

Sobre o preparo dos parasitas da malária em distensões espessas, especialmente em amostras supersecas *

Pelo

Dr. G. de Freitas

do Instituto Oswaldo Cruz

Em virtude das condições climáticas da região do nordeste brasileiro invadida pelo *A. gambiae* Giles, 1902, o preparo das distensões espessas de sangue para diagnóstico protozoológico da malária oferece grandes dificuldades, pois as amostras de sangue sob esta forma perdem, após curto lapso de tempo (de dois a três dias), a capacidade de se deixarem deshemoglobinizarem pelos métodos usuais, tornando-se inteiramente imprestáveis. Este fato, de início, comprometeu seriamente o trabalho de levantamento de índices de infecção, criando um problema, que, dado o valor destes índices, não era em absoluto de se desprezar.

Ora, no Serviço de Malária do Nordeste, como em qualquer outra campanha anti-malárica de grande envergadura, era quase excepcional que se pudesse preparar amostras de sangue para levantamento dos índices pouco tempo após sua colheita. Razões técnicas e econômicas de primeira ordem, inerente à própria amplitude das campanhas, determinam que o levantamento dos índices epidemiológicos seja elaborado por um órgão central, e dotado da organização de pessoal e material necessário para uniformizar o trabalho e diminuir ao mínimo os erros próprios aos métodos.

O contato prático com tal rotina mostra claramente que a possibilidade de dilatar o espaço de tempo de utilização das amostras de sangue em distensões espessas não constitui problema local, mas um problema geral sempre presente pelas razões expostas, em campanhas antimaláricas de certa amplitude e, agravado, como no caso da campanha do nordeste brasileiro, pela

* Recebido para publicação a 20 de maio e dado à publicidade em junho de 1942.

(*) Os estudos e observações em que este artigo é baseado foram realizados sob os auspícios do Serviço de Malária do Nordeste, entidade cooperativa do Ministério da Educação e Saúde e a Divisão Sanitária Internacional da Fundação Rockefeller, e do Instituto Oswaldo Cruz.

influência adversa do clima e pelas vias de comunicação. A experiência de mais de um ano, adquirida na rotina de levantamento de índices de infecção na Baixada Fluminense, onde as condições são mais favoráveis e as vias de comunicação melhores, fornece uma prova farta desta asserção.

No presente trabalho analisamos rapidamente os métodos de preparo de amostras de sangue que já ultrapassaram o limite normal de aproveitamento, apresentando um cutro, desenvolvido no Laboratório de Acaratí em maio de 1939, graças ao qual foi possível a realização do serviço de levantamento de índices de infecção na região invadida pelo *A. gambiae*. Este método foi empregado em 1940, na Secção de Pesquisas do Serviço de Malária da Baixada Fluminense, para idênticas finalidades.

Dos inúmeros métodos para a coloração dos parasitos da malária em distensões espessas, registrados pela literatura, dois são indicados para a finalidade que nos interessa, ou sejam, o método de Knowles (1913) (Ind. Med. Gaz. T. 66) e o de Chorine (1932) (Bull. Soc. Path. Exot. T. 25 n. 6).

O método de Knowles é baseado numa deshemoglobinação por uma solução fracamente ácida, seguida pela fixação pelo álcool metílico. Com este método alguns resultados foram obtidos, uma vez que foi possível deshemoglobinar amostras não recentes. Contudo, na maioria dos casos era necessária a permanência de 20 minutos ou mais na solução ácida, de modo que, como o material não era previamente fixado, sobrevinham inevitáveis e profundas alterações morfológicas nos parasitos. Assim sendo, nada se poderia esperar da fixação, uma vez que, agindo posteriormente à deshemoglobinação, o álcool não fixava senão estruturas já alteradas.

Outro ponto que prejudica a viabilidade do método de Knowles no preparo simultâneo de grande número de amostras é o que se refere à eliminação do deshemoglobinizante ácido, que neste caso é efetuado com água destilada neutra ou ligeiramente alcalina. Deste modo, a neutralização do substrato exige a retirada muito cuidadosa dos ácidos, que se consegue com repetidas lavagens que, além de complicar o método, consomem tempo e material. Mesmo que houvesse resolvido o problema da coloração, seria necessário adaptar o método de Knowles no preparo simultâneo de muitas amostras de sangue, uma vez que, para trabalhos desta natureza, apresenta outros inconvenientes. Assim, a intromissão do álcool metílico como fixador aumenta consideravelmente o custo do preparo das amostras, dificultando a fixação simultânea de um grande número, porquanto rapidamente se contamina com os ácidos da solução deshemoglobinizante. Knowles preconiza metanol puro e isento de acetona, o que acentua notavelmente os inconvenientes acima.

