

Identificação de cogumelos patogênicos por meio da coloração ácido periódico -- Schiff

pelo

Dr. R. Pimenta de Mello, * L. Pimenta de Mello ** e A. Perez ***

A introdução do método de PAS (ácido periódico — Schiff) em histoquímica, por Mc MANNUS (1) e HOTCHKISS (2), foi imediatamente seguida pela sua aplicação na identificação de cogumelos nos tecidos lesados.

KLIGMAN (3), utilizando o método de HOTCHKISS-Mc MANNUS com algumas variações, STARR, DAWE e WEED (4), SEABURY, PEABODY e LIBERMAN (5), KADE e KAPLAN (6), entre outros, evidenciaram perfeitamente as extraordinárias vantagens do método em questão.

Uma das principais vantagens do emprêgo desta técnica, consiste, segundo a maioria dos autores, na possibilidade de demonstrar parasitos não visíveis pelos métodos habituais de laboratório, ou seja possibilitar um diagnóstico preciso. Dados interessantes, foram fornecidos por PUCKETT (7), no estudo de granulomas pulmonares. Verificou êle, empregando o método de PAS, *Histoplasma capsulatum* em 22 lesões pulmonares, nas quais o cogumelo havia sido cultivado exclusivamente em uma única oportunidade.

STARR, DAWE e WEED (4), publicam uma interessante tabela, na qual demonstram os resultados de positividade, obtidos com o PAS e sem êste, em diversos casos, como passaremos a mostrar.

<i>Cogumelos</i>	<i>Total de casos</i>	<i>Casos positivos em exame histológico</i>		
		<i>H.E.</i>	<i>PAS</i>	<i>Total</i>
Blastomices (tipos norte e sul americanos) .	15	9	5	14
H. capsulatum	18	11	5	16
C. immitis	20	6	9	15
C. neoformans	3	2	1	3
S. schenckii	5	2	1	3
Total	61	30	21	51

* Do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Atualmente no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. São Paulo.

** Técnica voluntária do mesmo Departamento.

*** Técnico de laboratório do referido Departamento.

* Entregue para publicação em 16-9-55.

O total de casos (61), representa aquêles que foram bacteriológicamente comprovados. Dessa maneira, de um total de 61 casos, 51 foram comprovados morfológicamente, com positividade nos tecidos. Dêsses 51, 30 o foram com hematoxilina eosina (H.E.), enquanto o método do PAS, além dêsses conseguiu identificar mais 21.

SEABURY, PEABODY e LIBERMAN (5), mostraram entre vários casos, um exibindo típico aspecto de doença de Hodgkin quando corado pela hematoxilina-eosina. Após coloração pelo PAS, verificou-se a presença de focos característicos de *Histoplasma capsulatum*.

MÉTODOS

O método utilizado para o PAS, foi o seguinte: (8)

Preparo do reagente de Schiff:

a) Dissolver uma grama de fucsina básica em 200 cm³ de água destilada fervendo. Esfriar até 50 graus centígrados. Filtrar. Adicionar 10 cm³ de ácido clorídrico normal (o ácido clorídrico normal deve ser preparado com muita precisão na proporção de 83.5 cm³ de ácido clorídrico concentrado, de densidade 1.19 (36.7%) para 916.5 cm³ de água destilada. Colocar duas gramas de metabisulfito de potássio. Deixar descorar pelo espaço de 24 horas. Adicionar, si necessário 0.5 c de carvão vegetal, agitar por 1 minuto e filtrar rapidamente através de papel de filtro. A solução deve ficar amarelo-pálida, em caso contrário tentar com fucsina de outra procedência.

b) Técnica:

- 1 — Desparafinar os cortes, e hidratá-los de acôrdo com a técnica usual.
- 2 — Colocar em solução de ácido periódico a 1%, durante 10 minutos.
- 3 — Lavar em água destilada.
- 4 — Colocar no reagente de Schiff durante 15 minutos.
- 5 — Colocar diretamente, sem lavagens intermediárias, em 3 mudas de metabisulfito de potássio, solução preparada da seguinte maneira:
10.4 g % de metabisulfito de potássio (sol. estoque).
Tomar 6 cm³ desta solução e diluir em 114 cm³ de água destilada (90 segundos em cada borrel desta solução).
- 6 — Lavar em água corrente durante 10 minutos.
- 7 — Corar os núcleos com hematoxilina de Lillie-Mayer.
- 8 — Realizar coloração de fundo de preferência com verde luz.
- 9 — Desidratar e montar.

