

RESUMEN.

Los sueros equinos antitóxicos (antidiftérico y antitetánico) desnaturizados, por acción proteásica o carbohidrásica, de modo que no provoquen anafilaxia aguda por inyección intracardíaca a los cobayos sensibilizados para el suero íntegro ni originen contracciones de los órganos aislados de estos mismos animales, no producen en la clínica el cuadro típico de la enfermedad del suero, aun cuando se trate de sujetos reinyectados, obteniéndose sólo un 10,34 por 100 de manifestaciones monosintomáticas, leves y fugaces, correspondientes a dicho síndrome.

BIBLIOGRAFIA

1. F. MORENO DE VEGA.—Rev. Clin. Esp., 19, 96, 1945.
2. F. MORENO DE VEGA.—Rev. Clin. Esp., 22, 114, 1946.

SUMMARY

Antitoxic horse sera (antitoxinum diphthericum and antitoxinum tetanicum) that have been denaturalized through proteasic or carbohydrazic action so as not to give rise to acute anaphylaxis by means of intracardiac injection in guinea-pigs sensitized to the whole serum, do not produce contractions in the isolated organs of these same animals nor do they produce a clear clinical picture of serum sickness, even in cases of individuals repeatedly injected. In only 10,34 % of the cases are single, slight and fleeting symptoms seen that belong to this syndrome.

ZUSAMMENFASSUNG

Die antitoxischen Pferdeseren für Diphtherie und Tetanus, die durch Proteolitische oder Carbohydrasewirkung entnaturalisiert worden sind, so dass sie bei Totalserum gegenüber sensibilisierten Meerschweinschen nach intracardialer Injektion keine akute Anaphylaxie hervorrufen und auch an den isolierten Organen dieser Tiere keinerlei Kontraktionen erzeugen, rufen in der Klinik nicht mehr das typische Bild der Serumkrankheit hervor, auch nicht, wenn die Injektion wiederholt wird. In nur 10,34 % traten leichte und vorübergehende, ganz vereinzelte Manifestationen dieser Krankheit auf.

RÉSUMÉ

Les sérum équins antitoxiques (antidiphthérique et antitétanique) dénaturalisés, par action protéasique ou carbohydrasique, de manière à ne pas provoquer d'anaphylaxie aigüe, par injection intracardiaque, chez les cobayes sensibilisés par le serum intégral, et qui n'originent pas de contractions des organes isolés de ces mêmes animaux, ne produisent pas dans la clinique le cadre typique de la maladie du serum, bien qu'il s'agisse d'un sujet reinjecté, obtenant uniquement un 10,34 % de manifestations monosymptomatiques, légères et fugaces, correspondant au dit syndrôme.

MICRORREACÇÃO DE WASSERMANN

(Micrométodo qualitativo e microtitulação da reagina.)

G. EGREJAS

Chefe de Laboratório.

Hospital de Júlio de Matos, Lisboa.
Director: Prof. A. Flores; Chefes de Clínica: Prof. Barahona Fernandes - Dr. Pedro Polónio.

I

São numerosas as microrreacções, quer de fixação do complemento, quer de flocação, que teem sido propostas para o diagnóstico serológico da Sífilis (DEMANCHE e LEMELAND; CHEDIACK, DAVIES, EAGLE, KLINE, LEIBOFF, MAZZINI, MEINICK, ROSENTHAL, STRAUSS, etc., etc.). As respectivas técnicas, de tipo qualitativo, são, na maior parte, reacções de flocação, e abundam entre estas, as modalidades executadas em lâmina.

Não obstante o seu número e variedade, não obtiveram tais técnicas, em muitos laboratórios, aquele franco acolhimento e plena aprovação que poderiam permitir, a algumas delas, o ingresso na rotina dos serviços. No entanto, sente-se constantemente a sua falta em todos os casos em que a colheita de sangue venoso se apresenta difícil ou impossível, com os meios habituais.

Passando em revista as diversas microrreacções de que pudemos ter conhecimento, julgámos encontrar no próprio aspecto das técnicas, tanto sob o ponto de vista da incomodidade de execução como no que respeita à exigência de um critério particular, e por vezes pouco definido, de apreciação dos fenómenos resultantes, a razão das críticas que vulgarmente lhes são feitas, e o motivo do desfavor com que, por vezes, teem sido acolhidas. A necessidade de por em uso um antigénio diferente dos habituais e de preparação ou obtenção muitas vezes difíceis, o aspecto grosseiramente qualitativo de algumas reacções no seu modo de execução, a exigência de titulações especiais e a natureza do material empregado em certos métodos, enfim, a falta de paralelismo entre as operações técnicas das microrreacções e dos métodos clássicos que teem de manter-se em rotina, são, na verdade, inconvenientes de considerável influência. Por tais motivos, ao que parece, a maior parte das técnicas propostas não chegou a ser ensaiada ou foi abandonada, em muitos serviços laboratoriais.

