

Methodo para diagnostico do alastrim *

pelos

Drs. C. Magarinos Torres e J. de Castro Teixeira

(Com 3 estampas)

Até agora, o diagnostico differencial entre variola e alastrim tem sido ponto de controversia por parte das autoridades sanitarias no Brasil.

Nestes ultimos annos tem prevalecido a doutrina segundo a qual as duas doenças seriam identicas. Como consequencia, encontramos registradas como epidemias de variola as que ocorreram na cidade do Rio de Janeiro, em 1932 (v. Bol. Estatist. Demogr. Sanit. Cid. Rio Jan., 1932, 12 : 47) e na de S. Paulo, em 1936.

Esse facto significa, apenas, a dificuldade que o sanitarista encontra, em realizar um diagnostico differencial, baseado em dados objectivos constantes e seguros. É sabido que a evolução clinica e os documentos epidemiologicos não bastam para resolver a questão. Por outro lado, a reacção da cornea do coelho apresenta dificuldade de interpretação. Os resultados alcançados com esse methodo de diagnostico só poderão ser proveitosamente utilizados por quem tiver experiencia prévia do processo applicado ao estudo dos virus da *variola vera*, da vaccina e do alastrim.

Queremos, assim, dizer que até o presente, no Brasil, os diagnosticos de variola e de alastrim tem sido mais a consequencia da doutrina que o sanitarista adopta, no momento, do que uma conclusão baseada em dados colhidos para o caso concreto.

Em trabalhos anteriores (Torres & Teixeira 1933, 1934 e 1935, e Torres 1936) descrevemos a morphologia das inclusões cellulares do alastrim, em cellulas epidermicas do homem e do *Macaca mulatta*, comparanda-as com as da *variola vera* e as da vaccina.

Chegamos ao resultado de que era possivel estabelecer distincções quanto á localisação, fórma, dimensões e propriedades tinctoriaes das inclusões cellulares especificas, em taes affecções.

* Recebido para publicação a 25 de Agosto de 1937 e dado á publicidade em Dezembro de 1937.

As figuras 1-8, Estampa 1, resumem taes conclusões, e nos dispensam de insistir nesse ponto.

Restava, comtudo, esclarecer se as inclusões do alastrim se apresentavam, sempre, com identico aspecto e propriedades tinctoriaes, em epochas differentes e qualquer que fôsse o fóco da doença estudado.

O presente trabalho procura esclarecer esse ponto, aproveitando material colhido em sete fócios epidemicos differentes.

Utilizando da experiencia que adquirimos, procuramos estatuir um methodo de laboratorio que dêsse resultados seguros e constantes, de modo a fornecer ao sanitaria, bases concretas em que apoiar o seu diagnostico.

EPIDEMIAS DE ALASTRIM ESTUDADAS

1. — Fóco occorrido na cidade de Belém, Estado do Pará (região Norte do Brasil), em Setembro de 1936.

Segundo informações do Dr. Acatuassú Nunes filho, Director da Saúde Publica do Estado do Pará, o surto epidemico constou de cerca de 300 casos com um obito.

O material, que nos foi gentilmente remettido pelo Dr. Acatuassú Nunes filho, consta de fragmentos de pustulas retiradas por biopsia, de um doente, e conservadas em glicerina pura.

Colhido a 13 de Setembro, foi o material, apenas recebido em nosso laboratorio, triturado com agua physiologica esteril e inculado, por via endovenosa, a um macaco rhesus adulto (n.º 2425). Este apresentou febre, no setimo dia, e erupção cutanea, no oitavo para nono dias, com predominancia nos membros superiores, especialmente na região plantar (Fig. 10). O macaco sobreviveu.

Em biopsia de uma vesicula retirada no sexto dia de inoculação, verificamos a presença de inclusões cytoplasmaticas, juxta-nucleares, basophilas, não coraveis pela safranina, (Fig. 13), identicas ás que anteriormente descreveramos no alastrim.

2. — Fóco occorrido na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo (região Sul do Brasil), durante o anno de 1936.

Informações detalhadas sobre este surto epidemico nos foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Calazans, Director Geral do Serviço Sanitario de São Paulo, e pelo Dr. Synésio Rangel Pestana, Director clinico da Santa Casa de Misericordia da Capital do Estado de São Paulo, aos quaes agradecemos.

A epidemia, oficialmente notificada como variola, constou de 186 casos e nenhum obito. Teve origem na Santa Casa de Misericordia, em

um individuo que viera do interior do Estado. Nessa occasião existiam fôcos epidemicos em diversos municipios, entre outros, nos de Juquery, Jundiaby, Atibaia e Bragança.

No periodo comprehendido entre Janeiro e Dezembro de 1936, as notificações de « variola » recebidas pelas Delegacias de Saúde do interior do Estado de São Paulo, foram em numero de 1.089, sendo os casos assim distribuidos, de accôrdo com as cidades: — Campinas, 449 casos, Baurú, 401 casos, Ribeirão Preto, 172 casos, Botucatu, 32 casos, Guaratinguetá, 22 casos, São Carlos, 12 casos, e Santos, 1 caso.