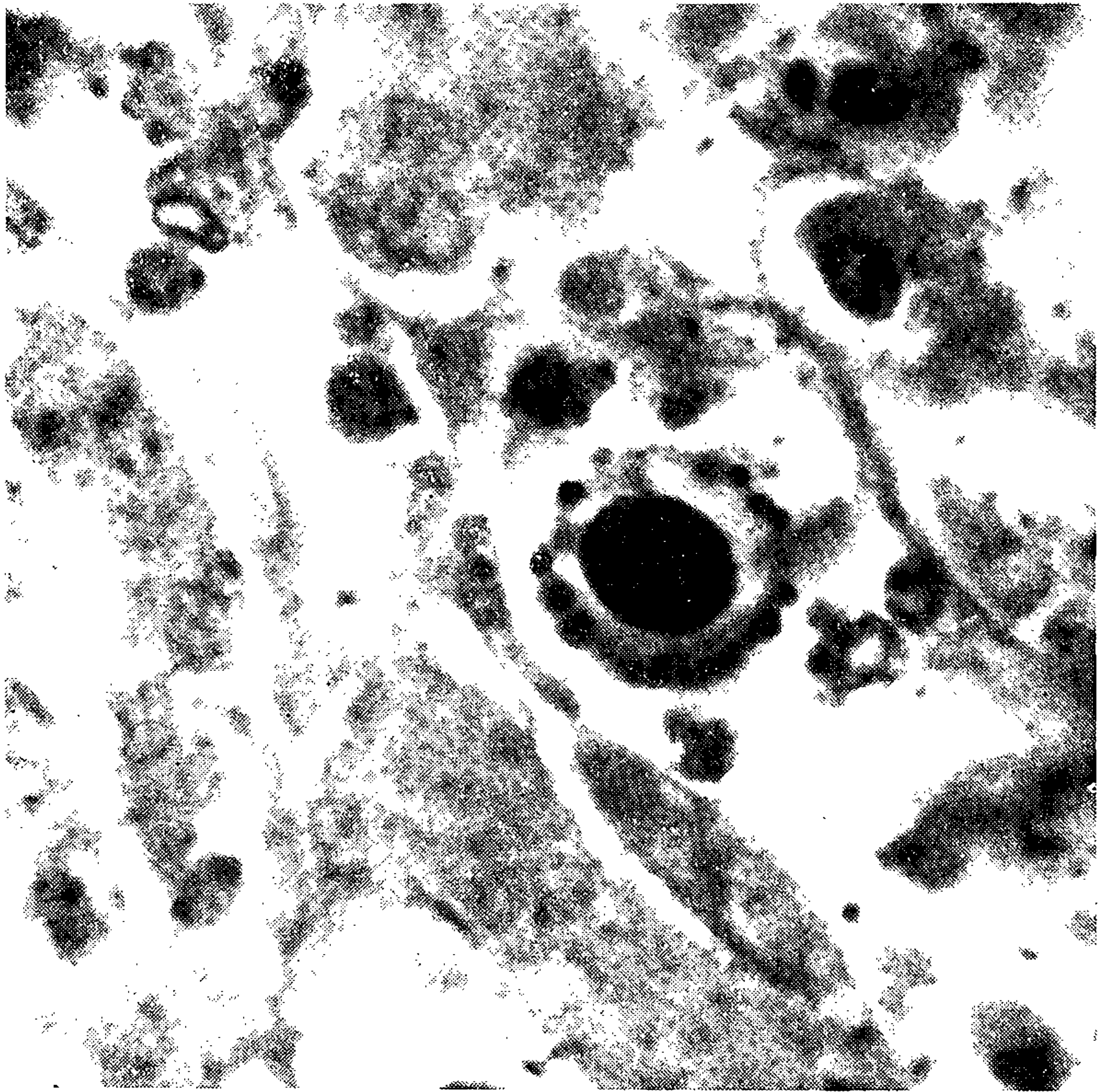


Fig. 1 — Blastomycose. x 800. Figado. Col. PAS.

