

## ESTUDO LABORATORIAL DA VARIOLA EM PACIENTES DO HOSPITAL DE ISOLAMENTO "EMÍLIO RIBAS", DE SÃO PAULO, BRASIL I — AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DIRETOS

Elfried KIRCHNER<sup>(1)</sup>, John NOBLE<sup>(2)</sup>, João SESSO<sup>(3)</sup> e Gary LONG<sup>(2)</sup>

### RESUMO

Estudaram-se algumas centenas de espécimens de material de lesão, coletados de uma amostragem de 262 pacientes do Pavilhão de Varíola do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas". Para cada paciente, registraram-se a história clínica e as observações relativas ao caráter do exantema apresentado. Os espécimens foram obtidos na forma de: a) esfregaços secos, em lâmina de vidro; b) fluido vesículo-pustular, em capilares e c) crostas, e estudados pelos seguintes métodos laboratoriais: a) microscopia eletrônica; b) cultivo em membrana cório-alantóica de ovo embrionado; c) precipitação em ágar-gel; d) teste de temperatura-teto para caracterização da linhagem viral e e) prova de virulência para camundongo. Discute-se a precisão de cada tipo de teste. A quantidade e condições de armazenamento da amostra demonstraram-se fatores importantes para o diagnóstico exato. Os resultados dos testes de temperatura-teto caracterizaram os vírus isolados neste estudo, como sendo de *Variola minor*; concordantemente, a análise das manifestações clínicas situou a varíola brasileira como pertencente ao Tipo VI da classificação de MARSDEN<sup>12</sup>.

### INTRODUÇÃO

Embora RIBAS<sup>16</sup>, em sua descrição original da varíola prevalente no Brasil, ressaltasse a diferença entre o "alastrim", como a designou, e a varicela, muitas epidemias da doença têm passado despercebidas por até quatro seqüências de casos, como relatam de JONG<sup>4</sup> em Haia, Holanda, e GORDON & col.<sup>8</sup> em Birmingham, Inglaterra. A pronta identificação etiológica das infecções pelo vírus da *Variola minor* é, freqüentemente, bastante difícil; de outro lado, dada a baixa morbidade da *Variola minor*, durante epidemias — tanto no Brasil como em outros

países — pacientes portadores de exantemas variólicos podem continuar a circular em suas comunidades, aumentando assim o potencial de disseminação da doença.

O presente estudo tem como objetivo primordial, determinar e comparar a precisão diagnóstica de cada um dos métodos atualmente adotados pelos laboratórios de virologia, para o isolamento, identificação e, possivelmente, caracterização da linhagem viral envolvida. A interpretação e avaliação dos resultados do diagnóstico indireto, sorológico, constitui objeto de estudo à parte<sup>11</sup>. A

Pesquisa realizada no Laboratório de Doenças Vesiculares do Centro de Doenças Transmissíveis Atlanta, Georgia, Estados Unidos da América.

- (1) Bolsista da Organização Panamericana da Saúde. Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil (Diretor: Prof. Carlos da Silva Lacaz)
- (2) Vesicular Disease Laboratory, Viral Exanthems Unit, Virology Section, Microbiology Branch, Laboratory Division, National Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia, U.S.A.
- (3) Chefe do Pavilhão de Varíola do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas", São Paulo, Brasil (Diretor: Dr. Carlos de Oliveira Bastos)

série ora investigada compreende numerosas amostras coletadas de 262 pacientes do Pavilhão de Varíola do Hospital "Emílio Ribas", cujos quadros clínicos foram também devidamente documentados.

#### MATERIAL E MÉTODOS

*Pacientes* — estudaram-se 262 pacientes, tendo sido as respectivas amostras de material das lesões obtidas durante um período de 3 anos consecutivos: de 18 pacientes em

1966, 44 em 1967 e 200 em 1968. Além da extensão da série, os 200 pacientes estudados em 1968 oferecem diversas outras vantagens como o grupo principal a ser considerado no presente estudo: a informação clínica (Fig. 1) foi documentada pessoalmente por um só dos Autores (E.K.), também responsável pela coleta das amostras correspondentes; as condições de coleta, armazenamento e transporte destas amostras puderam também ser melhor controladas do que nos anos anteriores.

São Paulo,

#### DADOS DO PACIENTE

Nome:

Sexo:

Idade:

Estado vacinal:

vacina sim: c/pega: s/pega:  
não:

Presença de cicatriz:

Procedência (bairro, cidade):

Data do início da doença:

Início: súbito:

Gradual:

Febre:

Dor de cabeça:

Dores generaliz.:

Dores nas costas:

Prostação:

Náuseas:

Vômitos:

Faringite:

Anorexia:

Arrepios:

Diarréia:

Perda da consciência:

Data do início de exantema:

Onde apareceu em 1.º lugar:

Face:

Mucosas:

Tronco:

Braços:

Pernas:

Distribuição:

Centrífuga:

Centrípeta:

Indefinida:

Monoformismo regional sim:

não:

Presença de lesões:

Palmares:

Plantares:

Febre secundária:

Sim:

Não:

Duração do exantema:

Estado atual da infecção:

Material colhido:

- 1)
- 2)
- 3)
- 4)
- 5)
- 6)

Fig. 1 — Modelo da ficha preenchida para cada paciente estudado. Elaborada pelos Drs. Luis Florencio de Salles Gomes, Chefe da Seção de Vírus Dermatropicos do Instituto Adolfo Lutz (Dr. Augusto Taunay) e John Noble, Chefe do Vesicular Disease Laboratory do National Communicable Center, Atlanta, Ga., USA

*Coleta e preparo das amostras:* seguindo-se as recomendações pertinentes da Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>18</sup> para coleta, armazenamento e transporte, colheu-se um total de 352 amostras de material de lesão dos 200 pacientes citados, para isolamento e identificação do agente viral.

Essas amostras foram obtidas: a) como esfregaços do exsudato de lesões sobre lâminas comuns de microscopia, principalmente nos casos de doença inicial, na fase máculo-papular; b) como fluido vesículo-pustular, coletado em tubos capilares e c) como crostas secas, quando de lesões em fase final.

De um grupo de 30 pacientes obtiveram-se, ainda, amostras de saliva colhidas entre o 3.º e o 12.º dia do exantema. Leite de paciente lactante foi coletado num único caso, aos 5.º dia do exantema.

Procurou-se sempre obter as amostras de material das lesões e, quando possível, do soro, logo ao primeiro dia de hospitalização do paciente. Subseqüentemente, êste era visitado diariamente e novas amostras colhidas a intervalos de 3 a 5 dias. Consideravam-se amostragem adequada: 4 ou mais esfregaços em lâmina, 2 tubos capilares de 67 x 1 mm repletos de fluido vesículo-pustular e, no mínimo, de 6 a 12 crostas, dependendo de seu tamanho. Com exceção dos esfregaços mencionados adiante, e de alguns espécimens coletados em 1966 e 1967, tôdas as amostras eram armazenadas em congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  logo após a coleta e assim mantidas até serem testadas em laboratório.

Com o objetivo de investigar a estabilidade do vírus variólico em condições variáveis de armazenamento, prepararam-se seis esfregaços em lâmina, de cada paciente, num grupo de 12. Duas lâminas de cada paciente permaneceram à temperatura ambiente (média  $22^{\circ}\text{C}$ ) durante 18 dias, antes de serem congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; as outras 4 foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  logo após a coleta, sendo 2 destas submetidas a incubação à temperatura de  $38,5^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas, imediatamente antes da inoculação do material em ovo embrionado e demais provas. Durante todo o período que precedeu os testes, as lâminas foram protegidas contra exposição a qualquer tipo de luz.

#### *Identificação do vírus*

a) *Microscopia eletrônica* — todos os espécimens foram submetidos à microscopia eletrônica, utilizando-se a técnica de coloração negativa por ácido fosfo-túngstico de CRUICKSCHANK & col.<sup>3</sup> De cada amostra colhida na forma de esfregaço em lâmina, fizeram-se duas preparações para exame ao microscópio eletrônico; das amostras de fluido vesículo-pustular ou de crostas, fêz-se apenas uma. Retículos preparados diretamente do homogeneizado original de fluido vesículo-pustular ou de crostas mostravam-se invariavelmente espessos demais; a diluição a  $10^{-1}$  proporcionava geralmente preparações satisfatórias. Como critério diagnóstico adotou-se, aqui, o exame de cada preparação durante 10 minutos quando não apresentasse, antes, partículas virais típicas dos Pox ou dos Herpes-vírus.

b) *Isolamento do vírus* — para isolamento do vírus adotou-se sistematicamente a técnica-padrão da OMS<sup>18</sup> e DOWNIE & DUMBELL<sup>5</sup> de inoculação de suspensão do material em membrana cório-alantóica (mca) de ovo embrionado de galinha, de 10 a 12 dias de incubação. Tôdas as amostras eram preparadas como suspensões homogêneas, em solução salina tamponada de McIlvaine (pH 7,2); os esfregaços secos, em lâmina, eram suspensos em algumas gotas da solução salina, o fluido vesículo-pustular dos tubos capilares era suspenso em 0,1 a 0,2 ml, sendo homogeneizado em gral ou por vigorosa agitação em frasco com pérolas de vidro, sempre que se apresentasse coagulado ou dessecado; finalmente, as crostas eram maceradas em gral e suspensas na proporção de 10 crostas para 1,0 ml da solução salina. Um décimo de mililitro das diluições a  $10^{-1}$  e  $10^{-4}$  desse homogeneizado original era, então, inoculado em cada um de um grupo de ao menos 4 ovos. A amostra era considerada positiva para varíola quando lesões típicas se desenvolvessem na mca após 72 horas de incubação a  $35^{\circ}\text{C}$ . Fazia-se uma segunda passagem nos espécimens cuja primeira fôsse não diagnóstica: homogenizavam-se as membranas da passagem precedente em frasco provido de pérolas de vidro e 0,1 ml da diluição a  $10^{-1}$  desse homogeneizado era

inoculado em cada um de 4 ovos embrionados. Uma amostra só era considerada negativa quando, à segunda passagem, também não apresentasse as lesões características do crescimento viral.