A microrreacção de Wassermann que vamos propor, com as suas modalidades qualitativa e quantitativa, consegue efectuar comodamente e com perfeita segurança de resultados, a vulgar reacção de Wassermann qualitativa, e a determinação do título de reagina no sôro, empregando apenas, em qualquer dos casos, uma colheita de 0,2 c. c. de sangue—não mais, portanto, do

que a quantidade exigida pelos micrométodos consagrados da determinação da glicose, da ureia, do azoto total não proteico, da velocidade de sedimentação, etc. A punção digital da prática corrente não tem, pois, qualquer dificuldade em fornecer o sangue necessário para a microreacção.

As técnicas que vamos descrever tem pouca originalidade e nisso reside, talvez, a sua melhor recomendação. Não pretendemos forçá-las nesse sentido, tanto mais que a sua semelhança e proximidade às reacções clássicas lhes dá o carácter essencialmente prático que desejávamos. Assim, os elementos reagentes são os mesmos da habitual reacção de Wassermann e submetidos às mesmas titulações, e as diversas operações e os respectivos tempos são também iguais, de modo que podem efectuar-se as microrreacções a par das reacções da rotina já estabelecida e na mesma sessão.

Manteem-se exactamente as proporções recíprocas dos elementos reagentes que a experiência estabeleceu como mais aconselháveis. As proporções em relação ao volume total, de não menor importância para o desencadeamento dos fenómenos coloidais que interessam à reacção, são também conservadas. Deste modo, afastam-se sérios motivos de crítica que incidem sobre outras microrreacções. Finalmente, o critério de apreciação dos resultados não requer qualquer adestramento especial.

O micrométodo que apresentamos, em qualquer das suas modalidades, não merecerá pois, ser considerado mais do que simples modificação às técnicas vulgares. A sua utilidade prática, não obstante, pareceu-nos apreciável, e isso nos animou à presente publicação.

II

O método que propomos tem por base uma diluição inicial do sangue da eccheta, com soro fisiológico, em proporções determinadas de modo a obter, após remoção do ecágulo, um soro diluído segundo um título que, sendo variável dentro de limites conhecidos, é sempre apropriado à realização da técnica qualitativa. A reacção de Wassermann propriamente dita, é de facto alterada o necessário para admitir este soro diluído, e reduzida nas suas doses a 3/10 do seu valor habitual. Este simples artifício é praticamente aplicável a todos os métodos correntes de soro inactivado, devendo apenas estudar-se para cada um, a adaptação conveniente, segundo o exemplo apresentado neste trabalho.

A técnica que vamos descrever toma como ponto de partida a reacção de Wassermann segundo KOLMER, na sua modalidade qualitativa, apenas com 0,1 c. c. de soro (SANFORD), que nos abstemos de transcrever integralmente. Lembremos apenas, que a titulação do complemento é feita após uma hora de permanência em presença da dose antigenica a 37°, e relativamente a um sistema hemolítico constituído por 0,5 c. c.

de suspensão a 2 % de glóbulos de carneiro, e por duas unidades do amoceptor respectivo. A dose de complemento convencionada compõe-se de duas unidades completas (duas unidades exactas + 0,1 c. c. de soro de cobaia a 1/30). As diluições dos elementos reagentes realizam-se de modo que as respectivas doses fiquem contidas nos seguintes volumes:

Antigénio (diluição optima).....	0,5 c. c.
Complemento (2 unidades completas). .	1 c. c.
Amoceptor hemolítico (2 unidades). .	0,5 c. c.
Suspensão globular (a 2 %).....	0,5 c. c.

A reacção passa-se num volume total de 3 c. c. que a quantidade indicada de soro problema (0,1 c. c.) e o necessário soro fisiológico (0,4 c. c.) completam convenientemente.

Pretendemos efectuar a microrreacção com os mesmos reagentes utilizados na técnica clássica de KOLMER, mas, isso não nos foi possível sem introduzir, nesta última, uma leve alteração que consiste em reduzir a metade a diluição do complemento (empregando, por consequência, na reacção, apenas metade do volume habitual) e em aumentar de 0,5 c. c. a quantidade de soro fisiológico.

As doses dos diversos elementos reagentes ficam assim contidas num volume uniforme, igual a 0,5 c. c. A quantidade de soro fisiológico passará, portanto, para 0,9 c. c., de modo a completar o volume total de 3 c. c. acima indicado:

Soro fisiológico	0,9 c. c.
Soro problema	0,1 c. c.
Antigénio (diluição optima em relação às doses dos outros elementos reagentes).....	0,5 c. c.
Complemento (2 unidades completas).....	0,5 c. c.
Amoceptor hemolítico (2 unidades).....	0,5 c. c.
Suspensão globular (a 2 %).....	0,5 c. c.

