

VARIOLA. DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE 1967 A 1970,  
NO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

SMALLPOX. ETIOLOGICAL DIAGNOSIS 1967-1970 AT INSTITUTO ADOLFO  
LUTZ, SÃO PAULO, BRAZIL

LUÍS FLORÊNCIO DE SALLES-GOMES (1)  
BEATRIZ CARDOSO CONCEIÇÃO (2)  
YARA DUARTE GALLUZI (2)  
YVETTE MONTEFORTE DA FONSECA (2)  
DALTON RAMALHO WEIGL (2)  
MARIA ELISA FERNANDES DE FIGUEIREDO (2)

SUMMARY

In 332 specimens of materials from suspected smallpox cases collected by the Smallpox Eradication Campaign between June 1967 and August 1970, virus cultures, electron microscopy, detection of viral antigen and serologic tests were done for etiological diagnoses purposes.

One hundred and seventy seven samples or 53.6% were positive for smallpox in chorioallantoic membrane and/or tissue cultures methods.

Ten smallpox strains were identified as variola minor or alastrim.

One hundred and ninety two samples were studied simultaneously by virus culture methods and electron microscopy with 89% of identical results.

Three hundred and seven samples inoculated in the chorioallantoic membrane of hen egg's and human kidney tissue cultures line showed 92% identical results.

The statistical analysis showed no significant difference between the two methods of virus culture and also between these two methods and electron microscopy.

Only 4 out of 56 samples of blood showed titres suggesting recent poxvirus infection through hemagglutination inhibition and complement fixation tests.

The clinical and epidemiological diagnoses of smallpox was correlated with etiological laboratory results.

INTRODUÇÃO

A varíola, infecção conhecida há séculos, ainda hoje apresenta, em cerca de 10-20% dos casos, dificuldades de diagnóstico clínico-epidemiológico. Nos países onde a varíola raramente ocorre, é óbvio que a grande maioria dos clínicos e epidemiologistas não está atenta para o diagnóstico desta infecção; por outro lado, nos lugares em que ela é endêmica não é raro ocorrerem surtos paralelos de varicela, confundindo o quadro clínico-epidemiológico. É simples fazer o diagnóstico da varíola quando o quadro clínico se apresenta igual ou semelhante àquele que se convencionou classificar como "clássico" ou típico da varíola; entretanto, existe difi-

culdade de diagnóstico quando nos defrontamos com casos não usuais ou ainda modificados principalmente pela vacinação anti-variolica prévia com pega. Segundo Dixon, a varíola, seja ela *major* ou *minor*, pode apresentar uma série de nove quadros clínicos diferentes, variando desde a varíola purpúrica, até a "sine eruptione", sem que, entretanto, a maioria dos tipos se afaste daquele que se convencionou classificar como clássico. Em nosso país é comum observar, durante um surto epidêmico, vários tipos clínicos da varíola com predominância do tipo VI de DIXON<sup>15</sup>. É óbvio que, seja qual for o tipo clínico que se manifeste, o isolamento e as medidas epidemiológicas devem ser impostas.

(1) Diretor do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

Nos países onde a varíola não é endêmica, e naqueles em que se propõe sua erradicação, como é o nosso caso, a confirmação etiológica através dos exames virológicos especializados é de suma importância sob os mais variados aspectos da saúde pública. Neste particular, nosso laboratório vem há alguns anos colaborando com a Organização Pan-Americana de Saúde e o Governo Federal, realizando diagnósticos etiológicos das infecções por vírus que causam exantemas.

Apresentamos neste trabalho os dados obtidos com os exames dos materiais procedentes de várias regiões do país, através da Campanha de Erradicação da Varíola, e evidências laboratoriais do tipo de vírus da Varíola que grassou em nosso meio, bem como comentários de interesse sobre o trabalho desenvolvido.

#### MATERIAL E METODOS

O material que chega regularmente ao Serviço de Virologia é constituído, na maioria das vezes, por 2 a 4 lâminas bacteriológicas com esfregaço de vésico-pústulas e por crostas de lesões em latas de metal tipo "vaselina" ou em tubos de vidro fechados com rolhas de cortiça. Raramente recebemos capilares ou vidros tipo "penicilina" com conteúdo de vésico-pústulas. Todos os materiais sem exceção chegaram através do correio aéreo ou não, sem qualquer refrigeração, acondicionados em invólucros apropriados cedidos pela Campanha de Erradicação da Varíola, ou ainda em caixas improvisadas de madeira ou de papelão. Geralmente o material vem acompanhado de ficha com dados clínico-epidemiológicos, pessoais, do local de origem e suspeita diagnóstica.

