

DIFERENCIAÇÃO ENTRE OS VÍRUS DA VARIÓLA E DA VACÍNIA POR MEIO DE CULTURAS DE TECIDOS ^(a)

DIFFERENTIATION BETWEEN SMALL-POX AND VACCINIA VIRUSES IN TISSUE CULTURES

ADELA ROTH ^(b)

MARTA IRENA MALACHOWSKA ^(b)

LUÍS FLORENCIO DE SALLES GOMES ^(b)

SUMMARY

The technique of Lindenmann for testing the effect of interferon on viruses grown in tissue cultures was successfully employed in the macroscopic differentiation between discrete lesions of variola and vaccinia viruses grown in cultures of chicken embryo, human kidney and amnion cells. Staining with crystal violet improved the differentiation.

INTRODUÇÃO

Pelo fato de provocarem reações imunológicas cruzadas, a diferenciação dos vírus variólico e vacínico em laboratório é feita tanto pela apreciação macroscópica da morfologia das lesões provocadas em membranas cório-alantóides de ovos embrionados de galinha como por passagens seriadas em pele de coelho. Existem trabalhos demonstrando alterações citopáticas bem definidas causadas por estes dois vírus em culturas de células HeLa, Fl, KB, RBV e outras, nas quais a observação microscópica cuidadosa permite diferenciá-los quando são usadas pequenas doses de vírus ^{1,2,3,7,8,9,10}.

A formação de placas pelo vírus vacínico e de pontos de proliferação pelo vírus variólico, em culturas de células, possibilitou não só a titulação destes vírus como a de soros específicos e também a de interferon ^{3,4,5,8}.

Neste trabalho, apresentamos aspectos morfológicos visualizados macroscopicamente, causados pelos vírus variólico e vacínico em culturas de células de em-

brião de galinha, de rim humano e amnióticas humanas, segundo a técnica de LINDENMANN ⁴.

MATERIAL E MÉTODOS

Usaram-se as seguintes células: primárias de embrião de galinha (EG), em segunda passagem, tanto estacionárias como em suspensão; linhagem de rim humano (HK), recebida do Instituto Biológico de Ness Ziona, Israel, e linhagem de âmnio humano (AV₃), recebida do Laboratório de Vírus da Ch. Pfizer Co. Inc. EE.UU. O meio de manutenção das células foi o de Hanks com lactalbumina e soro de vitelo a 10%, contendo 100 unidades de penicilina e 100 microgramas de estreptomicina por ml de meio.

As amostras de vírus usadas foram: 1) linfa vacínica, fornecida pelo Instituto Butantan, para vacinação antivariólica, cujo vírus foi adaptado a membranas cório-alantóides de ovos embrionados de

(a) Trabalho realizado na Secção de Vírus Ectodermotrópicos da Diretoria de Microbiologia e Diagnóstico do Instituto Adolfo Lutz.

(b) Do Instituto Adolfo Lutz.

galinha, em nosso laboratório, e recebeu a denominação de Bt; 2) as amostras de vírus variólico, denominadas "1026" e "1080", por nós isoladas, em membranas cório-alantóides de ovos embrionados de galinha, de pacientes de varíola menor (alastrim), internados no Hospital "Emílio Ribas".

Estas duas amostras foram identificadas com provas de soro-neutralização.

Tôdas as amostras de vírus foram tituladas nas células escolhidas para a determinação da dose 50% (DCT_{50%}) e ponto final (End point), segundo as técnicas correntes de rotina. O número de tubos usados para estas determinações foi de 4 para cada diluição do vírus e a temperatura de incubação foi a de 36°C. A leitura final foi feita no 6.º dia após a inoculação do vírus.

Para as experiências, usamos culturas de células, em camada única, em frascos retangulares de 60 cm³ de capacidade, nos quais, antes da inoculação do vírus, o meio nutritivo era substituído por meio de Hanks com soro de vitelo a 2% (com antibióticos), no volume de 3,5 a 4,0 ml por frasco, quantidade suficiente para cobrir todo o tecido.

Após a inoculação do vírus, todos os frascos eram incubados em estufa (36°C) e, de acôrdo com nosso planejamento, retirávamos os frascos da incubação, desprezávamos o meio nutriente e corávamos as células com solução aquosa de cristal violeta a 10%, durante dois minutos. Em seguida, lavávamos as células com água de torneira no mínimo três vezes e deixávamos secar os frascos para a apreciação dos resultados. Da mesma maneira procedíamos com os frascos-contrôle das células.

