

METODO RAPIDO DE COLORAÇÃO DE ESFREGAÇOS DE SANGUE.
NOÇÕES PRATICAS SOBRE CORANTES PANCROMICOS
E ESTUDO DE DIVERSOS FATORES.

POR G. ROSENFELD

(Do Laboratório de Hematologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil)

A coloração de esfregaços pelos metodos pancromaticos apresenta quase sempre variações nas mãos do mesmo tecnico, e especialmente quando executados por pessoas com pouca experiencia nessas colorações. No entanto trata-se de um trabalho elementar e simples em que não devem existir esses inconvenientes, que provavelmente são acentuados pela falta de exatidão das tecnicas como são usualmente descritas.

É frequente ver-se recomendado o uso de quantidades medidas em gotas, estas variam bastante de volume com os conta-gotas ou as pipetas com que são contadas, acarretando sempre variações na relação entre agua e corante, o que é importante na coloração.

Em algumas tecnicas aconselham o uso de numero igual de gotas de corante e de agua, outros interpretando esses dados erroneamente recomendam quantidades iguais medidas em cm³. Ora é muito grande a diferença entre os dois metodos, os corantes sendo usualmente dissolvidos em metanol dão gotas com cerca da metade do volume das de agua, de modo que enquanto no primeiro metodo a quantidade de agua é cerca do dobro da de corante, no segundo elas são realmente iguais. Isso sem contar a variação do volume das gotas condicionadas pelas circunstancias anteriormente mencionadas.

No presente trabalho estudamos os diversos fatores que têm influencia na coloração, assim como metodos de conservação das preparações coradas, com o intuito de fixar todos os dados para uma tecnica de coloração rapida e simples, o mais regular e independente possivel do fator pessoal, afim de eliminar o fator virtuosidade até agora importante nessas colorações. O resultado foi um metodo de coloração simples e muito proximo dos metodos usuais de coloração rapida em que, porém, estão determinados os fatores de variação e sua influencia. Os dados obtidos serviram-nos de base para a preparação de um corante que propuzemos em outro trabalho (3), porém o metodo de coloração pode ser aplicado á maioria dos corantes usuais.

Recebido para publicação em 27 de outubro de 1947.

MATERIAL E METODOS

Os esfregaços de sangue eram feitos de modo usual em laminae e datando no maximo 24 horas, pois, que, quanto mais velhos dão colorações um pouco peores e portanto não bem comparaveis.

Corantes — Usamos diversos: Leishman, Wright, Giemsa e o corante por nós proposto (3). De fabricação "Grübler" e "Harleco" os 3 primeiros e "Corm" os quatro.

As soluções de corantes que devem sempre ser conservadas em vidros secos e bem fechados foram preparadas das seguintes maneiras:

Soluções metilicas — 0,15 gr. % de corante em metanol sintético, neutro ao tornesol. Essa solução é agitada algumas vezes, conservada á temperatura ambiente e, no dia seguinte filtrada, depois do que está pronta para usar. Foram tambem preparadas, diluindo 1 parte de solução glicerizada com 4 partes de metanol, porém não com resultados tão bons quanto com a solução metilica pura.

Soluções glicerizadas tipo Giemsa — 0,75 gr. % de corante numa mistura de partes iguais de metanol e glicerina pura com d-1,26. Essa solução é agitada diversas vezes e conservada 2 a 6 horas a 60°, ou cerca de 12 horas a 37°. No dia seguinte é filtrada e está pronta para usar.

Solução tampão — Foi preparada com fosfato monopotassico anidro ($K H_2 P O_4$), e fosfato disodico anidro ($Na_2 H P O_4$). Foram feitas soluções a 10% com cada um desses sais. A mistura correspondente ao p 6,95 e a uma concentração M/1,5 foi preparada adicionando 54,468 ml. da solução de fosfato monopotassico a 107,0 ml. da solução de fosfato disodico. Essa solução stock com uma concentração de 10,7645 gr % para ser usada era diluida a 10% em agua destilada.

O pH foi sempre determinado com potenciometro.