Imediatamente após sua chegada ao laboratório, abertos os invólucros e verificadas suas condições, os materiais eram registrados em série numérica e de acordo com a quantidade de material recebido de cada caso, separava-se parte destinada ao laboratório de microscopia eletrônica e o restante, de acordo com sua natureza, era suspenso e/ou macerado em 0,5-1,0 ml de solução fisiológica tamponada (PBS, pH = 7,2) acrescido de antibióticos (2.000 U Pen. + 350  $\gamma$  de Estreptomicina), controlados em meios bacteriológicos e conservados em temperatura de -27°C até o momento da feitura dos exames.

#### *Técnicas Viroológicas: Cultivo e Identificação*

As inoculações para a tentativa do isolamento do vírus foram feitas em membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha de 11-12 dias de incubação e/ou em cultura celular contínua de rim humano (RH), original de Ness Ziona, Israel, de acordo com a disponibilidade dos meios de cultivo. A técnica de inoculação em ovos embrionados foi a usual (WHO), e a quantidade inoculada nos meios foi sempre de 0,1 ml. O número de ovos inoculados foi de 4-6, e de 3-4 o de tubos de culturas celulares, para cada material. Os meios inoculados foram incubados a 36°C; os ovos foram abertos após 72 horas de incubação, a membrana corioalantóide excisada e colocada em placa de Petri contendo solução fisiológica tamponada e examinada com luz incidente contra fundo escuro. Observaram-se as culturas celulares diariamente para a verificação ou não da presença do efeito citopático até 7-8 dias após a inoculação.

A identificação do vírus em membrana corioalantóide foi feita pelo aspecto macroscópico e características morfológicas das lesões<sup>6</sup> verificando-se crescimento confluyente, realizávamos passagens seriadas com diluições do vírus até obtermos lesões isoladas de aspecto típico. Se os caracteres morfológicos não exibissem tipicidade, procedíamos à identificação de grupo através da reação de hemaglutinação com hemácias de galinha previamente selecionadas. A identificação do vírus nos sistemas celulares também foi feita pelo caráter de efeito citopático quando as lesões ou focos eram isolados; porém, quando o crescimento era total, procedíamos às passagens seriadas com diluições de vírus isolado. Se ainda persistisse qualquer dúvida com relação ao agente isolado, realizávamos a reação de hemadsorção com hemácias de galinha também previamente selecionadas, para identificá-lo (grupo).

#### *Microscopia Eletrônica*

Os exames feitos pela microscopia eletrônica consistiram em colorações do material pelo método do contraste negativo pelo ácido fosfotúngstico (PTA) e pesquisa microscópica exaustiva para visualização do corpúsculo elementar do vírus<sup>4</sup>. No mínimo 2-3 grades de cada material eram examinadas.

### Difusão em Agar

Na dependência da quantidade de material da amostra recebida, realizávamos também a prova da dupla difusão em ágar para demonstrar o antígeno viral<sup>10</sup>. A leitura final da reação foi feita em 18-24 horas e o sôro hiperimune antivacínico foi por nós preparado segundo a técnica usual. Foram sempre incluídos no teste contrôles positivos já conhecidos e sôro de coelho normal. O resultado só era considerado positivo de grupo quando uma linha de precipitação do desconhecido unia-se ou fundia-se com uma linha do controle positivo e os contrôles negativos não exibiam qualquer linha de precipitação.

Em certo número de soros recebidos em condições de serem manipulados, realizaram-se reações de fixação de complemento e inibição da hemaglutinação para dosagens de anticorpos específicos de grupo pela micro-técnica de rotina usada em nosso laboratório<sup>12</sup>.

### Identificação do Tipo de Vírus

Todos os vírus isolados foram sistematicamente guardados em refrigerador a -70°C algumas amostras foram selecionadas para a prova de identificação do tipo de vírus da varíola; a técnica usada foi a descrita por NIZAMUDIN & DUMBELL<sup>13</sup>, que consiste em comparar o crescimento ou a inibição do vírus à temperatura de 35°C e 38,5°C.