Tendo em vista determinar em que dia de incubação as lesões eram macroscopicamente mais facilmente identificadas e se doses variáveis de vírus influenciavam a morfologia destas alterações citopáticas, usamos inicialmente 10, 100 e 1 000 DCT_{50%} dos três vírus escolhidos nas células EG, HK e AV₃. Procedíamos à retirada de 4 frascos de cada sistema de células inoculadas com vírus e de 1 frasco-contrôle de células de estufa após 24, 48, 72, 96 e 120 horas de incuba-

ção. Após coloração e tempo necessário para secagem, os resultados eram observados a olho nu ou por meio de lupa de 5 aumentos.

Posteriormente, tendo em vista os resultados desta experiência, passamos a utilizar uma série de 10 materiais colhidos de vesico-pústulas de doentes de alastrim internados no Hospital "Emílio Ribas". Colocávamos em 1,0 ml de meio de Earle o conteúdo variável de uma a cinco lesões, tratávamos êstes materiais com antibióticos (1 000 U de penicilina e 250 mg de estreptomina), deixávamos na temperatura ambiente por duas horas, centrifugávamos (2 000r.p.m por 10-15m) e retirávamos o sobrenadante, que era usado para inoculações em frascos de células HK. Após 48 e 72 horas de incubação, procedíamos à coloração e observação dos resultados.

Dois materiais, um deles constituído pelo conteúdo de lesão vacínica da pálebra e outro pelo raspado de uma lesão do lábio inferior de diferentes casos humanos de vacínia generalizada, também foram experimentados nestas últimas células.

RESULTADOS

Após 24 horas de incubação, nenhuma alteração foi observada macroscopicamente nos frascos com células EG, HK e AV₃, inoculadas com as três amostras de vírus, em doses diferentes (10, 100 e 1 000 DCT_{50%}). Após 48 horas de incubação, verificamos macroscopicamente a presença de lesões proliferantes causadas pelas amostras de vírus variólico, com as três doses usadas, nas células EG e HK, e de placas causadas pelo vírus vacínico, nestas mesmas células. Não foram observadas macroscopicamente alterações das células AV₃ inoculadas com êstes vírus. Após 72 horas de incubação, as lesões proliferantes causadas pelo vírus variólico e as placas causadas pelo vírus vacínico eram verificadas com maior evidência nas células EG e HK. Não se observou nenhuma alteração macroscópica provocada por êste vírus no sistema de células AV₃. Após 96 horas de incubação, além das alterações causadas pelos vírus variólico e vacínico nas células EG e HK, verificamos macroscò-

picamente pontos de proliferação causada pelo vírus variólico e placas causadas pelo vírus vacínico nas células AV₃. Após 120 horas de incubação, limite de nossa experiência, além das alterações nas células EG e HK, notava-se o aparecimento de alterações nas células AV₃, causadas pelos vírus variólico e vacínico.

É interessante notar que macroscopicamente as lesões proliferantes causadas pelo vírus variólico coram-se mais intensamente pela violeta que o resto do tecido aparentemente não afetado pelo vírus. Ao redor de 72-96 horas de incubação, êste agrupamento de células degeneradas parece destacar-se mais do resto do tecido vizinho, ou ainda, tornar-se mais distinto macroscopicamente, pela formação de um halo ao redor da lesão. Êste fato foi verificado nas células EG e HK, o mesmo acontecendo nas células AV₃, com incubação de 96-120 horas. Por outro lado, as placas causadas pelo vírus vacínico, com 48 horas de incubação, demonstraram macroscopicamente, após coloração, contornos irregulares mais intensamente corados que o resto do tecido aparentemente não afetado pelo vírus, sendo perfeitamente visível um pequeno centro necrótico. Depois de 72 e 96 horas de incubação, estas placas assumiram contornos muito regulares e muito nítidos, não se percebendo qualquer resto celular em seu interior. Também nas células AV₃ êste aspecto foi observado com maior tempo de incubação vírus-células. Após 96 horas de incubação, nas células EG e HK, verificou-se ainda que as placas causadas pelo vírus vacínico aumentam de tamanho, podendo juntar-se às placas secundárias ou às primárias circunvizinhas, formando placas maiores que, por vêzes, lembram a forma de vírgula ou cometa.