c) *Provas de precipitação em ágar-gel* — o teste de difusão em gel foi realizado em tôdas as amostras de fluido vesículo-pustular, crostas e saliva e na maioria das amostras do material colhido como esfregaços. Adotou-se o padrão estabelecido por DUMBELL & NIZAMUDDIN<sup>7</sup>; o sôro hiperimune específico foi produzido em coelhos albinos adultos, inicialmente vacinados com a linhagem "Lister" do vírus vaccínico, adaptada a coelhos e, 30 dias após, inoculados por via intravenosa com 1,0 ml de suspensão purificada da linhagem "Wyeth" do mesmo vírus, sendo sangrados 10-12 dias mais tarde. Os soros hiperimunes assim produzidos apresentavam títulos aproximados de 1:4.096 em provas de inibição da hemaglutinação e de 1:256 em provas de fixação do complemento; em ágar-gel, produziam geralmente uma faixa de precipitação diante de material positivo, em cerca de 6 horas, ou 2 ou 3 faixas, em 16 horas.

#### *Caracterização da linhagem viral*

a) *Testes de temperatura-teto* — Com o objetivo de se pesquisar a eventual presença de *Variola major* entre as amostras estudadas, aplicou-se, segundo a técnica de NIZAMUDDIN & DUMBELL<sup>14</sup>, o teste de temperatura-teto, que é de 37,5°C para *V. minor* e de até 38,5°C para *V. major*. Escolheram-se ao acaso três amostras de material de crostas de pacientes de 1966, três de 1967 e 21 de 1968; de cada amostra preparada como descrito acima inocularam-se 10 ovos com cada uma das diluições seguintes: 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup>; 5 ovos de cada diluição eram incubados a 38,5°C e os restantes 5 a 35°C. Como contrôles, inocularam-se igualmente as linhagens-padrão "Harvey" de *V. major* e "Butler" de *V. minor*. Após as 72 horas usuais de incubação, colhiam-se as mca em solução salina de McIlvaine e procedia-se à medida do crescimento viral por meio da contagem do número médio de lesões produzidas nas duas condições experimentais testadas.

b) *Testes de virulência para camundongos* — adotou-se o teste de BAUER & DUMBELL<sup>2</sup> para comparar a virulência dos isolamentos do Brasil à das linhagens-padrão "Harvey" e "Butler".

c) *Teste de similaridade antigênica das hemaglutininas* — cultivaram-se em células de linhagem BHK<sub>21</sub> — 13 S de rim de "hamster" mantidas em suspensão, segundo as técnicas e o meio nutriente padronizados por HALONEN & col.<sup>9</sup> as linhagens-padrão "Harvey", "Butler" e "Wyeth" (*Vaccinia*), bem como 3 amostras de isolamentos brasileiros tomados ao acaso, sendo um de cada ano estudado. As culturas celulares eram inoculadas na proporção de 1 ufp por célula; as inoculadas com o vírus vaccínico foram incubadas a 37°C, enquanto as demais o foram a 35°C. Quando 80% das células se mostravam degeneradas ou quando o título hemaglutinante do fluido da cultura era igual a 1:16, ou seja, após cerca de 72 a 96 horas, as suspensões celulares eram sonicadas e clarificadas por centrifugação através de uma camada de solução aquosa de sacarose a 35%, a 10.000 rpm durante uma hora (Spinco, rotor n.º 30). As hemaglutininas eram, então, concentradas por centrifugação do sobrenadante a 30.000 rpm durante 4 horas (Spinco, rotor n.º 30) e ressuspensas em solução salina tamponada de McIlvaine num volume final correspondente a 10% do volume original da suspensão celular. Em micro-placas, realizaram-se provas cruzadas de inibição da hemaglutinação entre as hemaglutininas assim preparadas e anti-soros específicos produzidos em galinhas. Estas haviam sido injetadas cinco vezes a intervalos de 1 semana, por via intravenosa, com 1 ml de suspensão viral semi-purificada e sangradas 10 dias após a última inoculação. Utilizou-se a fórmula de ARCHETTI & HORSFALL<sup>1</sup> para determinar os coeficientes de similaridade que exprimem o grau de relacionamento antigênico entre as hemaglutininas.

## RESULTADOS

### *Clínicos*

O grupo para o qual se dispõe tanto de diagnósticos clínicos como laboratoriais com-

preende 165 pacientes, sendo 98 (59,4%) homens e 67 (40,6%) mulheres, com 59,4% do total situando-se no grupo etário abaixo de 15 anos de idade (Tabela I). Noventa e nove (60%) dos pacientes nunca haviam sido vacinados contra varíola. Embora 66 (40%) dos pacientes referissem história de vacinação específica prévia, apenas 16 (9,7%) apresentavam cicatriz consistente com pega vacinal (Tabela II).