### RESULTADOS

No período de Junho de 1967 a Agosto de 1970 recebemos amostras de materiais suspeitos de varíola que puderam ser examinados por alguns métodos laboratoriais para a confirmação etiológica do diagnóstico clínico-epidemiológico da varíola. Do total de 332 materiais provenientes de várias Unidades da Federação, 177 resultaram positivas para varíola, correspondendo a 53,6% de positividade no material estudado (Quadro I).

Das cinco Unidades da Federação tivemos materiais representativos de quatro, nas quais despistamos casos positivos de varíola com comprovação etiológica no laboratório. Com base nestes resultados podemos afirmar que

*Materiais que puderam ser trabalhados e diagnosticados por meio de isolamento e identificação do vírus, recebidos através da Campanha da Erradicação da Variola, de junho de 1967 até agosto de 1970*

Unidades da Federação	Estados	Nº de amostras	Positivos para varíola
Nordeste	Maranhão	1	0
	Ceará	5	4
	Rio Grande do Norte	2	0
	Paraíba	4	3
	Pernambuco	4	0
Sudeste	Alagoas	3	2
	Minas Gerais	50	31
	Rio de Janeiro	3	0
Sul	São Paulo	98	43
	Paraná	17	13
Centro-Oeste	Rio Grande do Sul	70	42
	Distrito Federal	29	11
Sem procedência	Goiás	29	20
		17	8
		332	177 53,6%

a infecção variólica grassou durante o período acima citado, praticamente em todo o país.

Foram realizadas em dez cepas de vírus isolados de diferentes regiões do Brasil as provas do crescimento ou inibição do crescimento do vírus da varíola em temperaturas de 35°C e 38,5°C. Dos resultados do quadro II, verificamos que houve nítida inibição do crescimento dos vírus usados no experimento, na realidade 100% de inibição, quando foram incubados a temperatura de 38,5°C. A cepa padrão do vírus da varíola maior, cepa Harvey, demonstrou, a 38,5°C, relativa inibição do crescimento evidenciada pela diminuição do número de lesões e ainda apresentou discreta diferença morfológica em relação ao seu crescimento típico à temperatura de 35°C. Todos os vírus autóctones usados neste experimento tiveram comportamento segundo o teste da temperatura como cepas de varíola minor ou alastrim. Comportamento semelhante aos vírus usados foi também verificado com a cepa Butler, padrão representativo da varíola minor. Obviamente, de acordo com os resultados, podemos afirmar, generalizando, que durante o período estudado os casos clínicos de varíola corresponderam etiológicamente aos de varíola minor ou alastrim.

QUADRO II

Resultados de 10 cepas submetidas a prova de temperatura para distinção entre varíola major e minor.

Amostra N.º	Procedência	N.º de lesões na MCA' após 72 horas		
		35°C	a 38,5°C	
1561	Paraíba	137 - 105		0 - 0
		> 200 > 200		0 - 0
1571	Alagoas	> 200 > 200		0 - 0
		185 > 200		0 - M
1600	Ceará	> 200 > 200		0 - 0
		150 180		0 - M
1627	Goiás	> 200 > 200		0 - 0
		200 M		0 - M
1642	Distrito Federal	80 - 68		0 - 0
		> 200 - 25sc		0 - 0
1725	Brasília	100 - 75		0 - 0
		85 - 200		0 - M
Harvey	Inglaterra	150 > 200		42 - 57
		> 200 170		10sc 18sc
Butler	Inglaterra	> 200 120		0 - 0
		> 200 150		0 - 0
2581	Paraná	125 > 200		0 - 0
		160 > 200		0 - 0
3159	M. Gerais	130 90		0 - 0
		70 150		0 - 0
3166	R. Grande do Sul	60 - 110		0 - 0
		150 > 200		0 - 0
3199	S. Paulo	50 - 35		0 - 0
		42 29		0 - 0
Harvey	Inglaterra	50sc 35sc		30 - 7sc
		100 > 200		13sc M
Butler		> 200 120		0 - 0
		85 M		0 - 0

> 200 = confluyente  
sc = semiconfluyente  
O = ausência de lesões  
M = morte.