Alguns casos, vistos pelo Prof. Dr. Flavio da Fonseca, em Dezembro de 1936, no Hospital de Isolamento da cidade de São Paulo, apresentavam erupção confluyente, sendo, no entanto, bom, o estado geral dos doentes. O material, que nos foi por elle gentilmente enviado, consistia do conteúdo de pustulas de dois doentes, conservado em pipetas capillares estereis.

Com o material de um delles (doente B. B., registro 506, Pavilhão 4), colhido no decimo terceiro dia de doença, inoculamos um macaco rhesus, femea, jovem (n.º 2493). Este apresentou elevação thermica e erupção vesico-pustulosa no setimo dia de inoculação. As lesões entraram em dissecação, no decimo primeiro dia. Eram predominantes na face (fig. 11) e membros inferiores (Fig. 12). O animal sobreviveu.

Foram feitas tres biopsias de lesões cutaneas, respectivamente no oitavo, nono e decimo dias de inoculação. O seu estudo histologico mostra accentuada hyperacanthose e espongiose em fôcos multiplos, iniciando a formação de vesiculas. Embora em phase precoce de evolução, as efflorescencias cutaneas experimentaes mostram, no derma, pronunciada infiltração cellular. As cellulas malpighianas, no fundo e margens das lesões, contêm numero consideravel de inclusões cytoplasmaticas typicas do alastrim (Fig. 14), bem como inclusões nucleares (Fig. 16).

3. — Fôco occorrido na cidade de Itaperuna, Estado do Rio de Janeiro (região Sul do Brasil), em 1933.

Não foram publicadas informações sobre o numero de casos, caracterisando-se a epidemia, por baixo indice de mortalidade.

Graças á gentileza do Dr. Americo Oberlaender, Director de Saúde Publica do Estado do Rio de Janeiro, pudemos estudar um doente, o qual foi transportado do fôco epidemico para o Hospital annexo ao Instituto Oswaldo Cruz.

Com material retirado de diversas vesico-pustulas, e emulsionado em agua physiologica, inoculamos, por via endovenosa, um macaco rhe-

sus (n.º 4060), o qual apresentou febre, no sexto dia de inoculação, persistindo nos tres dias immediatos, e uma erupção vesico-pustulosa, iniciada no sexto dia. O animal sobreviveu.

Numerosas inclusões cytoplasmaticas basophilas, juxta-nucleares, não coraveis pela safranina, com a morphologia e reacções corantes das inclusões do alastrim, são encontradas em cellulas epidermicas das margens e fundo de uma vesico-pustula retirada, por biopsia, no sexto dia de inoculação.

4. — Fóco ocorrido na cidade de Caratinga, Estado de Minas Geraes (região central do Brasil), em Julho e Agosto de 1933.

Não foram publicadas informações officiaes sobre o numero de casos ocorridos. A epidemia caracteriza-se por baixo indice de mortalidade.

O material consta do conteúdo de vesico-pustulas de dois doentes, colhidos em tubos capillares esterelizados, o qual nos foi, gentilmente, enviado pelo Dr. Jairo Lobo Martins, clinico naquella cidade.

Dois macacos rhesus (nos. 1577 e 1593), foram inoculados por via endovenosa, um a 13 de Julho, com material colhido a 9 de Julho, e outro a 9 de Agosto, com material colhido a 3 de Agosto. Ambos apresentaram elevação thermica no quinto para o sexto dias de inoculação, e uma erupção vesico-pustulosa, a qual predomina nos membros inferiores. Ambos sobreviveram.

Inclusões cytoplasmaticas typicas do alastrim, juxta-nucleares, basophilas, não coraveis pela safranina, existiam em cellulas epidermicas de uma vesico-pustula do primeiro macaco, retirada por biopsia, (n.º 3904), no sexto dia de inoculação.

5. — Fóco ocorrido na cidade de Bello Horizonte, Estado de Minas Geraes (região central do Brasil), em Setembro de 1933.

Não foram publicadas informações sobre o numero total de casos, tendo sido registrados tres obitos com o diagnostico de variola no Bol. Estatist. Dem. Sanit. Cid. Rio de Janeiro, 1933, 12 : 219.

O material, gentilmente fornecido pelo Dr. Ernani Agricola, Director de Saúde Publica Estadual, consta do conteúdo de varias pustulas, conservado em glicerina a 50 %. Colhido a 1 de Setembro, foi o material, préviamente emulsionado em agua physiologica, inoculado por via endovenosa, a 12 de Setembro, em um macaco rhesus adulto (n.º 1597). O protocollo deste animal menciona elevação thermica no quinto dia de inoculação, e apparição, no sexto dia, de numerosas vesiculas nas extremidades dos membros (Fig. 9). e, em menor numero, na face. O animal sobreviveu.

Inclusões cytoplasmaticas juxta-nucleares, basophilas, não coraveis pela safranina, eram muito numerosas em cellulas epidermicas de uma papula (Fig. 15) retirada no sexto dia de inoculação.

6. — Fóco ocorrido na cidade do Rio de Janeiro (região Sul do Brasil), em 1932.

A epidemia constou de pequeno numero de casos registrados no Boletim Mensal da Estatistica Demographo-Sanitaria da Cidade do Rio de Janeiro, 1932, 12: 47, sob as epigraphes de variola (32 casos); e alastrim (3 casos), aos quaes é preciso acrescentar mais oito por nós observados em tropa aquartellada e isolados no Hospital annexo ao Instituto Oswaldo Cruz. Apenas um obito foi registrado.

