

EXAMEN DE ESPECIMENES PARA EL DIAGNOSTICO DE LA VIRUELA EN UN LABORATORIO DEL BRASIL¹

Dres. H. G. Schatzmayr² y J. A. Mesquita³

Este trabajo describe los resultados de un examen de 268 especímenes, recogidos de casos de enfermedad vesicular provenientes de diversas partes del Brasil, que se realizó en un laboratorio instalado para ayudar en la "Campaña de Erradicación de la Viruela".

Introducción

El diagnóstico de la viruela en laboratorio está cobrando cada vez más importancia en razón del desarrollo de programas de vacunación y del mejoramiento de los métodos de notificación y de los estudios epidemiológicos de los casos sospechosos. Esto resulta especialmente cierto en aquellas regiones del país en las que ya se ha efectuado la primera fase de ataque de la campaña de vacunación.

En la Fundación Instituto Oswaldo Cruz, de Río de Janeiro, se instaló un laboratorio de diagnóstico para asistir en la "Campaña de Erradicación de la Viruela". A partir de mayo de 1968, este laboratorio ha estado recibiendo especímenes enviados directamente por los trabajadores de campo que participan en esa campaña, así como por las oficinas locales de salud pública. Este informe contiene datos obtenidos en trabajos de rutina realizados desde esa fecha hasta mayo de 1970.

Materiales y métodos

Se examinaron 176 especímenes de costras y 92 de fluido vesicular o pustuloso, pro-

venientes de 268 pacientes, empleándose básicamente los procedimientos descritos por la OMS (1).

Preparación de los especímenes

a) Se trituraron las costras en un triturador de tejidos, con tampón McIlvaine a 0.004 M, pH 7.2 (2, 3), más antibióticos, obteniendo como resultado una espesa suspensión.

b) El fluido vesicular o pustuloso recogido en tubos capilares o en frotis sobre láminas de vidrio, fue cuidadosamente enjuagado con pequeñas cantidades de tampón de McIlvaine.

En los casos en que ambos especímenes provinieron del mismo paciente, se mezclaron las costras y el fluido pustuloso. Se adoptó este procedimiento debido a la pequeña cantidad de material que solía llegar al laboratorio.

Las suspensiones obtenidas de la manera descrita se utilizaron para la inoculación de huevos o para pruebas de precipitación en agar-gel.

Inoculación de huevos

Se inocularon los especímenes, tanto de suspensiones originales como de diluidos de 1:100, en membranas corioalantoicas go-teadas (MCA) de huevos de gallina embrionados. Después de mantenidas unas 60 horas a una temperatura de 36°C, se re-

¹ Realizado en los laboratorios de virus del Instituto Presidente Castello Branco, Fundación Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil. El laboratorio de diagnóstico de la viruela se estableció como parte de la Campaña de Erradicación de la Viruela y como dependencia de la Escuela Nacional de Salud Pública. La OPS ha suministrado, asimismo, diversos tipos de asistencia técnica.

² Profesor titular, jefe de los laboratorios de virus.
³ Profesor asistente, virólogo del laboratorio de virus de enfermedades vesiculares.

colectaron y examinaron las MCA. Para efectuar una nueva inoculación de los huevos o una prueba confirmatoria en agar-gel, se trituraron las MCA en una mezcladora eléctrica de uso general ("omni-mixer") sin diluyente.

Prueba de precipitación en agar-gel

Se realizó con la suspensión original de especímenes; al obtenerse resultados negativos, se repitió la prueba con las MCA trituradas como prueba confirmatoria, de acuerdo con la técnica establecida (1, 4). Se utilizó como antígeno de control, el virus de alastrim además del de la vaccinia.

Goteo de las MCA y su sensibilidad al virus de alastrim

Inmediatamente después de efectuar el goteo, así como 1, 2, 3 y 4 horas después, se inoculó en las MCA goteadas una suspensión del mismo diluido de virus de alastrim en tampón de McIlvaine, más leche desnatada (5). Como se describió en la inoculación de huevos, se recolectaron las MCA y se contaron las pústulas. Se llevaron a cabo tres experimentos.

