

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE VARIOLA:

I. Resultados do primeiro ano de atividades *

H. G. Schatzmayr,** e J. A. Mesquita***

Os autores escrevem a experiência obtida no Diagnóstico Laboratorial de Variola, durante o primeiro ano de funcionamento de uma unidade montada para servir à Campanha de Erradicação de Variola no Brasil.

O exame de 71 materiais de crostas e de 16 de líquido de vesícula ou pústula, forneceu 28 e 9 amostras de vírus da variola, respectivamente. As provas de precipitação em agar-gel foram positivas em 21% e 25% dos espécimens respectivamente (Tabela 1).

A coleta foi muitas vezes realizada em regiões distantes e os espécimens levaram algumas vezes até mais de 15 dias para chegar ao laboratório, o que influenciou sensivelmente os resultados obtidos (Tabelas 2 e 3), reduzindo a percentagem de isolamentos.

A reação de precipitação diretamente a partir do espécimen, não foi útil quando eram disponíveis quantidades reduzidas de material; a reação foi, no entanto, usada com sucesso para informar a presença de vírus em membranas cório-alanólicas, como confirmação do diagnóstico.

Próximamente serão apresentados e analisados comparativamente os resultados obtidos nos meses seguintes de trabalho.

Com a intensificação das vacinações contra a variola e conseqüentemente com a melhora dos serviços de notificação de casos suspeitos, o papel do laboratório de diagnóstico aumenta de importância, especialmente em relação àquelas áreas onde a fase de vacinação inicial vai sendo completada.

Um laboratório de diagnóstico foi montado no Departamento de Ciências Biológicas da Fundação de Recursos Humanos para a Saúde, o qual começou a receber materiais de casos suspeitos, diretamente da Campanha de Erradicação da Variola, em fins de maio de 1968.

MATERIAL E MÉTODOS

Essencialmente foram usados os métodos de trabalho descritos pela Organização Mundial de Saúde (3).

1 — Amostras de casos suspeitos de variola

Crostas, líquido de vesícula ou pústula, e amostras de soro colhidas por pessoal da Campanha de Erradicação da Variola, foram recebidas pelo laboratório de diferentes partes do País e preparadas como descrito abaixo:

* Trabalho do Laboratório de Vírus Vesiculares e Exantemáticos, Departamento de Ciências Biológicas da Fundação de Recursos Humanos para a Saúde, Caixa Postal 16, ZC-24, Mangueiras, Rio de Janeiro.
** Professor-Adjunto, responsável pelos Laboratórios de Vírus.
*** Auxiliar de Ensino, Laboratório de Vírus Vesiculares e Exantemáticos.
Recebido para publicação em 1-7-70.

- a) Crostas foram trituradas em tubos de vidro de fundo esmerilhado, na proporção de cêrea de 10 crostas/ml de PBS, pH 7,2, com antibióticos, e usadas para as provas de inoculação em ovos embrionados e em testes de precipitação em agar-gel.
- b) Líquido de vesícula ou pústula — o conteúdo de tubos capilares e o material seco da superfície de lâminas foram recolhidas por lavagens repetidas com pequeno volume de PBS e usados para inoculação de ovos embrionados. A precipitação em agar-gel foi realizada com o conteúdo de tubos capilares, sem diluição, quando havia material suficiente.
- c) Amostras de soro — foram inativadas a 56°C, por 30 minutos e usadas em provas de fixação do complemento e de inibição da hemaglutinação segundo técnicas descritas (4).

2 — Inoculação em ovos embrionados

Ovos embrionados de 11 dias foram inoculados na membrana cório-alantóica (MCA), com a suspensão inicial do material e com a diluição 1:100 desta, 0,1ml para cada ovo. Os ovos inoculados foram mantidos a 35°C por aproximadamente 60 horas, após o que foram recolhidas as MCA, examinadas e eventualmente trituradas em gral ou em homogeneizador elétrico, para reinoculação.

