

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE VARIÓLA:

II. Resultados do segundo ano de atividades, de maio de 1969 a maio de 1970 *

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

Os autores relatam os resultados obtidos no diagnóstico laboratorial de varíola, durante o segundo ano de funcionamento de uma unidade montada no Instituto Presidente Castello Branco, da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro.

O exame de 105 espécimens de crostas e de 76 de líquido vesicular/pustular, forneceu 39 e 34 amostras de vírus da varíola, respectivamente (Tabela 1).

A demora em chegar ao laboratório influencia significativamente a taxa de isolamento de vírus (Tabela 2).

Foi encontrada estreita relação entre os diagnósticos clínico e laboratorial (Tabela 3), quando possível compará-los.

A inoculação em ovos embrionados após 1 a 2 horas do abaixamento da membrana cório-alantóica, foi considerada como adequada às condições em que são realizados os exames. O laboratório continua a receber regularmente mais espécimens para diagnóstico.

INTRODUÇÃO

A continuidade das atividades da Campanha de Erradicação da Varíola no Brasil reflete-se na melhoria dos serviços de notificação de casos suspeitos e estudos epidemiológicos, aumentando a importância do laboratório de diagnóstico.

O presente trabalho relata os resultados obtidos durante o segundo ano de atividades, no laboratório montado no Instituto Presidente Castello Branco, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, no exame de 181 espécimens coletados em diferentes partes do Brasil, através da Campanha de Erradicação da Varíola e Serviços Regionais de Saúde Pública.

No laboratório já foram examinados 271 espécimens, dos quais os primeiros 90 resultados foram alvo de publicação anterior (5).

MATERIAL E MÉTODOS

1) De 181 pacientes, foram examinados 165 espécimens de crostas e 76 de líquido vesicular/pustular.

Essencialmente foram usados os métodos de trabalho preconizados pela Organização Mundial de Saúde e os já descritos (3, 5) com duas alterações aqui apresentadas.

a) Tampão Mc Ilvaine 0,004M pH7,2 com antibióticos, em substituição a salina PBS na suspensão dos espécimens (2).

* Trabalho do Laboratório de Vírus Vesiculares e Exantemáticos, Instituto Presidente Castello Branco, da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Caixa Postal 16, ZC-24, GB.

** Professor-Titular, responsável pelos Laboratórios de Vírus.

*** Professor-Assistente, Laboratório de Vírus Vesiculares e Exantemáticos.

Recebido para publicação em 25.8.70.

b) As membranas cório-alantóicas (MCA) inoculadas, depois de examinadas foram trituradas em homegeneizador elétrico Omni-mixer, sem adição de diluente, para estocar as amostras de vírus isoladas. Essas suspensões, clarificadas por centrifugação, foram usadas como antígeno em teste de confirmação de diagnóstico através precipitação em agar-gel, ou para eventuais reinoculações em ovos embrionados quando havia dúvidas no diagnóstico.

2) Tempo de abaixamento da MCA e sensibilidade ao vírus da variola.

Logo após o abaixamento das membranas cório-alantóicas e também 1, 2, 3 e 4 horas após, foi inoculada em ovos embrionados, uma mesma diluição do vírus da variola. Para melhor conservação do título da suspensão durante as cinco horas necessárias ao experimento, foi usado tampão Mc Ilvaine com leite desnatado a 20% (1). As membranas foram coletadas, examinadas e contadas as lesões produzidas pelos vírus (pocks), como anteriormente descrito (5).

RESULTADOS

1) Isolamento de amostras de variola.

De 181 espécimens examinados neste período, 73 amostras de vírus da variola foram isoladas em MCA e identificadas sorologicamente através testes de precipitação em agar-gel. As taxas de isolamento alcançaram 37% e 43%, respectivamente para

espécimens de crostas e líquido vesicular/pustular (Tabela 1).

A Tabela 2 apresenta os resultados de isolamento em relação à demora do espécimen em chegar ao laboratório e ser examinado.

A Tabela 3 apresenta a relação entre o resultado do exame laboratorial e o diagnóstico clínico, quando este último estava indicado nas fichas de informação que acompanham os espécimens. Não nos foi possível isolar vírus de 15 casos com diagnóstico clínico "variola" e por outro lado, conseguimos isolar vírus da variola de dois casos com diagnóstico clínico "não é variola".

Os casos em que o diagnóstico laboratorial confirmou o diagnóstico clínico, incluem o de uma gestante e seu filho, o qual veio a nascer com variola clínica em fase de vesículas, enquanto a mãe apresentava-se já em fase de crostas.

2) Testes de precipitação em agar-gel.

Os testes de precipitação em agar-gel, os quais resultaram positivos em apenas 23% dos casos anteriormente descritos (5) usando diretamente como antígeno o espécimen recebido do paciente, foram positivos em todos os casos em que se usou triturados de MCA com abundantes lesões típicas de variola.

3) Sensibilidade da MCA ao vírus da variola.

Os resultados de três experimentos, propostos como descrito em "Material e Mé-

Tabela 1

RESULTADOS DO EXAME DE ESPÉCIMES RECEBIDOS DE MAIO DE 1969 A MAIO DE 1970

Espécimens	Variola	Negativo	Total
Crostas	39 (37%)	66	105
Líquido Vesicular/Pustular	34 (43%)	42	76
Total	73	108	181

Tabela 2

TAXA DE ISOLAMENTO DE VÍRUS DA VARIOLA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE DIAS ENTRE A COLETA E O EXAME DOS ESPÉCIMENS

Dias	Espécimens*	Amostras de Vírus Isoladas
0 a 5	41	30 (73%)
6 a 8	22	9 (41%)
9 a 11	9	4 (44%)
12 a 14	4	1 (25%)
15 ou mais	60	25 (41%)
S/data coleta	5	4
Total	141	73

* Não inclui 40 espécimens com diagnóstico clínico "Não é variola".

todos", foram analisados estatisticamente. Os resultados dessa análise foram comparados com trabalhos já descritos (4) em que a contagem de pocks resultou em distribuição normal. A análise de variância, com o nível de significância de 5%, demonstrou serem nossos resultados consistentes com os daqueles autores.

