

Universidade Federal de Minas Gerais
Conselho de Pós-Graduação
Escola de Veterinária

PRODUÇÃO EXPERIMENTAL DO ANTÍGENO PARA A PROVA DE IMUNODIFUSÃO
EM ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

Isabella Bias Fortes Ferraz

Belo Horizonte
Minas Gerais
1990

Isabella Bias Fortes Ferraz

PRODUÇÃO EXPERIMENTAL DO ANTÍGENO PARA A PROVA DE IMUNODIFUSÃO
EM ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Belo Horizonte
Minas Gerais
1990

636.108 969 2

F381p Ferraz, Isabella Bias Fortes, 1959.

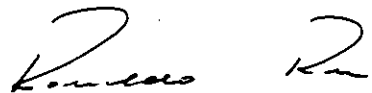
Produção experimental do antígeno para a prova de imunodifusão em anemia infecciosa equina/Isabella Bias Fortes Ferraz. - Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1990.

69p. : il.-

Tese (Mestrado)

1. Anemia Infecciosa eqdina. 2. Antígenos. I. Título.

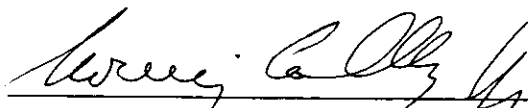
Aprovada em: 12/02/90



PROF. RONALDO REIS
- Orientador -



PROF. RÔMULO CERQUEIRA LEITE



PROF. ROMAIN ROLAND GOLGHER



PROF. ÉLVIO CARLOS MOREIRA

A Deus, aos meus pais,
Cléa e Biazinho, a minha
irmã Danuza e ao meu ma-
rido Amadeu,

dedico.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos Professores: Ronaldo Reis, Rômulo Cerqueira Leite, Paulo César Peregrino e Romain Roland Golgher, pela amizade e orientação.

Às colegas Tetê e Zélia, pela solidariedade e amizade.

Ao Amadeu, pelo estímulo, compreensão e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao LANARA que, na pessoa do seu então Diretor Técnico Dr. Roberto Joviano, me liberou para o curso de Pós-Graduação. Aos colegas, da mesma entidade, que me auxiliaram neste trabalho, Aládio e Ricardo, e ao Sr. Oswaldo, pela dedicação aos animais.

A Polícia Militar do Estado de Minas Gerais, pela doação dos cavalos.

A Dra. Olga e Esperanza pela amizade e conhecimentos adquiridos durante a minha permanência no ICA, Bogotá.

Aos colegas dos cursos de Mestrado: Roberto, Gilmar, Chico, Hamilton, Arthur e Daniel, pelo companheirismo e agradável convivência.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva: Marília, Ricardo Reis, Valéria, Nádia Cunha, Doracy, Nádia Silva, Olívia, Toninho, Luiz André, Ailton, Cleuza, Joãzinho, Tião, Agostinho, Sandra, Ricardo Canesso, Beth, Nelson, Rima e Claret, pela amizade e colaboração.

Aos alunos do curso de Pós-Graduação Sergio e Andrey pela amizade e colaboração.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Preventiva pelos ensinamentos.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Vírus (ICB): Angela, Ademir, Maria Cristina, Igor, Cláudia Renata, Jacqueline, Glória, Cida, Ilda, Lúcia, Bernadete, Laila, Jener

e Cláudio, pela amizade e colaboração. Ao João, Cássia, Helena e Regina, pela amizade, colaboração e ensinamentos. A Sumika e Ana Luiza pela amizade e valioso auxílio na execução das eletroforeses. Ao Nem pelos gráficos e ao Alex pela constante disposição de ajudar.

Ao Moura e D. Sônia pela dedicação e serviços datilográficos.

Aos funcionários da Biblioteca da Escola de Veterinária da UFMG, pelo auxílio e orientação bibliográfica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelos auxílios financeiros durante a realização do curso.

RESUMO

Foram produzidos experimentalmente dois tipos de antígenos para o diagnóstico por imunodifusão em gel de ágar (IDGA) da Anemia Infecciosa Equina (AIE). O primeiro antígeno foi preparado a partir de baço de cavalos inoculados com a amostra "Wyoming" do vírus. Apresentando um período febril de sete a nove dias, os animais foram sacrificados no 10º dia e os baços foram colhidos assepticamente e congelados a -70°C . A seguir, os baços foram submetidos a vários ciclos de congelamento e descongelamento, tratamento com sulfato de amônia e extração com éter etílico, obtendo-se antígenos parcialmente purificados. A purificação final foi realizada através de cromatografia de afinidade.