O período de incubação parece ser de cerca de 12 dias, mas não pôde ser documentado com precisão em número de casos suficiente para análise estatística. A fase prodrômica da doença geralmente se instalava bruscamente e, em 73% dos pacientes, durava apenas 2 ou 3 dias. Dos 165 pacientes, 98,2% referiam febre durante a fase prodrômica e 62,4% apresentavam febre e calafrios. Cefaléia foi registrada para 79,4% dos casos; mal-estar e anorexia estiveram presentes em 66,7% e 60,6% da população estudada, respectivamente. As dores nas costas, referidas em 44,2% dos casos, eram descritas como dor severa e persistente na região lombo-sacral (Tabela III). Pacientes previamente vacinados e com pega, parecem apresentar sintomas de mesmo tipo e mesma duração no período prodrômico, que os pacientes nunca vacinados. Não houve casos de lesões confluentes ou hemorrágicas e

a maioria dos pacientes apresentava menos de 100 lesões discretas na face onde, na quase totalidade dos casos, as lesões apareciam em primeiro lugar, independentemente do estado vacinal (Tabela II). Lesões palmares e/ou plantares foram registradas em 95,2% e distribuição centrífuga das lesões, em 97,6% dos casos.

TABELA I

Incidência da varíola segundo o grupo etário, em pacientes do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas"

Grupo etário (anos)	Número	Porcentagem
1	2	1,2
1-4	26	15,8
5-9	48	29,1
10-14	22	13,3
15-19	14	8,5
20-29	31	18,8
30-39	10	6,1
40-49	7	4,2
50+	5	3,0
Total	165	100,0

TABELA II

Área em que apareceram as primeiras lesões variolosas, em pacientes do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas"

Área	Estado vacinal					
	Nunca vacinados		Sem pega		Com pega	
	n.º	%	n.º	%	n.º	%
Face	77	77,8	29	58,0	9	56,2
Braços	12	12,1	10	20,0	5	31,2
Pernas	3	3,0	4	8,0	1	6,3
Tronco	5	5,1	7	14,0	1	6,3
Ignorada	2	2,0	—	—	—	—
T o t a l	99	100,0	50	100,0	16	100,0

TABELA III

Sintomas prodrômicos da varíola, em pacientes do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas"

Sintomas	N.º de pacientes	Porcentagem
Febre	162	98,2
Cefaléia	131	79,4
Mal-estar	110	66,7
Calafrios	103	62,4
Anorexia	100	60,6
Dores nas costas	73	44,2
Faringite	63	38,2
Náusea	61	37,0
Vômitos	50	30,3
Diarréia	6	3,6

O tempo de evolução das lesões variólicas, do estágio máculo-papular ao estágio final de crosta, variou grandemente entre os pacientes. Vesículas bem desenvolvidas geralmente estavam presentes ao terceiro dia da instalação do exantema, evoluindo a pústulas no 4.º ou no 5.º dia. Dessecação e cicatrização precoce das lesões principiavam em torno do 6.º dia do exantema. Alguns pacientes desenvolviam pústulas superficiais volumosas, repletas de fluido leitoso, que persistiam até ao 10.º ou 11.º dia do exantema. Outros pacientes apresentavam exantemas abortivos, em que das vesículas resultavam lesões pequenas e já cicatrizadas ao 6.º dia. A extensão e a taxa de evolução do exantema não pareceram estar relacionados ao estado vacinal dos pacientes.

Estes geralmente recebiam alta após 3 semanas de hospitalização, quando era total a descamação de tôdas as crostas. Nessa ocasião, apresentavam manchas hipopigmentadas vestigiais das lesões e, em muitos casos, ligeiramente salientes. Não se observaram lesões profundas em qualquer dos pacientes.

### Laboratoriais

O diagnóstico de varíola foi estabelecido tanto por microscopia eletrônica como por cultura em mca, em 100% dos casos em que a amostra era fluido vesículo-pustular ou material de crosta (Tabela IV). Os testes de precipitação em ágar-gel foram positivos para 98,3% dos espécimens de fluido vesículo-pustular e 97,1% dos de crostas.

O diagnóstico foi menos preciso com os esfregaços de exsudatos de lesões que haviam sido mantidos por períodos variáveis — alguns, dos coletados em 1966 e 1967, por até 2 meses — à temperatura ambiente, antes de serem congelados; obtiveram-se diagnósticos positivos por microscopia eletrônica para 57,7% e, por cultura em mca, para 53,8% dessas amostras. Em três casos, a microscopia eletrônica foi positiva e o isolamento em mca negativo, enquanto somente um dos 52 esfregaços foi positivo em mca e negativo à microscopia eletrônica. O teste de precipitação em ágar-gel foi negativo em 20 esfregaços, mas 15 destes foram positivos à microscopia eletrônica e por isolamento em mca. Entretanto, sempre que o teste de difusão em ágar-gel era positivo para amostras de esfregaços, a microscopia eletrônica e a cultura em mca também o eram (Tabela IV).