Esta modificação à técnica de Kolmer, sendo apenas de pormenor, em nada prejudica, evidentemente, quaisquer qualidades que possa ter o seu esquema original. Podemos afirmar até, que lhe acrescenta uma vantagem. Assim, quando se efectua a reacção com líquido céfalo-raquidiano, a técnica primeiramente indicada não admite mais de 0,5 c. c., ao passo que no esquema modificado se podem introduzir maiores quantidades. E, embora a interpretação dos resultados obtidos com doses elevadas de líquido céfalo-raquidiano deva ser cuidadosamente ponderada, não há dúvida que a possibilidade de se realizar a reacção nestas condições, representa apreciável melhoramento.

Com qualquer outra técnica diferente da de Kolmer, quer no seu esquema de ensaios quer nas operações de titulação, para se poder efectuar a microrreacção com os mesmos reagentes, apenas se torna necessário modificar as diluições destes últimos, de modo que as respectivas doses fiquem contidas no volume uniforme de 0,5 c. c. Evidentemente que estas doses a que nos referimos, devem corresponder a um esquema de ensaios cujo volume total seja igual a

3 c. c. Quando se trate de técnicas que adoptam um volume total de ensaio diferente deste, torna-se necessária uma mais profunda modificação, que afectará também o próprio sistema de titulações, e que terá como objectivo a transposição de todas as operações para volumes totais de 3 c. c.

Nenhuma outra modificação é preciso adoptar para pôr em prática a microrreacção. No entanto, julgamos aconselháveis, para melhoramento paralelo da reacção vulgar e da microrreacção, outras modificações à técnica de Kolmer, que mencionamos e justificamos apenas resumidamente, por se desviarem do objectivo principal deste trabalho. São elas, a redução da dose de complemento a uma unidade exacta + 0,1 c. c. de sôro de cobaia a 1/30, e o emprêgo de uma dose constituída por aquela unidade + 0,05 c. c. do mesmo sôro diluído, nas testemunhas.

A primeira modificação significa, evidentemente, um aumento de sensibilidade da prova. E recomendável, em especial, para quem entenda não dever usar, ou não disponha, de antígenos hipercolesterinados altamente sensíveis. A experiência não nos tem condenado esse aumento de sensibilidade, por excessivo, e, pelo contrário, em numerosos casos de sífilis tratada, com baixos níveis de reagina no sôro, pudemos apreciar o seu valor. Além disso, quando se emprega sôro de cobaia recente, a margem de complemento livre não fica tão pequena como pode parecer, porque a unidade determinada na titulação com uma hora de permanência a 37°, é bastante superior à unidade correspondente a 5-8 ou mesmo 15 horas de geleira, a qual, na verdade, é a que interessa à reacção. Em numerosas experiências de titulação comparativa que realizámos, pudemos verificar que a diferença entre as unidades assim determinadas é variável de sessão para sessão, e atinge com frequência, valores de 0,15 a 0,20 c. c. de sôro de cobaia a 1/30. Há pois que considerar e combater, em novas técnicas, mais este factor variável entre as numerosas causas determinantes da inconstante sensibilidade da reacção. Notaremos, entretanto, que o sôro estabilizado no sua actividade complementar (Nicolle e Pozerski) não apresenta aquella divergência e com facilidade produz unidades muito mais aprimadas nos dois processos de titulação. Justificando, ainda, a mesma modificação, devemos ponderar também, que em diversas técnicas conhecidas se valorizam resultados correspondentes à fixação de margens de complemento ainda menores (método de Sormani, método de Mathis e Lebougle, vários métodos de sôro activo), de modo que, o aumento de sensibilidade que recomendamos, mesmo à luz da experiência alheia, não deve ser rejeitado como comprometedor para o grau de especificidade indispensável.

A outra modificação que indicámos, tem por fim conferir um valor decisivo às testemunhas, com vantagem, sobre tudo, no apuramento dos casos de positividade moderada. Julgamo-la recomendável especialmente, quando se trabalhe com uma margem reduzida de complemento livre, como aconselhámos na primeira modificação. O valor que adoptámos como diferença entre as doses de complemento destinadas aos tubos de reacção e aos tubos testemunhas (0,05 c. c. de sôro de cobaia a 1/30), resultou de numerosas experiências de titulação comparativa do complemento, com e sem a presença de antígenos habituais, em que as diferenças verificadas nunca excederam aquele valor. Por outro lado, uma tal margem de segurança não se mostrou, na prática, impediva ou prejudicial para a legibilidade dos resultados, e a sua concepção tem, evidentemente, muito mais lógica do que o emprêgo, com o mesmo fim, de uma dose reforçada de sôro problema nas testemunhas, visto que, é ao antígeno e não a este sôro que se atribuem as diferenças de inibição inespecífica entre os ensaios de reacção e de testemunha. A modificação indicada, tem ainda a vantagem de proporcionar um certo grau de segurança contra os erros de técnica causados por im-

perfeições na medida dos reagentes, actuando em conjunção, o que não é para desprezar no trabalho corrente, conforme temos podido observar.