Secagem — A secagem das laminae depois de coradas e lavadas, era feita com um dessecador de ar quente, do modelo corrente para secagem de cabelo, instalado sob a mesa com a boca voltada para cima e adaptada a um orificio do mesmo diametro feito no tampo da mesa. Esse metodo de secagem economiza muito tempo e quando o volume do trabalho de rotina justifica essa despesa é o mais aconselhavel. Tem as vantagens de ser rapido, evita arranhar o esfregaço e o tempo exigido para secar é suficientemente curto para evitar que a lamina descore irregularmente como acontece quando se deixa a lamina em posição vertical para escorrer e secar.

RESULTADOS

Coloração

1) *Coloração na fase de fixação* — Essa verificação foi feita, cobrindo no microscópio esfregaços não fixados com corante em solução metilica, que eram imediatamente recobertos com laminula. Após alguns segundos notava-se que os núcleos ficavam corados em azul violáceo, sem grande intensidade porém com notável delicadeza de estrutura. Depois coravam-se as hemácias em rosa pálido, as plaquetas com o cromômero em violáceo, e, finalmente, as granulações e o citoplasma dos leucócitos. Essa coloração atingia o máximo no fim de 1 minuto ou pouco mais.

2) *Diluição do corante sobre o esfregaço* — Dois lotes de lâminas foram tratados das seguintes maneiras:

a) Os esfregaços foram fixados com metanol durante 1 minuto, depois de secados foram corados durante 10 minutos com uma diluição feita no momento num provete, de 1 ml de corante com 2 ml de água destilada.

b) Os esfregaços foram fixados cobrindo com 1 ml de corante, depois de 1 minuto juntou-se 2 ml de água destilada e depois de misturado deixou-se corar durante 10 minutos.

As lâminas do lote B mostravam núcleos com estrutura mais delicada e detalhes citoplasmáticos mais nítidos.

3) *Volume do corante* — Foram experimentadas diversas quantidades de corante, desde 0,1 até 2,0 ml. A quantidade que recobria bem os esfregaços, era suficientemente para uma boa fixação e cuja evaporação dentro do tempo de fixação escolhido não foi prejudicial à coloração, foi de 0,5 ml.

4) *Tempo de fixação* — Foram fixadas preparações pelo metanol, com tempos que variavam de 1 minuto, desde 1 até 10 minutos. Essas lâminas foram depois coradas de igual modo com uma mesma solução aquosa de corante. Foi verificado que estavam todas bem fixadas e coradas igualmente, portanto o tempo de 1 minuto é o melhor, pois o mais curto dos tempos suficientes é o que permite menor evaporação com as variações das condições do ambiente, como a temperatura e ventilação.

Usando esfregaços muito recentes, de alguns minutos apenas, a fixação de 1 minuto falhava às vezes, porém era perfeitamente suficiente se prolongada para 1 1/2 a 2 minutos. Também foi possível corrigir essa falha secando muito bem o esfregaço antes de fixá-lo, agitando muito bem e vigorosamente a lâmina ou melhor ainda, submetendo durante alguns minutos à corrente de ar do dessecador.

5) *Segunda fase ou tempo de coloração* — O tempo de coloração dependia principalmente da concentração do corante já que o volume estava determinado.

Em virtude disso achamos preferível escolher a priori um tempo mais comodo que economizasse tempo e não fosse excessivamente curto, de modo que variações moderadas não acarretassem modificações sensíveis da coloração. Esse tempo foi arbitrado em 5 minutos e depois experimentamos diferentes concentrações até achar a melhor.

6) *Volume da agua* — Foram coradas laminas com diferentes volumes de agua, desde 0,5 ml até 2,5ml, com variações de 0,5 ml. Foi observado que 1 ml de agua com 0,5 ml de corante resulta numa quantidade de solução corante que recobre bem a lamina e permite misturar perfeitamente sem transbordar o liquido.

