

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE LEITURA E DA TEMPERATURA NA REAÇÃO V.D.R.L. °

DURVAL ROSA BORGES *

INTRODUÇÃO

Das novas reações para o diagnóstico da sífilis uma das mais interessantes pela simplicidade de técnica e fidelidade dos resultados é a comumente chamada de V. D. R. L., iniciais do "Venereal Disease Research Laboratory", onde foi criada e experimentada. Não se trata, na realidade, de reação nova, pois além de se basear nos mesmos princípios das demais reações de flocculação, muito se assemelha à reação de Kline, apenas se diferenciando pelo antígeno de cardiolipina, afinal também adotado por esta.

É uma reação de flocculação, de leitura microscópica, feita em lâminas com anel de parafina ou semelhantes. O antígeno recomendado pelos AA. é constituído de 0.03 g % de cardiolipina, 0.9 g % de colesterol e de lecitina em quantidade dependente da estandarização sorológica. Pela facilidade de execução, economia de material e reprodutibilidade de resultados vem sendo preferida pelos sorologistas, tendo mesmo nos EE. UU. suplantado a reação de Kahn, que era a reação de flocculação mais praticada naquele país.

A simplicidade de sua técnica obriga que seja executada com cuidado para evitar falsas reações positivas e colher os melhores resultados. Entre as medidas desta natureza deve-se incluir o conhecimento da temperatura em que a reação é praticada e o tempo gasto entre a agitação e a leitura microscópica.

A influência da temperatura na velocidade de toda reação antígeno/anticorpo é bastante conhecida e vem citada nos tratadistas¹, tendo mesmo aplicação prática no estudo e diferenciação de anticorpos^{2, 3}. A reação que se passa entre a "reagina" luética e os lipóides do antígeno sofre a mesma influência⁵ obrigando a que se leve em conta a temperatura em que se executa uma reação de flocculação⁴.

Recebido para publicação em 4-8-1955.

° Trabalho realizado na Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas (Prof. Lucas de Assumpção) da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

* Assistente da Cadeira.

MÉTODOS

Para tentar fixar esta influência da temperatura e relacioná-la com o tempo na leitura da reação V. D. R. L. fizemos uma série de reações em três temperaturas diferentes, 20°C., ambiente de 29°C. e 37°C. e praticamos a leitura imediatamente após a agitação e de 5 em 5 minutos até 30 minutos. Foram tomados cuidados especiais para que entre a reação e a leitura não houvesse a *menor perda de tempo*. Uma só pessoa foi encarregada da leitura a fim de evitar o fator pessoal e valorizar a leitura de floculações leves e duvidosas. Para fins deste trabalho foram adotadas leituras de "duvidosa" até 4 cruces e para facilidade de anotação usadas a letra D e os números 1, 2, 3 e 4. No mais foi adotada a técnica original que vem descrita nos livros e manuais especializados.

Os resultados estão representados nos três quadros a seguir. No quadro n.º 1 acham-se as leituras obtidas com uma primeira série de soros, em que a emulsão do antígeno foi colocada e mantida em cada temperatura indicada. No quadro n.º 2 se encontram os resultados de 8 reações quantitativas em que também foi obedecida esta condição. Finalmente no quadro n.º 3 estão os resultados de outra série de soros em que a emulsão do antígeno foi mantida em geladeira (4°C.) até o momento da distribuição, segundo aconselha a técnica original⁴ para dias quentes e secos.

Foram examinados 106 soros, executadas 318 reações e feitas 2.898 leituras. Como antígeno foi usado o de fabricação da Sylvana Chemical Comp., lote n.º 8.352.

DISCUSSÃO

É observação corrente a maior tendência à floculação nas reações deste tipo para diagnóstico da sífilis nos meses quentes do ano. Algumas técnicas originais aconselham, como a do V. D. R. L., cuidados relativos ao dessecação e conseqüente falseamento dos resultados, nos dias quentes e de baixo valor de umidade. Entretanto em países sul-americanos, em muitas zonas do Brasil, incluindo o Estado de São Paulo, são freqüentes temperaturas elevadas e valor alto de umidade, o dessecação não sendo tão rápido nestas condições.