TÉCNICA DA MICRORREACÇÃO QUALITATIVA.

Lançar num tubo de centrífuga de fundo estreito, 0,9 c. c. de sôro fisiológico. Com uma pipeta de 0,2 c. c. (ou de 0,1 c. c., por duas vezes), colher este volume de sangue capilar e juntá-lo ou sôro fisiológico, lavando a pipeta e agitando ligeiramente. Enquanto não se adquirir alguma prática, é prudente empregar quantidades um pouco maiores—1,35 c. c. de sôro fisiológico e 0,3 c. c. de sangue—mas, após os primeiros ensaios, esta precaução é completamente dispensável.

Guardar o tubo na geleira durante algumas horas, e de preferência até ao dia imediato. Descolar a formação fibrinosa das paredes do tubo, empregando o fio de platina. Centrifugar a alta velocidade. Transferir o sôro diluído, agora separado do coágulo, com uma pipeta de Pasteur afilada, provida de tetina, para outro tubo de centrífuga idêntico ao primeiro, aproveitando cuidadosamente o maior volume possível. Conservar na geleira. Inactivar conforme as regras habituais. Este é o "sôro problema diluído" apropriado à reacção.

Antes ou durante a inactivação pode aparecer, raramente, uma nova formação fibrinosa que deve remover-se repetindo as operações indicadas.

Devem usar-se tubos escrupulosamente limpios, e evitar-se hâ o emprêgo de sôro fisiológico de pH demasiadamente baixo que, além dos inconvenientes vulgarmente apontados, pode aqui prejudicar, em certos casos, a estabilidade dos componentes coloidais do sôro, principalmente durante a inactivação.

Quem desejar reduzir a quantidade de amboceptor hemolítico natural contido nos sôros, deverá efectuar a colheita do modo acima indicado, mas com 0,3 c. c. de sangue e 1,30 c. c. de sôro fisiológico. Procederá como ficou descrito até concluída a inactivação, e juntará depois ao líquido uma gota de suspensão globular a 10 %, em sôro fisiológico. Após 15 minutos de estágio na geleira, centrifugará e decantará, obtendo o "sôro problema diluído" pronto para realizar a reacção.

Para a microrreacção propriamente dita, utilizam-se tubos de ensaio de 12 mm. × 75 mm., aproximadamente (tubo vulgar para a reacção de Kahn). Empregam-se, como já dissemos, os mesmos tempos e reagentes da reacção vulgar segundo KOLMER, excepto o complemento que será preparado em dupla concentração.

O esquema da reacção é o seguinte:

	Ensaio de reacção	Ensaio de testemunha
"Sôro problema diluído".....	0,3 c. c.	0,3 c. c.
Antígeno (diluição optima)....	0,15 c. c.	—
Sôro fisiológico	—	0,15 c. c.
Complemento (3/10 da dose)....	0,15 c. c.	0,15 c. c.

Período de estágio na geleira.
Período de estágio em B. M. a 37°

	Ensaio de reacção	Ensaio de testemunha
Amboceptor hemolítico (3/10 de 2 unidades)	0,15 c. c.	0,15 c. c.
Suspensão globular (a 2 %) ...	0,15 c. c.	0,15 c. c.
Período de estágio em B. M. a 37°		

A leitura faz-se com o mesmo critério empregado para a reacção de Wassermann vulgar, e, quer imediata, quer tardia, após sedimentação (hoje geralmente condenada), ou ainda acompanhando o decorrer da hemólise, não apresenta qualquer dificuldade porque o volume contido nos tubos oferece à observação uma coluna de altura suficiente para permitir uma boa apreciação do grau de hemólise.

TÉCNICA DA MICRORREACÇÃO QUANTITATIVA.

Esta modalidade que se destina à determinação do título de reagina no sôro, realiza-se, conforme as regras práticas geralmente estabelecidas, não como um método de diagnóstico inicial, mas após uma reacção qualitativa que deu resultado positivo com inibição completa da hemólise.

Por esta razão pudemos limitar a técnica à pesquisa do título de reagina apenas a partir de 1/2, inclusive, visto que um título menor que este, tendo dado anteriormente um resultado positivo na reacção qualitativa, não deixa por isso de ficar claramente determinado (1/1).