192 materiais suspeitos de varíola foram estudados simultaneamente pela microscopia eletrônica e por cultivo do vírus em membrana corioalantóide e/ou cultura contínua de células de rim humano. 97 materiais resultaram positivos para varíola nos meios de cultivo para o vírus, correspondendo prática-

mente a 50% de positividade nos materiais estudados. Em microscopia eletrônica tivemos 88 materiais positivos ou seja praticamente 46% de material estudado. A concordância nos dois métodos foi de 89% porque, seis materiais foram positivos em microscopia eletrônica e negativos em membrana corioalantóide e/ou sistema celular, por outro lado 15 materiais foram positivos em cultivo porém foram negativos em microscopia eletrônica. Os resultados deste experimento estão demonstrados no Quadro III; o tratamento estatístico demonstrou não haver diferença significativa entre os métodos em relação ao diagnóstico etiológico da varíola. O teste usado foi "x<sup>2</sup>", com correção de Yates, obteve-se um valor de x<sup>2</sup> = 0,66 com um grau de liberdade que seria estatisticamente significativo somente a um nível de P = 50%.

QUADRO III

Resultados obtidos pela microscopia eletrônica e cultivo em membrana corioalantóide e/ou cultura celular (RH).

Resultado Prova	Resultado		Total
	+	-	
ME	88 (92,5)	104 (99,5)	192
MCA e/ou CT	97 (92,5)	95 (99,5)	192
Total	185	199	384

x<sup>2</sup> = 0,66  
df = 1  
(N.<sup>os</sup>) = freqüências teóricas.  
ME = microscopia eletrônica.  
MCA = membrana corioalantóide  
CT = cultura de tecidos.

307 materiais suspeitos de varíola foram inoculados em membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha e em cultura contínua de células de rim humano para testar a sensibilidade dos dois meios de cultivo para o vírus da varíola. Os resultados estão ilustrados na quadro IV. 170 materiais foram positivos em membrana corioalantóide correspondendo a 55,3% de positividade no material estudado. 156 materiais foram po-

sitivos em cultura celular correspondendo a 50,8% de positividade. As diferenças de dados obtidos nos dois métodos quando analisados sob o ponto de vista estatístico, não demonstraram ser significativas. O teste usado foi o "x<sup>2</sup>" com correção de Yates. Obteve-se um valor de "x<sup>2</sup>" = 1,10 com um grau de liberdade, neste caso só haveria significância estatística a um nível de P = 30%.

QUADRO IV

Resultados obtidos pelos métodos de cultivo em membrana coriolantóide e linhagem contínua de células de rim humano (RH)

Resultado Método	Resultado		Total
	+	-	
CT	156 (163)	151 (144)	307
MCA	170 (163)	137 (144)	307
Total	326	288	614

x<sup>2</sup> = 1,10

df = 1

(N<sub>te</sub>) = freqüências teóricas

MCA = membrana coriolantóide

CT = cultura de tecidos.

Em relação às provas de dupla difusão em ágar para demonstração da presença do antígeno viral, realizamos somente 18 provas em virtude da exigüidade do material recebido. A experiência que tivemos em 1967 (Luís Florêncio de Salles Gomes e John Noble Jr.), de que há necessidade de no mínimo 10-12 crostas maceradas de variola minor para obtermos resultados positivos nesta prova, impediu a realização de maior número de testes. Do total de 18 provas, 16 exibiram resultados concordantes quando relacionados com o cultivo do vírus; dos 8 materiais que foram positivos para difusão em ágar, 6 eram constituídos por crostas e 2 por esfregaços de conteúdo de lesões em lâminas; dos 10 negativos, 9 eram crostas e 1 esfregaço de conteúdo de lesões em lâminas.

QUADRO V

Diagnóstico clínico-epidemiológico	Variola no laboratório	
	Casos	Positividade
a) Variola	122	88*
b) Não é variola	25	1
c) Duvidoso	28	12

\* 3 casos de Vacinia generalizada.

Apenas 56 amostras de sangue chegaram ao nosso laboratório em condições de serem trabalhadas e, destas, somente 8 vieram acompanhadas de fichas completas, contendo dados informativos de valor. Das 56 amostras, somente 4 tiveram títulos iguais ou acima de 1:10 em fixação de complemento, e somente uma teve título de 1:160 em inibição da hemaglutinação. Em todas as amostras positivas para inibição da hemaglutinação, o título foi de 1:10 ou 1:20. De nenhum caso recebemos a 2.<sup>a</sup> amostra para verificação do aumento ou não significativo do título. De acordo com o critério dos autores ingleses<sup>7</sup>, generalizando, podemos afirmar que somente quatro amostras examinadas correspondiam a uma infecção atual ou recente pelo poxvírus, isto porque em um caso o título de inibição da hemaglutinação de 1:160 correspondeu a um título de fixação de complemento de 1:40.