Nem por isso devem ser desprezadas medidas que procurem evitar a influência da temperatura no aparecimento e na intensidade da floculação, principalmente na relação que parece existir entre a temperatura e o tempo gasto na leitura da reação.

Em nosso serviço, nos dias de temperatura elevada, fomos obrigados a modificar a rotina a fim de evitar *qualquer demora* na leitura da reação. Antes disso ser adotado, a demora, por menor que fôsse, se traduzia em reações positivas que não se confirmavam em exames posteriores nem con-

cordavam com a reação de fixação de complemento realizada no mesmo dia (Maltaner-Almeida).

O exame de nossos resultados (Quadro n.º 1) mostra inicialmente a existência de discrepâncias leves entre as leituras obtidas anteriormente e no dia da experiência: somente um caso (sêro 904) passando de negativo a positivo. Essas oscilações são previstas dentro da sensibilidade da reação. Tomados, entretanto, os resultados do dia da experiência como ponto inicial de comparação vemos que na temperatura de 20°C. até 10 minutos, prazo entre agitação e leitura, não há praticamente diferenças na leitura. Até 30 minutos de observação, embora apareçam estas diferenças não são suficientemente fortes para tornar "positiva" uma reação inicialmente negativa.

À temperatura de 29°C. (ambiente), aos 10 minutos de observação, já se inicia a positividade de reações negativas, acentuando-se a floculação progressivamente. O mesmo se verifica com maior nitidez nas reações feitas a 37°C. cuja positividade começa aos 5 minutos e se acentua de tal modo que aos 30 minutos todos os soros fornecem leituras "positivas".

Em pequeno número de soros com resultado inicial positivo verifica-se, a 37°C., maior floculação, mesmo quando a leitura é feita imediatamente após agitação. Ainda o mesmo se repete com 8 soros positivos quando são titulados. Leituras feitas a 37°C. mesmo imediatas, apresentam diferenças suficientes para elevar o título do sêro de uma diluição (Quadro n.º 2).

Colocando a emulsão do antígeno a 4°C., conservando-a nesta temperatura até o momento de sua distribuição (o restante do material sob as mesmas temperaturas anteriores), obtivemos leituras diferentes das dos quadros anteriores. Embora se verifiquem pequenas diferenças de floculação com alguns soros, somente aos 20 minutos de observação a 37°C. é que se torna positiva uma única reação anteriormente negativa ou "duvidosa" (Quadro n.º 3 — sêro 1031). A intensidade da floculação a 37°C. após 30 minutos em tôdas as observações também é nitidamente menor do que a verificada inicialmente (Quadro n.º 1).

CONCLUSÕES

1. A leitura da reação V. D. R. L. é influenciada pela temperatura em que é executada. Quanto mais alta a temperatura maior é a tendência à floculação.
2. O aparecimento e a acentuação da floculação também sofrem a influência do tempo gasto entre a rotação da mistura sêro/antígeno e a leitura. Quanto maior o intervalo maior será o número de reações positivas.

3. O mesmo fato se verifica nas reações quantitativas, o título da “reagim-na” se elevando progressivamente.
4. Reações executadas à temperatura de 20°C. praticamente fornecem a mesma leitura até 10 minutos. Dêste prazo em diante já se nota maior número de floculações. À 29°C. (temperatura ambiente da experiência) as leituras feitas aos 10 minutos já dão certo número de reações positivas, que se torna bem maior a 37°C.
5. A colocação da emulsão do antígeno na geladeira (4°C.) até o momento da distribuição praticamente evita falsas reações positivas, quando executadas a 20°C. mesmo até 30 minutos de observação. Diminui, proporcionalmente, sua freqüência, a 29 e 37°C. Nas leituras retardadas, entretanto, aparecem as reações positivas, de tal modo, que a 37°C. e depois de 30 minutos todos os soros são positivos.
6. Aconselha-se, como conseqüência, em zonas de temperatura alta, independentemente do grau de umidade, cuidados especiais na execução da reação V. D. R. L. a fim de evitar falsas reações positivas. A leitura *imediate* e a colocação da emulsão do antígeno em geladeira parecem ser medidas essenciais para esta finalidade.
7. Sugere-se a pesquisa da influência da temperatura e do tempo de leitura nas demais reações de floculação usadas no diagnóstico da sífilis.