A microdeterminação do título de reagina no sôro, pode efectuar-se com o líquido de colheita obtido, como acima indicámos, para a técnica qualitativa, quando puder excluir-se a existência de uma anemia intensa, e quando, em trabalho corrente, for tolerável um resultado apenas aproximado (com um erro, em todo o caso, muito menor do que o valor da oscilação natural dos resultados, de sessão para sessão, admitido pelos mais autorizados serologistas). Este modo, de proceder, cómodo e simples, satisfaz na prática, perfeitamente.

Quando se quiser obter um título mais exacto, não sujeito às variações do volume de eritrocitos sedimentados, isto é, praticamente igual ao que resultaria de uma determinação efectuada em sôro de sangue venoso pelo método quantitativo vulgar, proceder-se há segundo a técnica que descrevemos a seguir.

Para um tubo de centrifuga de fundo estreito, medir 0,6 c. c. de sôro fisiológico. Juntar 0,2 c. c. de sangue capilar e agitar um pouco, após lavagem da pipeta. Colher também sangue para um hematórito de Van Allen ou de Daland, e determinar o volume de eritrocitos sedimentados (V. E. S.).

A diluição de sangue efectuada naquele tubo

de centrifuga, há que acrescentar ainda um volume V de sôro fisiológico que se calcula pela expressão seguinte:

$$V = 0,018 (100 - V. E. S.) - 0,6$$

Deduzimos esta fórmula de um modo simples que passamos a descrever:

Volume de sangue colhido = 0,2 c. c.

Volume dos eritrocitos sedimentados = V. E. S. (em 100 c. c.).

Diluição de sôro pretendida = 1/10.

Com esta diluição, o emprêgo de 0,15 c. c. ou de 0,20 c. c. de sôro diluído, corresponde, respectivamente a 0,015 ou 0,020 de sôro puro, isto é, 3/20 ou 4/20 da dose de sôro habitual.

O volume de sôro existente nos 0,2 c. c. de sangue da colheita, é dado, evidentemente, pela expressão:

$$\frac{V. E. S.}{0,2} - \frac{500}{500}$$

Designemos por X o volume de sôro fisiológico que é necessário juntar aos 0,2 c. c. de sangue da colheita, para obter a referida diluição a 1/10.

Posto o problema em equação obtém-se a seguinte igualdade:

$$X + \left(0,2 - \frac{V. E. S.}{500}\right) = 10 \left(0,2 - \frac{V. E. S.}{500}\right)$$

ou:

$$X + \left(\frac{100 - V. E. S.}{500}\right) = 10 \left(\frac{100 - V. E. S.}{500}\right)$$

onde:

$$X = 9 \left(\frac{100 - V. E. S.}{500}\right)$$

$$X = 0,018 (100 - V. E. S.)$$

Como, no acto da colheita, se efectua uma diluição provisória do sangue, com 0,6 c. c. de sôro fisiológico, o volume V a acrescentar, será apenas:

$$V = X - 0,6$$

ou, finalmente:

$$V = 0,018 (100 - V. E. S.) - 0,6$$

Adicionado este volume V de sôro fisiológico ao tubo de colheita, esperar, descolar o ecáculo, centrifugar e decantar, como foi indicado na técnica qualitativa. Inactivar segundo as normas habituais.

Com o líquido proveniente de qualquer das modalidades de colheita, proceder à determinação do título de reagina, conforme o esquema que damos a seguir (notar-se há que os ensaios "testemunha" e "1/2" são de facto correspondentes, visto que representam, respectivamente, reduções a 3/10 e a 4/10, das doses e do volume total, da técnica de que derivam).

	Test.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Sôro fisiológico	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Sôro problema	0,15	0,4	—	—	—	—	—	—	—	—
Passagens de 0,4	—	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antigénio (dil. opt.)	—	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Complemento (contendo 3/10 da dose em 0,15, ou 4/10 em 0,20 c. c.)	0,15	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Período de estágio na geleira
Período de estágio em B. M. a 37°

	Test.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Ambococeptor hemolítico (contendo 3/10 da dose em 0,15, ou 4/10 em 0,20 c. c.)	0,15	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Suspenção globular (a 2 %).....	0,15	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Período de estágio em B. M. a 37°

Dos ensaios de reacção, para se dispor de um volume facilmente manejável, foram os elementos reagentes reduzidos, não a 3/10, como na testemunha e na microrreacção qualitativa), mas a 4/10 das doses que se empregam no macrométodo correspondente. Esta mudança de coeficientes de redução, em nada altera, evidentemente, o significado dos ensaios, isto é, o seu valor representativo da técnica de que derivam e que se mantém invariável.

O sôro problema figura, pois, na quantidade de 4/10 de 0,05 c. c. (0,02 c. c. de sôro puro, ou 0,2 c. c. de sôro a 1/10) no ensaio de título "1/2", e em doses sucessivamente reduzidas a metade nos ensaios seguintes, cujos títulos se encontram anotados ao alto das colunas representativas dos diversos tubos, no esquema da determinação.

