.

Contracorar a frio com solução aquosa saturada de marron de Bismark por um minuto; lavar e secar.

— Segundo procedimento, citado por Poiré e Carranza (1925):

Corar a frio, durante 12 h ou a quente, até desprendimento de vapores, durante 5 min, com fucsina anilina.

As demais etapas como no primeiro procedimento.

— Terceiro procedimento, citado por Poiré e Carranza (1925):

Corar com fucsina anilina a quente, durante 5 min.

Descorar com bisulfito de sódio a 2%, até descoloração completa. Lavar e contracorar com azul de metileno.

Método de Gabbet, citado por Zinsser e Russel (1922):

Corar com fucsina a quente como no método de Ziehl-Neelsen.

Imergir durante um minuto na seguinte solução: 2g de azul de metileno e 100ml de ácido sulfúrico a 25%. Neste método a descoloração e a contracoloração acontecem simultaneamente.

Método de Luisi modificado por Versari (1923):

Cobrir a lâmina com solução aquosa saturada de cristal de violeta, na qual se adiciona 3 a 5 gotas de ácido fênico a 5%, mantendo-a por 15 a 20 segundos.

Descorar rapidamente, com solução aquosa de ácido nítrico a 10% e lavar abundantemente em água destilada.

Contracorar com solução de fucsina a 1%, por 30 a 40 segundos.

Método de Schulte-Tigges, citado por Haseltine e Gorman (1924):

Cobrir a lâmina com solução de carbol-fucsina de Ziehl-Neelsen.

Aquecer a lâmina até emissão de vapores e continuar por um minuto, evitando ebulição.

Lavar o excesso em água por agitação e descorar com solução aquosa de sulfito de sódio a 10% (renovar a solução a cada 3 ou 4 dias, devido a transformação do sulfito em sulfato).

Lavar o excesso em água por agitação e contracorar com solução aquosa saturada de ácido pícrico, durante 5 a 10 min.

Lavar o excesso da solução de ácido pícrico, até que não saia mais corante na água.

Método de Baumgarten:

— Primeiro procedimento, citado por Poiré e Carranza (1925):

Imergir a lâmina, previamente fixada pelo calor, em solução alcoólica saturada de violeta de metila. Deixar de 12 a 24 h à temperatura ambiente, ou de 10 a 20 min aquecendo-se até emissão de vapores.

Colocar as lâminas em uma solução de carbonato de potássio a "média saturação", durante 5 min.

Descorar com álcool absoluto por 5 a 10 min.

Por este procedimento os bacilos conservam a cor violeta, o restante da preparação se descora.

— Segundo procedimento, citado por Poiré e Carranza (1925):

Corar a preparação como na primeira etapa do primeiro procedimento.

Colocar a lâmina em solução aquosa de marron de Bismark com ácido acético a 1%, por 15 a 20 min.

Desidratar com álcool, secar e observar.

Por este procedimento os bacilos conservam a cor violeta e o restante da preparação assume a cor marrom.

Método de Konrich, citado por Poiré e Caranza (1925) e Ibars (1949):

Corar com solução de fucsina fenicada de Ziehl, aquecendo até o desprendimento de vapores, durante 3 a 5 min.

Lavar em água corrente.

Descorar com solução aquosa de sulfito de sódio a 10%, até o desaparecimento da cor vermelha (Renovar a solução de sulfito de sódio a cada 3 ou 4 dias, devido a transformação do sulfito em sulfato).

Contracorar com solução aquosa saturada de verde malaquita (50g de verde malaquita em 100 ml de água destilada), por 15 a 30 segundos.

Método de Carpano (1936):

Fixar o esfregaço por aquecimento. Corar, com solução composta de 0,5g de fucsina, 10 ml de álcool, 40 ml de fenol liquefeito e 100 ml de água destilada, por uma hora.

Descorar com solução a 20% de ácido sulfúrico, alternando esta solução com algumas gotas de água.

Contracorar com vesuvina em solução aquosa acima de 2 a 3%.

Lavar por 4 a 5 min em lugar fresco.

Por este método os bacilos se coram em violeta escuro e o restante do material em amarelo.

Método de Cooper, descrito e utilizado por Manalang (1939):

Este método é, na realidade, modificação do método de Ziehl-Neelsen onde o autor introduz um eletrólito responsável pela precipitação da carbolfucsina. Adiciona-se 3 ml de solução de cloreto de sódio a 10% em 97 ml de carbolfucsina.

— Primeiro procedimento, “rápido”:

Cobrir a lâmina com o corante descrito anteriormente e aquecer até emissão de vapores, durante 4 min.

Deixar esfriar por 2 min ou mais, para permitir a precipitação.

Lavar em água corrente e descorar em ál-

cool-ácido (5 ml de ácido nítrico em 95 ml de álcool etílico a 95%) por um a 2 min.