A influência da temperatura sobre a estabilidade e atividade virais em 12 amostras de material de esfregaço é demonstrada pelos resultados da Tabela V. O vírus variólico foi isolado e identificado em todos os esfregaços congelados desde o momento da coleta até o momento da prova laboratorial. Partículas de Poxvírus puderam ser demonstradas pela microscopia eletrônica em apenas 83% dos esfregaços mantidos à temperatura ambiente ou submetidos à incubação a 38,5°C durante 48 horas. Os resultados do isolamento em mca foram até mesmo mais drasticamente afetados pelas temperaturas de armazenamento prévio, uma vez que apenas 16,6% dos espécimens apresentaram crescimento. Antígenos virais solúveis puderam ser evidenciados por precipitação em ágar-gel três vezes mais freqüentemente com os esfregaços submetidos à temperatura de 38,5°C durante 48 horas do que com aqueles mantidos a 22°C durante 18 dias.

KIRCHNER, E.; NOBLE, J.; SESSO, J. & LONG, G. — Estudo laboratorial da varíola em pacientes do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas", de São Paulo, Brasil. I — Avaliação dos diferentes métodos diagnósticos diretos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13:257-267, 1971.

T A B E L A I V

Resultados laboratoriais obtidos com amostras de material de lesão, de 165 pacientes de varíola do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas"

Material da amostra	Microscopia eletrônica		Isolamento em mca *		Precipitação em ágar gel	
	N.º de espécimens	% de positivos	N.º de espécimens	% de positivos	N.º de espécimens	% de positivos
Esfregaços de fluido vesículo-pustular	52	57,7	52	53,8	32	40,6
Fluido vesículo-pustular **	126	100,0	126	100,0	120	98,3
Crostas	174 ***	100,0	171	100,0	171	97,1
T o t a l	352	93,8	349	93,1	323	92,0

\* mca — membrana cório-alantóica de ovo embrionado

\*\* amostras de fluido vesicular ou pustular coletadas em tubos capilares

\*\*\* incluíram-se três pacientes de varicela, de 1968. Partículas virais típicas de Herpes-virus foram evidenciadas por microscopia eletrônica em material de crosta, nos três casos

T A B E L A V

Estabilidade do vírus variólico em amostras de esfregaços de lesões variólicas de pacientes do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas" submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento

N.º e condições de armazenamento	Resultados dos testes diagnósticos		
	Microscopia eletrônica % positivos	Isolamento em mca % positivos	Precipitação em ágar-gel % positivos
24 — Congeladas a -20°C	100	100	100
24 — 18 dias à temperatura ambiente (média, 22°C)	83,0	16,6	16,6
24 — 48 horas a 38,5°C	83,0	16,6	58,8

Não se verificaram, em laboratório, resultados falso-positivos. Entre os pacientes de 1967 e 1968 houve, porém, um grupo de 7 casos nos quais o diagnóstico baseado exclusivamente nos dados clínicos divergiu do diagnóstico laboratorial. Material de lesões foi estudado nos 7 casos: em 4, partículas virais características do grupo Herpes foram evidenciadas ao microscópio eletrônico; o isolamento em mca e os testes de precipitação em

ágar-gel foram negativos para varíola em todos os espécimens. Em 1 caso, o diagnóstico de varicela só pôde ser estabelecido pelo exame histo-patológico de material colhido por biópsia, de vesículas que aparentavam ser típicas da varíola. Anticorpos fixadores do complemento para varicela apresentavam-se em título elevado, de 1:160 ou mais, em 5 desses 7 pacientes, de forma que o diagnóstico de varicela pôde ser estabelecido em

6 dos 7 casos, seja por microscopia eletrônica ou por provas sorológicas. Somente em 1, foi o diagnóstico re-estabelecido em bases puramente clínicas, uma vez que o paciente recebeu alta antes que se pudessem colher amostras adequadas.

Diagnósticos falso-negativos para varíola foram feitos em 20 (5,7%) dos 352 espécimens estudados em 1968 — todos, em material de esfregaços. Entretanto, para 19 dos pacientes confirmou-se o diagnóstico de varíola pelo exame dos demais tipos de material; não se dispunha de outras amostras no caso restante.

Quanto às amostras de saliva, embora o diagnóstico de laboratório tenha sido positivo para varíola nos 30 pacientes, o vírus só pôde ser isolado em primeira passagem em mca em 10 das amostras colhidas entre o 6.º e o 10.º dia do exantema, apresentando o vírus título muito baixo; 5 outros espécimens de saliva permitiram identificação do vírus após uma segunda passagem em mca. A microscopia eletrônica e os testes de precipitação em ágar-gel foram consistentemente negativos para os 30 casos. Não se observou correlação entre a presença de vírus na saliva do paciente e ocorrência de faringite, na amostragem estudada.