DISCUSSÃO

A taxa de isolamento de vírus a partir de espécimens de líquido vesicular/pustular, maior que a partir de crostas (Tabela 1), deve ser interpretada tendo em vista que a maioria dos espécimens de líquido vesicular/pustular foi oriunda de áreas

Tabela 3

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL EM RELAÇÃO AO DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Diagnóstico Clínico	Diagnóstico Laboratorial		Total
	Variola	Negativo	
Varíola	31	15	46
Duvidoso	5	23	28
Não é variola	2	40	42
Não indicado	35	30	65
Total	73	108	181

próximas ao laboratório, demorando menor tempo entre a coleta e o exame.

A Tabela 2 mostra a influência do tempo que os espécimens demoraram para chegar ao laboratório, desde que não são transportados sob refrigeração. É importante notar que dos 141 espécimens considerados, somente 41 foram examinados com menos de 6 dias da coleta, e a influência deste fato na taxa de isolamento de vírus. Foram excluídos 40 casos com diagnóstico clínico "não é variola", pois alterariam a observação já registrada em descrição anterior (5) e que é confirmada presentemente com maior número de casos.

A Tabela 3 é por si mesma resultado de melhoria das condições de coleta e envio de espécimens para exame, inclusive com a inclusão da ficha epidemiológica correspondente. A indicação do diagnóstico clínico, por parte do médico epidemiologista que examina o paciente e remete os espécimens para exame de laboratório, nos permitiu testar a eficiência dos méto-

dos. De 31 casos com diagnóstico clínico "variola", não nos foi possível isolar vírus de 15; deve ser notado que todos esses 15 espécimens chegaram ao laboratório com mais de 16 dias após a coleta. Em dois casos com diagnóstico clínico "não é variola", foi isolado vírus dos espécimens; nas fichas de pedido de exame havia indicação de contato do paciente com pessoas doentes cujo diagnóstico era duvidoso.

A Tabela 4 tem a intenção de mostrar as dificuldades de transporte que devem ser vencidas para que os espécimens cheguem ao laboratório em tempo viável ao isolamento de vírus, sendo muitos originários de áreas remotas dos respectivos Estados.

Os resultados dos três experimentos propostos para estudar a sensibilidade dos ovos usados na nossa rotina de trabalho, não revelaram diferenças significativas entre o número de pocks. Os dados conseguidos mostram que a nossa rotina usando ovos entre 1 e 2 horas após o abaixamento da membrana cório-alantóica é adequada.

A substituição de salina PBS por tampão Mc Ilvaine para a suspensão dos espécimens a examinar, foi adotada neste segundo ano, devido a variações de títulos observados em suspensões de vírus vaccínico mantidas no laboratório para provas de soroneutralização. Em revisão bibliográfica foi encontrado um trabalho (2) o qual descreve fenômenos de agregação de partículas dos vírus do grupo Pox, em função da concentração de fosfatos no meio.

Neste segundo ano, só consideramos com diagnóstico de variola, os casos em que isolamos vírus em ovos embrionados (lesões características na membrana cório-alantóica) e que foram confirmados sorologicamente por testes de precipitação em agar.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Praticante de Laboratório Ismael da Rocha Lopes pela excelente assistência técnica prestada durante os trabalhos aqui descritos.

Tabela 4

ORIGEM DOS ESPECIMENS EXAMINADOS

Ceará	10
Pernambuco	9
Sergipe	10
Alagoas	5
Goiás	7
Distrito Federal	1
Bahia	70
Paraná	1
Espírito Santo	18
Rio de Janeiro	15
Guanabara	32
Não anotado	3
Total	181

SUMMARY

The authors relate the results which have been obtained during the second year of work in a unit set up to support the National Smallpox Eradication Campaign in Brazil.

The examination of 105 crusts and 76 vesicular/pustular fluid specimens results in the isolation of 39 and 34 smallpox strains, respectively (Table 1).

The time of arrival to the laboratory, influenced the virus isolation rate (Table 2).

Close relationship was reached between clinical diagnosis and virus isolation rate (Table 3) when both data were available for comparison.

The inoculation of eggs between 1 to 2 hours after chorio-allantoic membrane dropping was shown as adequate in conditions under which tests were carried-out.

The laboratory is getting regularly more specimens for diagnosis.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BOUTLER, E.A. — The titration of vaccinal neutralizing antibody on chorio-allantoic membranes, *J. Hyg., Camb.*, 55:502-512, 1957.
- 2 — GALASSO, G.J. & SHARP, D.G. — Virus particle aggregation and plaque forming unit, *J. Immunol.*, 88:339-347, 1962.
- 3 — Guide to the Laboratory Diagnosis of Smallpox World Health Organization, Geneva, 1969.
- 4 — Mc CARTY, K., DOWNIE, A.W. & ARMITAGE, P. — The Antibody response in man following infection with viruses of the pox group, *J. Hyg., Camb.*, 56:84-100, 1958.
- 5 — SCHATZMAYR, H. G. & MESQUITA, J. A. — Diagnóstico laboratorial de variola. I. Resultados do primeiro ano de atividades. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 5: 355-359, 1970.