Inocularam-se, em menor número de frascos de células EG e HK, quantidades mais concentradas (10 000 e 100 000 DCT_{50%}) dos vírus variólico e vacínico e, após 48, 72 e 96 horas de incubação, foram coradas e observadas. O resultado demonstrou, confirmando os achados microscópicos de VIEUCHANGE⁹, em tubos, não ser possível qualquer caracterização macroscópica do vírus variólico ou vacínico, devido ao rápido e extenso efeito citopático. Com incubações

de 48-72 horas, pequena parte do tecido ainda colado à parede dos frascos não permitia a observação morfológica das lesões específicas individualizadas. Por esta razão, com os materiais colhidos diretamente dos doentes, inoculávamos três frascos, o primeiro com o inóculo sem diluição, o segundo e terceiro com diluições do material a 10⁻² e 10⁻³. Em nenhuma ocasião foi preciso aumentar as diluições dos materiais experimentados para a observação e caracterização macroscópica das lesões específicas.

DISCUSSÃO

A comparação macroscópica das lesões produzidas pelos vírus variólico e vacínico em culturas de tecido constitui um dado a mais para a diferenciação dêstes dois vírus. Estas lesões, após coloração, podem ser caracterizadas com clareza, com 48 horas de incubação do vírus nos sistemas celulares EG e HK.

A leitura microscópica das culturas de células em tubos inoculados com doses maciças dêstes vírus não possibilita a apreciação das lesões, devido ao rápido efeito citopático⁹.

A técnica de Lindenmann, nas culturas de células em garrafas, proporciona maior clareza para a observação macroscópica das lesões causadas por êstes dois vírus, o que nos parece tão simples quanto a observação macroscópica das lesões provocadas por êstes mesmos vírus na membrana cório-alantóide de ovos embrionados de galinha.

Os experimentos, visando a aplicação prática do diagnóstico diferencial entre êstes vírus, demonstraram a viabilidade dêste diagnóstico, com os resultados de 10 amostras de portadores de varíola minor e 2 amostras de portadores de vacínia generalizada. Tôdas estas amostras foram paralelamente isoladas e identificadas, segundo a morfologia das lesões e por provas de sôro-neutralização em membranas cório-alantóides de ovos embrionados de galinha.

Outros vírus são capazes de provocar lesões em células semelhantes às causadas pelo vírus vacínico, porém, na prática diagnóstica, a sôro-neutralização es-

pecífica esclarece a etiologia, acrescenta dos dados da procedência do material e da suspeita clínica.

RESUMO

A técnica de Lindenmann em culturas de células de embrião de galinha, rim humano e âmnio humano foi empregada para a observação macroscópica das lesões provocadas pelos vírus variólico e vacínico. Verificou-se ser possível, pela técnica em questão, a diferenciação macroscópica entre estes dois vírus. A coloração das lesões facilita sobremaneira a observação da sua morfologia. A viabilidade do método foi observada com o material de dez pacientes de varíola minor (alastrim) e de dois de vacínia generalizada.

BIBLIOGRAFIA

1. NOYES, W.F. — A simple technic for demonstrating plaque formation with virus of vaccinia. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83:426-429, 1953.
2. ST. GEME, J.W., Jr. — A simple *in vitro* assay for vaccinia virus using tube cultures of human cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.: 113:133-135, 1963.
3. KIRN, A. & BRAUNWALD, J. — Titration du virus vaccinal par la méthode des plages sur souche cellulaire KB. 1. Exposé de la méthode. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 103:832-840, 1962.
4. LINDENMANN, J. & GIFFORD, G.E. — Studies of vaccinia virus plaque formation and its inhibition by interferon. 1. Dynamics of plaque formation by vaccinia virus. Virology 19:283-293, 1963.
5. MAHNEL, H. & MUNZ, E. — Differenzierung von Variola- und Vakzine-virus in HeLa- und F1-Zellkulturen. Zbl. Bakt. (Orig.) 178:149-155, 1960.
6. PORTERFIELD, J.S. — A simple plaque-inhibition test for the study of arthropod-borne viruses. Bull. Wld. Hlth. Org. 22:373-380, 1960.
7. PORTERFIELD, J.S. & ALLISON, A.C. — Studies with poxviruses by an improved plaque technique. Virology 10: 233-244, 1960.
8. POSTLETHWAITE, R. — A plaque technique for the titration of vaccinia virus in chick embryo cells and some features of vaccinia infection in this system. Virology 10:466-482, 1960.
9. VIEUCHANGE, G., BRION, G. de & GRUEST, J. — Virus variolique en cultures de cellules. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 95:681-693, 1958.
10. YOUNGNER, J.S. — Virus adsorption and plaque formation in monolayer cultures of trypsin-dispersed monkey kidney. J. Immun. 76:288-292, 1956.