7) *Relação entre volume de corante e agua* — Depois de experimentadas diversas proporções entre corante e agua, a relação de 1:2 foi a que deu coloração mais eficiente dentro do tempo de 5 minutos. Havia uma precipitação de corante muito pequena, evitando-se assim o risco de inutilizar pelo deposito de precipitado de corante, o que se dava quando se aumentava a proporção de agua. Diminuindo-a a coloração era pouco intensa devido à precipitação e dissolução insuficientes das substancias corantes na agua.

8) *Condições da agua distilada* — A agua distilada recente dá muito boas colorações e tem um pH muito próximo da neutralidade. Quando a agua não é recente, em geral com mais de 1 semana e especialmente si ficou exposta ao ar, já não dá boas colorações e o seu pH baixa. Porém essa mesma agua ou mesmo mais velha, submetida á ebulição durante 10 minutos torna a um pH mente neutro e dá boas colorações.

Pertanto é o contato com o ar que inutiliza a agua para a coloração tornando-a acida. Isso é devido ao CO_2 , esta verificação foi feita borbulhando ar por meio de vacuo, em agua distilada e em solução diluida de hidrato de bario. Com 15 minutos de passagem de ar já havia precipitação de carbonato de bario. Esse mecanismo pode ser verificado nas tabelas 1 e 2, onde está demonstrado como o borbulhamento de ar ou de CO_2 acidificam a agua.

TABELA I

	Tempo minutos	H_2O		Sol. Tampão 1 %	
		pH	coloração	pH	coloração
Antes	—	6,95	boa	7,05	boa
Depois de borbulhar o ar .	90'	6,6	sofrível	7,0	regular
Depois de ferver	5'	6,9	regular	7,1	boa
Depois de ferver	10'	7,0	boa	7,15	boa

Essa acidez devida ao CO_2 é eliminada pela abulição dentro de 10 minutos, isso também está demonstrado na mesma tabela. Também foi verificado pela ebulição de agua distilada velha ou borbulhada com ar, em que o vapor expelido do balão passava noutro com una solução de hidrato de bario. Nos primeiros minutos já aparecia um precipitado de carbonato de bario, no fim de 10 minutos foi substituido o balão com bario por outro com solução nova, este segundo balão não mostrou nenhuma passagem de CO_2 nos 10 minutos subseqüentes de fervura a que continuamos a submeter a agua.

O mais pratico é portanto utilizar agua distilada recente e no fim de uma semana substitui-la por outra. Desde que se submeta a agua á ebulição durante 10 minutos antes de po-la em uso, o que é o mais recomendavel, não é necessario usar agua recentemente distilada.

9) *Concentração de sais na solução tampão* — Utilizamos uma mistura de fosfato monopotassico e de fosfato disodico com pH 6,95. Na concentração M/1,5 ou seja 10,76 gr % de sal, a solução tampão demonstrou uma ação impediante sobre a coloração. Numa concentração 10 vezes menor, esse efeito não se faz notar a não ser em grau muito ligeiro. A solução stock diluida á 1% em agua distilada, com a concentração de 0,1076 gr. % deu bons resultados.

O envelhecimento estraga a solução tampão diluida, do mesmo modo que a agua distilada, porém não tão rapidamente. Esses sais não tem ação tampão contra o CO_2 , ou é muito pequena como em geral para todos os acidos organicos fracos. O mecanismo da alteração da solução tampão é o mesmo que o da agua distilada como pode ser observado pelos dados das tabelas 1 e 2.

TABELA II

	Tempo minutos	H_2O		Sol. Tampão 1 %	
		pH	coloração	pH	coloração
Antes	—	6,95	boa	7,05	boa
Depois de borbulhar CO_2 .	5'	4,2	má	5,5	má
Depois de ferver	5'	6,3	má	7,0	regular
Depois de ferver	10'	6,95	regular	7,05	boa

10) *pH* — Usamos soluções tampão com diversos *pH*, desde 6,0 até 8,0. As melhores colorações para fins usuais de hematologia e citologia clinica foram obtidas com soluções neutras ou quase neutras. Soluções mais alcalinas com *pH* 7,2 ou 7,4 são mais indicadas para o estudo de parasitas; soluções acidas com *pH* 6,4 ou menos, para o estudo de granulações e modificações citoplasmáticas.