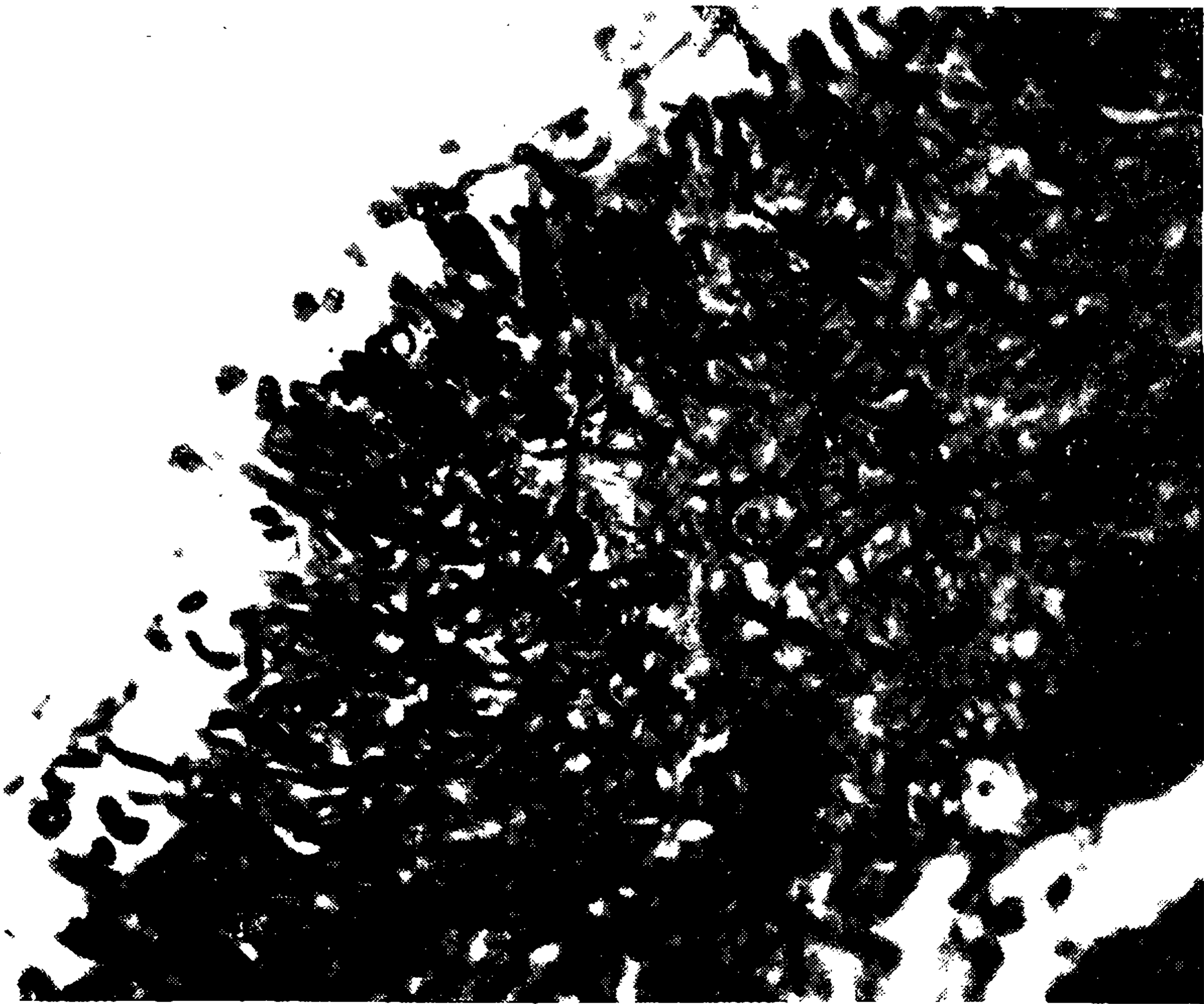


Fig. 2 — Blastomycose. x 800. Rim. Col. PAS.

