

---

# NOTAS

---

## GEL-ELETROFORESE NO DIAGNÓSTICO DA VARÍOLA<sup>1\*</sup>

**JULIO A. MESQUITA,\*\***

**AKIRA HOMMA e HERMANN G. SCHATZMAYR \*\***

Instituto Presidente Castello Branco, Fundação Instituto Oswaldo Cruz,  
Rio de Janeiro, Guanabara

**SUMÁRIO:** O emprego de gel-eletroforese no diagnóstico da varíola, demonstrou ser ao menos trinta vezes (30×) mais sensível que o teste de agar-gel, nas condições descritas (tabela I).

Doze (12) espécimes, cujos testes convencionais de inoculação em ovos embrionados e de agar-gel resultaram positivos, foram testados em suas diluições originais congeladas por mais de um ano, sendo seis deles revelados por gel-eletroforese enquanto nenhum o foi por agar-gel (tabela II).

Trinta e três (33) amostras isoladas no laboratório, foram testadas com material colhido de membrana cório-alantóica da primeira inoculação para o diagnóstico, conservado em glicerina 50%, resultando 15 positivas em gel-eletroforese e apenas 3 em agar-gel (tabela II).

Os últimos 60 espécimes recebidos para diagnóstico, através a Campanha de Erradicação da Varíola, também resultaram negativos em gel-eletroforese, que não mostrou falsos-positivos nas condições descritas.

**V**ÁRIAS formas de emprego da eletroforese têm sido descritas ultimamente para a revelação de antígenos virais, **Gocke & Owe, Pesendorfer, Krassnitzky, & Wewalka, Prince & Burke e Wallis & Melnick**, (<sup>3,4,5,7</sup>), em testes mais sensíveis e rápidos de precipitação de complexos antígeno-anticorpo.

O presente trabalho relata os resultados obtidos com a utilização de gel-eletroforese na revelação de antígenos virais do grupo Pox, e compara

esse método com testes convencionais de precipitação por imunodifusão em gel de agar (agar-gel).

### MATERIAL E MÉTODOS

*I — Antígenos virais do grupo Pox —* sob a forma de passagens em membrana cório-alantóica de ovos de galinha embrionados de 12 dias (MCA).

a) Vaccínia — vacina antivariólica VL 479, do Instituto Oswaldo Cruz;

b) Varíola — amostras isoladas em nosso laboratório, a partir de espécimes

---

1 Recebido para publicação a 26 de janeiro de 1972.

\* Trabalho do Laboratório de Virologia da Área de Ciências Biológicas.

\*\* Bolsistas do Conselho Nacional de Pesquisas.

recebidos para diagnóstico através a Campanha de Erradicação da Variola (CEV).

II — *Soros precipitantes* — Soros de coelhos hiper-imunizados com Vaccinia.

a) Soro de referência — obtido do Centro de Doenças Comunicáveis dos Estados Unidos da América (CDC), Atlanta, Georgia;

b) Soro produzido em nosso laboratório — como se descreve a seguir: vacinação por espalhamento de uma suspensão 1:50 da vacina antivariólica já citada, na pele escarificada dos animais (área aproximada de  $5 \times 10$  cm em cada flanco) — 20 dias depois da vacinação (queda das crostas) foram feitas três séries de inoculações consecutivas a intervalos semanais — cada série constou de: 1) aplicação endovenosa de  $10^7$  UFP de vírus (1 ml da vacina); 2) aplicações intramusculares, distribuindo vírus emulsificado em parafina líquida (1 ml da vacina mais 3 ml de parafina) pelas quatro patas — uma semana após a última série de inoculações, foi feita a sangria total dos animais e comparação deste soro com o de referência, em provas de precipitação e neutralização.

III — *Soro normal* — “mistura” dos soros coletados dos coelhos antes da vacinação inicial.

IV — *Teste de agar-gel* — precipitação por imunodifusão em gel de agar (Ouchterlony), segundo método descrito, DUMBELL & NIZAMUDDIN (8 e 2).