Origen de los virus

a) Virus de la vaccinia: vacuna de huevo liofilizada, obtenida del Instituto Oswaldo Cruz, de Río de Janeiro.

b) Virus de alastrim: suspensión de MCA, obtenida del Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Origen del suero

Parte del antisuero de vaccinia de conejos lo suministró el Centro Nacional de Enfermedades Transmisibles de los Estados Unidos y parte se preparó en el laboratorio de virus.

Resultados

Aislamiento de la viruela

De 268 especímenes recibidos, se aislaron 110 cepas de viruela en MCA con pruebas

CUADRO 1—Cepas de virus de viruela aislados de casos de enfermedad vesicular, mayo de 1968 a mayo de 1970.

Especímenes	Cepas aisladas	Aislamiento sin virus	Total
Costras	67(38%)	109	176
Fluido vesicular pustuloso	43(47%)	49	92
Total	110	158	268

agar-gel confirmatorias. El índice de aislamiento alcanzó 38% y 46%, respectivamente, para los especímenes de costras y de fluido vesicular o pustuloso (cuadro 1).

En el cuadro 2 se indican los resultados del aislamiento en relación con el número de días transcurridos entre la recolección de los especímenes y su llegada al laboratorio.

En el cuadro 3 se observa la relación entre el diagnóstico clínico y el aislamiento confirmatorio del virus de viruela en un laboratorio. No se habían aislado 15 casos con diagnóstico clínico de viruela, ya que todos estos especímenes demoraron más de 15 días en llegar al laboratorio. Por otro lado, se aisló virus de viruela de dos casos que habían recibido el diagnóstico clínico de "inexistencia de viruela".

Los casos de aislamiento de virus de viruela incluyen también el de una mujer embarazada que dio a luz un niño con enfermedad clínica en etapa vesicular, estando la madre ya en etapa de costras.

Se aisló un virus de vaccinia de costras

CUADRO 2—Índice de aislamiento del virus de la viruela en relación con el tiempo transcurrido entre la recolección de los especímenes y su examen.

Días	Especímenes ^a	Cepas aisladas de viruela
0 a 5	48	35(73%)
6 a 8	32	14(44%)
9 a 11	18	8(44%)
12 a 14	12	5(42%)
15 o más	94	39(41%)
Desconocido	24	9(38%)
Total	228	110

^a Excluyendo 40 especímenes con diagnóstico clínico de "inexistencia de viruela".

CUADRO 3—Diagnóstico clínico relacionado con el aislamiento del virus de la viruela.

Diagnóstico clínico	Aislamiento del virus de la viruela		Total
	Positivo	Negativo	
Viruela	31	15	46
Dudoso	5	23	28
Inexistencia de viruela	2	40	42
No registrado	72	80	152
Total	110	158	268

tomadas de bovinos que habían tenido contacto con ordeñadores recientemente vacunados (6).

Prueba de precipitación en agar-gel

Las pruebas de precipitación en agar-gel resultaron positivas para sólo un 20% de los especímenes. Sin embargo, las pruebas resultaron positivas en todos los casos en los que se usaron como antígenos las suspensiones de MCA con lesiones sospechosas de contener virus de viruela.

Sensibilidad de MCA al virus del alastrim

Los resultados de los tres experimentos, efectuados como se describe en "Materiales y métodos", se analizaron estadísticamente. Se compararon los descubrimientos con un informe previo de conteo de pústulas considerado normal (2), se efectuó un análisis de variación—usando el nivel de significación a 5%—y se vio que los resultados eran consecuentes con ellos.

Discusión

Los resultados presentados en este informe ponen de relieve algunos de los problemas inherentes al diagnóstico de la viruela en áreas en que es endémica, especialmente en un país extenso como el Brasil.

El hecho de que el índice de aislamiento del virus de especímenes de fluido vesicular o pustuloso sea más alto que el de los especímenes de costras (cuadro 1) debe interpretarse en el sentido de que la mayoría

de los especímenes anteriores provenían de áreas cercanas al laboratorio y, por lo tanto, fueron objeto de un examen más temprano.