Lavar em água corrente e mergulhar por 2 min em álcool etílico a 95%.

Lavar e corar com verde-brilhante a 1% em uma solução de hidróxido de sódio a 1:10.000 por um a 2 min.

— Segundo procedimento, “lento” (overnight):

Cobrir a lâmina com a carbolfucsina adicionada do eletrólito, como descrito no início, e incubar em estufa durante uma noite.

No dia seguinte retirar da estufa o recipiente com o corante e as lâminas e colocar em uma caixa com gelo, para precipitação, durante um período variável de meia a uma hora (são obtidas belas lâminas quando o período de incubação é de 14 a 20 h).

Continuar como o descrito para o procedimento rápido.

Método de Hallberg (1941, 1946):

Fixar os esfregaços na chama.

Cobrir, totalmente, com solução de azul noite (10 ml de solução alcoólica saturada estoque a 5% de azul noite; 2,5 ml de fenol liquefeito; 0,2 ml de solução de hidróxido de potássio a 10% e 90 ml de água destilada). Aquecer, cuidadosamente, com a chama sob a lâmina, até emissão de vapores. Deixar o corante atuar por 5 min.

Escorrer o corante e descorar, com solução a 3% de ácido clorídrico em álcool a 70%, até não conter mais traços de cor azul.

Lavar em água corrente e contracorar com solução de marrom de Bismark, ou vermelho neutro ou carbolfucsina, durante 5 a 10 segundos ou, ainda, com solução de pironina durante 15 segundos, segundo as fórmulas de preparação que se seguem:

- a) Marrom de Bismark: 2g de marrom de Bismark em 100 ml de água destilada;
- b) Vermelho neutro: 0,1g de vermelho neutro, 0,2 ml de ácido acético a 1% e 100 ml de água destilada;
- c) Carbolfucsina: 5 ml de solução de carbolfucsina concentrada e 95 ml de água destilada;
- d) Pironina: 0,25 ml de pironina, 0,5g de fe-

nol cristalizado e 100 ml de água destilada.

Este método foi desenvolvido, pelo autor, para o bacilo de Koch e, concomitantemente, empregado para o bacilo de Hansen por Reenstierna (1941).

Método de Castro (1947):

Adicionar 3 ml de uma solução de fosfato de potássio primário (KH_2PO_4), a 10%, em 100 ml de carbolfucsina. A solução do sal deve conter calomel para prevenir o crescimento de fungos.

Cobrir a lâmina com o corante e aquecer até a emissão de vapores, por 5 min. Deixar esfriar até turvar a solução e começar a precipitar.

Escurrer o corante sem se importar com a cor verde metálica formada.

Sem lavar, descorar, com solução a 3% de ácido hidrocloreídrico em álcool etílico a 96%, até que todo corante desapareça da lâmina e esta fique clara.

Contracorar com solução aquosa diluída de azul de metileno a 0,01%. O corante não deve ser usado por muito tempo, pois pode interferir na coloração dos bacilos. Meio minuto de exposição é suficiente. Lavar e secar.

Método de Zabary-Simon (1947):

Fixar o esfregaço pelo calor, cobrir com solução de azul de toluidina (0,5g de azul de toluidina, 10 a 15 ml de álcool a 95 ^\circ GL, 3g de ácido fênico e 100 ml de água destilada q.s.p.) e incubar, em estufa a 38 ^\circ C, durante 3 a 4 h.

Lavar em água e diferenciar com ácido clorídrico a 3% e com álcool a 95 ^\circ GL, alternando a passagem pelos dois diferenciadores e lavando em água entre uma passagem e outra, até que a preparação adquira uma cor azul clara. Lavar e secar.

Método de Zanetti (1947):

Fixar pelo calor e corar a frio, durante 20 min, com solução de Ziehl (1g de fucsina bá-

sica, 10 ml de álcool a 95 ^\circ GL, 5 ml de fenol fundido e 100 ml de água destilada q.s.p.). Lavar rapidamente em água.

Descorar mergulhando a lâmina, por 7 min, em solução de ácido sulfúrico a 0,5% e lavar em água.

Contracorar com solução de azul de toluidina (0,15g de azul de toluidina, 10 ml de álcool a 95 ^\circ GL, 3g de fenol cristalizado e 100 ml de água destilada q.s.p.).

Método de Jotten-Haarmann, citado por Ibars (1949):

Corar a lâmina como o método de Ziehl-Neelsen.

Descorar com ácido nítrico a 15%.

Contracorar com solução de ácido pícrico.

Método de Kamei:

— Primeiro procedimento, “clorídrico”, citado por Ibars (1949):

Corar a quente com a fucsina de Ziehl.

Descorar e contracorar, de uma só vez, com a seguinte solução: 2g de tripaflavina, 2 ml de ácido clorídrico, 70 ml de álcool a 90 ^\circ e 30 ml de água destilada.