O segundo antígeno foi preparado a partir de linhagem celular de derme equina (ED-ATCC-57) na 19ª passagem, persistentemente infectada com a amostra "Wyoming" do vírus da AIE. A linhagem infectada foi mantida por 16 subcultivos sem o aparecimento de alterações morfológicas e o antígeno foi detectado no sobrenadante a partir da quinta passagem. Os meios de crescimento e manutenção das células foram submetidos a dois processos de esterilização: a filtração e a autoclavação. Pode-se observar na pesquisa de antígeno no sobrenadante dos cultivos que, quando foi utilizado o meio autoclavado com 10% de soro fetal bovino, a porcentagem de reações negativas ou fracamente positivas foi de 29,41% e com o meio filtrado foi de 5,88%, no

total. A introdução de células não infectadas foi empregada a partir da oitava passagem, este cocultivo com células persistentes infectadas apresentou resultados favoráveis já na primeira coleta de sobrenadante. A purificação do antígeno a partir do sobrenadante foi realizada através de tratamento com polietilenoglicol 6000, ultracentrifugação com sacarose a 10% e éter etílico. Uma solução de imunoglobulina G parcialmente purificada com ácido caprílico foi preparada a partir de soro positivo para AIE para ser utilizada como referência positiva nos testes de IDGA.

Ambos os antígenos foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida e apresentaram uma banda próxima, ou, na mesma altura do padrão de peso molecular, tripsinogênio bovino (24.000 daltons). Os antígenos foram testados frente ao soro de referência positivo e os que apresentaram títulos mais altos e reações nítidas eram em seguida titulados com a solução de IgG. Escolhidas as diluições ideais para o teste de IDGA os antígenos foram testados frente a 120 soros, sendo 60 positivos e 60 negativos. Os resultados obtidos apresentaram uma correlação direta com o antígeno de referência.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Cultivo do vírus da Anemia Infecciosa Equina (AIE) em sistemas celulares.....	04
2.2. Técnicas de diagnóstico sorológico da AIE.....	07
2.3. Imunodifusão em gel de Ágar (IDGA) no diagnóstico da AIE.....	07
2.4. Técnicas de produção de antígeno (Ag) para o teste de IDGA.....	13
2.5. Diagnóstico da AIE no Estado de Minas Gerais....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Obtenção de Ag a partir de baço.....	22
3.1.1. Vírus.....	22
3.1.2. Animais.....	22
3.1.3. Inoculação.....	22
3.1.4. Acompanhamento dos animais.....	23
3.1.5. Sacrifício dos animais.....	23
3.1.6. Processamento do baço e extração do Ag...	23
3.1.7. Purificação do Ag por cromatografia de a- finidade.....	25

3.2. Obtenção de Ag a partir de linhagem celular.....	27
3.2.1. Vírus.....	27
3.2.2. Linhagem celular.....	27
3.2.3. Estoque de células.....	27
3.2.4. Inoculação do vírus.....	28
3.2.5. Subcultivos da linhagem infectada.....	28
3.2.6. Pesquisa do Ag no sobrenadante.....	29
3.2.7. Extração concentração e purificação do Ag.....	29
3.3. Purificação parcial da solução de imunoglobulina G (IgG), para utilização como referência.....	30
3.4. Testes com os Ags.....	30
3.4.1. IDGA.....	30
3.4.2. Titulação em bloco.....	31
3.4.3. Teste frente a soros de campo.....	31
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)....	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Obtenção de Ag a partir de baço.....	34
4.2. Obtenção de Ag a partir de linhagem celular.....	35
4.3. Purificação parcial da solução de IgG, para uti- lização como referência.....	36
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA I - Comparação entre os vários testes sorológicos em Anemia Infecciosa Equina.....	08
TABELA II - Aplicação do teste de imunodifusão em AIE, em equídeos no Estado de Minas Gerais, no período de 1973-1989.....	21
TABELA III - Caracterização dos antígenos para IDGA em AIE obtidos a partir dos baços de cinco cavalos inoculados experimentalmente.....	38
TABELA IV - Titulação de dois antígenos de IDGA em AIE obtidos a partir de baço de cavalo, frente a solução imunoglobulina G (IgG), por imunodifusão em bloco.....	39
TABELA V - Caracterização dos antígenos para IDGA em AIE, obtidos a partir de baço de cavalos, purificados por cromatografia de afinidade...	40
TABELA VI - Comparação entre dois processos de esterelização do meio MEM, através do teste de IDGA, com o sobrenadante dos cultivos de ED persistentemente infectados com o V-AIE, entre a 8ª e a 16ª passagens.....	41