11) *Lavagem* — Coramos lamínas com a mesma água e algumas foram lavadas com água destilada já velha e ácida, outras com água corrente alcalina, e finalmente outras com a mesma água que tinha servido para a coloração e que tinha *pH* 6,95. O primeiro grupo apresentava uma coloração muito avermelhada, o segundo muito azulada e o terceiro estava bem corado.

Frequentemente as lamínas são coradas com água destilada ou solução tampão com todos os requisitos exigíveis, e depois são lavadas ou com água destilada velha geralmente ácida, ou com água corrente em geral alcalina (num laboratório na nossa cidade, chega a atingir *pH* 8,8). No primeiro caso a coloração torna-se avermelhada e muito descorada e no segundo, azulada e menos diferenciada. Isso se dá porque a coloração é fácil e rapidamente influenciada pelas variações do *pH*. Devido a esse fato é lógico que deve ser usada para a lavagem a mesma água ou solução tampão empregada para a coloração.

Durante a lavagem faz-se a diferenciação da coloração, e quanto mais tempo a lamina permanecer molhada, maior será, podendo ficar muito descorada si fôr excessivamente demorada.

Conservação

É sabido que as colorações pancromicas são as mais difíceis de ser conservadas, pois têm tendencia a se descorar e são muito influenciadas por emanções ácidas de qualquer natureza. Foram experimentados varios metodos depois de retirar todo o óleo de cedro com xilol.

1) *Balsamo do Canadá* — Fechando a preparação com balsamo do Canadá e laminula, mesmo que seja da melhor proveniencia e esteja em boas condições, a coloração é prejudicada e destruída em prazo relativamente curto pela oxidação e consequente acidificação da resina.

— 2) *Óleo de cedro* — Tem os mesmos inconvenientes do balsamo, apenas as alterações se dão num prazo um pouco mais longo.

3) *Parafina líquida* — Cobre-se simplesmente o esfregaço com uma ligeira camada espalhada com o dedo. Com o tempo a lamina fica praticamente seca e ha tendencia a aglomerar detritos que ficam aderentes ao esfregaço. Ao ser retirada a parafina com xilol os detritos continuam aderentes ou arranham a superficie da preparação ao se tentar tira-los.

4) *Parafina solida* — Funde-se um pouco de parafina solida (ponto de fusão 55°), de boa qualidade, como a usada para inclusões. Pinga-se 2 ou 3 gotas sobre o esfregaço, passa-se a lamina sobre uma chama até que a parafina derreta e espalha-se sobre todo o esfregaço com um bastão de vidro ligeiramente aquecido ou com o dedo. Melhor ainda será deixar espalhar a parafina colocando a lamina numa estufa a 60° (de inclusão). A temperatura de 60° não altera a coloração. Para examinar retira-se a parafina com xilol. Esse processo é um pouco incomodo para reexaminar as laminas.

5) *Alcool polivinilico* — Utilizamos uma solução aquosa a 20%, bem viscosa. Deu pessimos resultados, dissolve o corante descorando rapidamente a lamina.

6) *"Euparal"* — Esse meio de montagem é de fabricação "Grübler". Laminas com ele montadas foram expostas ao ambiente durante 6 anos. Já comunicamos os resultados após um prazo de 21 meses (2). No fim de 6 anos a parte central das preparações ainda conserva-se em boas condições, porém, nos bordos tinha havido oxidação do conservador e destruição da coloração.

7) *"Enecê"* (1) — É um meio de montagem semelhante ao "Euparal" (*). Laminas foram montadas e submetidas pelo mesmo tempo às mesmas condições que o "Euparal". Resultados provisorios tambem já foram por nós relatados (2). No fim de 6 anos, manteve a coloração em boas condições, apenas nos bordos havia desaparecimento da basofilia do citoplasma dos mononucleares, porém mesmo nessa zona da preparação as outras tonalidades e detalhes estavam bons.

