CORANTE PANGROMICO PARA HEMATOLOGIA E CITOLOGIA CLINICA. NOVA COMBINAÇÃO DOS COMPONENTES DO MAY-GRÜNWARD E DO GIEMSA NUM SÓ CORANTE DE EMPREGO RAPIDO

POR G. ROSENFELD

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

A preferencia pelos corantes de Wright e Leishman é devida a simplicidade de sua tecnica e pouco tempo exigido na coloração, apesar de seus resultados serem reconhecidamente inferiores aos da coloração combinada de May-Grünwald e Giemsa ou metodo de Pappenheim; que segundo a opinião da maioria dos hematologistas é o mais rico em detalhes.

Apesar de vantagens incontestaveis o metodo de Pappenheim não é o mais usado nem o mais recomendavel devido a sua tecnica um pouco complicada e muito demorada para um trabalho massivo de rotina. Exige atenção pois são necessarias diversas manipulações, e variações destas têm como consequencia irregularidade nos resultados. O Giemsa isolado é de tecnica mais simples, porém exige um tempo relativamente demorado e seus resultados são inferiores aos do metodo de Pappenheim. A evidencia desses inconvenientes é demonstrada pela tendencia a utilizar cada vez mais o Wright e o Leishman, e tambem pelas tentativas de simplificar o Pappenheim.

Varios autores já indicaram simplificações afim de diminuir as manipulações da tecnica e encurtar o tempo. Nazim (2) em 1920 propôz uma mistura de 2 partes de solução de May-Grünwald e 1 de solução de Giemsa, o esfregaço é fixado cobrindo com o corante durante 1 minuto e corado, juntando igual volume de agua que se deixa permanecer durante 1 a 2 minutos. Não obtivemos bons resultados com esse metodo. A concentração que esse autor indica para a solução de May-Grünwald é de 1%, portanto 4 vezes maior do que a usual, usando esse corante com a concentração normal, 0,25%, obtivemos resultados melhores porém chegamos á conclusão que esse metodo tem o grave inconveniente de usar tempo demasiadamente curto o que ocasiona variações muito grande nas colorações. Strumia (4) em 1936 recomenda uma mistura de Giemsa e May-Grünwald em pó, dissolvidos segundo tecnica especial em glicerina, metanol e acetona. O corante corresponde mais ou menos a uma proporção final de 170 ml. de solução

Recebido para publicação em 27 de outubro de 1947.

de Giemsa, mais 60 ml, da solução de May-Grünwald, com 460 ml. de acetona e 310 ml. de metanol. Cora usando 1 ml. do corante que fixa durante 2 minutos, e juntando depois 1 ml. de agua alcalinizada que permanece 3 minutos. O corante conserva-se durante 18 meses.

Como os melhores resultados para verificação de detalhes morfológicos de importancia no trabalho corrente, segundo o consenso quase unanime é dado pela coloração combinada do May-Grünwald e Giemsa, foi estudada uma combinação desses corantes que permitisse uma coloração com essas vantagens associadas a um metodo de coloração facil e rapido. Noutro trabalho (3) foram determinados os requisitos ideais que deve apresentar o metodo de coloração para esfregaços de sangue. O corante foi preparado após numerosas tentativas, até que se encontraram concentrações e proporções otimas, para ser utilizado dentro das condições do metodo deduzido como o melhor no trabalho citado.

MATERIAL E METODOS

Na preparação dos corantes usamos azul de metileno para uso medicinal, eosina amarelada (tetrabromo-fluoresceina sodica), eosina azulada (dibromo-dinitro-fluoresceina sodica) e metanol sintetico. Empregamos essas substancias de diversas procedencias, com bons resultados.

O azul de metileno, azul A de Kehrmann, foi preparado pelo metodo de Mac Neal utilizado por Meyer (1).

As colorações foram sempre feitas em esfregaços usuais não fixados, de sangue humano, do dia ou no maximo do dia anterior.