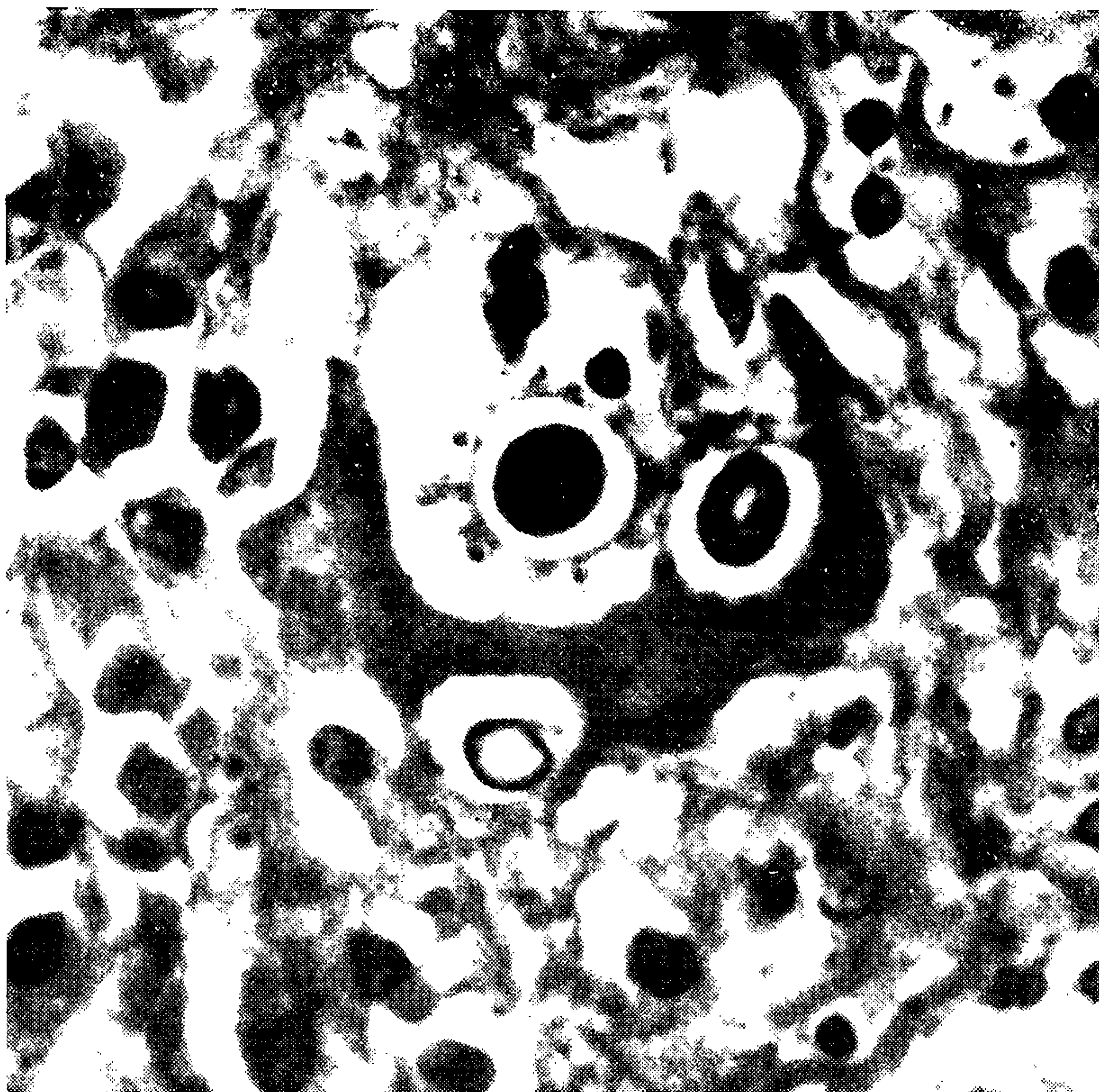


Fig. 3 — Blastomicose 800. Gânglio linfático. Col. PAS.



