

ESTUDOS LABORATORIAIS DE INFECCÕES HUMANAS E DE BOVINOS COM VÍRUS DO GRUPO POX *

J. A. Mesquita ** H. Schatzmayr ***

Os autores descrevem estudos laboratoriais de infecções bovinas e humanas após vacinação anti-variólica em comunidade rural, tendo sido isolada uma amostra de vírus vaccínico de um dos animais infectados. Essa amostra foi reisolada de material original mantido a -20°C e identificada pelas lesões de membranas cório-alantóicas, provas de precipitação em agar-gel e reações sorológicas, nas quais a amostra isolada serviu de antígeno.

Estudos sorológicos comparados com sôros padrões imunes, mostraram a presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação e fixadores de complemento, usando-se antígenos padronizados de vírus vaccínico, evidenciando-se assim uma infecção recente por vírus do grupo Pox.

Os dois casos humanos, verificados em indivíduos não vacinados originaram-se muito provavelmente dos animais, pela análise dos dados disponíveis e pela localização das lesões observadas.

Os autores discutem ainda a possível ação dos contaminantes presentes nos materiais sobre os vírus do grupo Pox.

Infeções com vírus do chamado grupo Pox, atingindo seres humanos e bovinos, constituem a própria base do desenvolvimento das vacinas antivariólicas e são exemplo para o estudo das cadeias epidemiológicas na natureza. Com a intensificação das campanhas de vacinação anti-variólica porém, tem sido verificada ocasionalmente, a infecção de bovinos por intermédio de indivíduos vacinados contra a variola (5, 6, 8). Neste trabalho relatamos os resultados obtidos no estudo laboratorial de uma epizootia bovina, com infecções humanas desenvolvidas provavelmente a partir dos animais.

Os estudos aqui apresentados foram

realizados no Laboratório de Vírus Vesiculares da FENSP, o qual recebe material, para diagnóstico de casos suspeitos de variola, de várias partes do Brasil, através da Campanha de Erradicação da Variola.

MATERIAL E MÉTODOS

a) *Origem dos casos estudados:* Os animais infectados pertenciam à uma fazenda situada no Município de Barra do Pirai, Estado do Rio de Janeiro. Quando de nossa visita à referida fazenda, encontramos grande número de vacas em lactação, com lesões restritas ao úbere, já em fase de cicatrização final. As crostas eram de ta-

* — Trabalho do Departamento de Ciências Biológicas da Fundação Ensino Especializado de Saúde Pública (FENSP) apresentado em resumo no XII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, em Dezembro de 1968.

** — Virologista, Laboratório de Vírus Vesiculares, FENSP, Caixa Postal 16, ZC-24, Rio de Janeiro — Guanabara.

*** — Professor-adjunto, responsável pelos Laboratórios de Vírus da FENSP.

manhos irregulares, notando-se a confluência de várias lesões. (Fig. 1). Os dois casos humanos observados correspondiam a dois ordenhadores, os quais desenvolveram lesões na palma das mãos e entre os dedos, sob a forma de vesículas em pequeno número, dolorosas, e que evoluíram sem maior gravidade. Não foram observados sintomas gerais importantes nos casos humanos nem nos animais.

b) *Coleta de material*: A coleta de material dos animais foi realizada com pinças e frascos esterilizados, de 10 animais escolhidos ao acaso, dentre aqueles que apresentavam crostas removíveis com relativa facilidade. Não foi colhido material das lesões dos casos humanos, porque as vesículas já haviam sido drenadas e tratadas com antissépticos locais. Foi coletado sangue por punção venosa, dos mesmos dez animais e dos dois ordenhadores, separando-se posteriormente o soro, o qual foi congelado a -20°C .

c) *Isolamento de vírus*: O material coletado foi trabalhado por técnicas de rotina no nosso Laboratório. As crostas, trituradas em solução salina tamponada e com antibióticos; as suspensões assim obtidas, inoculadas em membranas corioalantóicas (MCA) de ovos embrionados de 11 dias, 0,1 ml por ovo e após 48-60 horas de incubação a 36°C , os ovos foram abertos e as membranas examinadas.

A forte contaminação bacteriana, presente no material de crostas, provocou a morte dos embriões, nos primeiros cinco espécimes examinados, obrigando a tratamentos mais prolongados com antibióticos (24 horas a 4°C) e o uso de Freon 113 (4), na proporção de 1 parte deste para 10 partes da suspensão de crostas.

d) *Reação de precipitação em ágar*: Foram usadas, essencialmente, técnicas já descritas, utilizando-se Special Agar-Noble (Difco) a 1% em água destilada, sobre lâmina. Antígenos positivos (suspensão de MCA ricamente infectadas com vírus vaccínico) e soro antivaccínico padrão (origem: NCDC, Atlanta, Georgia, USA), foram usados nos controles juntamente com o soro normal de coelho (3).

e) *Reação sorológicas*: As provas de fixação de complemento e de inibição da hemaglutinação foram realizadas usando-se 2 e 4 unidades, respectivamente, de antígeno preparado a partir de MCA infectadas, segundo técnicas padronizadas.