3 — Soro de referência

Obtido de coelhos hiperimunizados com vírus vaccínico, fornecido pelo Laboratório de Virus Vesiculares do NCDC, Atlanta, Georgia, USA.

4 — Virus de referência

- a) Vaccinia — sob a forma de vacinas liofilizadas, fornecidas pelo Dr. José Fonseca da Cunha, do Instituto Oswaldo Cruz.
- b) Alastrim — passagem em MCA, fornecido pelo Dr. Luiz F. de Salles Gomes, do Instituto Adolfo Lutz.

5 — Provas de Precipitação em agar-gel

Realizada sobre lâminas de microscópio, de acordo com padrões e técnicas estabelecidas (2,3).

O antígeno de referência foi preparado por trituração de MCA infectadas com vírus vaccínico ou de alastrim.

RESULTADOS

Foram examinados 90 espécimens, sendo 71 amostras de crostas, 16 de líquido de vesícula ou pústula e 3 amostras de soro. A tabela 1 resume os resultados obtidos.

O teste de precipitação em agar-gel foi positivo em apenas 21% dos materiais de crosta e em 25% dos materiais de líquido de vesícula ou pústula.

Os isolamentos em MCA alcançaram 39% e 56% respectivamente, para os materiais de crosta e líquido de vesícula ou pústula.

A prova de agar-gel não foi realizada em algumas oportunidades devido à reduzida quantidade de material, disponível apenas para as inoculações em ovos embrionados.

Na tabela 2 são apresentadas as percentagens de isolamento em relação ao número de dias entre a coleta do material e o exame de laboratório. Consideráveis distâncias foram algumas vezes percorridas (tabela 3), o que decisivamente influenciou nas taxas de isolamento de vírus.

Uma amostra do vírus da vaccinia foi isolada de crostas coletadas de bovinos, que adoeceram após contacto com pessoas recentemente vacinadas (5).

DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados refletem diversos problemas do diagnóstico de variola nas condições brasileiras.

As amostras isoladas não foram estudadas no sentido de diferenciação entre variola major e alastrim. A primeira porém não tem sido assinalada no Brasil, exceto em uma comunicação (1).

Em nenhum dos casos estudados suspeitou-se de lesões provocadas por herpes simples nas MCA; lesões inespecíficas não

Tabela 1

RESULTADOS DOS EXAMES LABORATORIAIS
DE ESPÉCIMENS SUSPEITOS DE VARIOLA

Espécimens		Isclamento em M.C.A.	Agar Gel (+)	
Tipos	N.º			
Crostras	71	28 (39%)	15	(21%)
Liq. Ves. Pust.	16	9 (56%)	4	(25%)
Sóros	3	—	—	—
Total	90	37	19	

constituíram um problema importante, porém apresentaram-se com certa periodicidade em ovos embrionados, adquiridos sempre na mesma fonte.

Reinoculações a partir de membranas foram inicialmente realizadas apenas quando o resultado da leitura era duvidoso (espessamento de membranas, lesões mal definidas etc.). Neste caso as membranas foram trituradas em gral com cuidados especiais e a suspensão inoculada em outros ovos. Esta decisão foi adotada devido às

condições "abertas" do trabalho no laboratório, nos primeiros meses. Posteriormente as membranas passaram a ser trituradas em um aparelho Omni-mixer, em recipientes fechados com 5ml de capacidade sem adição de diluente, o que em nossa experiência apresentou excelentes resultados.