Recebido para publicação em 1.º de outubro de 1964

Fig. 1

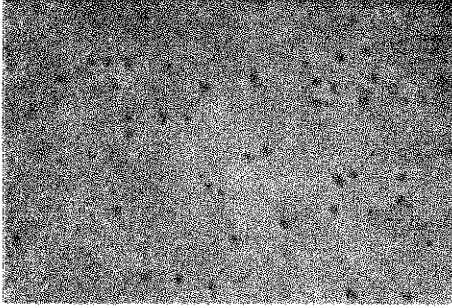


Fig. 2

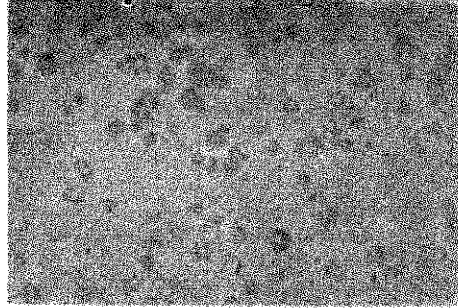


Fig. 3

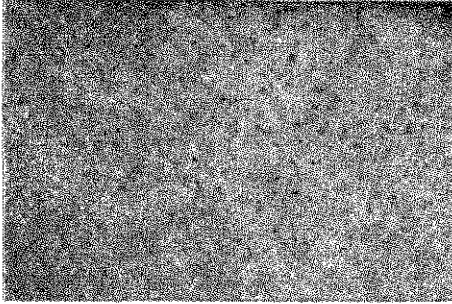


Fig. 4

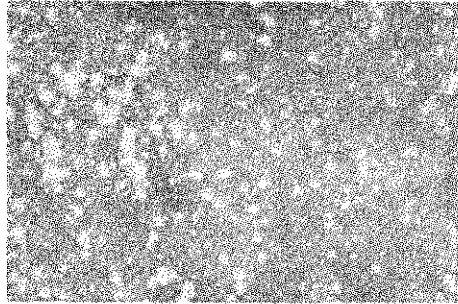


Fig. 5

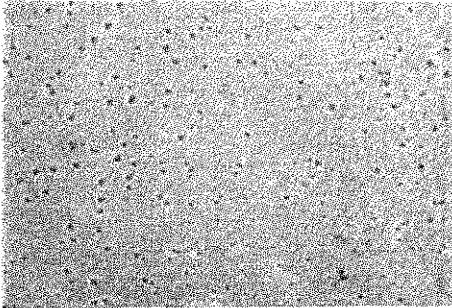


Fig. 6

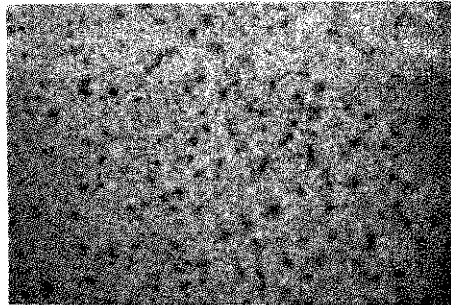
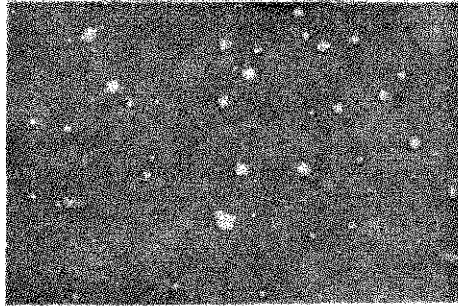


Fig. 7

Fig. 1 — Vírus variólico
(em culturas E.G. com 48 horas de incubação)

Fig. 2 — Vírus vacínico
(em culturas E.G. com 48 horas de incubação)

Fig. 3 — Vírus variólico
(em culturas H.K. com 72 horas de incubação)

Fig. 4 — Vírus vacínico
(em culturas H.K. com 72 horas de incubação)

Fig. 5 — Vírus variólico
(em culturas AV₃ com 96 horas de incubação)

Fig. 6 — Vírus vacínico
(em culturas AV₃ com 96 horas de incubação)

Fig. 7 — Material tirado de pústulas de um caso
de variola, inoculado em células H.K., com 48
horas de incubação