Fig. 4 — Actinomicose. Grão. x 320. Col. PAS

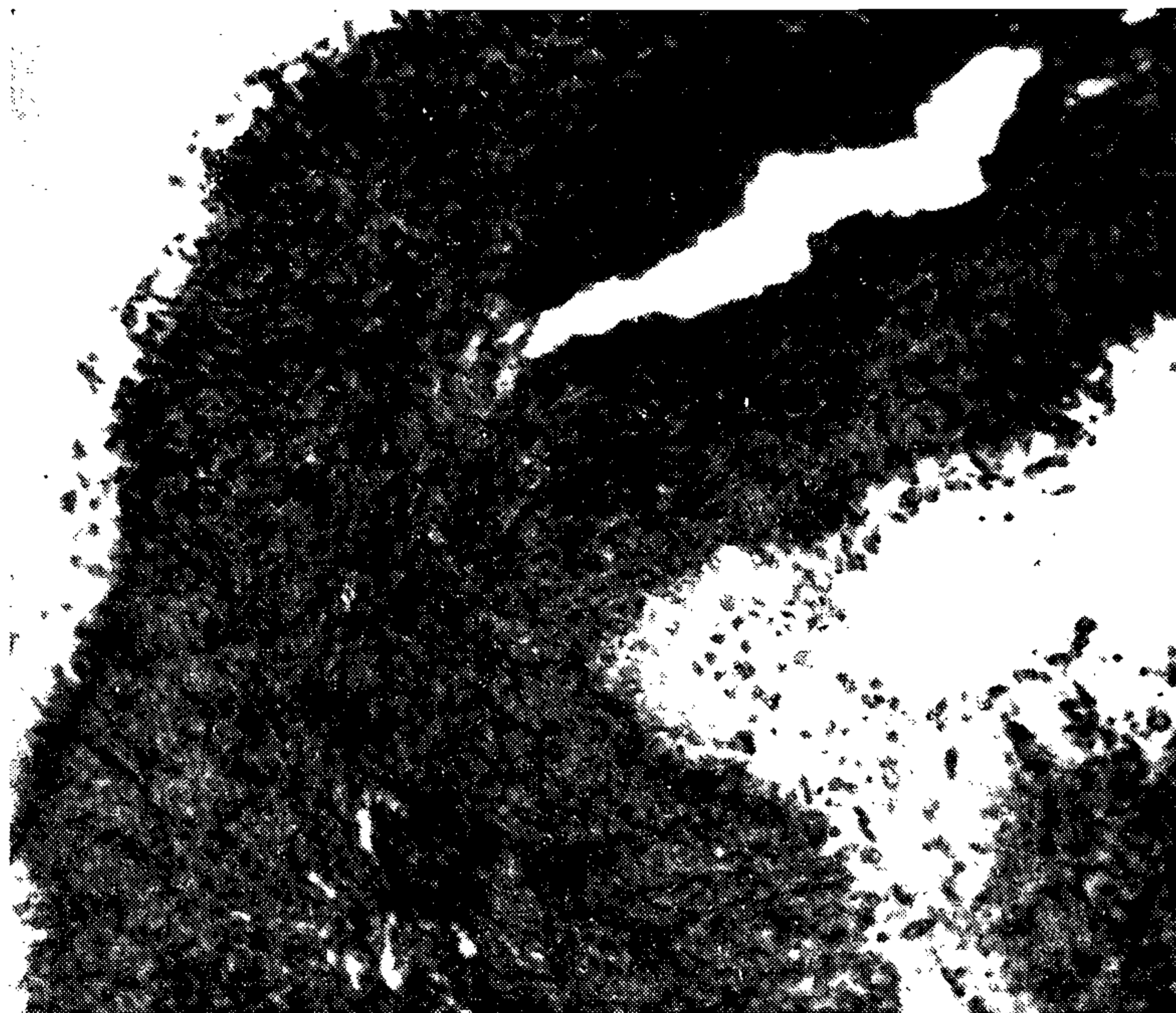


Fig. 5 — Actinomicose. Grão. x 120. Col. PAS.