RESUMO

O A. estuda a influência da temperatura e do tempo gasto na leitura da reação V. D. R. L., no sôro-diagnóstico da sífilis. Fez uma série de reações em três temperaturas — 20°, 29° e 37°C. — repetindo as leituras de 5 em 5 minutos até 30 minutos. Os resultados mostraram que quanto mais alta a temperatura maior será o número de reações positivas e que a demora na leitura provocará proporcionalmente maior número ainda de positividade. O mesmo se verificou nas reações quantitativas. A colocação da emulsão do antígeno na geladeira até o momento do uso e a prática da leitura *imediatamente* após a agitação evitam falsas reações positivas devidas à temperatura. Êsses cuidados podem ter importância em zonas do Brasil e de outros países em que prevaleçam condições de temperatura alta e alto teor de umidade.

SUMMARY

The A. studied the influence of temperature and reading time in the V. D. R. L. test for syphilis. Tests were performed at three temperatures — 20°, 29° (room temperature) and 37°C. — and readings made from 5 to

5 minutes until 30 minutes. Results showed that in higher temperature more tests were positive and the longer the time elapsing between agitation and reading the more intensive was the flocculation observed.

The same happened in quantitative tests. Placing the antigen emulsion in the cold until the moment of use and reading the tests *immediately* after the agitation prevent false positive reactions due to high temperature.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos são feitos às Srtas. Antónia Godoy, Therezinha de Amorim e Onélia Martins, técnicas sorologistas do Departamento, que executaram as reações.

REFERÊNCIAS

1. Cannefax, G. R. et al.: A study of the effects of temperature... Am. J. Syph. **37**, 348, 1953.
2. Eagle, H.: Laboratory diagnosis of syphilis. St. Louis, Mosby, 1937.
3. Kabat, E. A. & Mayer, M. M.: Experimental immunochemistry. Springfield, Thomas, 1948.
4. Kahn, R. L.: Serology with lipid antigen. Baltimore, William & Wilkins, 1950.
5. Manual of serologic tests for syphilis. New York, Division of Venereal Diseases, 1949.
6. Stura, C. A.: Tratado de inmunologia y serologia. Buenos Aires, Alfa, 1952.

QUADRO N.º 2

LEITURA DA REACÇÃO V.D.R.L. QUANTITATIVA SEGUNDO TEMPO E TEMPERATURA DIFERENTES

Emulsão do antígeno preparada e conservada em cada temperatura indicada

Sôro 561 (Título anterior 1)

Tempo	20°C					29°C					37°C				
	Diluição:														
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Imed.	2	D	—	—	—	3	D	—	—	—	3	D	—	—	—
5'	3	D	—	—	—	3	D	—	—	—	3	1	—	—	—
10'	3	D	—	—	—	3	1	—	—	—	3	1	—	—	—
15'	3	D	—	—	—	3	1	—	—	—	3	1	D	—	—
20'	3	1	—	—	—	3	1	—	—	—	3	2	2	1	—
25'	3	1	—	—	—	3	1	—	—	—	3	3	2	2	—
30'	3	2	—	—	—	3	2	D	—	—	4	4	3	2	2

Sôro 743 (Título anterior 4)

Imed.	4	3	1	—	—	4	4	2	D	—	4	4	3	2	D
5'	4	3	2	—	—	4	4	2	D	—	4	4	3	2	D
10'	4	4	2	—	—	4	4	2	D	—	4	4	3	2	D
15'	4	4	2	—	—	4	4	2	D	—	4	4	4	2	1
20'	4	4	2	—	—	4	4	3	1	—	4	4	4	4	2
25'	4	4	3	D	—	4	4	3	1	—	4	4	4	4	3
30'	4	4	4	1	—	4	4	4	3	3	4	4	4	4	4

Sôro 891 (Título anterior F. P.)