Da amostra de leite da paciente lactante, colhida ao 5.º dia do exantema, isolou-se também o vírus variólico em primeira pas-

sagem em mca. A microscopia eletrônica foi negativa; não se fez prova de precipitação em ágar-gel.

#### Caracterização viral

As linhagens "Harvey" e "Butler" e os isolamentos brasileiros desenvolviam-se prontamente em mca quando incubados a 35°C. O crescimento da linhagem de *V. major* ("Harvey") é ligeiramente inibido a 38,5°C; na presente investigação, sofreu uma redução de 0,5 log<sub>10</sub> na contagem média das leões. O crescimento da linhagem padrão de *V. minor* ("Butler") e das linhagens da varíola brasileira foi totalmente inibido à temperatura de 38,5°C.

As doses infetantes letais para a totalidade dos camundongos inoculados foram de 1 x 10<sup>6</sup> para a *V. minor* brasileira (com 4 dias de incubação) e de 1 x 10<sup>5</sup> para as linhagens "Harvey" e "Butler" (com 3 dias de incubação).

Os coeficientes de similaridade para as hemaglutininas do vírus variólico brasileiro e das demais linhagens estudadas apresentam grau muito próximo de relacionamento antigênico, já que o coeficiente 1,0 na fórmula de ARCHETTI & HORSFALL indica, por definição, linhagens indistinguíveis nas condições experimentais adotadas (Tabela VI).

TABELA VI

Relação antigênica das hemaglutininas das linhagens "Harvey" (*V. major*), "Butler" (*V. minor*), *V. minor* brasileira (\*) e "Wyeth" (*Vaccinia*)

Hemaglutinina	Anti-soros específicos			
	Harvey	Butler	Brasil (*)	Vaccinia
Harvey	1.0 (**)	1.4	1.0	1.4
Butler	1.4	1.0	0.5	1.0
Brasil	1.0	0.5	1.0	1.4
Vaccinia	1.4	1.0	1.4	1.0

(\*) Amostra isolada de pacientes do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas"

(\*\*) Valores de *r* segundo a fórmula de ARCHETTI & HORSFALL<sup>1</sup>

## DISCUSSÃO

As manifestações clínicas observadas no grupo de pacientes estudados foram similares às classicamente já descritas (RIBAS<sup>16</sup>; JORGE<sup>10</sup>; MARSDEN<sup>12</sup>; DeJONG<sup>4</sup>; RODRIGUES DA SILVA & col.<sup>17</sup>; GORDON & col.<sup>8</sup> e outros. Em sua maioria, os pacientes apresentavam menos de 100 lesões na face, raríssimamente confluentes e nunca hemorrágicas, enquadrando-se como casos de varíola do tipo VI da classificação estabelecida por MARSDEN<sup>12</sup> para casos de "alastrim" na Grã-Bretanha.

Entretanto, em alguns dos casos comprovadamente variolosos, verificava-se um pleomorfismo regional das lesões, bastante sugestivo da varicela e, como já se mencionou, sete dos casos inicialmente admitidos ao Pavilhão de Varíola eram, efetivamente, de pacientes de varicela. À exceção de um, todos tinham mais de 10 anos de idade e haviam apresentado quadro prodrômico pouco acentuado; o número de lesões que exibiam variava de 80 a 1.000 e quatro dentre êles, apresentavam lesões palmares e/ou plantares bem definidas. Clinicamente, o erro diagnóstico em tais pacientes só se evidenciava ao 2.º ou 3.º dia de internamento, quando as lesões deixavam de evoluir à fase pustular típica da varíola, dessecando-se e descamando-se precocemente. O fato ilustra que, embora o diagnóstico clínico de um caso típico de varíola em pleno desenvolvimento não oferece dúvidas, nem sempre é possível se diferenciarem casos com sintomas iniciais atenuados ou exantemas atípicos, de casos severos de varicela.

As provas diagnósticas de laboratório revestem-se, então, de extrema importância. O isolamento em mca — e em primeira passagem — diagnóstico em 48-72 horas, com absoluta precisão, todos os casos em que o material testado provinha de lesões vesiculares, pustulares ou em fase de crosta (Tabela IV); nossos resultados são, aqui, comparáveis aos relatados por DOWNIE & DUMBELL<sup>5</sup> para casos de *V. major*. Já nos espécimens colhidos como esfregaços de exsudatos em lâminas, de pacientes em fase inicial do exantema, os resultados foram bem menos satisfatórios e o mesmo pode ser dito com relação às amostras de saliva, as quais apresen-

tavam teores muito reduzidos de vírus. Das dez amostras de saliva positivas, cinco só apresentaram crescimento viral evidente à segunda passagem em mca, embora houvessem determinado áreas de reação na mca, com turvação e opacidade, à primeira passagem. Observou-se que não houve um só isolamento à segunda passagem quando as mca não exibiam tais áreas à primeira passagem. A cultura em mca mostrou ser, não obstante, o recurso diagnóstico mais sensível para evidenciar o vírus variólico quando presente em títulos reduzidos, como no caso descrito em que, nas demais provas testadas, os mesmos espécimens produziram resultados consistentemente negativos.