En el cuadro 2 se indica la influencia que ejerce el tiempo que tardan los especímenes en llegar al laboratorio, dado que ningún espécimen se transportó bajo refrigeración. Es importante notar que, de 228 especímenes que se analizaron, sólo 48 llegaron dentro de los seis días siguientes a su recolección, lo que influyó en el índice de aislamiento de los virus. Del cuadro 2 se excluyeron 40 especímenes con diagnóstico de "inexistencia de viruela" con el objeto de poder obtener resultados más comparativos.

No se registraron en el laboratorio, especialmente en los primeros meses de trabajo, los diagnósticos clínicos. El cuadro 3 indica los datos disponibles. De 46 especímenes con diagnóstico clínico de viruela, 15 dieron resultados negativos en las pruebas de virus, habiendo todos demorado más de 15 días en llegar al laboratorio. Se logró aislar virus en dos de los casos que tenían diagnósticos de "inexistencia de viruela". En ambos casos, los informes epidemiológicos citaban contactos anteriores entre los pacientes y casos positivos o dudosos de viruela.

Los resultados de los experimentos llevados a cabo con el fin de estudiar la sensibilidad de los huevos empleados en los trabajos de rutina no revelaron ninguna diferencia significativa en los conteos de pústulas, lo que demostró que era apropiado el empleo de huevos entre una y dos horas después del goteo de las membranas.

Las reinoculaciones en membranas (2a etapa) se efectuaron en los primeros meses del trabajo, pero únicamente cuando los resultados eran dudosos (el grosor de la MCA, lesiones no específicas, etc.). Más tarde, mejoradas las condiciones, especialmente mediante el empleo de una mezcladora eléctrica "omni-mixer", se trituraron todas las membranas sin diluyente alguno en un recipiente cerrado de 5 ml, y la suspen-

sión resultante se inoculó en nuevos huevos o se utilizó para pruebas confirmatorias en agar-gel (1). Se comprobó que membranas que habían dado resultados positivos de viruela daban resultados irregulares en las pruebas en agar-gel cuando se trituraban en un frasco con cuentas de vidrio.

Las lesiones no específicas nunca constituyeron un problema de importancia fundamental, pero se han encontrado con cierta periodicidad en huevos adquiridos de un mismo proveedor.

En ninguno de los especímenes se llegó a sospechar la presencia de virus de *Herpes simplex* en huevos inoculados; no se ha intentado aislar el virus de la varicela debido a la ausencia de refrigeración de los especímenes recibidos.

Se ha observado (7) que el diagnóstico presuntivo de casos de alastrim por medio de la prueba en agar-gel puede efectuarse solamente cuando los especímenes son suficientemente grandes. Esto se ha confirmado en varias ocasiones, especialmente con especímenes de costras.

No se presentan datos comparativos acerca del índice de supervivencia de virus en fluidos vesiculares o pustulosos recogidos en láminas de vidrio o tubos capilares, debido a las grandes variaciones de las condiciones en que fueron recolectados los especímenes y la manera como llegaron al laboratorio.

No se han empleado técnicas de diagnóstico como la microscopía electrónica, el uso de anticuerpos fluorescentes, el aislamiento en

cultivos de tejidos o métodos de coloración. No se llevó a cabo el estudio de cepas aisladas con el fin de buscar las diferencias entre viruela y alastrim.

Resumen

Se describe la experiencia obtenida en los trabajos de diagnóstico de la viruela realizados en un laboratorio de Río de Janeiro, instalado con el fin de asistir en la "Campaña de Erradicación de la Viruela".

Se examinaron un total de 268 especímenes y se aislaron 110 cepas de viruela mediante la inoculación de huevos con la prueba confirmatoria en agar-gel. El índice de aislamiento alcanzó 38% y 46% para las costras y el fluido vesicular o pustuloso, respectivamente. Los especímenes se recogían, a veces, lejos de los laboratorios, lo que determinaba el tiempo que demoraban en llegar así como el índice de aislamiento del virus.

Se llegó a un compromiso bastante definido entre el diagnóstico clínico y los índices de aislamiento de los virus, en los casos en que se disponía de ambas clases de datos para su comparación.

La inoculación de huevos entre una y dos horas después del goteo de la membrana corioalantoica resultó ser adecuada en las condiciones bajo las cuales se realizaron las pruebas.