O metodo de coloração empregado foi o recomendado em outro trabalho (3) e deve se submeter ás seguintes condições:

- 1) A fixação do esfregaço deve ser feita pelo proprio corante que deve estar em solução metilica. Essa fixação deve durar 1 minuto usualmente e 2 minutos para esfregaços muito recentes (alguns minutos depois de preparados).
- 2) O volume de corante a empregar nessa primeira fase deve ser de 0,5 ml.
- 3) O segundo tempo deve ser feito com agua destilada previamente fervida durante 10 minutos e utilizada até 1 semana depois. Pode ser empregada uma solução tampão diluida, com pH bem proximo da neutralidade. Esse segundo tempo deve durar 5 minutos ou um pouco mais. Para hematozoários, outros parasitos ou laminas muito ricas em celulas: medula, ganglio, leucemia, etc., deve-se prolongar o tempo para 10 minutos. Para laminas muito pobres em celulas: anemias muito intensas, agranulocitose, etc., a duração deve ser reduzida para cerca de 3 minutos. De um modo geral esses tempos não precisam ser ne-

cessariamente observados com rigor, pequenas flutuações não têm grande influencia.

4) No segundo tempo o volume do diluente a empregar deve ser de 1,0 ml ou seja, o dobro do volume do corante.

5) A lavagem da lamina deve ser feita com agua distilada ou solução tampão, porém a mesma que se usou para a coloração. Despeja-se um jato franco primeiramente num dos extremos e depois passa-se pelo resto da lamina. Toma-se a lamina por um dos extremos, despeja-se o liquido e imediatamente enxuga-se em papel de filtro ou de preferencia, si o volume de trabalho justificar, emprega-se a corrente de ar quente de um dessecador de cabelo, instalado sob a mesa, com a abertura voltada para cima justaposta a um orificio feito na mesa. Quanto mais tempo a lamina permanecer molhada nessa fase de lavagem mais descorada ficará.

RESULTADOS

Dentro dos detalhes da tecnica previamente fixada e das condições exigidas, partindo de dados arbitrarios fomos variando a concentração de componente por componente, enquanto os outros eram mantidos fixos. Chegamos, após mais de uma centena de tentativas, ás seguintes proporções que nos deram as melhores colorações:

Formula A

Azur A	0,342	gr
Eosina amarelada	0,342	gr
Azul de metileno	0,286	gr
Eosinato de azul de metileno	0,530	gr
Metanol q. s.	1.000,0	ml

O mesmo corante pode ser obtido utilizando Giemsa e May-Grünwald em pó, nas seguintes proporções:

Formula B

Giemsa em pó	0,97	gr
May-Grünwald em pó	0,53	gr
Metanol	1.000,0	ml

Tambem podem ser utilizadas soluções de Giemsa e de May-Grünwald para chegar ao mesmo corante:

Formula C

Giemsa em solução	125	ml
May-Grünwald em solução	215	ml
Metanol	660	ml

O corante em pó era preparado misturando os corantes das formulas A ou B, e juntando cerca de 200 ml de metanol para 10 gr de corante; afim de dissolver depois de evaporado era triturado.

Para fazer a solução metilica usual o corante em pó era dissolvido na proporção de 0,15 g % em metanol. Agitava-se diversas vezes enquanto se conservava ao ambiente em vidro bem arrolhado durante 24 horas. Filtrava-se e o corante ficava pronto para usar. Essa solução metilica tambem pode ser preparada a partir da solução glicerizada, diluindo 1 parte desta ultima com 4 partes de metanol.

A solução glicerizada tipo Giemsa para coloração pelas tecnicas classicas, de cortes histologicos ou de muitas laminas simultaneamente em cubas, é preparada da seguinte maneira: 0,75 g % de corante numa mistura em partes iguais de metanol e glicerina pura com $d = 1,26$. Agita-se diversas vezes enquanto se conserva 2 a 6 horas a 60° , ou cerca de 12 horas a 37° . Cerca de 24 horas depois filtra-se e está pronta para usar.

O corante em pó e as soluções guardadas bem fechadas conservaram-se bem até cerca de 8 anos, periodo em que tivemos ocasião de observar. Temos usado continuamente o corante durante todo esse tempo com muito bons resultados, para esfregaços de sangue, medula, baço, ganglio, tumores, pús, sedimentos de derrames e todo o genero de exames citologicos clinicos.