Tanto nesta técnica como na qualitativa, a qua anteriormente nos referimos, não incluimos testemunhas para o antigénio, sistema hemolítico e glóbulos, porque supusemos realizada paralelamente uma reacção de Wassermann vulgar, tornando inútil repetir nos micrométodos, as mencionadas verificações.

A leitura, procurando o ensaio com mais alta diluição de sôro, que apresenta inibição completa, tem de fazer-se com um critério de observação tanto quanto possível uniforme, e não suscitará maiores dificuldades que os métodos habituais de titulação da reagina.

Deve ter-se em conta que, naturalmente, o título de reagina assim definido—a mais alta diluição que fixa totalmente a dose de complemento escolhida—depende, de certo modo, da técnica utilizada, isto é, do volume de líquido problema (sôro em diversas diluições) que se emprega em relação ao volume total da reacção, da dose de complemento convencionada para esse mesmo volume, das qualidades do antigénio, etc. Não há que esperar, portanto, resultados iguais de diversas técnicas quantitativas, e, mesmo re-

lativamente a uma determinada técnica, tanto quanto possível uniforme com os meios de que actualmente se dispõe, não podem os títulos de reagina obtidos em diversas sessões utilizar-se com precisão para fins comparativos. Apenas deve atribuir-se significado às variações superiores a 100 % (EAGLE).

III

As diferenças possíveis entre os resultados da microrreacção qualitativa e os da reacção vulgar, se admitirmos que o conteúdo em reagina nos soros do sangue venoso e capilar é igual, devem depender apenas da variável proporção de sôro existente no sangue, ou, por outras palavras, das variações que pode apresentar o volume de eritrocitos sedimentados (despresada a presença de fibrina).

Vejamos pois, nesta hipótese, quais são as divergências que se podem esperar, considerando as alterações de que é susceptível aquela grandeza hematológica.

Quando o V. E. S. tiver um valor aproximado a 50 %, a microrreacção corresponderá, bastante exactamente, a uma reacção vulgar efectuada com 0,1 c. c. de sôro problema.

Em todos os casos em que o V. E. S. for acentuadamente inferior a 50 %, passará a microrreacção a corresponder a uma reacção vulgar, qualitativa, realizada com mais de 0,1 c. c. de sôro, o que, dentro de certos limites, pode tomar-se como um aumento de sensibilidade. Na verdade, porém, as alterações neste sentido são sempre moderadas. Assim, por exemplo, quando existe uma baixa acentuada do V. E. S., atingindo o valor de 25 %, a microrreacção qualitativa tornar-se há equivalente a uma reacção de Wassermann vulgar com cerca de 0,14 c. c. de sôro, e, mesmo nos casos de extrema baixa do V. E. S. (10 % ou menos) que raramente se ve-

rificam, aquela correspondência apenas se aproxima de 0,182 c. c. de sôro, não podendo em caso algum chegar a atingir exactamente este valor. Ora, na reacção qualitativa de Kolmer (modalidade semi-quantitativa, segundo SANFORD), as quantidades de sôro empregadas são 0,1 e 0,2 c. c., e, a experiência que temos desta técnica mostrou-nos que o ensaio de 0,1 c. c. raramente se revela superior em intensidade de positivação, ao de 0,2 c. c., sem que, em todo o caso, alguma vez tivessemos visto uma divergência ampla neste sentido. De resto, está estabelecido seguramente que as perdas de sensibilidade da reacção provocadas pelo emprêgo de quantidades excessivas de sôro problema (influência inibitória sobre a fixação do complemento exercida pelo elevado conteúdo proteico), tanto de recear nos métodos com incubação em banho-maria a 37°, não devem ser consideradas no Wassermann-geleira, em que, praticamente, a uma maior quantidade de sôro corresponde uma maior sensibilidade (embora dentro de certos limites, isto é, segundo Eagle, não ultrapassando 0,25 c. c. de sôro, num volume total à roda de 2,5 c. c.).

Os factos apontados parecem-nos suficientes para afastar apreensões quanto à variação de sensibilidade produzida pela descida do V. E. S.

Quando, pelo contrário, o V. E. S. estiver aumentado, a microrreacção corresponderá a uma reacção vulgar com menos de 0,1 c. c. de sôro. Daqui uma diminuição de sensibilidade que à primeira vista pode parecer de recear. Contudo, é fácil de concluir, examinando a questão, que, sempre que se trate de um engrossamento transitório do sangue, a microrreacção corresponderá mais de perto (e no sentido de maior sensibilidade) a uma macrorreacção que se efectuasse antes daquele engrossamento, do que a própria reacção vulgar praticada durante a hemoconcentração (também deslocada no sentido de maior sensibilidade, mas mais acentuadamente que a microrreacção). Os restantes casos de aumento do V. E. S., se for apreciada a sua frequência e amplitude de variação, não julgamos que devam ser considerados como objecção séria à utilidade desta técnica, na prática corrente.