Em oito doentes praticamos biopsias de lesões cutaneas, nellas encontrando inclusões cytoplasmaticas, juxta-nucleares, basophilas, não coradas pela safranina, em cellulas epitheliaes das margens das vesiculas e vesico-pustulas. Inclusões com caracteres morphologicos e tinctoriaes semelhantes foram obtidas em dois macacos rhesus inoculados, por via endovenosa, com material dos doentes. Tendo sido esse material aproveitado em trabalho anterior (Torres & Teixeira 1934a, Figuras 1-18, Estampa 28. Figuras 19-23, Estampa 29, e Figuras 33-38, Estampa 30), dispensamo-nos de maiores considerações a respeito.

7. — Fóco de alastrim ocorrido na cidade do Rio de Janeiro (região Sul do Brasil), em 1937.

Com o conteúdo de vesico-pustulas de dois casos isolados na Enfermaria 18 do Hospital São Francisco de Assis, Serviço do Professor Dr. J. Moreira da Fonseca, inoculamos por via endovenosa, dois macacos rhesus, os quaes apresentaram os symptomas habituaes do alastrim experimental.

Inclusões cytoplasmaticas, juxta-nucleares, basophilas, não coradas pela safranina, foram evidenciadas em cellulas epidermicas de lesões cutaneas retiradas por biopsias, respectivamente, no quarto dia de erupção e nono de inoculação, em um macaco, e no terceiro de erupção e oitavo de inoculação, em outro.

METHODO PROPOSTO

Baseia-se na sensibilidade que apresenta um animal de laboratorio, o macaco rhesus (*Macaca mulatta*), ao virus do alastrim, e no aspecto typico que revestem as inclusões cellulares especificas, nas cellulas epidermicas das lesões experimentaes.

Quer as inclusões cytoplasmaticas, quer as nucleares são muito

semelhantes ás vistas em casos humanos de alastrim, sendo nitidamente differentes, pela sua morphologia, e, especialmente, pelas suas reacções corantes (Figs. 1-8, Est. 1) das conseguidas, na mesma especie de macaco, com o virus da vaccina, e das encontradas em casos humanos de *variola vera*.

1. — Colher o material no doente suspeito, aspirando o conteúdo de vesiculas ou de vesico-pustulas, préviamente desinfectadas com alcool, em pipetas capillares esterelizadas. A colheita é praticada, ordinariamente, entre o segundo e o decimo dias de erupção, mais commumente entre o quarto e o nono dias, quando o exanthema se apresenta em franca evolução, e o doente é posto em contacto com as autoridades sanitarias. As pipetas, convenientemente acondicionadas, são remettidas ao laboratorio. Uma demora até de quinze dias no transporte, não traz sérios prejuizos ao resultado do methodo, embora seja preferivel, naturalmente, usar material tanto mais recente quanto possivel

2. — O material recebido no laboratorio é diluido em sôro physiologico, e inoculado, por via endo-venosa, em um macaco rhesus. A inoculação é feita, com facilidade, nas veias da face interna dos membros inferiores. O animal infecta-se, *de modo constante*, apresentando symptomatologia typica, da qual faz parte um exanthema assaz semelhante ao da doença humana (Figs. 9 e 10); sobrevive á infecção, resistindo bem ás biopsias praticadas.

3. — Retirar, por biopsia, lesões cutaneas do macaco rhesus, quando estas se encontram bem constituidas, o que, de regra, ocorre entre o sexto e o nono dias de inoculação. É sufficiente uma simples contenção manual, no momento de praticar as biopsias, bastando, como instrumental, tesouras e pinças. A applicação de « agrafes », e desinfeccção com tintura de iodo, completam o acto operatorio. Quando a hemorragia é pequena, não é necessario usar de « agrafes », bastando tamponar o ferimento com algodão immerso em collodio. Os fragmentos de tecido são fixados em Zenker-formol, durante 24 horas. Praticar, com lamina cortante fina (lamina de navalha Gillette), um córte perpendicular á superficie da lesão, de modo a obtér córtes histologicos orientados nesse sentido, e abrangendo, desde logo, a lesão. Inclusão em paraffina.

4 — Coloração dos córtes, da espessura maxima de 6 micra, pelos seguintes methodos:

a) — hematoxylina-eosina, segundo o processo rolineiro.

b) — hematoxylina-safranina, demorando os córtes 10 minutos, na

hematoxylina de Delafield diluida, 10 minutos em agua corrente, 10 minutos em uma soluçao aquosa a 1% de safranina, e 10 minutos em soluçao aquosa de acido tannico a 25%. Agua. Alcool absoluto. Oleo de bergamota-xylol. Xylol. Balsamo.

Resultado: — Procurar as inclusões cytoplasmaticas especificas, em cellulas epidermicas das margens e fundo da lesão, de preferencia nas que apresentam nucleo bem conservado.

No alastrim, as inclusões cytoplasmaticas são juxta-nucleares, isoladas, ou em polos oppostos do nucleo, coradas em azul-cinzeno, nos preparados pela hematoxylina-eosina, e pallidamente em azul, nos pela hematoxylina-safranina. Nestes ultimos, fazem grande contraste com os nucleolos das cellulas, intensamente corados pela safranina.