QUADRO VI

Dados comparativos entre os resultados obtidos pelo diagnóstico clínico e do laboratório

DC \ DL	DL		Total
	+	-	
+	88	34	122
-	1	24	25
Total	89	58	147

x<sup>2</sup> = 29,25

df = 1

P < 0,001

DL = diagnóstico laboratorial

DC = diagnóstico clínico

Em 175 casos clínicos, relacionando os resultados etiológicos com as três alternativas diagnósticas contidas nas fichas clínico-epidemiológicas a saber: varíola, não é varíola e "duvidoso", quadros V e VI, eliminando os 28 casos classificados como "duvidosos" para o estudo estatístico, podemos concluir que os diagnósticos clínico e etiológico diferem significativamente quanto à proporção de casos positivos em laboratório. O teste usado foi o das mudanças de McNemar, obtve-se um valor de  $\chi^2 = 29,25$  com um grau de liberdade, portanto uma probabilidade de  $P < 0,001$ , o que quer dizer que o valor encontrado é altamente significativo.

#### COMENTARIOS

Com exceção da Região Norte do país, foram examinados materiais procedentes de todas as Unidades da Federação; 53% resultaram positivos para varíola. Com base nos estudos etiológicos, verificamos que a infecção grassou praticamente em todos os recantos do país.

Sob o ponto de vista clínico-epidemiológico este fato é sobejamente conhecido; entretanto, reafirmamos a verificação, com a comprovação etiológica pelo fato de ainda existir em nosso meio certa "crença" de que determinadas zonas são isentas da varíola, ocorrendo somente casos de "varicela". Ora, este erro é muitas vezes determinado pelo desconhecimento do polimorfismo do quadro clínico da varíola e motivado ainda mais pela ocorrência entre nós de grande número de casos benignos, classificados como tipos 6, 7 e 8 de Dixon<sup>15</sup>.

É comum ouvirmos, em assuntos referentes à varíola, a afirmação de que em nosso país não existe varíola e sim alastrim. Ora, a verdade é que o alastrim é nome regional da varíola minor. Epidemiologicamente, é considerado uma variante estável do vírus da varíola major, causando uma entidade nosológica, muito afim, somente distinguível através dos dados epidemiológicos e de testes laboratoriais<sup>5</sup>.

Na literatura nacional, existe uma referência de CLAUSELL<sup>2</sup>, no Rio Grande do Sul, que publicou um estudo com bases epidemiológicas e laboratoriais afirmando que

seis cepas de vírus por ele isolados foram diagnosticadas como varíola major. Por outro lado, DOWNIE<sup>8</sup> e NOBLE JR. e col.<sup>14</sup> 1968 estudando materiais colhidos em São Paulo no Hospital Emílio Ribas, e BRICEÑO-ROSSI<sup>1</sup>, na Venezuela, trabalhando com materiais de indígenas da fronteira com o Brasil, concluíram que todas as cepas por eles isoladas eram de varíola minor ou alastrim.

Ainda, sob o ponto de vista clínico-epidemiológico, há em nosso país a descrição da epidemia ocorrida em 1926 no Rio de Janeiro, com um índice de letalidade de 45,12% (COUTINHO<sup>3</sup>); portanto sob esse aspecto não há dúvidas de que o agente etiológico em questão foi a varíola major. CLAUSELL<sup>2</sup> sugere que, devido aos índices de letalidade de 8,5 e 5,6%, houve possibilidade de, no Rio Grande do Sul, em 1960 e 1961, ter havido etiologia mista, isto é, varíola minor e major. Parece-nos, entretanto, que a ocorrência mais freqüente é a de surtos paralelos de vírus diferentes como a varíola e a varicela, ou ainda, quando um vírus é introduzido artificialmente, como é o caso da vacinação antivariólica.

Das cepas por nós estudadas em temperatura de 35°C e 38,5°C, nenhuma pôde ser classificada como varíola major, isto é, todos os vírus comportaram-se no teste da temperatura como varíola minor ou alastrim. Usando um termômetro que demonstrava variações de décimos de grau, embora não possuíssemos um registrador que demonstrasse essas variações, a validade de nossos experimentos não pode ser contestada porque introduzimos no teste as duas amostras padrão dos vírus da varíola. O controle interno do experimento afasta qualquer dúvida da veracidade dos resultados.