— Segundo procedimento, “sulfúrico”, citado por Ibars (1949):

Corar da mesma forma que no primeiro procedimento.

Descorar e contracorar, de uma só vez, com a seguinte solução: 2g de tripaflavina, 25 ml de ácido sulfúrico e 75 ml de água destilada.

Método de Arena, citado por Ibars (1949):

Corar com solução preparada com 33 gotas de fucsina fenicada em 1 ml de cloreto de sódio a 10%.

Descorar com solução hidroalcoólica de cloreto de sódio (4g de cloreto de sódio, 100 ml de água destilada e 100 ml de álcool a 96 ^\circ GL).

Lavar em água e contracorar com amarelo de metila a 1%.

Método de Osol, citado por Ibars (1949):

Corar com fucsina fenicada a quente.
Descorar, primeiro com solução de ácido sulfúrico a 10% e, logo depois, com solução de sulfito de sódio a 10%.

Método da Carbofucsina/Verde malaquita com ácido acético, Harada e Kasai (1978):

Corar com uma mistura de Carbofucsina (1g de fucsina básica dissolvida em 10 ml de etanol absoluto, misturada a uma solução de fenol a 0,5% em água destilada - 100 ml), que deve ser filtrada na hora de ser utilizada.

Lavar a lâmina em água comum.

Diferenciar em solução de ácido acético a 10%, por meio minuto.

Lavar a lâmina em água comum e mergulhar a lâmina em solução aquosa a 1% de verde malaquita.

Diferenciar e contracorar, simultaneamente, com solução de verde malaquita a 1% em solução de ácido acético a 10%, por um a dois minutos.

Lavar a lâmina em água comum e secar ao ar.

MÉTODOS PARA COLORAÇÃO DE GRANULAÇÕES

Método de Ziehl-Iodo-Amônia, Cerqueira (1916, 1923):

Corar com fucsina de Ziehl a quente, durante um min.

Descorar com ácido nítrico a 1:5 rapidamente e lavar em água corrente.

Banhar a lâmina em tintura de iodo, durante um minuto, e lavar em água corrente.

Imergir a preparação em amônia pura durante alguns segundos.

Lavar em solução de hipossulfito de sódio a 0,2%. Secar lentamente à chama.

Método de Fontes (1909) aplicado para M. leprae por Horta (1941) e Ibars (1949):

Corar a preparação pela fucsina de Ziehl, durante 2 min.

Lavar e corar pelo cristal de violeta fenicada, durante 2 min.

Lavar e tratar pelo lugol, substituindo-o 3 vezes.

Descorar pela acetona. Lavar e contracorar pelo azul de metileno de Kuhne. Lavar e secar.

O método de Fontes consiste na associação dos métodos de Ziehl e Gram, sendo muito indicado para o estudo das granulações.

Método de Spengler-Sphel, citado por Ibars (1949):

Fixar o material pelo calor e corar a quente, por 3 min, com uma mistura preparada no momento, de 3 partes de fucsina e duas partes de violeta de genciana.

Verter a mistura e, sem lavar, juntar álcool-pítrico saturado (preparado com álcool 60%GL) durante 5 min.

Descorar com ácido acético ao sexto e depois com álcool a 60%GL.

Contracorar, com álcool pítrico saturado, durante 5 min.

Método de Spengler-Sphel, modificado por Ibars (1949):

O autor só modifica a última etapa substituindo o álcool pítrico saturado, utilizado como contracorante, por tripaflavina.

MÉTODO PARA DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES

Método de Baumgarten (M. tuberculosis x M. leprae):

— Terceiro método, citado por Balthazard e col. (1907):

Imergir a lâmina em solução alcoólica saturada de cristal de violeta por 5 min.

Descorar com mistura de ácido nítrico e álcool a 1:10 e lavar em água.

— Quarto método, citado por Marchoux (1919):

Imergir a lâmina em solução hidroalcoólica de rosa de fucsina pelo mesmo tempo do método anterior.

Descorar com solução alcoólica de ácido nítrico a 1:3. Lavar em água. Contracorar com azul de metileno (solução aquosa).

Rodriguez (1942) afirma que por este método o tempo não é suficiente para corar o bacilo de Koch, porém cora o bacilo de Hansen.

Método de Yamamoto (*M. tuberculosis* x *M. leprae*):

Indicado como método diferencial entre o bacilo de Koch e o bacilo de Hansen por Horta (1941), Rodriguez (1942), Ibars (1949) e Poiré e Carranza (1925).

Mergulhar a lâmina, com o esfregaço fixado pelo calor, por 10 min em solução de nitrato de prata a 5%, a uma temperatura de 55°C a 60°C.

Lavar em banho redutor (1g de tanino e 2g de ácido pirogálico em um litro de água destilada).