8) *Sem conservador* — No nosso clima as laminas não se conservam muito bem, a duração da coloração em boas condições varia com diversas circunstancias. Precisam ser conservadas em caixas bem fechadas. Porém si consegue-se manter algumas, outras estragam-se perdendo os tons azulados e violetas, o que é de regra nas laminas alteradas com qualquer conservador.

COMENTARIOS

O que foi observado quanto ao que se passa na 1a. fase chamada de fixação, está em desacordo com o conceito classico, de que não ha coloração nessa fase. Consequencia dessa coloração previa é o fato de se obter uma maior delicadeza e detalhe da estrutura quando se usa o corante para a fixação, em lugar de fixar com metanol e corar com solução aquosa de corante. Esse resultado é pro-

(*) O "Enecê" é composto de colofonia, goma copal, alcool, canfora, terebentina e eucaliptol. Agradecemos ao Prof. J. Lane que nos cedeu o "Enecê" que havia sido preparado pelo próprio autor desse meio de montagem.

vavelmente devido a que o corante em solução metilica impregna as células enquanto coagula as proteínas, desse modo a penetração é mais rápida e perfeita. Depois, na 2a. fase, a água dissolvendo e precipitando as substâncias corantes na intimidade da estrutura celular, daria como consequência a diferença notada entre os dois métodos de coloração.

Está de acordo com essa nossa observação a justificativa dada por Schiling (6) para o emprego do Giemsa rápido. Afirma que o Giemsa usado desse modo (diluído com metanol), cora as granulações, estrutura nuclear, plaquetas, etc., melhor do que pelo método clássico. Beck (5) já indicou o uso da solução de Giemsa diluído com metanol em proporções iguais à que aconselhamos.

Todos os corantes pancromicos à base de eosinato de azul de metileno, como o Leishman, Wright, Giemsa, a mistura por nós proposta (3), etc., podem ser usados segundo verificamos, de duas maneiras:

Soluções glicerizadas tipo Giemsa — Soluções desse tipo são usadas com as técnicas clássicas na coloração em cubas, para cortes histológicos ou para a coloração simultânea de muitos esfregaços, ou ainda para gotas espessas.

Soluções metilicas para coloração rápida — Os corantes preparados desta maneira podem ser utilizados com a técnica que recomendamos, que nos parece a mais prática e é baseada nos resultados relatados.

No derroter de preparações do azul de metileno, de eosinatos de azul de metileno, das combinações e soluções dos corantes, tivemos ocasião de verificar que no que se refere à qualidade das anilinas e solventes e técnica de preparo das soluções ha muitos conceitos que não são validos, transmitidos pelos livros e não baseados na prática ou em experimentação. Quase todos os que se referem a esses detalhes insistem sobre a necessidade do emprego de anilinas desta ou daquela afamada marca. Já relatamos (3) que os resultados na preparação das substâncias corantes independem das marcas de anilinas usadas.

O metanol sintético para uso industrial nos deu resultados tão bons quanto os "pro analyse". Parece-nos que a recomendação insistente de muitos autores sobre a necessidade de empregar metanol purissimo de Merck ou similares, é devido aos conselhos de outras épocas, quando o metanol não era sintético e sim proveniente da destilação da madeira, podia então conter frequentemente impurezas que prejudicavam. Atualmente com o uso quase exclusivo de metanol sintético não é mais preciso escolher com tanto cuidado. O metanol quando absolutamente incolor sempre nos deu bons resultados. Mesmo usando metanol ligeiramente ácido ao tornesol não houve modificação do corante. Por precaução neutralizamos, varias vezes com carbonato de calcio em pó, e depois, de preferencia, pondo fragmentos de marmore bem lavado e seco, que eram conservados dentro do metanol. Essa neutralização é feita depois de alguns dias ou semanas e não nos parece indispensavel.

Quanto ao preparo das soluções de corantes, inclusive do Giemsa, não apresenta dificuldades, desde que se use vasilhame bem vedado e seco, glicerina branca $d=1,26$ que não tenha sido exposta ao ar, e metanol incolor. O que é preciso é nunca deixar esses corantes em vidros abertos ou mal arrolhados pois que absorvem humidade o que os prejudica, também é necessário não introduzir no corante pipetas húmidas ou sujas.

