

ESTUDO LABORATORIAL DA VARIOLA EM PACIENTES DO HOSPITAL DE ISOLAMENTO "EMÍLIO RIBAS", DE SÃO PAULO, BRASIL.

II — Avaliação e interpretação do diagnóstico sorológico

Elfried KIRCHNER⁽¹⁾, John NOBLE⁽²⁾, João SESCO⁽³⁾ e Gary LONG⁽²⁾

RESUMO

Realizou-se uma avaliação da resposta imunológica na infecção pelo vírus da *Variola minor*, fazendo-se estudo comparativo entre as provas de inibição da hemaglutinação, fixação do complemento, neutralização e precipitação, em 147 amostras sorológicas coletadas de 98 pacientes. Os anticorpos inibidores da hemaglutinação apresentaram-se em níveis elevados logo à primeira semana de exantema e foram demonstrados em todos os espécimens; somente 40% dos soros apresentaram títulos de anticorpos fixadores do complemento superiores a 1:8, enquanto 79,2% mostraram títulos neutralizantes superiores a 1:8. Os níveis de anticorpos dos dois últimos tipos elevaram-se ao fim da segunda e no decurso da terceira semana de exantema. Elevada proporção de amostras (81,7%) apresentou anticorpos precipitantes; dos 29 soros (18,3%) que não os apresentaram, 28 haviam sido coletados ao ou antes do 13.º dia de exantema. A prova de difusão em ágar-gel demonstrou ser, portanto, método fidedigno, simples e de rápida execução para o diagnóstico indireto da varíola.

INTRODUÇÃO

A presente investigação vem complementar estudo anterior³, cujo objetivo principal foi determinar a precisão dos vários métodos laboratoriais atualmente empregados no diagnóstico direto da varíola.

Reproduzindo-se com material de pacientes de varíola do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas" de São Paulo, Brasil, o estudo comparativo realizado por DOWNIE & col.⁵ com soros obtidos de pacientes de *V. major* de Madras, Índia, procurou-se avaliar, nesta segunda parte do nosso estudo,

a resposta imunológica na *V. minor*, discutindo-se o valor das provas de inibição da hemaglutinação, fixação do complemento, neutralização e precipitação em ágar-gel.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras sorológicas simples ou múltiplas, num total de 147, foram obtidas de 98 pacientes de varíola estudados em 1967 e 1968; os soros foram mantidos congelados a -20°C até o momento das provas, realizadas no

Pesquisa realizada no Laboratório de Doenças Vesiculares do Centro de Doenças Transmissíveis de Atlanta, Georgia, Estados Unidos da América

- (1) Bolsista da Organização Panamericana da Saúde. Professora-Assistente do Departamento de Microbiologia e Imunologia e do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil (Diretor: Prof. CARLOS DA SILVA LACAZ)
- (2) Vesicular Disease Laboratory, Viral Exanthems Unit, Virology Section, Microbiology Branch, Laboratory Division, National Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia, U.S.A.
- (3) Chefe do Pavilhão de Varíola do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas", São Paulo, Brasil (Diretor: Dr. CARLOS DE OLIVEIRA BASTOS)

Laboratório de Doenças Vesiculares do Centro de Doenças Transmissíveis de Atlanta, Georgia, Estados Unidos da América.

A pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação (IHA) se fêz segundo a adaptação a microplacas descrita por KEMPE & ST. VINCENT⁷, empregando-se hemaglutinina parcialmente purificada, preparada pelo método de KISSLING⁹, em culturas de células BHK-21; a pesquisa de anticorpos fixadores do complemento (FC) se fêz pelo método descrito por CASEY¹. As provas de anticorpos neutralizantes (NT) foram efetuadas em culturas de células HeP-2 utilizando-se uma adaptação da técnica descrita por CUTCHINS & col.². Para o teste de precipitação em ágar-gel, realizado em lâmina de acordo com o padrão estabelecido por DOWNIE³, os soros foram diluídos a 1:2 em solução fisiológica comum, sendo o antígeno constituído de homogenato de membranas cório-alantóicas de ovos embrionados de galinha de 10-11 dias de incubação e portadoras de crescimentos confluentes do vírus vaccínico. A incubação das lâ-

minas foi feita à temperatura ambiente e sua leitura, após 24 ou 48 horas.