O bacilo de Koch apresenta-se em negro e o bacilo de Hansen permecece incolor, prestando-se para receber a coloração de Ziehl-Neelsen, utilizada como contraprova.

Método do Sudan Black B-Safranina, aplicado por Chaussinand (1955) (*M. tuberculosis* x *M. leprae* x *M. lepraemurium*):

Cobrir a lâmina com solução de Sudan Black B a 0,5% em álcool a 70% e aquecer até emissão de vapores.

Descorar com acetona. Contracorar com solução aquosa de safranina a 1%.

O bacilo de Koch cora-se em negro, outros bacilos álcool-ácido resistentes coram-se em róseo com exceção dos bacilos de Hansen e de Stefansky.

Contreras e col. (1956) consideram a técnica perfeita para diferenciação entre o bacilo de Koch e o bacilo de Hansen.

Método de Ootaka (1959) (*M. tuberculosis* x *M. leprae* x *M. lepraemurium*):

Cobrir os esfregaços, fixados pelo calor, com carbolfucsina de Ziehl a 30%. Aquecer gentilmente por um a dois minutos.

Lavar e tratar com antiformina a 5% por um a 5 min.

Constrastar com azul de metileno a 2%, por 30 a 60 segundos (azul de Loeffler diluído 1:4).

O bacilo de Koch cora sempre em azul ou rosa, enquanto que o bacilo de Hansen e o bacilo de Stefansky não são coráveis.

Método de Baker modificado por Campo-Aasen e Convit (1968) (*M. leprae* x *M. lepraemurium*):

Secar os esfregaços à temperatura ambiente por 4 a 5 h, ou por uma hora a 37°C. Fixar em formol-cálcio de Baker por 5 h.

Deixar as lâminas imersas em solução de dicromato de cálcio a 5%, por uma noite, ou por 16 h. Lavar em água destilada. (As duas últimas etapas são opcionais).

Imergir as lâminas em solução mordente de dicromato de cálcio por uma hora, a 60°C e lavar em água destilada.

Diferenciar com solução de ferrocianeto bórico por uma e meia a duas horas e lavar em água destilada. Secar com mata-borrão e montar.

O *Mycobacterium leprae* cora-se em azul escuro, perde esta cor após tratamento para retirada de fosfolípidos, enquanto que o *Mycobacterium lepraemurium* cora-se e retém a cor após o mesmo tratamento.

Os vários métodos criados na tentativa de diferenciação, e conseqüentemente classificação, de algumas das micobactérias mais importantes, só conseguiram mostrar algumas variáveis do comportamento tintorial existentes entre diferentes espécies. Não se prova, entretanto, a eficácia de nenhum dos métodos descritos, frente a falta de controle de variáveis intrínsecas das micobactérias como, por exemplo, a relação entre idade do germe e sua capacidade de álcool-ácido, resistência e outras.

MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE BACILAR

Método de Unna ("Método do azul vitória-timol"), citado por Klingmuller (1930):

Imergir as lâminas durante uma noite, à temperatura ambiente, em solução de azul vitória-timol (dissolver 1g de azul vitória em solução preparada com duas gotas de timol em 100 ml de água e filtrar).

Lavar em água e descorar em solução de ácido nítrico a 30% durante 5 a 8 segundos. Completar a descoloração com álcool durante 5 a 10 min e lavar.

Recorar com solução de safranina a 10%, durante 10 min. Descorar em seguida pelo mesmo processo anterior.

Os bacilos vivos coram-se em azul-escuro e os mortos em amarelo-alaranjado, podendo apresentar pontos azuis escuros.

Método de T. Aoki e Y. Aoki, descrito por Ibars (1949):

Fixar pelo calor e cobrir por 5 min com solução de eritrosina, (1g de eritrosina, 0,15g de ácido pícrico em 100 ml de água destilada) aquecida a 80°C.

Passar a lâmina em solução de potassa (5g de hidróxido de potássio, 30 ml de álcool absoluto em 70 ml de água destilada), durante um minuto. Lavar e corar com solução alcoólica de azul de metileno (15g de azul de metileno em 100 ml de água destilada).

Os bacilos vivos apresentam-se vermelho claro e os mortos em azul escuro ou violeta.

Método de Murohashi (1963):

Corar o esfregaço com solução de Verde Malaquita a 1 a 2% (pH em torno de 4), a 50 - 60°C, por 5 min, aproximadamente. Lavar em água corrente

Tornar a corar com uma solução de fenolfucsina de Ziehl a 1:10 (pH em torno de 6), por 4 - 5 min à temperatura ambiente (a temperatura mais adequada é ao redor de 20°C). Remover o excesso de fucsina, do fundo do material corado, empregando solução de ácido nítrico a 2% e lavar gentilmente em água corrente.