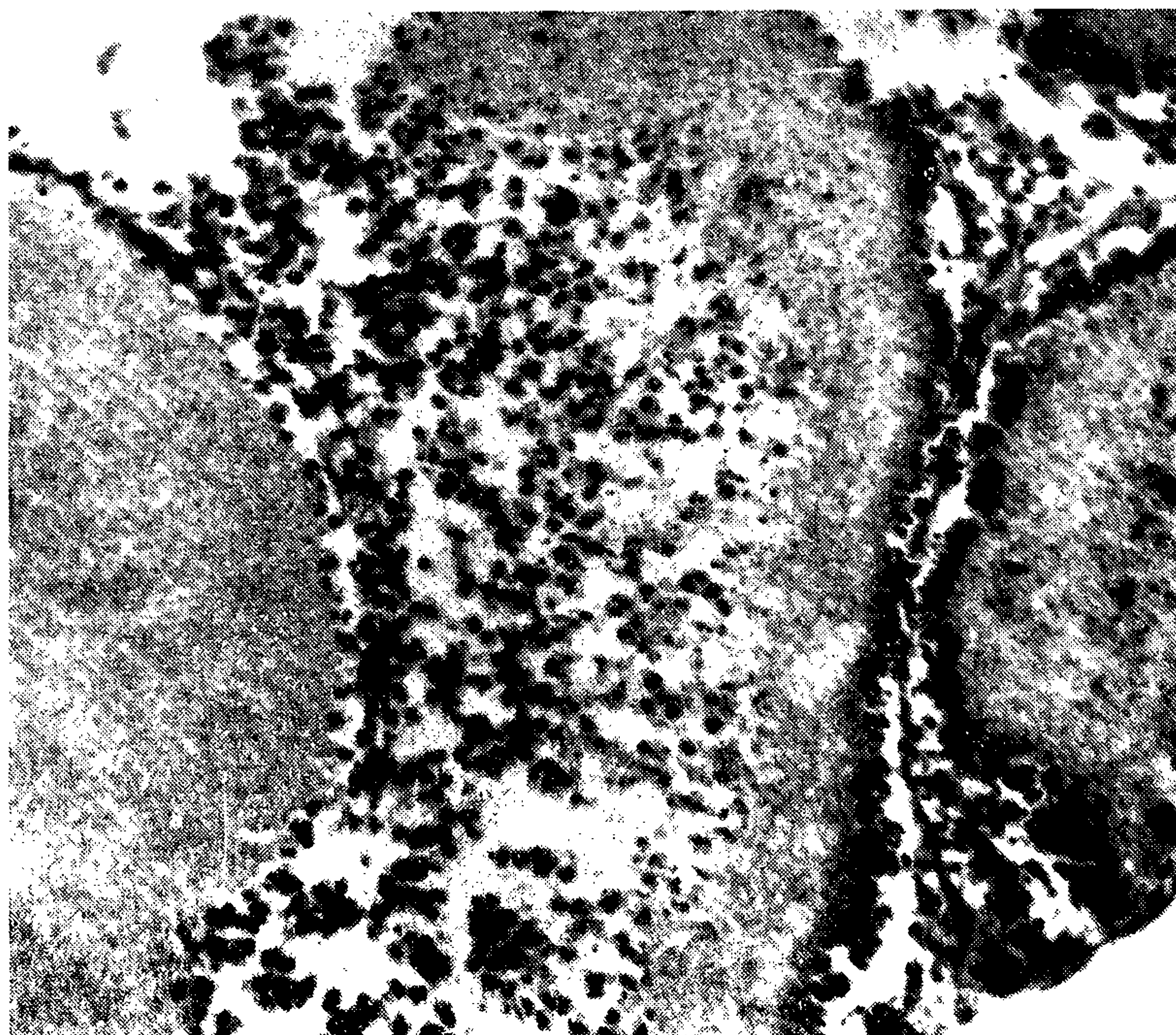


Fig. 6 — Actinomicose. Grão. Hematoxilina-eosina x 120.



Fig. 7 — Cromoblastomicose. x 800. Pele. Col. PAS.



Rinosporidiãse. Polipo nasal. Col. PAS x 320.