V — *Teste de gel-eletroforese* — utilizando equipamento convencional, colocamos 600 ml de tampão veronal com força iônica de  $0,075\mu$  e pH 8,6 (1,84 g de ácido dietilbarbitúrico e 10,3 g de dietilbarbiturato de sódio em 1 litro de água destilada), em cada uma das duas cubas. Com diluições deste tampão, foram feitas soluções de força iônica diferentes, como a de  $0,015\mu$  obtida pela diluição 1:5. O gel de agarose (Bauch & Lomb) a 1% em veronal  $0,015\mu$ , foi montado sobre lâminas de vidro de  $8,3 \times 10,2$  cm (Kodak lantern slide cover glasses), sendo cada uma coberta com 15 ml de agarose fundido e deixado solidificar em superfície plana. Foi possível perfurar 56 orifícios de 3 mm de

diâmetro, formando 4 colunas de 14 orifícios afastados 1 cm de seus centros — essa disposição permite testar 28 amostras diferentes ao mesmo tempo. Foi aplicada corrente de 100 volts durante 45 minutos, produzindo eletroforese descontínua, WALLIS & MELNICK (7), pois o gel utilizado tinha força iônica 5 vezes menor que o tampão das cubas.

## RESULTADOS

I — Em termos de definição e centralização das linhas de precipitação, bem como de maior diluição dos antígenos testados em que a reação é positiva, os melhores resultados foram obtidos com o esquema de gel-eletroforese descrito em materiais e métodos, escolhido dentre os seguintes, também testados:

- a) agar (Difco-Noble) a 1% em veronal  $0,075\mu$ ;
- b) agar e agarose misturados em partes iguais, a 1% em veronal  $0,075\mu$ ;
- c) agarose em concentrações de 0,5%, 0,75% e 1% em veronal com forças iônicas de  $0,75\mu$ ,  $0,05\mu$ ,  $0,025\mu$ ,  $0,015\mu$ , e  $0,0075\mu$ .

II — A tabela I mostra que o teste de gel-eletroforese foi, pelo menos, trinta vezes mais sensível que o agar-gel, nas condições descritas. Considere-se ainda a diferença do tempo, 45 minutos e 24 horas, respectivamente, para se completarem os testes acima.

III — A tabela II mostra que:

- a) dentre 12 espécimes, cujas diluições, Schatzmayr & Mesquita, (8 e 6) foram congeladas após os testes convencionais (positivos para variola), 6 ainda puderam ser revelados por gel-eletroforese enquanto nenhum o foi por agar-gel;

b) dentre 33 amostras conservadas em MCA com glicerina, 15 puderam ainda ser reveladas por gel-eletroforese e apenas 3 por agar-gel;

c) os 60 espécimes negativos (recebidos a partir de maio de 1971) também resultaram negativos em gel-eletroforese.

IV — Todas as amostras que precipitaram frente ao soro imune, não precipitaram frente ao soro normal.

TABELA I

DILUIÇÕES-LIMITE NA REVELAÇÃO DE ANTÍGENOS VIRAIS EM TESTES DE AGAR-GEL E GEL-ELETROFORESE

Teste	Vírus	
	Vaccínia	Variola
agar-gel	1:16	1:8
gel-eletroforese	1:512	1:128

TABELA II

COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DE AGAR-GEL E GEL-ELETROFORESE, NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA VARÍOLA

Antígenos	Teste/N.º de positivos	
	Agar-gel	Gel-eletroforese
a) 12 espécimes congelados (varíola)	0	6
b) 33 amostras de varíola (MCA + glic.)	3	15
c) 60 espécimes congelados (negativos)	0	0

a e c) diluições originais de espécimes recebidos para diagnóstico, Schatzmayr & Mesquita (6), congelados após os testes convencionais de MCA e agar-gel. Os espécimes diagnosticados como varíola, permaneceram congelados por mais de 1 ano.

b) suspensões das membranas das MCA em que se fez o isolamento das amostras, rotineiramente conservadas em glicerol 50% a - 15° C.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No momento em que a Campanha de Erradicação da Varíola alcança no Brasil a fase de Vigilância Epidemiológica (1), o laboratório de diagnóstico adquire grande importância como suporte às atividades de descoberta de casos novos e bloqueio imediato de

possíveis surtos de varíola. Da rapidez do diagnóstico laboratorial dependerá o sucesso das diferentes operações que serão necessariamente desencadeadas frente a um caso de varíola, no Brasil, nas circunstâncias atuais.