A necessidade de verificar experimentalmente a utilidade das técnicas que ficam descritas, apreciando na prática, a segurança dos resultados que fornecem, em confronto com as técnicas de reputação firmada, levou-nos, em princípio, a planear a execução de uma extensa série de micro e macrorreacções qualitativas, em casos não seleccionados, de modo a poder constituir uma pesada estatística comparativa dos resultados, como é de uso em trabalhos d'este género. Contudo, uma apreciação mais cuidada do problema modificou a nossa atitude e conduziu-nos a outra maneira de proceder.

Na verdade, as longas estatísticas comparativas que estamos habituados a ver publicar com referência a diversas reacções para o diagnóstico serológico da sífilis, não obedecem a planos

de verificação organizados de acordo com alguns conhecimentos seguramente adquiridos nesta matéria. Assim, quando duas reacções são executadas em séries paralelas, para averiguar sobre a sensibilidade relativa que possuem, é natural, embora uma seja muito mais sensível do que outra, que concordem inteiramente em todos os casos francamente negativos (soros cujas características reaccionais não atingem o nível correspondente ao limiar da positividade da técnica mais sensível). Ora, estes soros, são a grande maioria dos casos, tanto quanto possível não seleccionados que veem aos laboratórios das clínicas vulgares.

Por outro lado, na maioria dos casos positivos que aparecem nos mesmos serviços, é sabido que o título de reagina excede, em medida mais ou menos apreciável, o valor necessário para produzir inibição completa da hemólise numa técnica escassamente sensível. Por consequência, com todos estes soros, é de esperar que seja também obtida concordância de resultados nas duas técnicas ensaiadas, mesmo que exista acentuada divergência das respectivas sensibilidades.

O valor probatório da fracção que acabamos de considerar, de uma série estatística de casos não seleccionados, assim constituída, temos de concluir que é de reduzido interesse. E, no entanto, essa fracção predomina largamente no número total das experiências realizadas.

Restam os casos com moderadas qualidades de positivação, baixos títulos de reagina, em que as técnicas em estudo confrontam efectivamente as suas sensibilidades; e falamos apenas de sensibilidades porque a existência de afinidades especiais de certos抗原s para determinados soros (fundamentando as técnicas com múltiplos抗原s) está hoje posta de parte, pois esclareceu-se definitivamente que um抗原 mais sensível engloba todos os resultados positivos fornecidos por outro menos sensível. Mas, ainda que assim não fosse, uma vez que nas nossas microrreacções utilizámos o mesmo抗原 da técnica clássica que lhes serviu de padrão para confronto, tal dúvida não ocorreria.

O exame comparativo que realizámos, não obedeceu inteiramente aos pontos de vista que acabamos de expor, pela dificuldade de reunir um número elevado de soros de positividade moderada (rejeitámos o recurso a misturas de soros positivos e negativos, de modo a obter o grau de positividade conveniente, por não desejarmos criar a possibilidade de se introduzirem novas variáveis no problema).

Também não quizemos desrespeitar completamente as normas de verificação que tem direitos adquiridos por um longo uso, em trabalhos d'este tipo. Praticámos, pois, a experiência comparativa em dois grupos de soros, um francamente negativo e outro positivo (hemólise nula) com a técnica de Kolmer, mas sem dúvidas sobre o escasso valor desta verificação.

Para controle da microrreacção qualitativa, escolhemos um grupo de 120 soros, em que 60

eram negativos e outros tantos positivos—incluindo nestes últimos, 9 casos de positividade moderada com a técnica padrão.

Os resultados fornecidos pela microrreacção e pela reacção de Wassermann segundo KOLMER, coincidiram em todos os casos negativos, bem como em todos os casos positivos (hemólise nula) dados por esta última reacção.

Dos 9 casos de positividade moderada com a reacção de Kolmer (hemólise parcial), 3 tiveram o mesmo aspecto nas duas reacções em confronto, e 6 mostraram maior grau de positividade na microrreacção do que na reacção vulgar, mas apenas com diferença muito ligeira.

A microrreacção nunca se comportou, pois, como menos sensível que a técnica padrão, e, em 6 casos, pelo contrário, evidenciou até um grau de sensibilidade levemente superior. No entanto, sendo tão moderado este acréscimo de sensibilidade, não ocorreu, nem há evidentemente que recear, qualquer prejuízo no grau de especificidade indispensável à reacção.

Estes resultados estão, naturalmente de acordo com o que se podia deduzir das considerações que expusemos sobre os fundamentos da técnica ensaiada.