RESULTADOS

1) *Isolamento e identificação do vírus*: Do material de um dos animais, foi isolada uma amostra de vírus, produzindo típicas lesões de vírus vaccínico (fig. 2) nas membranas corioalantóicas (amostra n.º 1026).



Figura 1: Lesões confluentes, em fase de crostas, na ocasião da coleta de material dos animais.

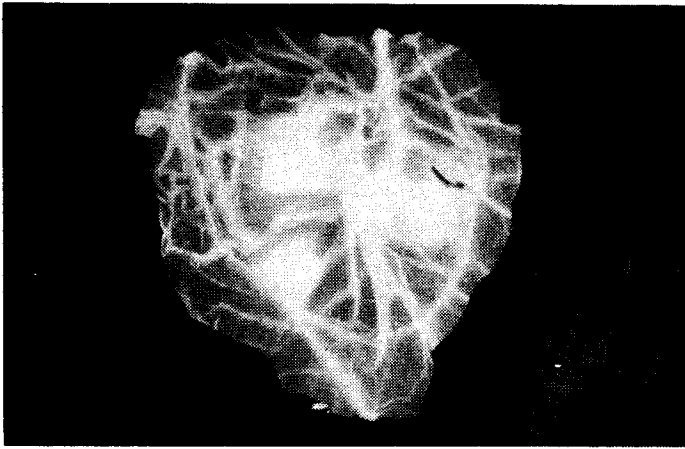


Figura 2: Lesões na membrana corio-alantóica. Embrões inoculados com 11 dias de idade e coletados após 60 horas.

A amostra pôde ser reisolada de material original mantido a-20°. Esse material, reinoculado em ovos embrionados, deu igualmente origem a lesões típicas de vírus vaccínico em MCA. Essa amostra foi ainda identificada como do grupo Pox, por provas de precipitação em agar-gel, fixação de complemento e inibição da hemaglutinação. Foram feitas passagens em ovos embrionados, e na 3ª passagem a amostra isolada alcançou o título de 17×10^8 lesões/ml em MCA.

A possibilidade de tratar-se de uma infecção pelo chamado vírus do "cow-pcx", o qual por coincidência tivesse surgido na região logo após a vacinação anti-variolica realizada algumas semanas antes, foi descartada pelos resultados laboratoriais, aqui descritos, além dos dados epidemiológicos disponíveis. Medidas profiláticas já haviam circunscrito a doença apenas aos currais onde ela se manifestou apesar de, em sua evolução rápida, ter atin-

gido grande número de animais em curto prazo.

2) *Provas sorológicas*: Os sôros animais e humanos foram incluídos em provas de fixação do complemento e inibição da hemaglutinação (Tabela anexa).

Podemos verificar a presença de anticorpos nos sôros examinados, indicando uma infecção por um vírus do grupo Pox, embora, como é conhecido, essas provas não possuam caráter de especificidade, que permita identificar os membros desse grupo de vírus, entre si.

DISCUSSÃO

O nosso país constituiu, infelizmente, ainda, o grande foco endêmico de varíola na América do Sul, com 3 109 casos notificados neste ano até 7 de dezembro de 1968 (1).

O notável incremento das vacinações humanas propiciou o aprimoramento de

PROVAS SOROLÓGICAS §

INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO E FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO

SÔRO Nº PROVA	Sôros bcvinos										S. humanos	
	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1032	1033
	§§											
In. Hem.	40	160	160	20	160	320	20	320	80	320	160	160
F. C.	40	40	20	AC	AC	40	80	20	40	40	320	320

§ — Antígenos preparados à partir de MCA infectados com vírus vaccínico.

§§ — Recíproca da diluição do sôro.

AC — Sôros anticomplementares.

técnicas, dispondo-se atualmente de vacinas de alto título e de métodos de vacinação em massa, com pistolas injetoras. Com isto, temos hoje a disseminação em curto prazo, de grandes quantidades de vírus vaccínico, com possibilidade de atingir bovinos quando do processo de ordenha, como é mostrado neste trabalho, e ainda a contaminação reversa, com casos humanos a partir dos animais.

A grande dificuldade de isolamento de vírus a partir das crostas de bovino pela presença de contaminantes foi superada pelo uso de Freon 113 com técnicas semelhantes às usadas para a purificação de vacinas antivariolicas. Tal procedimento apresentou excelentes resultados em nossas mãos.

Segundo Mayr (7), os anticorpos fixadores do complemento para o vírus vaccínico em bovinos, aparecem em baixo título ou mesmo não são detectáveis. Foi possível confirmar essa observação, nos séros bovinos estudados, enquanto que os séros humanos apresentaram títulos elevados (Tabela anexa).