Método de Murohashi, adaptado por Kanetsuna (1964):

Fixar o esfregaço em chama. Imergir as lâ-

minas em solução de Verde Malaquita, a 1%, dissolvido em tampão acetato 0,2M e pH 4,2, por 60 min a 60°C e, depois, deixar as lâminas cobertas com pequena quantidade, do mesmo corante, à temperatura ambiente por 20 min (prevenir o ressecamento).

Lavar em água corrente e cobrir as lâminas com solução Pfeiffer (solução de carbol-fucsina 1:10 em água) por 5 min à temperatura ambiente.

Lavar e cobrir as lâminas com solução de ácido nítrico a 8% (ou ácido sulfúrico a 25%), por um minuto, à temperatura ambiente. Lavar, secar e examinar.

MÉTODOS PARA COLORAÇÃO DE FORMAS NÃO ÁCIDO-RESISTENTES

Método de Much, modificado por Rodrigues e col. (1933):

Fixar o esfregaço pelo calor. Deixar a lâmina em repouso por 4 a 6 h antes de corar. Quando corada muito cedo grande parte do material pode ser danificado nos dois processos seguintes.

Cobrir o esfregaço com solução de carbonato de sódio a 2%; o tempo de duração depende da espessura do esfregaço e é, habitualmente, de 5 a 30 min. Retirar o excesso.

Cobrir o esfregaço com antiformina e deixar em repouso por 5 a 10 min. A antiformina deve ter sido preparada recentemente. Retirar a antiformina e lavar.

Fixar de novo, levemente, pelo calor. Cobrir com um dos seguintes corantes:

- solução alcoólica saturada de metil-violeta B. N., uma parte e mais 9 partes de fenol a 2%;
- solução alcoólica saturada de violeta de genciana, uma parte mais 9 partes de fenol a 5%;
- solução alcoólica saturada de violeta de genciana, uma parte mais 3 partes de água saturada de anilina.

Retirar o excesso e adicionar solução de lugol. Deixar um minuto. Lavar rapidamente. Não usar papel de filtro, visto que adição impurezas e precipita corantes na preparação.

Tratar com ácido azótico a 5% durante um minuto. Retirar o excesso. Não lavar. Aplicar ácido clorídrico a 3% durante 20 segundos e retirar o excesso.

Descorar pingando acetona e álcool absoluto (partes iguais) até que não mais seja removido corante.

Lavar em água destilada e, sem secar, contracorar durante 3 a 5 min. pelo marrom de Bismark.

Ao final do trabalho, os pesquisadores decidiram que deveriam ser omitidas as segunda e terceira etapas, pois nestas haviam perdas de bacilos. E concluem que por este método é possível demonstrar a presença de formas Gram-positivas não ácido-resistentes.

Método da Tripla coloração de Alexander-Jackson (1945):

Método desenvolvido por Alexander-Jackson (1944) para estudo do bacilo da tuberculose e aplicado ao *Mycobacterium leprae* um ano depois.

Preparar esfregaços que não sejam muito finos e fixar pelo calor.

Corar com carbolfucsina de Ziehl por 3 min, aquecendo até emissão de vapores.

Diferenciar com solução de álcool ácido clorídrico a 3%, por 1 a 3 min e lavar em água corrente ou destilada.

Cobrir a lâmina com solução de azul de metileno de Loeffler e adicionar 6 a 8 gotas de solução de hidróxido de sódio 1N (a solução deve ser nova, no máximo um mês) com o auxílio de um pipeta capilar, distribuindo a soda por pequenos movimentos. Deixar por mais de um minuto e lavar em água corrente.

Cobrir a lâmina com solução de hipossulfito de sódio preparada na hora (um grão de hipossulfito de sódio em 50 ml de água, ou uma solução a mais ou menos 0,25%). Esta descoloração deve ser breve e, rapidamente, lavada em água corrente.

Cobrir imediatamente a lâmina com corante verde (solução aquosa a 1% v/v de

"acid green", C. I. nº 42.085 e solução aquosa a 1% de "acid yellow", C. I. nº 47.005). Deixar alguns segundos e lavar.

MÉTODOS DE COLORAÇÃO PARA MICROSCOPIA FLUORESCENTE

Método da Auramina O, citado por Henderson e col. (1942) e por Prendes e col. 1958):

Cobrir a lâmina, previamente fixada pelo calor, com solução de Auramina O (mistura de solução de Auramina O, preparada com 0,10g do corante dissolvido em 10 ml de álcool 95%, com solução de fenol, preparada com 3g de ácido fênico cristalizado dissolvido em 87 ml de água destilada) por 2 min à temperatura ambiente.

Lavar em água corrente e diferenciar com solução de álcool-ácido (colocar 0,5g de ácido clorídrico concentrado e 0,5g de cloreto de sódio em 100 ml de álcool 70%) por 2 min. Repetir, por mais de uma vez, esta etapa.