Todos os materiais positivos (membranas com lesões típicas de varíola) passaram também a ser trituradas e as suspensões usadas em um teste de precipitação

Tabela 2

PERCENTAGEM DE ISOLAMENTOS EM RELAÇÃO AO NÚMERO
DE DIAS ENTRE A COLETA E O EXAME DO MATERIAL

Número de Dias	Número de Espécimens	Amostras isoladas em M.C.A.	
3 a 5	7	5	(71%)
6 a 8	10	5	(50%)
9 a 11	9	4	(44%)
12 a 14	8	4	(50%)
15 ou +	34	14	(41%)
Sem data da coleta	19	5	(26%)
Total	87	37	

em agar-gel, como confirmação definitiva da presença de antígeno do grupo (3). Em nossa experiência, membranas trituradas em frascos contendo pérolas de vidro apresentaram resultados irregulares quando usadas como antígeno em provas de agar-gel.

O diagnóstico por meio de microscopia eletrônica não foi utilizado, nem técnicas de microscopia fluorescente. Em razão da própria natureza dos materiais recebidos, crostas e líquido pustular, não foram

realizados métodos de coloração. Por outro lado, como os espécimens foram sempre recebidos sem refrigeração, não foram realizadas tentativas de isolamento do vírus da Varicela.

Observações anteriores têm mostrado que o diagnóstico presuntivo pela prova de agar-gel, em casos de alastrim, é útil apenas quando se dispõe de razoável quantidade de material (6). Isto foi por nós confirmado em diversas oportunidades.

Dados comparativos sobre a sobrevivência de vírus em espécimens colhidos sobre lâminas ou em tubos capilares não são apresentados devido à grande variação das condições em que estes materiais foram colhidos e chegaram ao laboratório.

Em próxima comunicação serão apresentados os resultados obtidos em meses seguintes de trabalho, uma vez que espécimens para exame continuam a ser recebidos de diversas partes do País.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a todos que colaboraram, sob as mais diversas formas, para a montagem e funcionamento do Laboratório de Virus Vesiculares e Exantemáticos do Departamento de Ciências Biológicas de nossa Fundação.

Agradecem ainda ao Praticante de Laboratório Ismael da Rocha Lopes pela excelente assistência técnica prestada.

Tabela 3

ORIGEM DOS MATERIAIS EXAMINADOS

Estados	N.º de espécimens
Ceará	12
Paraíba	8
Pernambuco	3
Alagoas	2
Goiás	14
Distrito Federal	16
Bahia	24
Rio de Janeiro	11

SUMMARY

The authors describe the experience of the smallpox laboratory diagnosis, during the first year of activity of a Unit prepared as a support to the Smallpox Eradication Campaign in Brazil.

From the specimens — 71 crusts and 16 vesicular pustular fluid — respectively 28 and 9 smallpox strains were isolated, and the agar-gel precipitation test was positive in respectively 21% and 25% of the specimens (table 1). Different periods of time were taken to the specimens reach the laboratory, what influenced the percentage of virus isolation (tables 2 and 3).

The agar-gel test with the original specimens showed positive results only when enough material was available; the test, however, was used as a confirmation of virus isolation, using egg membrane with virus lesions.

The results obtained by the laboratory in the last months will be presented and discussed in the next paper.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — CLAUSELL, D.T. — Seminário sobre o diagnóstico laboratorial de variola. WHO/PAHO, Rio de Janeiro, 9 a 14 de setembro de 1968.
- 2 — DUMBELL, K.R. & NIZAMUDDIN, MD. — An agar-gel precipitation test for the Laboratory diagnosis of Smallpox. *Lancet*, 1:916-917, 1959.
- 3 — Guide to the Laboratory Diagnosis of Smallpox. World Health Organization, Geneva, 1969.
- 4 — KEMPE, G.H. & ST. VINCENT, L. — Variola and Vaccinia Viruses, Diagnostic Procedures for Virus and Rickettsial Diseases. 3.^a ed., N. York: American Public Health Association, 1964, pp. 665-692.
- 5 — MESQUITA, J.A. & SCHAZMAYR, H. G. — Infecções humanas e de bovinos com vírus do grupo Pox. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 3(4):171-175, 1969.
- 6 — NOBLE, J. — Comunicação pessoal.