Os anticorpos anti-hemaglutinantes desenvolveram-se em baixo título, em dois animais, por razões não definidas. Sabemos que, em alguns indivíduos já vacinados, tendo pois desenvolvido uma infecção pelo vírus vaccínico, uma segunda vacinação promove resposta deficiente de anticorpos inibidores da hemaglutinação. Sobre a presença de infecção anterior com vírus do grupo Pcx, nos animais estudados, não há dados disponíveis, embora a hipótese não possa ser afastada.

Devemos assinalar que as epizootias pelo vírus vaccínico, assumem via de regra, um caráter de disseminação rápida entre os animais, ao contrário das infecções pelo vírus do chamado "cow-pox" que evoluem mais lentamente e, via de regra, se disseminam em menor velocidade. Constituem,

porém, as provas laboratoriais de isolamento e identificação de vírus, um dado fundamental e indispensável no esclarecimento de epizootias do tipo aqui estudado. Os dados epidemiológicos e clínicos são, dentro do grupo Pox, especialmente em relação aos vírus da vaccínia e do chamado "cow-pox", próximos e mesmo coincidentes, não permitindo diagnóstico diferencial seguro.

A presença de contaminantes, que é a regra em todo material enviado ao laboratório para diagnóstico de infecções pelo grupo Pox, tem segundo Dostal et col. (2) um papel importante, através de suas enzimas proteolíticas e lipolíticas. Estes autores mostraram que enzimas bacterianas têm uma ação sobre o envoltório dos vírus Pox, especialmente vaccínia. Acreditamos perfeitamente possível que o isolamento de apenas uma amostra de vírus a partir de material de 10 animais, todos na mesma fase de evolução tenha sido influenciado pelos contaminantes presentes; devemos acrescentar que, nos materiais de origem humana por nós recebidos para diagnóstico, raramente observamos mortes de embriões por contaminação, mesmo após tratamento simplesmente com penicilina e estreptomycin. Estes fatos talvez devam ser considerados quando tivermos resultados negativos nas tentativas de isolamento de vírus a partir de material fortemente contaminado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à direção da Campanha de Erradicação da Variola que nos proporcionou facilidades para a realização do trabalho bem como ao veterinário Dr. Camillo F. C. Canella que colaborou nas coletas de material e obtenção de dados disponíveis sobre os animais.

SUMMARY

The authors describe the isolation and identification of vaccinia virus from a cow in farm where human vaccination had been carried out some weeks before. Many of the vaccinated people had developed typical vaccine reaction and had been in close contact with the animals. Two human cases with lesions on hands, have been observed in not vaccinated farm employees; unfortunately the lesions from these human cases were already open and washed with local antiseptics and no attempt to isolate virus could be done.

The infection disseminates very rapidly among the animals but no severe symptoms have been observed neither in the animals, nor in the two human cases.

The isolated strain has been identified by serological tests (complement fixation and HI tests) and lesions on the corio-alantoic (fig. 2) of embryonated eggs; the strain could be reisolated from original material kept at minus 20°C.

The material collected from the animals was heavily contaminated and it was necessary to use Freon 113 (1 part to 10 of the material suspension) in order to control these contaminants.

The possible action of bacterial enzymes against Pox virus in heavily contaminated materials, is discussed in relation to a recent reference in the literature.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — Boletim Semanal da Campanha de Erradicação da Variola, Tomo 2: (42), pág. 4, Semanas n.º 48 e 49, 1968.
- 2 — DOSTAL, V. & BRANTNER, H. — The influence of bacterial enzymes on the stability on vaccinia virus, Ztschr. Immunforsch., 134: 493-504, 1968.
- 3 — DUMBELL, K. R. & NIZAMUDDIN, M. — An agar-gel precipitation test for the laboratory diagnosis of Smallpox, Lancet, 1: 916-917, 1959.
- 4 — EPSTEIN, M. A. — An investigation into the purifying effect of fluorocarbon on vaccinia virus, Brit. J. Exp. Med., 39: 436-446, 1958.
- 5 — HAEDO, A. F. — Epizootia de cow-pox en el ganado lechero producido por la inoculación accidental de un hombre recientemente sometido a la vacunación antivariólica, Arch. Urug. Med., 34 : 252-259, 1949.
- 6 — LUN, G. S., SORIANO, F., TREJOS A. & LLERENA, J., — Vaccinia epidemic and epizootic in El Salvador, Am. J. Trop. Med., 16: (3), 332-338, 1967.
- 7 — MAYR, A. Mikrobiologie, — (Editores: Rolle, M. & Mayr, A.). Editora Ferdinand Enke, Stuttgart, 1966, págs. 638-639.
- 8 — PANDO, U. G., LOPEZ, J. H. T., RESTREPO, A. R. & FORERO P. C., — Estudio de un brote de vaccinia en ganado lechero y sus ordeñadores. Bol. Of San. Panam., LXIII : (2), 111-121, 1967.