A maioria das recomendações do uso de soluções tampão, ou de adição de alcalinizantes á agua distilada, têm a finalidade de corrigir alcalinizando uma agua inicialmente não apropriada para a coloração. Já demonstramos que a ebulição por 10 minutos torna aproveitavel a agua distilada, o que é mais vantajoso do que o uso de solução tampão ou de alcalinizantes.

As soluções tampão usualmente recomendadas assim como a agua distilada adicionada de carbonato de sodio não apresentam vantagens sobre a agua distilada quanto á conservação. Todas elas estragam-se da mesma maneira quando expostas ao contato do ar devido ao gaz carbonico que as acidifica e, os corantes pancromaticos são sensiveis ao acido carbonico.

Si bem que os corantes pancromaticos para dar o maximo de resultado exijam um pH 7,0 ou muito proximo, pois são corantes neutros e como tais muito sensiveis a acidos e alcalis, ás vezes para fins especiais necessita-se corar com um pH acido ou alcalino. Nesses casos é conveniente que se empreguem soluções tampão para regularidade e melhor reprodução das colorações, é então aconselhavel usar misturas de fosfatos de sodio e potassio, observando concentrações de sal dentro dos limites que referimos ao tratar do assunto. A solução tampão aconselhada por Lacorte (4) tem um pH 7,4 que é o mais conveniente para a coloração de parasitos.

CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos chegamos á conclusão que é mais aconselhavel o uso de corantes em solução metilica que devem ser utilizados para a fixação e, a diluição do corante deve ser feita sobre o esfregaço. O uso de solução tampão ou agua alcalinizada é desnecessario a não ser para fins especiais, a agua distilada recente ou recentemente fervida durante 10 minutos, dentro de prazo de 1 semana dá boas colorações para o uso corrente.

Método de coloração

A tecnica de coloração rapida que parece ser a mais pratica e pode ser usada com todos os corantes em solução metilica é a seguinte:

- 1) Cobrir o esfregaço com 0,5 ml. de corante. Deixar 1 a 2 minutos.

2) Juntar ás gotas, 1 ml. de agua, misturar bem, deixar 5 a 7 minutos. Para hematozoários, outros parasitos ou laminae muito ricas em células nucleadas (leucemias, medula ossea, etc.), deixar corando mais tempo, cerca de 10 minutos.

3) Não despejar o corante. Lavar com um jato de agua, da mesma que foi utilizada para a coloração, escorrer e secar rapidamente em papel de filtro, mata-borrão ou secador de ar quente.

Dados praticos sobre colorações

Modo de misturar o corante — Um bom metodo para misturar o corante com a agua, no momento da diluição, é o seguinte: toma-se um bastão de vidro que se coloca paralelamente sobre a lamina e toca-se a superficie do liquido, com o liquido aderido ao bastão por capilaridade (fig. 1), agita-se varias vezes de um lado para o outro (fig 2), destacando o bastão da superficie. Repete-se essa manobra cerca de 5 vezes consecutivas. O bastão não precisa ser lavado, desde que usado só para esse fim.