Imed.	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	—
5'	1	—	—	—	—	1	D	—	—	—	1	D	—	—	—
10'	2	—	—	—	—	1	D	—	—	—	2	D	—	—	—
15'	2	—	—	—	—	2	D	—	—	—	2	D	—	—	—
20'	2	—	—	—	—	2	D	—	—	—	3	2	D	—	—
25'	2	D	—	—	—	3	2	1	—	—	3	2	D	—	—
30'	3	1	—	—	—	3	2	1	—	—	4	3	2	1	—

Sôro 927 (Título anterior 1)

Imed.	3	1	—	—	—	3	2	1	—	—	4	3	1	—	—
5'	3	1	—	—	—	3	2	1	—	—	4	3	1	—	—
10'	3	2	—	—	—	3	2	1	—	—	4	3	1	D	—
15'	3	2	—	—	—	3	2	1	D	—	4	3	1	D	—
20'	3	2	—	—	—	3	2	1	D	—	4	4	1	D	—
25'	3	2	D	—	—	3	3	1	D	—	4	4	2	1	—
30'	4	2	D	—	—	4	3	1	D	—	4	4	3	2	1

Sôro 928 (Título anterior 1)

Imed.	1	—	—	—	—	2	—	—	—	—	2	—	—	—	—
5'	1	D	—	—	—	2	—	—	—	—	2	D	—	—	—
10'	1	D	—	—	—	2	D	—	—	—	2	D	—	—	—
15'	1	D	—	—	—	2	D	—	—	—	2	1	D	—	—
20'	2	D	—	—	—	2	D	—	—	—	3	1	D	—	—
25'	2	D	—	—	—	3	1	—	—	—	3	2	1	—	—
30'	2	1	—	—	—	3	2	—	—	—	4	4	2	1	—

Sôro 937 (Título anterior 2)

Imed.	1	—	—	—	—	2	1	—	—	—	3	2	—	—	—
5'	2	—	—	—	—	3	D	—	—	—	3	2	D	—	—
10'	2	—	—	—	—	3	1	—	—	—	3	2	D	—	—
15'	2	D	—	—	—	3	1	—	—	—	4	3	1	—	—
20'	2	2	D	—	—	3	2	—	—	—	4	4	2	1	—
25'	2	2	1	—	—	4	3	D	—	—	4	4	2	2	2
30'	3	2	1	—	—	4	3	2	1	—	4	4	4	3	2

Sôro 938 (Título anterior 1)

Imed.	1	—	—	—	—	2	—	—	—	—	2	1	—	—	—
5'	1	—	—	—	—	2	D	—	—	—	2	1	—	—	—
10'	1	—	—	—	—	2	D	—	—	—	2	1	—	—	—
15'	2	—	—	—	—	2	D	—	—	—	3	1	—	—	—
20'	2	D	—	—	—	2	D	—	—	—	3	2	1	D	—
25'	2	D	—	—	—	2	D	—	—	—	4	3	2	2	1
30'	2	D	—	—	—	3	2	2	1	—	4	4	4	3	1

Sôro 939 (Título anterior 1)

Imed.	2	—	—	—	—	3	1	—	—	—	3	1	—	—	—
5'	2	—	—	—	—	3	1	—	—	—	3	2	D	—	—
10'	2	1	—	—	—	3	1	D	—	—	3	2	—	—	—
15'	2	1	—	—	—	3	2	D	—	—	4	2	2	1	—
20'	2	1	D	—	—	3	2	D	—	—	4	3	2	2	—
25'	2	1	D	—	—	3	2	1	—	—	4	4	4	3	1
30'	3	1	D	—	—	4	3	2	D	—	4	4	4	4	2