Está fora de dúvidas a utilidade de um teste com maior sensibilidade e rapidez que o de agar-gel, o qual,

por suas limitações, é considerado apenas como teste presuntivo.

As comparações de sensibilidade foram levadas a cabo com diluições de passagens em MCA, porque não ocorreram casos de varíola desde maio de 1971. Foi empregado o mesmo diluente usado rotineiramente para o preparo dos espécimes a examinar, *Schatzmayr & Mesquita* (6).

A especificidade dos resultados aqui descritos, foi comprovada pela ausência de precipitação frente ao soro normal, de todos os espécimes que precipitaram frente ao soro imune.

Os últimos 60 espécimes negativos nos testes convencionais de diagnóstico de varíola (agar-gel e ovo embrionado), também foram negativos em gel-eletroforese.

A simplicidade de execução, a possibilidade de serem testados 28 amostras numa só lâmina, aliadas às qualidades de sensibilidade, especificidade e rapidez, recomendam a utilização do teste de gel-eletroforese aqui descrito, na rotina do trabalho dos laboratórios de diagnóstico de varíola, após sua adequação a esse propósito.

Reagentes :

**Vírus** — passagens em MCA, diluições de 1:2 até 1:1024.

**Diluente** — tampão McIlvaine 0,004M, pH 7, 2, também utilizado rotineiramente no preparo dos espécimes recebidos para diagnóstico.

**Soro precipitante** — coelho/vaccínia preparado nesse laboratório e obtido do CDC para referência (Mat. e Mét.).

**Soro de controle** — soro de coelhos normais.

## SUMMARY

### Gel-electrophoresis in the smallpox diagnosis

The test of gel-electrophoresis applied to the Pox virus group showed to be at least thirth times (30X) more sensitive than agar-gel test on the described conditions (Table I).

Twelve specimens, which were positives for Smallpox in the conventional tests of egg inoculation and agar-gel difusion test, have been screened in their original dilutions frozen for more than 1 year and six of them were still detectable by gel-eletrophoresis, while by agar-gel test any of them was positive (Table II).

Thirty three Smallpox isolates have been tested with material from first egg inoculation (chorioallantoic membranes) which have been stored in glycerin 50%, at  $-15^{\circ}\text{C}$ . Fifteen of them were still positive by gel-electrophoresis and only 3 by agar-gel (Table II).

The last 60 specimens received for diagnosis from Smallpox Erradication Campaign (CEV), were negatives by both tests. The gel-electrophoresis, did not show false-positives on described conditions.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas (TC 10.709).

Os autores agradecem aos laboratorista Ismael da Rocha Lopes e José Farias, por suas excelentes assistências técnicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — BOLETIM DA CAMPANHA DE ERRADICAÇÃO DA VARÍOLA, 1971, tomo 5, n.º 30.
- 2 — DUMBELL, K. R. & NIZAMUDDIN, MD., 1959, An agar-gel precipitation test for the laboratory diagnosis of smallpox, *Lancet*, 1 (7079): 916-917.
- 3 — GOCKE, D. J. & OWE C., 1970. Rapid detection of Australia antigen by counterimmuno-electrophoresis, *J. Immunol.*, 104 (4): 1031-1032.
- 4 — PESENDORFER, F., KRASSNITZKY, O. & WEWALKA, F., 1971. Immu-noelektrophoretischer Nachweis von "Hepatitis-Associated-Antigen" (Au/SH antigen), *Klin. Wochenschs.*, 48 (1): 58-59.
- 5 — PRINCE, A. M. & BURKE, K., 1969, Serum hepatitis antigen (SH): rapid detection by high voltage immuno-electroosmophoresis, *Science*, 169 (3945): 593-595.
- 6 — SCHATZMAYR, H. G. & MESQUITA, J. A., 1970. Examen de especimenes para el diagnostico de la viruela en un laboratorio del Brasil, *Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 69 (6): 500-504.
- 7 — WALLIS, C. & MELNICK, J. L., 1971. Enhanced detection of Australia antigen in serum hepatitis patients by Discontinuous Counter-Immuno-electrophoresis, *Applied Microbiology*, 2 (5): 867-869.
- 8 — WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1969. Guide to the laboratory diagnosis of smallpox for smallpox eradication programs.