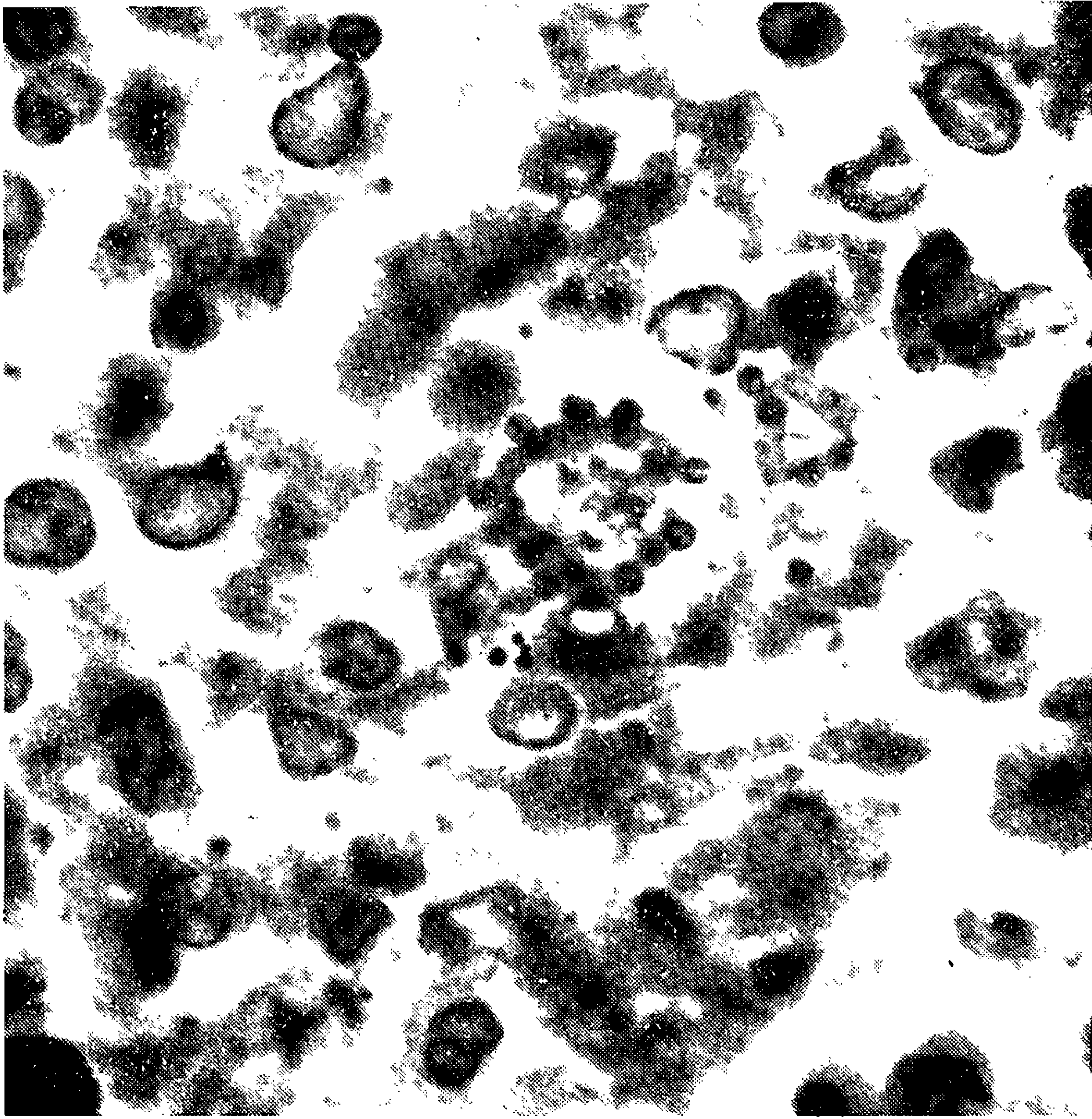


Fig. 9 — Criptococose

RESULTADOS

Com a técnica acima descrita, tivemos a oportunidade de observar, 6 casos de blastomicose sul-americana, 1 caso de rinosporidiose, 1 caso de criptococose, 2 casos de actinomicose e 1 caso de cromoblastomicose.

As fotografias exibidas a seguir, demonstram perfeitamente a nitidez dos cogumelos corados pelos PAS, comparando-se em um caso com preparação corada pela hematoxilina-eosina.

Blastomicose sul-americana.

Vemos nitidamente em tôdas as fotografias apresentadas o aspecto característico de roda de leme, com as suas esporulações externas. O cogumelo em todos os tecidos sobressai acentuadamente, corando-se sua membrana de duplo contôrno em vermelho intenso, contra um fundo corado em verde.

Actinomicóse.

Em duas microfotografias apresentadas, vemos um grão actinomicótico corado pelo PAS, notando-se o enovelamento do micélio, e em certos pontos as características dilatações terminais. Em uma fotografia de preparação corada com hematoxilina-eosina, notamos infiltrado leucocitário, sendo todavia o micélio muito pouco nítido.

Cromoblastomicose.

Com o método de PAS, notamos no interior da célula gigante, dois cogumelos, um dos quais com dupla segmentação. No seu interior percebemos pequeninos filamentos corados em verde escuro pelo verde luz.

Rinosporidiose.