RESULTADOS

As Tabelas I e II resumem os resultados obtidos pelos quatro diferentes tipos de provas sorológicas a que se submeteram as 147 amostras sorológicas estudadas, bem como a identificação das mesmas em relação ao estado vacinal do paciente e à fase em que foram coletadas. Tôdas as amostras colhidas à primeira semana do exantema apresentavam títulos de anticorpos IHA de 1:32 ou mais; os títulos de anticorpos FC e NT variaram de < 1:8 a 1:1024 durante as quatro semanas subsequentes ao aparecimento da erupção (Tabela III). Elevação de quatro vêzes nos títulos de anticorpos IHA, FC e NT só foi demonstrada em 28 dos 52 pacientes dos quais se obtiveram amostras pareadas de sôro. O intervalo médio de tempo entre a coleta dessas amostras pareadas foi de 7 dias; a faixa de variação geral foi de 3 a 16 dias.

TABELA I

Resposta imunológica na *Varicla minor*, em pacientes do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas", de São Paulo, Brasil — 1967

Pac. n.º	Estado vacinal	Data de			Estágio da doença	Resposta imunológica				
		Início da doença	Início do exantema	Coleta do sôro		IH	Vacc	FC Var/He	NT	PPT
2	sp	10/10	12/10	18/10	Pústulas	32		8/64		+
3	nv	8/10	11/10	18/10	Ves. pust.	128	8	32/16	7	0
				23/10	Crostras	128	8	16	50	+
4	nv	9/10	11/10	24/10	Crostras	256	32	16/64		+
5	sp	17/10	19/10	25/10	Pústulas	128	16	32/64		+
7	nv	13/10	16/10	19/10	Vesículas	16	8	8/64		0
				23/10	Crostras	128	128	32/64		+
8	sp	9/10	13/10	19/10	Vesículas	64	32	16/64		+
				23/10	Crostras	256	64	16/64		+
9	sp	2/10	12/10	17/10	Pústulas	128		8	35	0
				19/10	Crostras	128	8	16	140	+
				23/10	Crostras	128	8	16	200	+
10	nv	4/10	8/10	13/10	Vesículas	32	8	8/16		0
				19/10	Pústulas	128	64	8/16		+
				23/10	Crostras	256	64	8/16		+
11	nv	8/10	13/10	18/10	Vesículas	256	64	16	28	+
				23/10	Crostras	512	64	16	256	+

TABELA I — (Continuação)

Pac. N.º	Estado vacinal	Data de			Estágio da doença	Resposta imunológica				
		Início da doença	Início do exantema	Coleta do soro		IH	FC		NT	PPT
						Vacc	Var/He			
12	nv	3/10	7/10	14/10 19/10	Vesículas Crostras	64 128	8 16	8 8/8	22 100	+ +
13	sp	1/10	3/10	17/10 19/10 23/10	Pústulas Crostras Desc. fin.	64 128 64	16 16 16	32/8 32/8 16/8	9 32 64	+ + +
14	sp	.. /10	8/10	14/10 19/10	Vesículas Pústulas	16 256		64 64	13 112	0 +
15	sp	13/10	14/10	24/10	Conval.			64/64		0
16	p	14/10	15/10	17/10 20/10 23/10	Vesículas Pústulas Púst. crostras	64 128 64	32 64 64	8/16 16/16 16/16		0 ± +
17	nv	14/10	15/10	18/10 24/10	Vesículas Pústulas	32 128	8 32	8/16 8/8		0 +
18	sp	15/10	15/10	17/10 20/10 23/10	Vesículas Pústulas Púst. crostras	16 64 64	8 8	16 16 16	256 1.024 565	0 + +
19	nv	12/10	14/10	18/10 24/10	Pústulas Crostras	8 64		32/16 16/16	64 160	+ +
20	sp	.. /10	18/10	19/10 24/10	Pápulas Vesículas	16 ≥1.024		8/16 8/32	45 178	0 +
21	nv	13/10	15/10	18/10 23/10	Pústulas Crostras	128 128	8 32	8 8	6 32	0 +
22	?	13/10	16/10	19/10 23/10	Vesículas Ves. púst.	16 64		16/16 8/16	32 50	0 0
23	sp	12/10	14/10	17/10 19/10	Vesículas Vesículas	128 128		8 8/8	50 450	± +
24	sp	10/10	12/10	18/10 23/10	Pústulas Crostras	256 128	128 16	16/32 8/32		+ +
26	nv	17/9	20/9	14/10 19/10	Crostras Conval.	256 256	32 64	8/64 16/64	50 140	+ +
27	p	12/10	14/10	17/10 19/10 23/10	Vesículas Vesículas Desc. fin.		8 8	8/16 32/32 64/32		0 0 0
28	sp	9/10	11/10	19/10 23/10	Ves. púst. Crostras	64 128	8 16	8/32 16	45 126	± +
29	nv	14/10	16/10	18/10 23/10	Pústulas Crostras	8 8	8 8	64/64 64/32	256 512	0 0
30	sp	19/10	19/10	25/10	Pústulas		8	8/16		0
31	nv	10/10	15/10	18/10 23/10	Pústulas Crostras	128 256	128 256	8/32 8/32		± +
32	p	20/9	23/9	14/10 19/10 23/10	Crostras Crostras Conval.	256 256 128	32 32 32	16 8 8		+ + +
33	p	14/10	14/10	17/10 19/10	Pústulas Desc. fin.	8 16		8 8		0 0
34	nv	27/9	1/10	14/10	Crostras	32	8	8/16		+