El laboratorio está recibiendo regularmente más especímenes para su diagnóstico. □

REFERENCIAS

- (1) World Health Organization. *Guide to the Laboratory Diagnosis of Smallpox for Smallpox Eradication Programs*, 1969.
- (2) McCarthy, K., Downie, A. W. y Armitage, P. "The antibody response in man following infection with viruses of the pox group". *J Hyg (Camb)* 56:84-100, 1958.
- (3) Galasso, G. J. y Sharp, D. G. "Virus particle aggregation and plaque forming unit". *J Immunol* 88:339-347, 1962.
- (4) Dumbell, K. R. y Nizamuddin, Md. "An agar-gel precipitation test for the laboratory diagnosis of smallpox". *Lancet* 1:916-917, 1959.
- (5) Boutler, E. A. "The titration of vaccinia neutralizing antibody on chorio-allantoic membranes". *J Hyg (Camb)* 55:502-512, 1957.
- (6) Mesquita, J. A. y Schatzmayr, H. G. "Estudos laboratoriais de infecções humanas e de bovinos com virus do grupo pox". *Rev Soc Bras Med Trop* 3(4):171-175, 1969.
- (7) Noble, J. Comunicación personal.

Smallpox specimens examined for diagnosis at a laboratory in Brazil (Summary)

The authors describe the experience gained in smallpox diagnostic work at a laboratory set up in Rio de Janeiro in order to aid the Smallpox Eradication Campaign in Brazil.

A total of 268 specimens were examined and 110 smallpox strains were isolated by egg inoculation with the agar-gel confirmatory test. Isolation rate was 38% and 46% respectively for crusts and vesicular or pustular fluid. Specimens were sometimes collected far from the

laboratory and this fact influenced the time of arrival as well as the virus isolation rate.

Close agreement was reached between clinical diagnosis and virus isolation rates, when both data were available for comparison.

The inoculation of eggs between 1 to 2 hours after the 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.

Exame de espécimes para o diagnóstico da varíola num laboratório do Brasil (Resumo)

Descreve-se a experiência obtida nos trabalhos de diagnóstico da varíola realizados num laboratório do Rio de Janeiro instalado com o fim de assistir à Campanha de Erradicação da Varíola.

Foi examinado um total de 268 espécimes e isoladas 110 cêpas de varíola mediante a inoculação de ovos com a prova confirmatória em ágar-gel. O índice de isolamento alcançou 38% e 46% para as crostras e o fluido vesicular ou pustuloso, respectivamente. Os espécimes eram recolhidos, às vezes, longe dos laboratórios, o que determinava o tempo que demora-

vam a chegar, assim como o índice de isolamento do vírus.

Chegou-se a um compromisso bastante definido entre o diagnóstico clínico e os índices de isolamento dos vírus, nos casos em que se dispunha de ambas as classes de dados para a sua comparação.

A inoculação de ovos entre uma e duas horas após a deposição da gôta na membrana cório-alantóide demonstrou ser adequada nas condições em que se realizaram as provas.

O laboratório está recebendo regularmente mais espécimes para diagnóstico.

Examen de spécimens pour le diagnostic de la variole dans un laboratoire du Brésil (Résumé)

Le rapport décrit l'expérience acquise à la suite des travaux en matière de diagnostic de la variole effectués dans un laboratoire de Rio de Janeiro, créé en vue d'aider à la "Campagne d'éradication de la variole".

On a examiné au total 268 spécimens et on a isolé 110 souches de variole au moyen de l'inoculation d'oeufs avec l'épreuve de confirmation par la gélose. L'indice d'isolement a atteint 38% et 46% pour les croûtes et le fluide vésicule ou pustuleux, respectivement. Les spécimens ont été parfois recueillis assez loin des laboratoires ce qui explique le temps qu'ils ont pris pour arriver, ainsi que l'indice d'isolement du virus.

On est parvenu à un accommodement assez précis entre le diagnostic clinique et les indices d'isolement des virus dans les cas où l'on disposait des deux catégories de données aux fins de comparaison.

L'inoculation des oeufs une ou deux heures après l'égouttement de la membrane corioalantoïde s'est révélée satisfaisante dans les conditions dans lesquelles les épreuves ont été réalisées.

Le laboratoire reçoit régulièrement un nombre croissant de spécimens aux fins de diagnostic.