Em um corte de polipo nasal, vemos uma nítida membrana envolvente, com poro situado à esquerda. Os esporos apresentam-se muito nítidos, com uma divisão interna em pequenos compartimentos.

Criptococose.

Em um caso de meningite, verificamos corando-se pelo PAS, um cogumelo perfeitamente redondo, com membrana corada discretamente em róseo, sem aparentemente evidenciar uma estrutura interna.

DISCUSSÃO

O método de PAS, se baseia essencialmente no reagente de Schiff, o qual é preparado, descorando-se fucsina básica com ácido clorídrico e metabisulfito anidro. Esta fucsina-ácido sulforoso descorada, vai se combinar com os aldeídos. Quando esta combinação se realiza, o reagente se recolora pela adição de aldeído e si o aldeído é relativamente insolúvel, a substância que o contém poderá se corar, variando a intensidade

desde o róseo ao vermelho púrpura. Os cogumelos patogênicos e algumas bactérias contêm material que, após oxidação, com ácido periódico, forma compostos adicionais corados com o reagente de Schiff.

A maioria dos autores, todavia, é de opinião, de que no caso dos cogumelos a coloração não é devida a uma reação histoquímica característica, e sim exclusivamente uma coloração de contraste, principalmente se utilizarmos o verde luz como corante de fundo, pois neste caso os cogumelos corados intensamente em vermelho, tornam-se mais nitidamente visíveis.

STARR, DAWE e WEED (4), em recente publicação, concluem os seguintes fatos:

- 1 — O PAS é o melhor método para evidenciar os cogumelos patogênicos nos tecidos com reação granulomatosa. Deve, entretanto, ser considerado como um método auxiliar, pois muitas vezes somente a cultura poderá nos dar o diagnóstico etiológico.
- 2 — É preciso grande cuidado, pois, algumas vezes o método do PAS, pode produzir artefatos, facilmente confundíveis com histoplasma e esporótrico.

A nosso ver, o método do PAS, é um extraordinário auxiliar na identificação e no estudo morfológico dos cogumelos patogênicos produtores de micoses, deixando-se todavia, bem claro, de que o diagnóstico de espécie somente poderá ser realizado pela cultura do agente.

RESUMO

Os autores apresentam 6 casos de blastomicose sul americana, 2 casos de actinomicose, 1 caso de rinosporidiose, 1 de cromoblastomicose e 1 caso de criptococose, estudando os respectivos cogumelos responsáveis, pela coloração empregando o ácido periódico-Schiff. As vantagens deste método para identificação e estudo morfológico são evidenciadas pelas microfotografias apresentadas.

SUMMARY

The authors present 6 cases of south american blastomycosis, 2 cases of actinomycosis, 1 case of rhinosporidiosis, 1 case of chromoblastomycosis and one case of cryptococcosis. They study the respective fungi employing the periodic-acid-Schiff reaction. The advantages of this method for identification and morphologic studies are seen through the photomicrographs in this paper.

BIBLIOGRAFIA

1. Mc MANNUS, J.F.A., 1946. Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, 158, 202.
2. HOTCHKISS, R.D., 1948, A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch. Biochem.* 16 : 131-141.
3. KLIGMAN, A.M., 1952. The diagnosis of Fungus infections with particular reference to staining methods. *Progress in Fundamental Medicine*. Lea & Febiger, Phila.
- 4 — STARR, G.F., DAWE, C.J. & WEED, L.A., 1955, Use of periodic acid — Schiff stain in identification of pathogenic fungi in tissues. *Am. J. Clin. Path.* 25 : 76.
5. SEABURY, J.H., PEABOBY, J.W. & LIBERWAN, M.J., 1954, The usefulness of the Hotchkiss — McMannus stain for the diagnosis of the deep mycosis. *Diseases of the chest* 25 : 1.
6. KADE, H. & KAPLAN, L., 1955, Evaluation of staining techniques in the histologic diagnosis of fungi. *Arch. of Path.* 59 : 571-577.
7. PUCKETT, T.F., 1953, Pulmonary histoplasmosis: a study of twenty-two cases with identification of *H. castulatum* in resected lesions. *Am. Rev. Tuberc.* 67 : 453-476.
8. LILLIE, R.D., 1948. *Histopathologic technic*. The Blakiston Co., Phila. and Toronto.