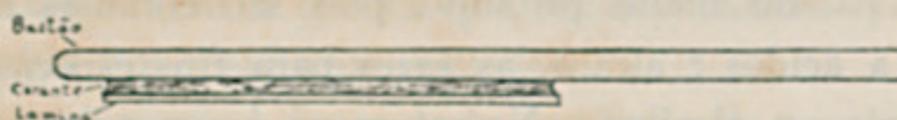


FIG. 1

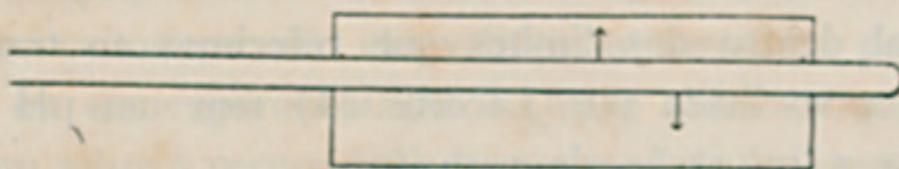


FIG. 2

Lavagem da lamina — A agua destilada ou a solução tampão para a lavagem deve de preferencia ficar num frasco ou balão lavador de cerca de 500 ml, (fig. 3). Lavar despejando um jato firme que se vai fazendo correr sobre toda a superficie da lamina rapidamente. Para isso gasta-se cerca de 20 ml. de agua. Deste modo evita-se o deposito de precipitados sobre o esfregaço. A lavagem ao mesmo tempo diferencia a lamina e é um dos tempos mais delicados de uma boa coloração. Deve em geral durar cerca de 10 segundos.



FIG. 3

Diferenciação — Caso a diferenciação não tenha sido suficiente, o que se reconhece pelo tom carregado das hemácias, limpar o oleo de cedro e tornar a diferenciar recobrando com a agua distilada ou solução tampão, deixando cerca de 20 a 30 segundos.

Medição do corante e da agua para coloração — Sendo os corantes pancromicos muito delicados, alterando-se facilmente com acidos, alcalis, humidade, exposição ao ar, etc., é conveniente não mergulhar pipetas sujas ou humidas no vidro de corante. Afim de evitar esses riscos é aconselhavel o seguinte metodo que nos têm dado bons resultados ha cerca de uma dezena de anos:

Guardar o corante e a agua ou solução tampão para diluição, em frascos contagotas de vidro de boa qualidade. Para o corante, contar o numero de gotas necessarias para encher 5 cm³ de um pequeno provete de 5 ou 10 cm³ bem graduado. Dividindo-se por 10 obtem-se o numero de gotas que corresponde a 0,5 ml de corante, numero esse que é marcado definitivamente no rotulo do vidro. Vidro contagotas com rolha pipeta facilita ainda mais o trabalho por evitar a contagem de gotas de cada vez. Para esses procede-se do seguinte modo: retira-se o bulbo de borracha, fecha-se a extremidade inferior com o dedo e pelo orificio superior, com uma pipeta fina põe-se 0,5 ml de metanol ou alcool, que facilitam a operação. Marca-se o nivel de liquido com um diamante e depois aprofunda-se bem a marca para que fique bem visivel. Desse modo de cada vez que se vai corar com o vidro contagotas basta despejar o numero exato de gotas ou, com o segundo vidro, encher a pipeta, esvasia-la no vidro até a marca e, depois, despejar a quantidade medida sobre a lamina a corar. Procede-se da mesma maneira para a agua empregada na diluição.

Correção de erros de coloração — Laminas hipercoradas — Diferenciar como foi explicado anteriormente. Quando se quizer verificar melhor a policromasia, pontilhado basofilo ou outras modificações das hemácias, proceder do mesmo modo.

Laminas hipocoradas — Si possivel, corar outro esfregaço, sinão, cobrir com metanol, deixar 1/2 minuto, despejar e repetir. Secar a lamina. Corar novamente desde o primeiro tempo.

Laminas precipitadas — Proceder do mesmo modo que no caso anterior.

Idade dos esfregaços — Os esfregaços não corados devem ser guardados não fixados. Até 2 ou 3 dias dão colorações muito boas, porém no mesmo dia obtem-se resultados melhores. Quanto mais velhos peor será a coloração, chegando a não se corar quando muito velhos.

Conservação de laminas coradas — Para a conservação das laminas o mais aconselhavel é retirar bem o oleo de cedro logo depois de examinar e guardar o mais possivel abrigado do ar e de emanações acidas ou alcalinas, o que se pode fazer em caixas ou gavetas bem fechadas.

Caso se queira fazer demonstrações repetidas é preferível montar com "Enecê" e laminula. Para tentar conservar por prazos muito longos pode ser usada a parafina solida.

RESUMO

Foram estudados varios fatores que têm influencia nas colorações pancromicas, na preparação de soluções corantes e na conservação das laminas coradas. Foram obtidas as seguintes conclusões:

Todos os corantes pancromaticos usuais podem ser usados em soluções glicerinadas tipo Giemsa ou soluções metilicas. O seu preparo é facil e ao alcance de qualquer laboratorio.