Legendas: Pac — paciente
 IH — reação de inibição da hemaglutinação
 FC — reação de fixação do complemento
 NT — reação de neutralização
 PPT — reação de precipitação em ágar-gel
 Vacc — vaccinia
 Var — varicela
 He — *Herpes simplex*
 sp — vacinado sem "pega"
 nv — nunca vacinado
 p — vacinado com "pega"
 Ves. púst. — vesículas + pústulas
 Desc. fin. — fase final de descamação
 Conval. — convalescente

Nota: Os títulos foram expressos como recíprocas das diluições séricas.

KIRCHNER, E.; NOBLE, J.; SESSO, J. & LONG, G. — Estudo laboratorial da variola em pacientes do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas", de São Paulo, Brasil. II — Avaliação e interpretação do diagnóstico sorológico. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 14:114-120, 1972.

TABELA II

Resposta imunológica na *Variola minor*, em pacientes do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas", de São Paulo, Brasil — 1968

Pac. N.º	Estado vacinal	Data de			Estágio da doença	Resposta imunológica				
		Início da doença	Início do exantema	Coleta do soro		IH	FC Vacc	FC Var	NT	PPT
29	sp	29/10	31/10	2/11	Pápulas	20	<8	8	64	0
30	nv	28/10	30/10	2/11	Páp. vesic.	320	<8	<8	<4	0
31	nv	26/10	28/10	2/11	Pápulas	160	<8	<8	<4	+
32	nv	26/10	29/10	4/11	Vesículas	320	32	8	≥ 1 024	+
				9/11	Pústulas	320	32	8	≥ 1 024	+
33	nv	25/10	26/10	4/11	Ves. pust.	160	8	<8	25	+
				9/11	Crostras	160	8	8	1 024	+
38	sp	2/11	5/11	9/11	Vesículas	40				+
				14/11	Crostras	160	<8	16	4	+
42	sp	24/10	31/10	9/11	Ves. pust.	320	16	16	<4	+
				14/11	Crostras	320	16	<8	<4	+
45	nv	2/11	6/11	21/11	Conval.	320	8	<8	18	+
46	sp	2/11	5/11	14/11	Pústulas	320	16	8	40	+
				21/11	Conval.	320	8	8	80	+
47	sp	9/11	11/11	14/11	Pústulas	20	<8	8	128	+
				21/11	Conval.	320	16	8	128	+
51	sp	3/11	6/11	14/11	Ves. púst.	320	8	8	≥ 1 024	+
				21/11	Crostras	320	<8	8	640	+
52	nv	31/10	4/11	14/11	Púst. crostas	320	16	8	≥ 1 024	+
				20/11	Conval.	320	8	8	256	+
54	nv	3/11	6/11	21/11	Conval.	320	8	8	398	+
55	sp	5/11	8/11	21/11	Crostras	160	<8	8	80	+
57	nv	13/11	16/11	21/11	Vesículas	160	<8	<8	4	+
				30/11	Crostras	320	16	<8	20	+
58	nv	10/11	12/11	24/11	Púst. crostas	160	16	8	100	+
				30/11	Conval.	320	8	8	64	+
64	nv	18/11	19/11	27/11	Púst. crostas	<10	8	256	<4	0
65	sp	14/11	17/11	24/11	Pústulas	40	<8	8	<4	+
				30/11	Crostras	320	8	16	400	+
66	nv	14/11	18/11	24/11	Páp. vesic.	160	<8	16	1 024	0
				7/12	Conval.	160	<8	8	64	+
72	nv	18/11	21/11	13/12	Conval.	320	8	8	45	+
74	nv	21/11	24/11	30/11	Pústulas	160	<8	8	<4	+
77	nv	20/11	23/11	30/11	Crostras	160	16	8	14	0
78	nv	18/11	21/11	30/11	Ves. púst.	320	16	<8	89	0
				7/12	Conval.	640	16	<8	500	+
83	nv	22/11	23/11	7/12	Pústulas	160	8	<8	560	+
				15/12	Conval.	160	8	<8	100	+
84	sp	23/11	26/11	7/12	Púst. crostas	160	32	<8	256	+
				13/12	Conval.	160	16	<8	64	+
85	nv	24/11	27/11	7/12	Pústulas	160	32	8	4	+
				13/12	Conval.	320	8	8	256	+
86	nv	30/11	30/11	7/12	Ves. púst.	320	<8	<8	20	0
				13/12	Crostras	320	<8	<8	6	±