Lavar em água corrente e contracorar com solução de azul de metileno de Loeffler, por 3 a 5 segundos. Lavar, secar e examinar.

Método de Hughes (1946), aplicado por Von Haeblert e Murray (1954) ao estudo do Mycobacterium leprae:

Secar e fixar os esfregaços em banho-maria à uma temperatura aproximadamente de 85°C, por 20 a 30 min.

Corar com mistura aquecida de Auramina O, Rodamina e amarelo de acridina, por 8 min.

Descorar com solução de álcool-ácido por um a dois minutos somente.

Método de Fluorocromo, Mansfield (1970):

Fixar o esfregaço pelo calor a 65°C por uma hora, ou por formalina a 10% por 15 min.

Corar com solução de fenol-Auramina O (misturar 40 ml de fenol a 60 ml de glicerina em um erlenmeyer de 100 ml, adicionar 3g de Auramina O e agitar por 5 min, em agita-

dor magnético, e adicionar 900 ml de água destilada à mistura; cobrir a boca do frasco com "parafilme" e agitar novamente, por 72 horas; deixar a solução em repouso no escuro, por 4 dias e, ao final, filtrar com Milipore Ap.20. Esta solução deve ser estocada em frasco escuro por 15 min a 25 - 30°C.

Lavar levemente em água corrente e descorar com solução de álcool-ácido a 0,5% (0,5 ml de ácido clorídrico concentrado em 100 ml de etanol 70% q.s.p.) por um minuto. Contracorar com solução de permanga-

nato de potássio 0,5% (solução aquosa), por 3 min à temperatura ambiente. Lavar e secar.

Método da Auramina, Delville (1977):

Cobrir a lâmina com uma solução de Auramina a 0,1% (preparada em água fenicada a 5%), por 15 min.

Lavar e descorar com álcool-ácido (ácido clorídrico a 5% em álcool a 70%). Lavar e conservar no escuro até o momento da coloração.

SIQUEIRA, L. F. de G. et al. [Staining methods used in the identification of *Mycobacterium leprae*]. Historical review. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 18: 246 - 58, 1984.

ABSTRACT: A historical review of the staining methods utilized in the bacilloscopic identification of the *Mycobacterium leprae* was made. Beside the description of each method and its variants, an extensive bibliographical review is made.

UNITERMS: *Mycobacterium leprae*. Dyes. Bacillus, stains and staining.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER-JACKSON, E. A differential triple stain for demonstrating and studying non acid-fast forms of the tubercle bacillus in sputum, tissue and body fluids. *Science*, 99: 307-8, 1944.
- ALEXANDER-JACKSON, E. Non acid-fast forms as the *Mycobacterium* of human leprosy. *Science*, 101: 563, 1945.
- ARGAÑARAZ, R. Semiologia y enfermedades de la conjuntiva. Coloration del bacilo de la lepra. *Rev. Círc. méd. Argent.*, 27: 1.062-112, 1927.
- BALTHAZARD, V. et al. *Précis de pathologie interne*. Paris, G. Steinheil-Éditeurs, 1907. v. 1, p. 239.
- CAMPANA, R. Alcune particolarità di distribuzione, morfologia et colorazione del bacillo de la lepra. *Gazz. degli ospitali*, 63, 1887. In: *Arch. Derm. Syph.*, Berlin, 20: 248, 1888.
- CAMPO-AASEN, I & CONVIT, J. Identification of the non cultivable pathogenic mycobacteria *M. leprae* and *M. lepraemurium*. *Int. J. Lepr.*, 36: 166-70, 1968.
- CARPANO, M. New stain for the lepra bacillus. *Arch. ital. Anat. Istol. pat.*, 1, 1936. In: *Urol. cutan. Rev.*, Chicago, 41(3): 225, 1937. [Resumo]
- CASTRO, G. M. O. Staining nodules of the leprosy bacillus. *Lepr. Rev.*, 18(2/3): 45-9, 1947.
- CERQUEIRA, D. Sobre um novo método de coloração do Bacilo de Koch e suas granulações. *Ann. Policlin. Ger. Rio de Janeiro*, 1: 28-33, 1916.
- CERQUEIRA, D. Sobre a coloração do bacilo de Hansen. *Ann. Fac. Med. Rio de Janeiro*, 7: 102-8, 1923.
- CHASLES, P. New simple method for staining Hansen bacillus (a modification of Ziehl-Neelsen method). In: National Leprosy Conference of Ethiopia, 2nd, Addis-Ababa, 1961. *Report. Addis-Ababa*, 1962. p. 80-3.
- CHAUSSINAND, R. & VIETTE, M. Étude de la coloration des bacilles ácido-alcool-resistants par le noir Soudan. *Ann. Inst. Pasteur*, 89: 280-9, 1955. In: *Int. J. Lepr.*, 24: 123, 1956. [Resumo]
- CONTRERAS, F.; GUILLEN, J.; TARABINI, J. & TERCENIO, J. La diferenciacion del bacilo de Hansen y de Koch mediante la tincion con el negro Sudan. *Acta dermo-Siflogr.*, Madri, 47: 475-80, 1956.