Os corantes em solução metilica, na 1a. fase, chamada de fixação, não agem somente fixando, na realidade nessa fase inicia-se a coloração.

Diluindo o corante sobre a lamina obtem-se uma coloração com estrutura nuclear e citoplasmatica mais fina e delicada do que fixando previamente os esfregaços com metanol e corando com corante diluido aparte. Os corantes metilicos são os mais aconselháveis.

O volume de corante mais conveniente para a fixação e coloração de um esfregaço é de 0,5 ml.

O melhor tempo para a primeira fase, chamada de fixação, é de 1 minuto, e de 2 minutos para laminas muito recentes.

O melhor volume de agua que recobre bem a lamina e permite uma boa mistura é de 1,0 ml.

A melhor relação entre volume de corante metilico e de agua é de 1/2.

A agua distilada recente ou recentemente fervida, dentro do prazo de 1 semana, dá boa coloração, não sendo necessario usar soluções tampão, agua alcalinizada com carbonato de sodio ou outros meios. Somente são necessarias soluções tampão para fins especiais.

A concentração de sais nas soluções tampão tem importancia na coloração e devem ser de preferencia menor do que 1%.

A lamina deve ser lavada com a mesma agua ou solução tampão utilizada na coloração.

Para a conservação das laminas o mais aconselhavel é guardar o esfregaço bem limpo, sem oleo de cedro, em caixas ao abrigo do ar e de emanações acidas ou alcalinas. Caso necessario pode ser usada a parafina solida ou o "Enecê".

ABSTRACT

Various factors which influence panchromic staining were studied in the preparations of stains solutions and in the conservations of stained smears. The following conclusions were reached:

All common panchromic stains may be used in solutions with glycerine of the Giemsa type, or in methylic solutions. Their preparation is simple and within the reach of any laboratory.

The stains, when used in a methylic solution in the first stage, which is called fixation, do not act by fixing exclusively, but in reality staining begins during this phase.

By diluting the stain on the smear, a finer and more delicate nuclear and cytoplasmatic structure is obtained than when methanol was used previously to fix the smear, and after were colored with stain diluted separately. The methylic stains are the most advisable.

The most convenient volume of the stain, to be used for fixation and coloration of a smear is 0,5 ml.

The best time for the first phase (fixation) is 1 minute, and 2 minutes for very recent smears.

The best volume of water to be employed for dilution over the slide and which permits a good mixture, is 1,0 ml.

The best relation between the volume of methylic stain and water is 1/2.

Water, recently distilled or recently boiled, within a period of 1 week, gives a good stain. It is not necessary to use buffer solutions, water alkalised with soda carbonate or other means. Buffer are necessary only for special purposes

The concentration of salts in buffer solutions are important in staining and should preferably be less than 1%.

The smear should be washed with the same water or buffer solution used in staining.

For the conservation of slides it is advisable to keep the stained smear very clean, without cedar oil, in air-proof boxes to avoid acid or alkaline emanations. If necessary, solid paraffin or "Enecê" may be used.

BIBLIOGRAFIA

1. *Cerqueira, M. L.* — Um novo meio para montagem de pequenos insetos em laminae, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 39:37, 1943.
2. *Rosenfeld, G.* — Nota sobre a experiência de conservação de laminae de sangue com Enecê, *Rev. Paul. de Med.*, 23:43, 1944.

3. *Rosenfeld, G.* — Corante pancromico para hematologia e citologia clinica; nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido, *Mem. Inst. Butantan*, 20: 329, 1947.
4. *Lacorte, J. G.* — Influência do pH sôbre as colorações do Giemsa, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Suplemento 1: 9, 1928.
5. *Beck, R. G.* — Laboratory manual of hematologic technic, Philadelphia, Saunder Co., 1938, pp. 145.
6. *Schilling, V.* — El cuadro hematico y su interpretacion clinica, ed. 3, trad. da ed. 10 alemã, Barcelona, Editorial Labor., 1936, pp. 18-19.