Quanto à microrreacção quantitativa, com a modalidade de colheita corrigida pelo V. E. S., a verificação que realizámos consistiu numa série de 24 titulações de reagina, obtidas com o micrométodo e com o método vulgar, em casos positivos como títulos variados. A concordância dos resultados foi perfeitamente satisfatória e consante, nunca se encontrando diferenças sensíveis entre os títulos obtidos com as duas técnicas executadas na mesma sessão e com os mesmos reagentes.

Esta constatação, servindo a hipótese de que partimos, sobre a igualdade de conteúdo em reagina do sôro venoso e capilar, fornece, claramente, novo apoio experimental à técnica da microrreacção qualitativa.

Ao concluirmos este trabalho devemos registar o nosso agradecimento aos Exmos Directores, Chefs de Clínica e Assistentes do Hospital de Júlio de Matos e do Centro de Assistência Psiquiátrica do Sul, que nos proporcionaram o material de experiência indispensável, e ao Exmo Sr. Dr. Manuel Mendes Silva, a quem devemos uma cuidada revisão.

Para as Exmas Senhoras D. Maria Raquel Almeida Dias e D. Maria de Lourdes Corrêa Pinto, pela sua dedicada colaboração, sem a qual este trabalho não teria sido possível, vão também os nossos melhores agradecimentos.

RESUMO.

Apresentam-se duas técnicas de Microrreacção de Wassermann, uma qualitativa, e outra quantitativa para determinação do título de reagina no sôro. Esta última é proposta com duas modalidades, uma das quais, rigorosa, efectua a colheita de sangue de acordo com o valor do Volume de Eritrocitos Sedimentados (obtido em hematocrito capilar) por meio de uma fórmula simples.

Discute-se o comportamento das técnicas e relata-se a verificação experimental a que foram submetidas.

BIBLIOGRAFIA

- BRAY, W. E.—Synopsis of Clinical Laboratory Methods, 1946.
 CERVIA, T. y GUTIÉRREZ, V.—Rev. Clin. Esp., 24, 2, 1947.
 DIAS-AMADO, L. E.—Diagnóstico Laboratorial da Sifilis. Lições sobre Sifilis, 1946.
 EAGLE, H.—The Laboratory Diagnosis of Syphilis, 1937.
 GRADWOHL, R. B. H.—Clinical Laboratory Methods and Diagnosis, 1943.
 KAHN.—Arch. Derm. and Syph., 41, 817, 1940.
 KLINE, B. S.—Am. Journ. Clin. Path., 10, 83, 1940.
 KOLMER, J. A.—Diagnóstico Clínico Pelos Exames de Laboratório (trad.), 1946.
 KOLMER, J. A. y BOERNER, F.—Técnica de Laboratório (trad.), 1944.
 NAVARRO MARTÍN.—Métodos de Laboratório para Diagnóstico de la Sifilis, 1944.
 REZOLA AZPIAZU, A.—Rev. Clin. Esp., 17, 5, 1945.
 REZOLA AZPIAZU, A.—Rev. Clin. Esp., 20, 5, 1947.
 STOKES, J. H., BEERMAN, H. y INGRAHAM, N. R.—Modern Clinical Syphilology, 1944.
 TODD, J. y SANFORD, A.—Diagnóstico Clínico por el Laboratorio (trad.), 1943.
 TOPLEY, W. W. C.—Elementos de Inmunidad (trad.).
 TOPLEY, W. W. C. y WILSON, G. S.—The Principles of Bacteriology and Immunity, 1946.

SUMMARY

Two Wassermann micro-reaction techniques are given, one qualitative and the other quantitative, to determine the titre of the reagins in the serum. The last one is proposed in two forms, one of which, the most exact, measures the blood according to the values of the volume of sedimented erythrocytes (obtained with the capillary hematocrit) by means of a simple equation.

The behaviour of these techniques is discussed and the experimental checking to which they were subjected is put forth.

ZUSAMMENFASSUNG

Man beschreibt zwei verschiedene Methoden, um den Reagintiter im Serum für die Wassermannsche Microreaktion festzustellen, eine qualitative und eine quantitative. Für die zweite Art werden 2 Modalitäten vorgeschlagen, davon eine genauere, die das Blut mittels einer einfachen Formel nach dem Volumenwert der sedimentierten Erythrozyten berechnet, dieser Volumenwert wird durch Capilarhämatokriten festgestellt.

RÉSUMÉ

On présente deux techniques de microrréaction de Wassermann, l'une d'elles qualitative et l'autre quantitative pour la détermination du titre de réagine dans le sérum. Cette dernière est proposée avec deux modalités, l'une desquelles, plus exacte prend le sang selon la valeur du volume d'érythrocytes sedimentés (obtenu par valeur hématocrite capillaire) au moyen d'une simple formule.

On discute la conduite des techniques et on expose la preuve expérimentale à laquelle elles furent soumises.