No método que ora apresentamos, que aliás não se baseia em nenhum princípio absolutamente novo, procuramos corrigir todos os pontos passíveis de crítica nos demais métodos, dando-lhe as características exigidas para os trabalhos nos quaes um grande número de amostras de sangue é empregado. Assim, tivemos intenção de lhe dar a maior simplicidade, constância e baixo preço, tornando o mais cômodo possível seu emprego na preparação simultânea de centenas de amostras.

Baseia-se na verificação de que uma rápida fixação prévia no formol diluído (2%) fixa suficientemente os parasitos, permitindo uma deshemoglobinação mais completa pela solução ácida, sem risco de alterações morfológicas. Na maioria dos casos a deshemoglobinação começa na solução de formol, o que nunca dispensa a ação posterior de solução ácida. A observação sugere por vezes a hipótese de que esta fixação prévia pelo formol "sensibiliza" de algum modo as distensões espessas, uma vez que, isoladamente, nem esta substância nem a solução de Knowles parece capaz de operar uma retirada tão intensa da hemoglobina.

Outro ponto digno de nota é o da eliminação da solução ácida e do acerto de pH da solução corante. Para ambos os casos experimentamos um sistema regulador bastante simples e econômico, que tem dado resultados perfeitamente satisfatórios.

Para obtenção desta solução regulada, quer para eliminar o deshemoglobinizante, quer para diluir o corante de Giemsa, procede-se do seguinte modo :

1.º, tomar a quantidade de água destilada necessária;

2.º adicionar ácido acético glacial na proporção de uma gota para cada 10 cc. de água;

3.º, acertar o pH no valor 7,2 com uma solução de carbonato de sódio a 2%, usando como indicador o bromocresol púrpura em solução hidroalcoólica a 0,02%, segundo Medalia (*). Foram-se assim o sistema "buffer" ácido acético \rightleftharpoons acetato de sódio. Esta operação pode ser realizada rapidamente por um processo simples e suficientemente preciso. Toma-se alguns pequenos tubos de hemólise, depositando-se em cada um 4 gotas da solução de bromocresol púrpura acima referido. Após cada adição de carbonato na água acidificada verifica-se o pH, adicionado à solução de indi-

(*) Para se preparar a solução de bromocresol púrpura, segundo Medalia, procede-se do seguinte modo :

a) preparar um solução "stock" dissolvendo 0,1 gr. em 50 cc de alcool a 95°;

b) diluir 5 cc desta solução "stock" em 45 cc de água destilada. Conservar em frasco bem fechado.

cadador de um tubo oito gotas ou 0,4 cc. de água. O pH conveniente será atingido quando o indicador tomar coloração púrpura violeta. Poucas tentativas são necessárias para completa percepção da tonalidade adequada do indicador, bem como para a avaliação aproximada da quantidade de carbonato a ser adicionada de uma só vez. Assim sendo, dois a três tubos são geralmente suficientes. O método é muito pouco preciso, porém, o bastante para coloração pelos métodos derivados de Romanowsky.

DESCRIÇÃO DO MÉTODO

I) *Disposição do material* — Pequeno número de amostras pode ser preparado em vasos para coloração como os de Coplin. Maior número contudo, deve ser disposto pelo processo descrito por M. A. Barber & Komp (1930) no qual as lâminas são dispostas em blocos, ficando separadas por pequenos pedaços de papelão de 2 ou 3mm de espessura.

Este processo, além de ser extremamente prático, permite a preparação simultânea de centenas de amostras, em grandes cristalizadores com tampa, de 25 cm. de diâmetro ou mais.

Ambas as distensões (espessa e delgada) devem ser confeccionadas na mesma lâmina, ficando o bordo da primeira a 2 ou 3mm. da extremidade. A pequena distensão delgada que se destina a uma consulta eventual deve ficar separada cerca de 5mm. do bordo da distensão espessa para que seja evitada a influência das soluções usadas no preparo desta última. Às vezes podem ser fixadas previamente com álcool metílico, tomando-se o cuidado de evitar que esta substância atinja a distensão espessa, que neste caso ficará perdida. Isto é fácil de se conseguir, contornando a distensão com um traço de lapis de cera, como prática Barber. Na falta de lapis de cera recorta-se um pedaço de papel filtro com as dimensões aproximadas da distensão delgada, coloca-se sobre ela e goteja-se o álcool sobre o papel filtro. Finda a fixação, retira-se o papel com cuidado e lava-se o preparado com água destilada, tendo-se a precaução de inclinar a lâmina numa direção conveniente, de modo a evitar que a água da lavagem molhe a distensão espessa. Uma recomendação que não deve ser omitida, é que o sucesso deste método depende muito da correta confecção da distensão, que nunca deve ser muito espessa.