Quanto à microscopia eletrônica, relatam CRUICKSCHANK & col.<sup>3</sup> que, em dois dos seus 30 pacientes, foi negativa, enquanto o isolamento em mca foi positivo. Os dois espécimens falso-negativos haviam sido colhidos ao primeiro e ao segundo dia do exantema, mais cedo, portanto, do que qualquer das amostras por nós estudadas. Na presente investigação, a microscopia eletrônica confirmou-se como meio excelente de diagnóstico presuntivo rápido ou, praticamente, imediato, embora constituindo diagnóstico apenas genérico dentro do Grupo Varíola-Vaccínia dos Poxvírus. Foi tão acurada quanto a cultura em mca para o material vesículo-pustular ou de crostas; no grupo de 52 esfregaços fez somente um diagnóstico falso-negativo, foi positiva três vezes quando a inoculação em mca foi negativa e, no caso dos esfregaços incubados a 38,5°C durante 48 horas, mostrou-se cinco vezes mais precisa do que a inoculação em mca. Conclui-se, pois, que a microscopia eletrônica pode evidenciar eficazmente tanto partículas virais ativas como inativas, desde que presentes em certo teor.

Confirmando os resultados de PANIKER & KALRA<sup>15</sup> no diagnóstico da varíola hemorrágica, observamos aqui boa correlação entre o isolamento viral e as provas de precipitação em ágar-gel e obtivemos até mesmo percentagem mais elevada de testes positivos — 98% das amostras de material vesículo-pustular e 97% das crostas — em relação às que referem NICOLI & col.<sup>13</sup>, ou seja, 83% das amostras de fluido e 69% das de crostas. Testes de precipitação realizados com certas amostras de crostas colhidas em 1966

e 1967 haviam produzido em nosso laboratório resultados inconsistentes, o que fez com que procurássemos coletar ao menos 12 crostas de cada paciente em 1968, já que o volume de cada amostra parece ter contribuído para a maior precisão obtida com os fluidos e crostas.

Resultados precisos das provas laboratoriais mostraram-se, assim, dependentes da quantidade e preservação adequada das amostras. Os critérios obedecidos neste estudo para a coleta de amostras foram satisfatórios para crostas e fluidos; mas, como já se referiu, os esfregaços em lâmina, de exsudatos de lesões, se mantidos à temperatura ambiente por certo tempo, deixavam de constituir material satisfatório. DOWNIE & DUMBELL<sup>6</sup> observaram crescente inativação do vírus da *V. major* à temperatura ambiente, em fluido vesicular seco sobre lâminas de vidro, após 35 dias à luz e após 84 dias em ausência de luz; a linhagem brasileira de *V. minor*, conservada em ausência de luz e sob condições variadas de temperatura, sofreu inativação mais rápida. Em tais esfregaços a microscopia eletrônica revelou degenerações estruturais das partículas virais e os testes negativos de difusão em ágar-gel indicam que também os antígenos virais solúveis haviam sido destruídos.

Ocasionalmente, os laboratórios de diagnóstico vêm-se às voltas com espécimens negativos de casos óbvios de variola. Em 1967, crostas de 2 pacientes do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas" foram negativos, neste laboratório, às provas de difusão em ágar-gel, microscopia eletrônica e cultura em mca. Os três testes, repetidos em outras crostas colhidas dos mesmos pacientes dois dias depois, foram positivos. Mas de maneira geral, pode-se afirmar que sempre que quantidades adequadas de crostas, fluido vesículo-pustular ou esfregaços de material de lesão são colhidas e transportadas rapidamente para o laboratório e congeladas até o momento da prova, os três testes diagnósticos-padrões mostram exatidão e inteira correlação.

Finalmente, quanto à caracterização viral, os resultados dos testes de temperatura-teto, das reações cruzadas de inibição da hemaglutinação entre hemaglutininas e anti-soros

específicos e das provas de patogenicidade para camundongos, permitem-nos situar a amostra brasileira do vírus variólico como linhagem de *Variola minor* cuja hemaglutinina é antigênicamente indistinguível das hemaglutininas produzidas pelas linhagens-padrões "Harvey", de *V. major*, "Butler" de *V. minor* e "Wyeth" de *Vaccinia*, mas que apresenta menor virulência para camundongos recém-nascidos do que as outras duas linhagens do vírus variólico estudadas.