Estes resultados ainda são consubstanciados pelos índices de letalidade apresentados nos relatórios da Campanha de Erradicação da Variola, índices que são compatíveis com os da varíola minor ou alastrim.

Seria interessante ainda ressaltar que o teste de diferenciação pela temperatura, entre varíola major e minor, segundo os autores ingleses, é válido para as amostras de varíola procedentes da Holanda, Inglaterra e América do Sul e pode dar resultados equivocados com as amostras do Leste da África<sup>11</sup>.

É óbvio que existe um interesse imediato em verificar durante o início de um surto de varíola qual o vírus responsável, devido à alta mortalidade pela varíola major em contraste com a baixa mortalidade pela varíola minor.

Em relação aos dados da microscopia eletrônica, merece algum comentário o fato de seis materiais serem positivos para poxvírus em microscopia eletrônica e negativos em membrana corioalantóide e/ou cultura celular. Poderíamos imediatamente interpretar este achado como normal, isto é, partículas de vírus encontradas na microscopia porém não viáveis, daí a falha no cultivo do material. Porém, deve ser lembrado que é possível isolar poxvírus a partir de crostas em temperatura ambiente por mais de doze meses<sup>9</sup>.

Um erro na caracterização do vírus na microscopia também não parece aceitável, devido à experiência dos microscopistas e ao achado constante de mais de uma partícula no mesmo material para a conclusão diagnóstica. Outra explicação seria provavelmente determinada pela escassez do material inoculado nos meios de cultivo, tendo em vista que a relação partícula/infectividade em membrana é de 6:1-10:1<sup>12</sup>.

A concordância obtida com os dois métodos de 89% pode ser considerada como boa se levarmos em consideração o fato de que os materiais examinados não foram colhidos por especialistas. Ainda, os materiais não eram uniformes, eram constituídos na maioria por crostas e esfregaços de vésico-pústulas em lâminas e chegavam ao laboratório com alguns dias em temperatura ambiente sem qualquer tipo de refrigeração. Apesar destes problemas, o estudo estatístico dos resultados não revelou diferença significativa entre os métodos.

Temos tido, nos últimos cinco anos, vasta experiência demonstrando que, quando o material é colhido em condições técnicas ideais, seja nas fases vesicular, pustular ou de crostas, os resultados têm sido praticamente de 100% de concordância. Índices de alta concordância por estes métodos são citados por CRUICKSHANK, BEDSON & WATSON<sup>4</sup> e por NOBLE JR. *et alii*<sup>13</sup>. A microscopia eletrônica é extremamente útil para o diagnóstico de grupo no caso dos poxvírus, podendo for-

necer o resultado em menos de uma hora e, por outro lado, pode ainda detectar infecções pelos herpesvírus, dando informações também imediatas para a orientação das medidas preventivas cabíveis.

Os resultados obtidos com as inoculações em membrana corioalantóide e cultura celular contínua de rim humano indica ser indiferente o uso de um ou outro meio para as tentativas de diagnóstico e isolamento do vírus da varíola, qualquer que seja o material recebido. Evidentemente, a cultura celular substituirá o ôvo embrionado de galinha quando não dispuzermos de fornecimento constante de ovos ou não tivermos ovos com tempo de incubação apropriado para as inoculações. Deve ser também levado em consideração que o *Herpesvírus hominis*, de origem genital, pode causar lesões semelhantes às de varíola na membrana corioalantóide, dificultando a identificação macroscópica do vírus porém, nestas membranas sempre encontramos lesões características dos herpesvírus. No sistema celular usado — linhagem contínua de células de rim humano — jamais tivemos com o *herpesvírus hominis* um efeito citopático semelhante ao produzido pelo vírus da varíola.

Em relação ao diagnóstico clínico-epidemiológico contido nas fichas, é provável que, com a evolução clínica da infecção, parte destes casos estudados tiveram seu diagnóstico clínico reavaliado. Obviamente, em vista dos resultados devemos insistir na necessidade de comprovação laboratorial dos casos clinicamente evidentes ou suspeitos de varíola. Atualmente, num país onde se caminha para a erradicação da varíola, não se pode admitir qualquer relaxamento ou descaso nas medidas de controle e de diagnóstico clínico e etiológico dos casos suspeitos ou duvidosos desta infecção.