TABELA II — (Continuação)

Pac. N.º	Estado vacinal	Data de			Estágio da doença	Resposta imunológica				
		Início da doença	Início do exantema	Coleta do soro		IH	FC Vacc	Var	NT	PPT
88	nv	25/11	30/11	7/12	Pústulas	160	<8	16	18	+
				13/12	Desc. fin.	320	<8	16	10	+
93	nv	27/11	2/12	7/12	Pústulas	40	<8	8	14	+
94	nv	29/11	2/12	7/12	Pápulas	80	<8	8	8	±
				13/12	Crostras	320	8	8	100	+
99	sp	4/12	9/12	13/12	Pústulas	160	<8	8	32	0
100	p	4/12	7/12	13/12	Pústulas	320	8	8	140	+
101	sp	4/12	6/12	13/12	Pústulas	320	16	8	56	+
115	p	10/12	13/12	28/12	Crostras	320	16	16	≥ 1 024	+
116	sp	9/12	12/12	28/12	Crostras	320	8	8	4	+
120	sp	12/12	13/12	28/12	Conval.	320	8	8	80	+
121	nv	14/12	17/12	28/12	Pústulas	64	16	8	80	+
				5/ 1	Conval.	64	16	8	100	+
122	sp	16/12	23/12	29/12	Pústulas	160	16	16	5	+
				5/ 1	Desc. fin.	320	16	16	45	+
125	sp	19/12	21/12	5/ 1	Desc. fin.	160	32	8	100	+
127	nv	21/12	24/12	5/ 1	Pústulas	160	16	8	13	+
128	nv	8/ 9	10/ 9	24/ 9	Púst. crostas	320	16	16	≥ 1 024	+
				1/10	Conval.	320	16	16	40	+
129	nv	16/12	12/ 9	24/ 9	Pústulas	320	16	16	9	0
				1/10	Conval.	320	16	8	9	±
131	sp	6/ 9	12/ 9	3/10	Conval.	320	<8	<8	40	+
132	p	2/ 9	6/ 9	26/ 9	Conval.	320	16	16	≥ 1 024	+
134	sp	12/ 9	14/ 9	26/ 9	Ves. púst.	160	<8	8	<4	+
				1/10	Crostras	320	8	8	316	+
				9/10	Conval.	320	8	8	64	+
137	nv	13/ 9	15/ 9	26/10	Púst. crostas	320	<8	<8	40	+
				1/11	Conval.	320	<8	<8	≥ 1 024	+
138	nv	23/ 8	25/ 8	25/ 9	Desc. fin.	160	<8	<8	398	±
153	nv	19/ 9	22/ 9	4/10	Crostras	320	16	32	64	+
154	sp	20/ 9	24/ 9	3/10	Pústulas	160	8	8	1 024	0
				10/10	Desc. fin.	320	8	8	5	+
155	sp	17/ 9	22/ 9	3/10	Crostras	320	8	16	8 900	+
156	sp	21/ 9	24/ 9	4/10	Púst. crostas	320	<8	8	≥ 1 024	±
				13/10	Conval.	320	8	8	200	+
157	nv	24/ 9	27/ 9	4/10	Pústulas	320	<8	16	≥ 1 024	+
158	nv	27/ 9	30/ 9	4/10	Páp. ves.	40	<8	16	32	0
159	sp	20/ 9	23/ 9	7/10	Pústulas	320	<8	8	6	+
160	sp	26/ 9	28/ 9	4/10	Pústulas	320	<8	<8	<4	+
				10/10	Conval.	640	<8	<8	≥ 1 024	+
162	nv	26/ 9	28/ 9	4/10	Pústulas	320	8	8	20	+
				10/10	Conval.	160	16	8	500	+
163	nv	26/ 9	29/ 9	4/10	Crostras	160	32	<8	<4	+
				10/10	Conval.	640	16	<8	12	+
168	sp	28/ 9	1/10	10/10	Púst. crostas	160	8	8	141	+
171	nv	23/ 9	25/ 9	9/10	Desc. fin.	320	<8	<8	11	+
177	sp	30/ 9	4/10	10/10	Pústulas	160	8	<8	<4	0
178	sp	30/ 9	1/10	10/10	Crostras	640	8	32	20	+
				15/10	Conval.	≥ 640	8	32	45	+
179	nv	25/ 9	1/10	10/10	Conval.	320	64	<8	25	+
180	sp	4/10	6/10	10/10	Ves. púst.	160	<8	8	<4	0
181	sp	27/ 9	3/10	10/10	Ves. púst.	80	<8	<8	<4	0
182	sp	6/10	8/10	13/10	Pústulas	160	8	32	70	+