COMENTARIOS

O corante obtido reúne todos os componentes do Giemsa e do May-Grünwald dando quase os mesmos resultados e os mesmos valores que os obtidos com o metodo de coloração combinada desses dois corantes, ou metodo de Pappenheim. As principais vantagens que apresenta são: exigir pouco tempo de coloração, tecnica muito simplificada e resultados muito regulares mesmo em mãos inexperientes, desde que sejam seguidas á risca todas as indicações.

A diferença que apresenta na coloração em relação ao metodo de Pappenheim é que as celulas mostram uma estrutura nuclear e citoplasmatica muito mais fina e delicada, o que tem muito valor para avaliar o estadio de maturação da celula e para o diagnostico diferencial de celulas patológicas o que é de grande importancia em certos diagnosticos, como na mononucleose, leucemias agudas, etc. Essa vantagem é principalmente devida a que as substancias corantes em lugar de agir sob a forma de solução aquosa em celulas já fixadas, agem já na primeira fase, a de fixação, enquanto ainda em solução metilica, o que como já demonstramos (3), apresenta grandes vantagens.

A unica inferioridade do metodo dentro do tempo e metodo padrão, é no que se refere á coloração de hematozoarios. Os *P. vivax*, *falciparum* e *malariae* em todos os estadios evolutivos ficam corados e perfeitamente diagnosticaveis, o

mesmo pode-se dizer quanto á demonstração dos pigmentos, porém a coloração não atinge a intensidade dada por outros corantes como o Giemsa, o Leishman e o Wright. Para que nesses casos se obtenha coloração igual, é preciso prolongar o tempo de coloração para 10 minutos, tempo mais recomendavel para todos os parasitos. Para esse fim também é mais indicado o emprego de solução tampão pH 7,2 ou 7,4 o que aliás se estende ao uso de todos os corantes desse genero.

Na preparação dos corantes usamos anilinas de muitas proveniencias, tanto de marcas alemãs como americanas, umas para fins de laboratorio, outras para uso farmaceutico e eosina amarelada para uso industrial. Os resultados foram sempre bons, as pequenas variações encontradas entre uma partida e outra resultavam sempre da preparação do azur de metileno ou do eosinato de azul de metileno, que apresenta quase sempre pequenas variações de partida para partida, porém de uma intensidade que não altera os resultados praticos. Os resultados obtidos com eosina amarelada e eosina azulada foram identicos, e não ha vantagem em empregar esta ultima, em geral mais difficil de ser obtida do que a primeira.

RESUMO

É apresentada uma nova combinação corante pancromica com os componentes do May-Grünwald e Giemsa, para esfregaços de sangue, exames citologicos clinicos e cortes histologicos. Ao lado, sobre as colorações de Wright e Leishman apresenta as qualidades da coloração combinada de May-Grünwald e do Giemsa, ou metodo de Pappenheim, e sobre este ultimo tem vantagens. O seu metodo de emprego é mais rapido e simples e mostra uma estrutura nuclear e citoplasmatica mais delicada. É de facil preparo e durante anos não foi observada nenhuma alteração das suas propriedades.

ABSTRACT

A new pancromic stain made with the components of May-Grünwald and Giemsa, is presented for staining blood smears, histological slides and smears for clinical cytologic examinations. When compared with the Wright and Leishman stains, it has the qualities of the Pappenheim method (May-Grunwald and Giemsa combined staining), and has over the later many advantages. Its application is more rapid and simpler to used, and it shows a more delicate nuclear and cytoplasmatic structure. It is easily prepared and no alteration of its properties was observed during a period of many years.

BIBLIOGRAFIA

1. Meyer, J. P. — Noções práticas sobre a preparação e emprego de um corante semelhante à mistura de Giemsa (Azul-Azul-Eosina), *Arch. Instituto Biológico*, 6:97, 1935.
2. Nazim, E. — Modification de la methode de Pappenheim, *Presse Medicale*, n. 23: 424, 1920.
3. Rosenfeld, G. — Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores, *Mem. Inst. Butantan*, 20:315, 1947.
4. Strumia, M. — A rapid universal blood stain; May-Grüwald Giemsa in one solution, *Jour. Lab. & Clin. Med.*, 21:930, 1936.