## RESUMO

Com 332 materiais suspeitos de varíola, encaminhados ao Inst. Adolfo Lutz através da Campanha de Erradicação da Varíola no período de junho de 1967 a agosto de 1970, foram realizadas provas de cultivo do vírus, pesquisa direta em microscopia eletrônica, pesquisa do antígeno solúvel viral e reações sorológicas para detectar anticorpo específico de grupo, no sentido de estabelecer o diagnóstico etiológico da infecção.

177 materiais ou 53,6% resultaram positivos para varíola nos meios de cultivo.

Dez cepas do vírus da varíola foram identificadas no teste da temperatura como cepas de varíola minor ou alastrim.

192 materiais foram estudados simultaneamente em meios de cultivo e em microscopia eletrônica. 89% dos resultados foram concordantes.

307 materiais foram inoculados em membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha e em cultura contínua de células de rim humano. Houve concordância de 92% nos resultados.

O estudo estatístico revelou não haver diferença significativa entre os dois métodos de cultivo do vírus e entre o cultivo do vírus e a microscopia eletrônica.

Foram realizadas ainda, as reações de inibição da hemaglutinação e fixação do complemento em 56 amostras de sangue, somente quatro demonstraram títulos que sugeriam uma infecção recente pelos poxvirus.

De 18 materiais foram feitas a reação de dupla difusão em ágar para detectar antígeno solúvel viral, 16 reações exibiram resultados concordantes quando relacionados com o cultivo do vírus.

Foi relacionado o diagnóstico clínico-epidemiológico da varíola com os resultados obtidos em laboratório.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BRIGENO ROSSI, A. L. — Las diferencias del virus de Alastrim. *Bolm. Of. Sanit. Pan-am.*, 54(5):419-23, 1923.
2. CLAUSELL, D. T. — Variola e Alastrim. *Hospital, Rio de J.*, 68(1):177-80, 1965.
3. COUTINHO, E. — *Tratado de clínica das doenças infectuosas e parasitárias*. 4ed. Rio de Janeiro, 1947. p. 11.
4. CRUICKSHANK, J. G.; BEDSON, H. S. & WATSON, B. H. — Electron microscopy in the rapid diagnosis of smallpox. *Lancet*, 2(1):527-30, 1966.
5. DIXON, C. W. — *Smallpox*. London, Churchill, 1962. p. 57.
6. DOWNIE, A. W. & DUMBELL, K. R. — The isolation and cultivation of variola virus on the choric-allantois of chick embryos. *J. Path. Bact.*, 59:189-98, 1947.
7. DOWNIE, A. W. & McCARTHY, K. — The fection with viruses of the pox group. antibody response in man following in-III. Antibody response in smallpox. *J. Hyg., Camb.*, 56:479-87, 1958.
8. DOWNIE, A. W.; DUMBELL, K. R.; GALVAO, A. P. A. & ZATS, I. Alastrim in Brazil. *Trop. Geogr. Med.*, 15:25, 1963.
9. DOWNIE, A. W.: In HORSFALL, F. L. & TAMM, J. — *Viral and rickettsial infections of man*. 4th ed. Philadelphia, Lippincot, 1965. p. 934.
10. DUMBELL, K. R. & NIZAMUDDIN — An agar-gel precipitation test for the laboratory diagnosis of smallpox. *Lancet*, 1(2):916-7, 1959.
11. DUMBELL, R. K. — Laboratory aids to the control of smallpox in countries where the disease is not endemic. *Prog. Med. Virol.*, 10:388-97, 1968.
12. McCARTHY, K. & DOWNIE, A. W. — The serum antibody response in Alastrim. *Lancet*, 1(1):257-60, 1953.
13. NIZAMUDDIN & DUMBELL, K. R. — A simple laboratory test to distinguish the virus of smallpox from that of Alastrim. *Lancet*, 1(1):68-9, 1961.
14. NOBLE Jr., J.; LONG, G. W.; KIRCHNER, E. & SESSO, J. — A clinical and laboratory study of smallpox in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 19(6):1020-8, 1970.
15. SILVA, R. G.; ANGULO, J. J. & RABELLO, S. I. — Clinical types of smallpox as seen in an epidemic. *Postgrad. Med. J.*, 18:140-4, 1962.

Recebido para publicação em 4 de agosto de 1971.