Legendas: Vide Tabela I

TABELA III

Evolução da resposta imunológica em pacientes de *Variola minor* durante as quatro semanas subseqüentes à instalação do exantema

Títulos	Número de soros investigados											
	IH				FC				NT			
	Semana				Semana				Semana			
	1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a	1. ^a	2. ^a	3. ^a	4. ^a
<1: 8	0	0	0	0	17	16	4	4	3	9	4	1
1: 8	1	0	0	0	9	16	17	4	2	7	2	0
1: 16	7	0	0	0	1	17	11	3	4	5	3	0
1: 32	4	3	0	0	3	8	2	1	5	6	3	1
1: 64	5	8	2	1	2	4	2	1	5	8	7	5
1: 128	13	24	4	5	2	0	0	0	4	6	4	2
1: 256	4	23	28	7	0	1	0	0	1	5	4	1
1: 512	0	4	2	0	0	0	0	0	3	2	2	1
1:1 024	1	0	0	0	0	0	0	0	1	10	7	2
Total	35	62	36	13	34	62	36	13	28	58	36	13

HI — Reação de inibição da hemaglutinação

FC — Reação de fixação do complemento

NT — Reação de neutralização

Anticorpos precipitantes foram evidenciados em 81,7% das amostras, por provas de difusão em ágar-gel. Vinte e nove amostras não apresentaram anticorpos precipitantes: 28 haviam sido coletadas ao 13.^o dia do exantema ou antes, e uma fora colhida ao 36.^o dia. Nas demais provas sorológicas, o paciente correspondente a esta última (N.^o 180, Tabela II), exibiu os seguintes títulos: 1:160 à IHA, 1:8 à FC e à < 1:4 NT.

DISCUSSÃO

Conversão sorológica ou elevação de quatro vezes no título de anticorpos ocorreu raramente durante os intervalos, aliás breves, em que os pacientes puderam ser estudados. Anticorpos IHA foram demonstrados em todos os espécimens; entretanto, apenas 40% dos soros apresentaram títulos de anticorpos FC superiores a 1:8. Embora 79,2% dos soros tivessem títulos de anticorpos NT superiores a 1:8, cinco soros obtidos durante a terceira e quarta semanas

de exantema não possuíam anticorpos NT demonstráveis. Os níveis de anticorpos IHA apresentavam-se elevados logo à primeira semana após o aparecimento das lesões, enquanto os níveis de anticorpos FC e NT, inicialmente baixos, elevavam-se durante a segunda semana do exantema.

Nossos resultados nas provas de NT e, em menor escala, de FC e IHA (Tabelas I, II e III), revelam variabilidade maior do que relatam DOWNIE & MCCARTHY⁴ e DOWNIE & col.⁵. A porcentagem de pacientes não vacinados poderia explicar tais diferenças: somente 14% dos pacientes de *V. major* estudados por DOWNIE & col.⁵ nunca haviam sido vacinados; em nossa série, 60% dos pacientes eram não-vacinados e 30% haviam sido vacinados mas não desenvolveram reação de "pega" vacinal. Em pacientes não vacinados, a resposta sorológica à varíola é retardada e os títulos são inferiores aos de indivíduos previamente imunizados. Poder-se-ia, ainda, supor que a *V. minor* seja imunogênicamente menos potente que a *V. major*.