- CORNIL, M. Leçons professées pendant le premier semestre de l'année (1883-1884). In: Cornil, M. *Lèpre ou éléphantiasis des grecs*. Paris, Ancienne Libraire Germe Baillièrre et C. Felix Alcan, 1884.
- DANIELSEN, D. G. & BOECK, W. *Traité de la Spédalskhed ou éléphantiasis des grecs*. Paris, Baillièrre, 1848.
- DAVISON, A. R. The technique of staining leprosy bacilli in smears. *Lepr. Rev.*, 31: 305-7, 1960.
- DELVILLE, J. Acido-alcool résistance de *M. leprae* et valeur relative des divers procédés de coloration. *Acta Leprol. N. S.*, (66/67): 265-70, 1977.
- FONTES, A. Estudos sobre a tuberculose. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1: 51-68, 1909.
- HALLBERG, V. A new method for staining tubercle bacilli (with a note by J. Reens-tierna on the use of this method for staining bacilli). *Acta. med. scand.*, 108: 11-7, 1941. In: *Int. J. Lepr.*, 13: 179, 1945. [Resumo]
- HALLBERG, V. *A new method for staining tubercle bacilli aplicable also to the micro-organism of leprosy and other acid-fast germs*. Upsala, Sweden, Almqvist & Wiksells Boktryckeri Ab, 1946.
- HANSEN, G. A. & LOOFT, C. *Leprosy: in its clinical & pathological aspects*. Bristol, John Wright, 1895.
- HARADA, K. & KASAI, T. Two methods of demonstrating leprosy bacilli in smears. *Int. J. Lepr.*, 46: 167-71, 1978.
- HASSELLTINE, H. E. & GORMAN, P. J. A comparative study of the Schulte-Tigges and the Ziehl-Neelsen method of staining *M. leprae*. *Publ. Hlth Rep.*, 39: 2.683-5, 1924.
- HENDERSON, J. A.; SPAULDING, E. H. & GAULT, E. S. Demonstration of globi and leprosy bacilli by fluorescence microscopy. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 50: 91-2, 1942.
- HORTA, A. C. *Diagnóstico clínico, laboratorial e imunobiológico*. Rio de Janeiro, Serviço Nacional de Lepra/Imprensa Nacional, 1941.
- HUGHES, G. C. An improved stain for fluorescence microscopy. *Tubercle*, 27(7): 91-2, 1946.
- IBARS, D. A. Técnicas de coloracion del *Mycobacterium leprae*. *Fontilles*, Alicante, 2: 231-6, 1949.
- JEANSELME, E. *La lèpre*. Paris, G. Doin, 1934.
- KANETSUNA, F. A study of malachite green staining of leprosy bacilli. *Int. J. Lepr.*, 32: 185-94, 1964.
- KLINGMULLER, V. Farbungen des Leprabacillus. In: Klingmuller, V. *Die Lepra*. Berlin, Jadassohn Josef J. Springer, 1930. v. 10, p. 90-4.
- LUBINOFF, M. Borofuchsin zum farben von leprabacillen. *Mh. prakt. Derm.* 7(16): 801, 1888 a.
- LUBINOFF, M. Sur la technique de la coloration des bacilles de la tuberculose et de la lèpre. *Zbl. Bakt. Parasit.*, 3: 540, 1888 In: *Ann. Inst. Pasteur*, 2(5): 289, 1888b. [Resumo]
- MANALANG, J. Removal of acid-fastness from *My. leprae*. *Mth. Bull. Bur. Hlth Philipp.*, 17: 47-54, 1937.
- MANALANG, J. A comparison of the cooper modification and the culion modification of the Ziehl-Neelsen staining method for "*Myc. leprae*" *Mth. Bull. Bur. Hlth Philipp.*, 19: 287-92, 1939.
- MANSFIELD, R. E. An improved method for the fluorochrome staining of mycobacteria in tissue and smears. *Amer. J. clin. Path.*, 53: 394-406, 1970.
- MARCHOUX, E. Le bacille de Hansen. Coloration des germes. In: Marchoux, E. *Traité de pathologie exotique, clinique et thérapeutique*. Paris, Baillièrre, 1919. v. 7, p. 350.
- MARTINEZ, B. L. & CALERO, J. R. Nuevos métodos de coloracion del bacilo de Hansen con fucsina tensio-activas. *Act. dermo-sifiliogr.*, Madrid, 47: 465-8, 1956.
- MUROHASHI, T. Differential staining of leprosy bacilli by the malachitegreen-fuchsin method. In: Japan Leprosy Research Committee. *Studies of leprosy based upon fundamental investigation into tuberculosis*. Tokyo, Tofu Kyokai, 1963.