Em material antigo, embora incluído em paraffina, as inclusões cytoplasmaticas do alastrim coram-se mal pela hematoxylina-safranina, ao passo que os granulos de chromatina, originarios de cellulas necrosadas, e occasionalmente englobados pelas cellulas epidermicas, conservam grande afinidade corante para com a safranina. É essa uma causa de erro que convem estar presente ao microscopista pouco familiarizado com o estudo de inclusões em doenças de virus.

SUMMARY

Inclusion bodies of alastrim are quite consistent in their morphology and staining properties when studied in material from seven epidemics occurring in several States of Brazil (Pará, Minas Geraes, Rio de Janeiro, Districto Federal and São Paulo) from 1932 to 1937.

Paranuclear or circumnuclear basophilic cytoplasmic bodies not stained by safranine, single or in pairs at opposite ends of the nuclei could always be demonstrated in epidermal cells from skin lesions either in man or in *Macaca mulatta*. Cytoplasmic inclusion bodies of *variola vera* as seen in human cases, and of vaccinia as seen in *Macaca mulatta* are acidophilic or polychromatophilic and deeply stained by safranine.

A method for the diagnosis of alastrim is devised taking into account the sensibility of *Macaca mulatta* to the virus, and the morphology and staining properties of the cytoplasmic inclusion bodies as seen in skin lesions of the monkey.

This method has been successfully tried in epidemics occurring at the States of Pará (1936), São Paulo (1936) and Districto Federal (1937) when the real diagnosis was a matter of discussion.

BIBLIOGRAPHIA

TORRES, C. M. & TEIXEIRA, J. C.

- 1933 a. Transmission de l'alastrim au *Macacus rhesus*. C. R. Soc. Biol., **112** : 917-919.
- 1933 b. Histologie de l'alastrim chez le *Macacus rhesus*. C. R. Soc. Biol., **112** : 920-921.
- 1933 c. Inclusions cytoplasmatiques de l'alastrim chez le *Macacus rhesus* et chez le Lapin. C. R. Soc. Biol., **112** : 922-924.
- 1933 d. Étude des inclusions cellulaires de l'alastrim et de la vaccine chez le Singe (*Macacus rhesus*). C. R. Soc. Biol., **114** : 967-968.
- 1934 a. Estudo comparativo das inclusões do alastrim e da vaccina no macaco (*Macacus rhesus*). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **28** : 181-203.
- 1934 b. Diagnostic différential des inclusions cytoplasmatiques de l'alastrim et de la variole. C. R. Soc. Biol., **117** : 505.
- 1935 a. Sur les inclusions intranucléaires de l'alastrim et de la variole chez l'homme. C. R. Soc. Biol., **118** : 719-720.
- 1935 b. Estudo comparativo das inclusões do alastrim e da *variola vera*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **30** : 183-240.

TORRES, C. M.

1936. Further Studies on the Pathology of Alastrim and their Significance in the Variola-Alastrim Problem. Proc. Roy. Soc. Med., London, **29** : 1525-1540.

Estampa 1

- Fig. 1 — Inclusões cytoplasmáticas, solitárias, juxta-nucleares, basófilas, em células epidérmicas de *Macaca mulatta* (n.º 3983), inoculado com alastrim. Coloração: hematoxilina-eosina.
- Fig. 2 — Inclusões cytoplasmáticas do alastrim em células epidérmicas de *Macaca mulatta* (n.º 3983). Ao passo que os nucleolos coram-se, intensamente, pela safranina, as inclusões tingem-se pallidamente em azul. Coloração: hematoxilina-safranina.
- Fig. 3 — Inclusões cytoplasmáticas, solitárias, juxta-nucleares, basófilas, em células epidérmicas de um caso humano de alastrim (n.º 3647). Coloração: hematoxilina-eosina.
- Fig. 4 — Inclusões cytoplasmáticas do alastrim em caso humano (n.º 3647). Nucleolos intensamente corados pela safranina, inclusões em azul pallido. Coloração: hematoxilina-safranina.
- Fig. 5 — Inclusões cytoplasmáticas, acidófilas, em células da epiderme de um caso humano de *variola vera* (n.º 3933). Coloração: hematoxilina-eosina.
- Fig. 6 — Inclusões cytoplasmáticas em células da epiderme de um caso humano de *variola vera* (n.º 3933). As inclusões, assim como os nucleolos, apresentam-se coradas pela safranina. Coloração: hematoxilina-safranina.
- Fig. 7 — Inclusões cytoplasmáticas, polychromatófilas, em células da epiderme de *Macaca mulatta* (n.º 3791) inoculado com vaccina. Coloração: hematoxilina-eosina.
- Fig. 8 — Inclusões cytoplasmáticas múltiplas, em células da epiderme de *Macaca mulatta* (n.º 3791), inoculado com vaccina. As inclusões, assim como os nucleolos, coram-se pela safranina. Coloração: hematoxilina-safranina.