II) *Fixação* — Fixar as lâminas isoladamente ou blocos de lâminas numa solução de formol a 2% durante cinco minutos. Quando se trabalha com muitas amostras em grandes cristalizadores, deve-se por a quantidade de solução estritamente necessária para banhar todas as distensões espessas, para que o nível do líquido não lhes ultrapasse. Para isto, deve-se primeiramente ordenar todos os blocos dentro das placas vazias e depois colocar as soluções, derramando o líquido com cuidado no pequeno espaço

livre entre os blocos e a parede da placa. Um pequeno funil é muito cômodo para esta operação. A deshemoglobinação começa nesta fase, dando a impressão de ser integral com amostras relativamente recentes.

III) *Deshemoglobinação* — Sem lavar, colocar na solução de Knowles, cuja fórmula é a seguinte :

Ácido acético a 2,5%	4 partes
Ácido tartárico a 2%	1 parte

Não é conveniente que as amostras permaneçam mais de 20 minutos nesta solução.

IV) *Lavagem* — Fazer duas lavagens sucessivas na água regulada pelo processo acima descrito. O nível da água de lavagem, sobretudo o da segunda, deve ser superior ao dos outros reativos precedentes.

V) *Secagem* — Secar os blocos, depositando-os sobre uma folha de mata borrão, que poderá ser utilizada muitas vezes.

VI) *Coloração* — Corar pela solução de Giemsa diluída na proporção de uma gota por centímetro cúbico de água regulada pelo processo acima descrito. Esta técnica da preparação da solução corante evita a possibilidade de uma precipitação precoce, permitindo por vezes, numa única solução, a coloração de séries sucessivas de centenas de lâminas cada uma.

Embora elaborado para coloração de distensões espessas de sangue supersecas, temos utilizado este método, com ótimos resultados em amostras recentes, garantindo conservação mais perfeita dos parasitos que a deshemoglobinação pela água destilada.

Dele temos a experiência de dois anos, durante os quais foram preparadas mais de 53.000 amostras de sangue, provenientes dos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte e, posteriormente, do Distrito Federal e Estado do Rio de Janeiro.

SUMMARY

I) The A. presents a method developed for the preparation of thick blood films, specially old desiccated smears.

The observations are based on the experience of more than 53000 blood samples collected in the laboratory of the "Serviço de Malaria do Nordeste" as well as in the research department of the "Serviço de Malaria da Baixada Fluminense".

II) As an introductory matter, he emphasizes the value of the obstacles presented by overdrying of the thick blood films occurring systematically in

great malaria control organizations in which the laboratory receives materials from more or less remote localities, particularly in the Brazilian northeast, in regions invaded by *Anopheles gambiae*.

III) An analysis of the causes of failure of the methods of Chorine and Knowles recorded in the literature for such purposes is given, as well as its adaptability for the simultaneous preparation of large numbers of samples.

IV) The method is based on the protective action of a previous fixation by a dilute solution of formalin, which, without preventing further dehemoglobinization, prevents morphological alterations in the parasites by the action of Knowles solution which is retained in this method without modification.

V) For washing out the acids of the dehemoglobinizing solution as well as for diluting the Giemsa stain, the A. proposes a very simple technique, extremely convenient for such purpose, which consists in adding acetic acid to the distilled water in the proportion of 1 drop for each 10cc of water, and then increasing the hydrogen-ion concentration to pH 7.2 with a 2 % sol. of sodium carbonate. As indicator a 0.02 % solution of purple-bromocresol prepared in accordance to Medalia, is used.

In this reaction there is the formation of the acetic acid \rightleftharpoons sodium acetate, buffer system very suitable for giving a convenient pH and for preventing the precipitation of the dye, which can be used for two or three batches of 700 or 800 slides each, without changing the staining solution.

VI) — The method can be summarized as follows :

For a small number of samples, Coplin's or any other staining jar can be used. Large number of slides must be placed in groups of 10 or 15 units each, the slides being separated by a piece of cardboard, according to Barber & Komp.

- a) Fix in dilute formalin (2 %), during 5 minutes.
- b) Without washing, put in Knowles solution (see the formula in the text), no more than 20 minutes.
- c) Two successive washings in distilled water, buffered as explained above (which can be used several times).
- d) Dry and stain with Giemsa solution, prepared by using 1 drop of the stain for each c. c. of buffered distilled water. Time : 1 hour.
- e) Wash in distilled water and dry.