#### S U M M A R Y

*Laboratory study of smallpox in patients of the "Emílio Ribas" Infectious Disease Hospital, São Paulo, Brasil. I — An evaluation of the different direct diagnostic methods*

Specimens from a sample of 262 patients were studied on the smallpox wards of the "Emílio Ribas" Infectious Disease Hospital. For each patient, clinical histories were obtained and observations concerning the character of the exanthem were recorded. The specimens were obtained as: (i) dried smears of lesion exudate on glass slides; (ii) vesicular or pustular fluids, in capillary tubes; (iii) scabs from crusting lesions. Laboratory methods comprised: (i) electron microscopy; (ii) culture on chorioallantoic membrane (cam); (iii) agar gel diffusion tests; (iv) viral characterization test. Accuracy of each type of test is discussed. Availability and storage conditions of the sample have proved to be essential for exact diagnosis. The results of the ceiling-temperature test clearly characterized the variola isolants from Brasil as *Variola minor*; accordingly, the analysis of the clinical manifestations situates the Brazilian smallpox as conforming to the Type VI described by MARDEN<sup>12</sup>.

#### A G R A D E C I M E N T O S

Ficamos gratos ao Dr. Carlos de Oliveira Bastos, Diretor do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas", ao Dr. Augusto de Taunay, Diretor do Instituto "Adolfo Lutz" e ao Prof. Carlos da Silva Lacaz, Professor-Catedrático de Microbiologia e Imunologia da Faculdade

de Medicina da Universidade de São Paulo e Diretor do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pela assistência que nos prestaram. Ao Dr. Luis Florêncio de Salles Gomes, Chefe da Seção de Vírus Dermotrópicos do Instituto "Adolfo Lutz", por valiosas sugestões e pelas facilidades que nos proporcionou em seu laboratório.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARCHETTI, I. & HORSFALL, F. L. — Persistent antigenic variation of Influenza A viruses after incomplete neutralization in ova with heterologous immune serum. *J. Exp. Med.* 92:441-462, 1950.
2. BAUER, D. J.; DUMBELL, K. R.; FOX-HULME, P. & SADLER, P. W. — The chemotherapy of *Variola major* infection. *Bull. WHO* 26:727-732, 1962.
3. CRUICKSCHANK, J. G.; BEDSON, H. S. & WATSON, D. H. — Electron microscopy in the rapid diagnosis of smallpox. *Lancet* 2: 527-530, 1966.
4. DeJONG, M. — The alastrim epidemic in the Hague. *Doc. Med. Geogr. Trop.* 8:205-235, 1956.
5. DOWNIE, A. W. & DUMBELL, K. R. — Isolation and cultivation of variola virus on the chorioallantois of chick embryos. *J. Path. Bact.* 59:189-198, 1947.
6. DOWNIE, A. W. & DUMBELL, K. R. — Survival of variola virus in dried exudate and crusts from smallpox patients. *Lancet* 1:550-553, 1947.
7. DUMBELL, K. R. & NIZAMUDDIN, M. D. — An agar gel precipitation test for the laboratory diagnosis of smallpox. *Lancet* 1: 916-917, 1959.
8. GORDON, C. W.; DONNELLY, J. D.; FOTHERGILL, R.; KER, F. L.; MILLAR, E. L. M.; FAWCETT, T. H.; BEDSON, H. S. & CRUICKSCHANK, J. G. — *Variola minor*, a preliminary report from the Birmingham region. *Lancet* 1:1311-1313, 1966.
9. HALONEN, P. E.; CASEY, H. L.; STEWART, J. A. & HALL, A. D. — Rubella complement fixing antigen prepared by alkaline extraction of virus grown in suspension cultures of BHK-21 cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125:167-172, 1967.
10. JORGE, R. — Alastrim and variola. *Lancet* 2:1317, 1924.
11. KIRCHNER, E.; NOBEL Jr., J.; SESSO, J. & LONG, G. W. — Estudo laboratorial da varíola em pacientes do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas", de São Paulo, Brasil. II — Avaliação e interpretação do diagnóstico sorológico. (Em preparo).
12. MARSDEN, J. P. — *Variola minor*, a personal analysis of 13,686 cases. *Bull. Hyg.* (London) 23:735-746, 1948.
13. NICOLI, J.; JOLLIPOIS, C.; BORDAS, J. & DENSAHAI, J. — Antigenes solubles des "Pox virus". *Ann. Inst. Pasteur* (Paris) 107: 453-457, 1964.
14. NIZAMUDDIN, M. D. & DUMBELL, K. R. — A simple laboratory test to distinguish the virus of smallpox from that of alastrim. *Lancet* 1:68-69, 1969.
15. PANIKER, C. K. G. & KALRA, S. L. — Agar gel diffusion precipitin test in the diagnosis of haemorrhagic smallpox. *Indian J. Med. Res.* 50:686-689, 1962.
16. RIBAS, E. — Alastrim, amaas or milk-pox. *Royal Soc. Trop. Med. & Hyg.* 4:224-232, 1910.
17. RODRIGUES DA SILVA, G.; ANGULO, J. J. & RABELLO, S. I. — Clinical types of smallpox as seen in an epidemic. *Postgrad. Med.* 38:140-144, 1962.
18. WORLD HEALTH ORGANIZATION — *A Guide to the Laboratory Diagnosis of Smallpox for Smallpox Eradication Programmes*. Geneva, 1969.

Recebido para publicação em 25/11/1970.