CYTOPLASMIC INCLUSION BODIES OF ALASTRIM, SMALLPOX AND VACCINIA IN EPIDERMAL CELLS

Alastrim in rhesus
monkey

Alastrim in man

Smallpox in man

Vaccinia in rhesus
monkey

Hematoxylin and eosin

Single
or double
juxta-nuclear
basophilic
bodies

Single
or double
juxta-nuclear
basophilic
bodies

Numerous
rather small
acidophilic
bodies

Numerous
polychromato-
philic bodies

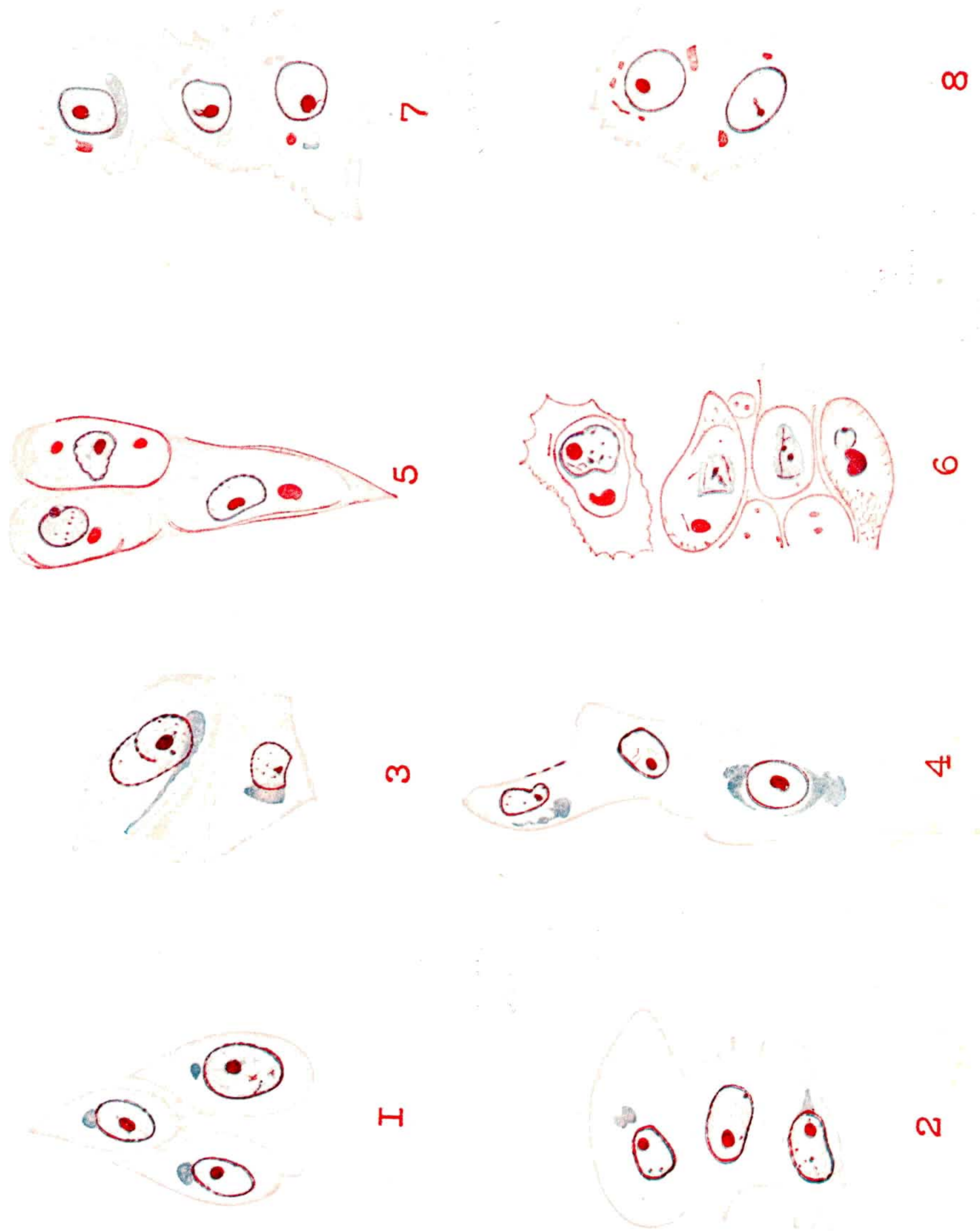
Hematoxylin and safranine

Juxta nuclear
pale blue
stained bodies

Juxta nuclear
pale blue
stained bodies

Deeply stained
safraninophilic
bodies

Deeply stained
safraninophilic
bodies



Estampa 2

- Fig. 9 — Exanthema do alastrim em *Macaca mulatta* (n.º 1597). Virus de Bello-Horizonte, Estado de Minas Geraes, 1933.
- Fig. 10 — Exanthema do alastrim em *Macaca mulatta* (n.º 2425). Virus do Estado do Pará, 1936.
- Figs. 11 e 12 — Exanthema do alastrim em *Macaca mulatta* (n.º 2493). Virus do Estado de São Paulo, 1936.