Entretanto, a elevada proporção de positividade observada em nossas provas de precipitação em ágar-gel (81,7% das amostras) demonstra que também na *V. minor*, anticorpos precipitantes participam da resposta imunológica, contrariamente ao que afirmam HERRLICH & col.⁸ ao asseverarem que este tipo de anticorpo só é produzido na infecção pelo vírus da *V. major*. Soros com títulos de 1:32 em FC, 1:16 na NT ou 1:256 na IHA mostraram-se, invariavelmente, positivos à prova de difusão em ágar-gel, o que comprova o valor deste tipo de teste como método fidedigno, de execução rápida e simples, para o diagnóstico indireto da varíola.

SUMMARY

Laboratory study of smallpox in patients of the "Emílio Ribas" Infectious Disease Hospital, São Paulo, Brasil. II — An evaluation of the different indirect diagnostic methods.

An evaluation of the immunological response in *Variola minor* infection was carried out by comparative studies of hemagglutination-inhibition, complement fixation, neutralization and agar-gel precipitation tests, on 147 serum samples collected from 98 patients. Hemagglutination-inhibition tests yielded high levels of antibodies at the first week of rash, and every blood specimen was positive; only 40% of the sera exhibited complement fixing titers higher than 1:8, whereas 79.2% had neutralization titers above 1:8. The level of the last two types of antibodies raised quickly after the first and during the second week of rash. Poxvirus precipitating antibody was detected in 81.7% of the specimens by the agar-gel test. Out of 29 sera (18.3%) which did not exhibit precipitating antibodies, 28 had been drawn on or before the 13th day of rash. The agar-gel test has thus proved to be a reliable, simple and quick method for the indirect diagnosis of smallpox.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos de Oliveira Bastos, Diretor do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas"; ao Dr. Augusto Taunay, Diretor do Instituto "Adolpho Lutz"; ao Prof. Carlos da Silva Lacaz, Diretor do Departamento de Micro-

biologia e Imunologia e do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Ao Dr. Luiz Florêncio de Salles Gomes, Chefe da Virologia, Instituto "Adolpho Lutz", que nos proporcionou amplas facilidades em seus laboratórios e sugeriu que examinássemos os soros quanto à presença de anticorpos precipitantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CASEY, H. L. — Adaptation of LBCF method to micro-technique in standardized diagnostic complement fixation and adaptation to micro test. *Public Health Monograph No. 74, U.S. Government Printing Office, Washington, D. C., 1965.*
2. CUTCHINS, E.; WARREN, J. & JONES, W. P. — The antibody response to smallpox vaccination as measured by a tissue culture plaque method. *J. Immun.* 85:275-283, 1960.
3. DOWNIE, A. W. — Poxvirus group. *In Viral and Rickettsial Infections of Man.* 4th Ed., Ed. Horsfall, F. L. and Tamm, I. Philadelphia, p. 944, 1965.
4. DOWNIE, A. W. & MCCARTHY, K. — The antibody response in man following an infection with viruses of the pox group. II — Antibody response in smallpox. *J. Hyg.* 56: 479, 1958.
5. DOWNIE, A. W.; ST.VINCENT, L.; GOLDS-TEIN, L.; RAO, A. R. & KEMPE, C. H. — Antibody response in non-haemorrhagic smallpox patients. *J. Hyg.* 67:609-618, 1969.
6. HERRLICH, A.; MAYR, A. & MAHNEL, H. — Das Antikörperbild der Variola-Vaccininfektion. 2. Mitteilung: serologische Untersuchungen an Variola-patienten. *Zbl. Bakt. I. Orig.* 175:163-180, 1959.
7. KEMPE, C. H. & ST.VINCENT, L. — Variola and vaccinia viruses. *In: Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Diseases.* Third Ed., Ed. Lennette, E. H. & Schmidt, N. J. New York, 665-692, 1964.
8. KIRCHNER, E.; NOBLE, J.; SESSO, J. & LONG, G. — Estudo laboratorial da varíola em pacientes do Hospital de Isolamento "Emílio Ribas", de São Paulo, Brasil. I — Avaliação dos diferentes métodos diagnósticos diretos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 13:257-267, 1971.
9. KISSLING, R. E. — Comunicação pessoal.

Recebido para publicação em 19/7/1971.