- OGDEN, M. A. Diagnosis of leprosy. *J. Amer. med. Ass.*, 150: 814, 1952.
- OOTAKA, K.; SATOÓ, S.; SATOO, J. et al. Une nouvelle coloration différentielle entre les bacilles de la tuberculose et les bacilles de la lèpre. *Hirosak Med. J.*, 10: 237, 1959. In: *Int. J. Lepr.*, 28: 210, 1960. [Resumo]
- PADMA, M. N. A standard technique of acid-fast staining for *M. Leprae* in smears. *Lepr. India*, 35(2): 62-4, 1963.
- POIRÉ, A. P. & CARRANZA, M. A. Improved staining technic for tubercle bacilli. *Sem. méd.*, Buenos Aires, 2: 877-944, 1925.
- PRENDES, M. A. G.; CARBONELL, A. F.; PARDO-CASTELLO, V. & HERNANDEZ, A. C. La microscopia fluorescente en leprologia - Valoracion del metodo fluorescente frente al Ziehl-Neelsen, en el diagnóstico bacteriológico. *Int. J. Lepr.*, 21: 35-40, 1958.
- REENSTIERNA, J. On the use of the Hallberg method for staining leprosy bacilli. Apud Hallberg, V. A. New method for staining tubercle bacilli. *Acta med. Scandinavica*, 108: 11-17, 1941. In: *Int. J. Lepr.*, 13: 179, 1945. [Resumo]
- RHODES-JONES, R. A modified technique for staining leprosy bacilli in smears. *Lepr. Rev.*, 30: 251, 1959.
- RODRIGUEZ, J.; MALABY, E. & TOLENTINO, J. C. Formas gram-positivas do *M. leprae* de lesões lepróticas bacteriológicamente negativas para organismos ácido-resistentes. *Rev. bras. Leprol.*, 1: 111-21, 1933.
- RODRIGUEZ, L. L. Coloracion del bacilo de Hansen. *Rev. Med. trop. Parasit. Bact. clin. Labor.*, 8: 13-4, 1942.
- ROTBURG, A. & BECHELLI, L. M. Etiopatogenia e anatomia patológica. In: Serviço Nacional da Lepra. *Tratado de leprologia*. Rio de Janeiro, 1944. v. 2.
- RUDEL, O. Zur farbung der leprabazillen. *Zbl. F. Bakt.*, 107(617): 357, 1928. In: *Derm. Wschr.*, 87(39 b): 1.528, 1928. [Resumo]
- SIQUEIRA, L. F. de G.; ALMEIDA, R. G. & BELDA, W. Modificação da coloração de fundo da técnica de Ziehl-Neelsen na identificação do *Mycobacterium leprae*. *Hansen. Int.*, 7: 88-94, 1982.
- SIQUEIRA, L. F. de G.; ALMEIDA, R. G. & BELDA, W. Comportamento tintorial do *Mycobacterium leprae*: revisão histórica. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 17: 297-315, 1983.
- VAN BREUSEGHEM, R. & MOULES, E. Pratique de la coloration du bacille de Hanse dans les frottis. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 17: 137-9, 1937.
- VERSARI, A. Contributo alla colorazione del bacillo di Hansen. *Rif. med.*, 40: 938-9, 1923.
- VON HAEBLERT, T. & MURRAY, J. F. Fluorescence microscopy as a routine method for the detection of *M. tuberculosis* and *M. leprae*. *South Afr. med. J.*, 28(3): 45-8, 1954.
- WADE, H. W. The variable partial solubility of basic fuchsin in alcohol. *J. Lab. clin. Med.*, 13: 1.052, 1928.
- WHEELER, P. R. & DRAPER, P. Soluble blue as a counterstain in the Ziehl-Neelsen procedure. *Int. J. Lepr.*, 48: 15-7, 1980.
- WILKINSON, F. F. Modification a la tecnica de Ziehl-Neelsen en las baciloscopias de los enfermos de la lepra tratados com sulfonas. *Int. J. Lepr.*, 19: 195-8, 1951.
- ZABARY-SIMON, P. Métodos de coloração metacromática do *Mycobacterium leprae*. *Rev. bras. Leprol.*, 15: 25-7, 1947.
- ZANETTI, V. Coloration en série du bacille de Hansen et depistage des lepreux bacillaires. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 27: 179-86, 1947.
- ZINSSER, H. & RUSSEL, F. F. Leprosy bacillus. Morphology and staining In: Zinsser, H. & Russel, F. F. *A textbook of bacteriologie*. 8th ed. New York, Appleton, 1922. p. 465.

Recebido para publicação em 08/02/1984
Aprovado para publicação em 26/03/1984