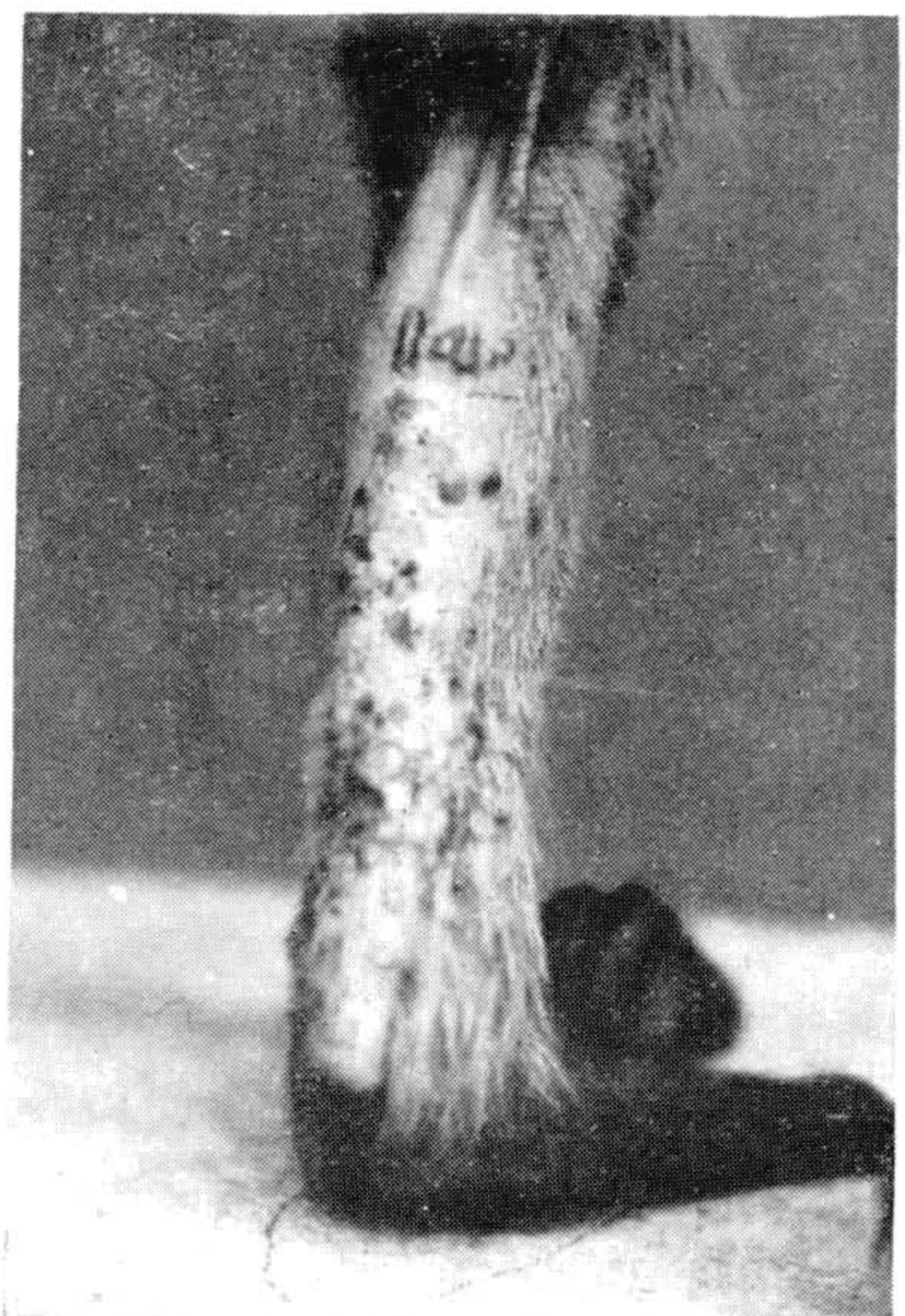
9



10



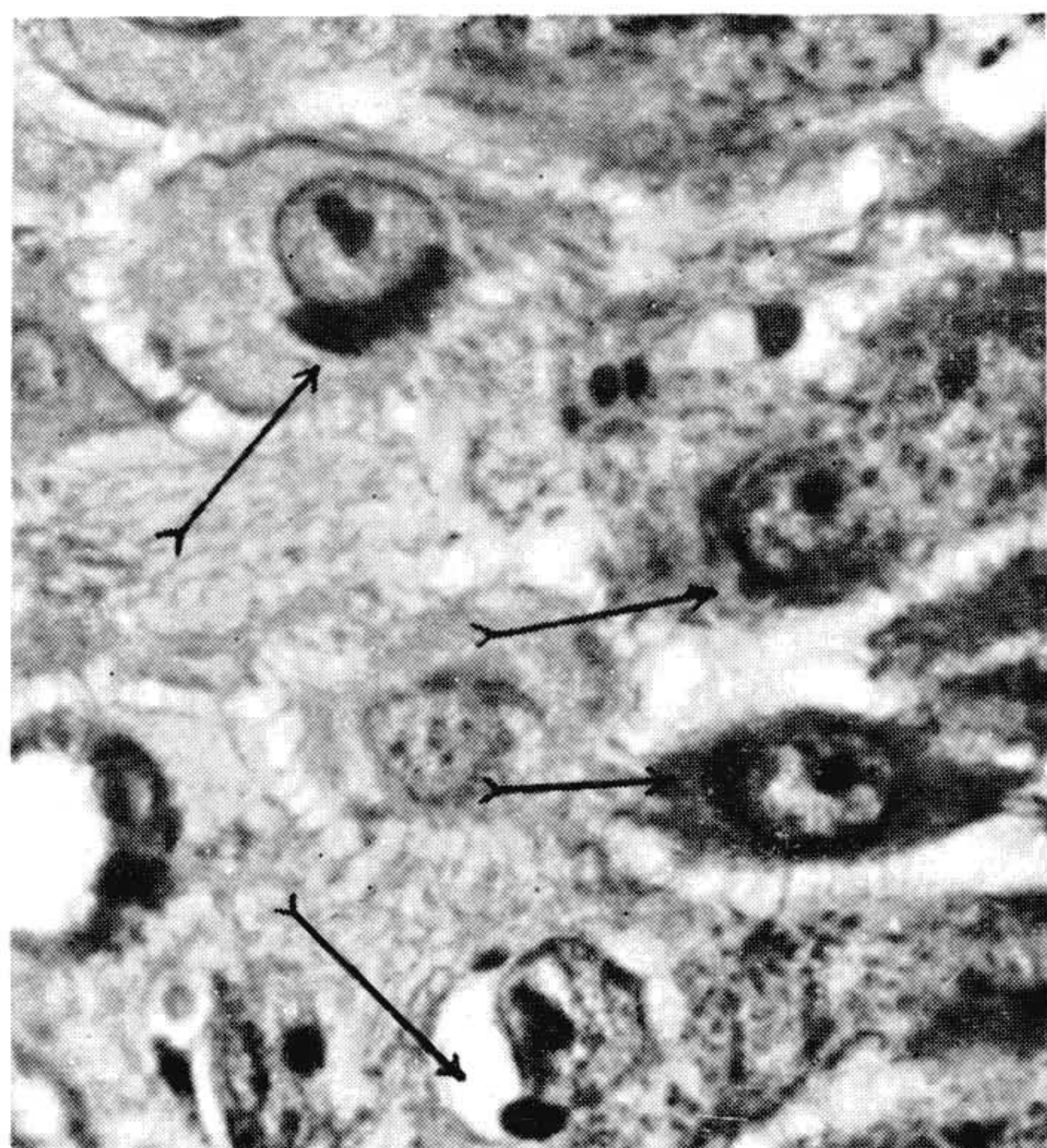
11



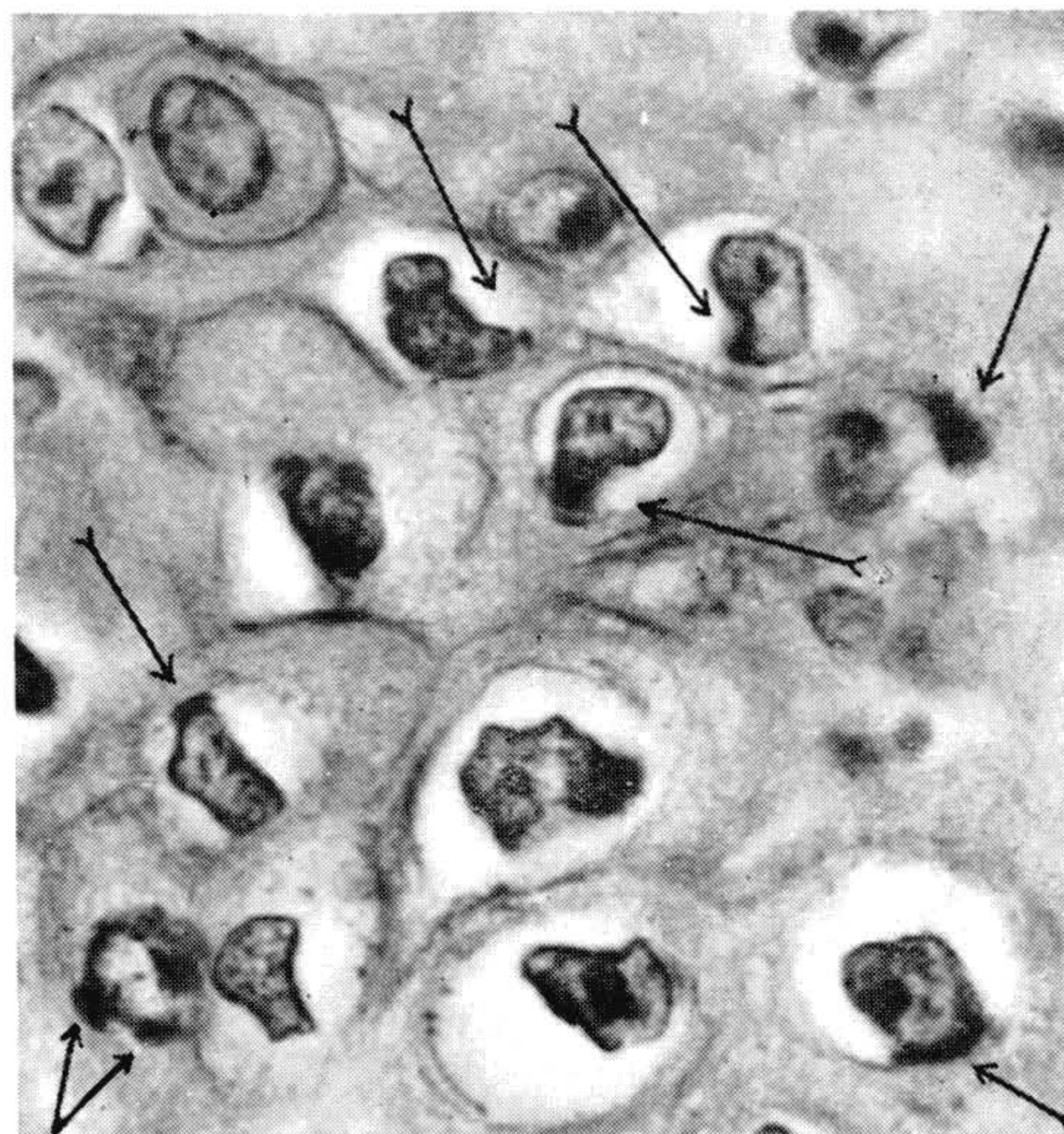
12

Estampa 3

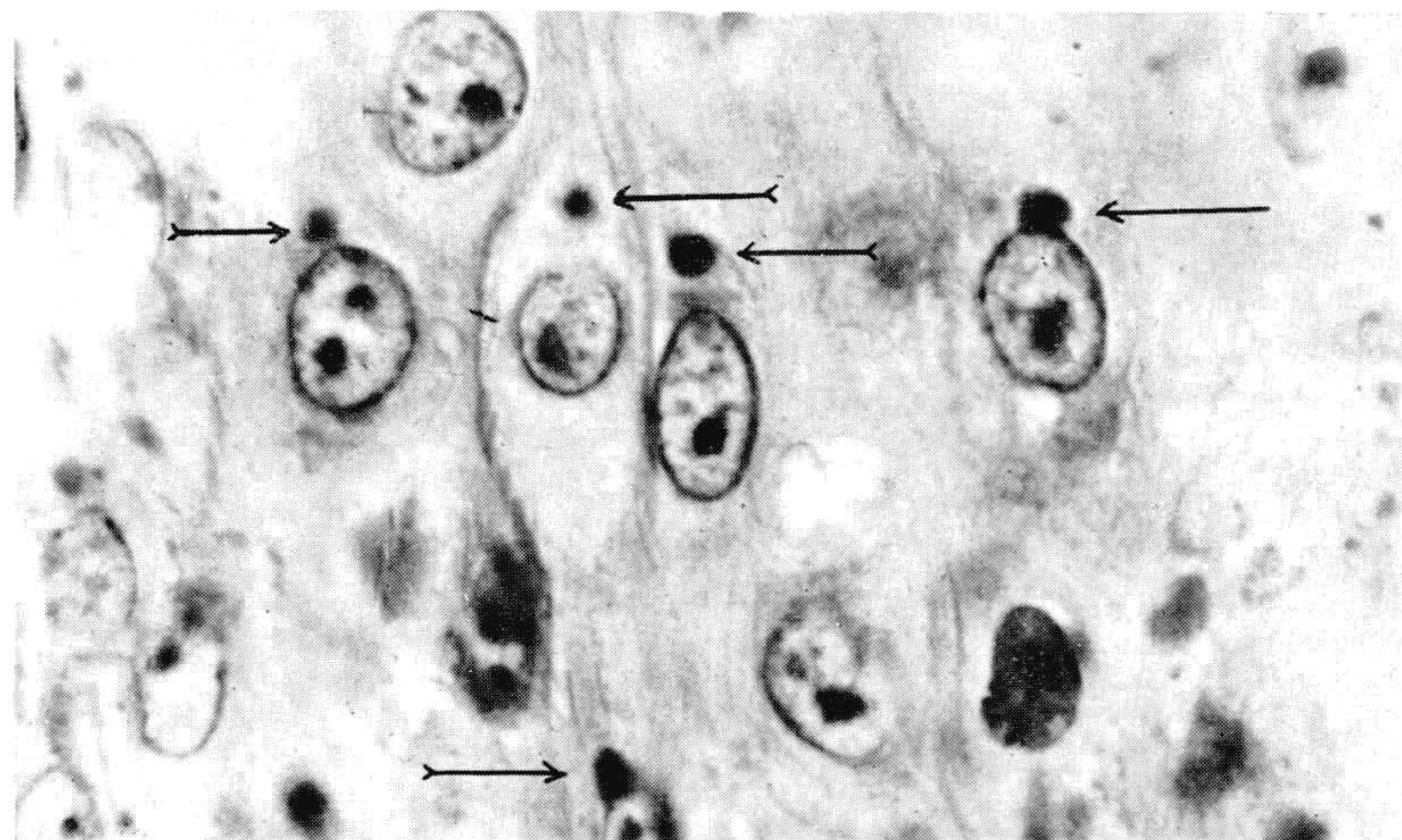
- Fig. 13 — Inclusões cytoplasmáticas do alastrim em células epidérmicas de *Maccaca mulatta* (n.º 2425, biopsia 7387). Virus do Estado do Pará, 1936.
- Fig. 14 — Inclusões cytoplasmáticas do alastrim em células epidérmicas de *Maccaca mulatta* (n.º 2493, biopsia 4929). Virus do Estado de São Paulo, 1936.
- Fig. 15 — Inclusões cytoplasmáticas do alastrim em células epidérmicas de *Maccaca mulatta* (n.º 1597, biopsia 3983). Virus de Bello-Horizonte, Estado de Minas Geraes, 1933.
- Fig. 16 — Inclusões intranuclear e cytoplasmática em célula epidérmica de *Maccaca mulatta* (n.º 2493, biopsia 4929). Virus do Estado de São Paulo, 1936.



13



14



15



16