Página

TABELA VII - Caracterização dos antígenos para IDGA em AIE obtidos a partir de linhagem celular ED persistentemente infectada com o V-AIE....	42
TABELA VIII - Titulação de três antígenos para IDGA em AIE obtidos a partir de linhagem celular ED, persistentemente infectada, frente a solução imunoglobulina G (IgG) por imunodifusão em bloco.....	43

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 - Resumo das propriedades fisicoquímicas e biológicas do vírus da Anemia Infecciosa Equina.	06
QUADRO 2 - Comparação entre as técnicas de imunodifusão desenvolvidas por COGGINS & NORCROSS (1970) e NAKAJIMA & USHIMI (1971), para o diagnóstico da AIE.....	10

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Imunodifusão em placa (COGGINS & NORCROSS, 1970). Disposição dos reagentes na placa.....	11
FIGURA 2 - Imunodifusão em lâmina (NAKAJIMA & USHIMI, 1970). Disposição dos reagentes na lâmina.....	11
FIGURA 3 - Resultado da termometria dos cinco cavalos i- noculados com a cepa "Wyoming" do vírus da AIE.....	44
FIGURA 4 - IDGA em lâminas dos Ags experimentais: Pitman- Moore (Referência) (I); 21 (baço) (II); 4 (ce- lular) (III); 5 (celular) (IV) e 12 (celular) (V).....	45
FIGURA 5 - PAGE dos Ags, soro e solução de IgG anti V-AIE. (1) Ag 13 (Baço); (2) Ag 13 pós cromatografia de afinidade; (3) Padrões de peso molecular; (4) Ag 4 (celular); (5) Ag 16 (celular); (6) Soro anti-AIE; (7) Solução IgG anti V-AIE....	46
FIGURA 6 - Perfil de eluição dos antígenos para IDGA em AIE purificados por cromatografia de afinida- de.....	47

1. INTRODUÇÃO

A anemia infecciosa eqüina (AIE) é uma das doenças mais antigas causadas por vírus, tendo sido descrita pela primeira vez na França por LIGNEÉ (1843). Ela afeta exclusivamente os membros da família *Equidae* e apresenta uma distribuição mundial e grande importância econômica, principalmente em regiões pantanosas e quentes. No Brasil a doença foi descrita pela primeira vez por DUPONT et alii (1968), SILVA et alii (1968) e GUERREIRO et alii (1968), nos estados da Guanabara, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul.

O vírus da AIE (V-AIE) é classificado como um lentivírus pertencente a família *Retroviridae* (CHARMAN et alii, 1976), onde também estão incluídos outros vírus que se caracterizam por causar uma infecção persistente, como os vírus da artrite e encefalite de caprinos, o visna-vírus de ovinos, da imunodeficiência de macacos (SIV) e da imunodeficiência humana (HIV). Assim, a AIE tem assumido um papel especialmente importante em patologia comparativa e nos estudos recentes sobre a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), no que diz respeito à avaliação de tratamento e desenvolvimento de possíveis vacinas (MONTELARO et alii, 1988).

A AIE pode-se apresentar nas formas aguda, subaguda, crônica e principalmente inaparente ou assintomática (ISSEL & COGGINS, 1979). Os sinais clínicos mais proeminentes são febre

recorrente, anemia, anorexia, rápida perda de peso e edema ventral.

A transmissão da AIE ocorre por quatro vias principais: pela placenta e pelo colostro de éguas com altos títulos de vírus; através de tabanídeos que sugam sangue em animais com a forma aguda da AIE, sendo esta uma transmissão puramente mecânica; pela transferência de sangue infectado em agulhas e instrumentos cirúrgicos (COGGINS, 1981). A transmissão da AIE a partir de portadores assintomáticos não é considerada importante no aparecimento de surtos. (ISSEL et alii, 1982 e COGGINS, 1984).

A infecção persiste por toda a vida do animal e os ataques febris cíclicos sugeriram aos primeiros pesquisadores uma ausência ou comprometimento da resposta imune. No entanto, vários testes têm demonstrado a presença de anticorpos (Ac) anti V-AIE e também de resposta imune mediada por células (REIS, 1984).

Considerando-se a alta prevalência de portadores assintomáticos, o diagnóstico clínico não conclusivo da AIE e a possibilidade de confundir com outras doenças como as tripanosomíase, piroplasmose, leptospirose, hepatites e endorparasitoses, o diagnóstico de laboratório assume um decisivo papel no controle e prevenção da AIE.

A técnica mais utilizada em todos os países para o diagnóstico da AIE é a prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Esta é uma prova de precipitação (OUCHTERLONY, 1968), que foi adaptada por COGGINS & NORCROSS (1970), utilizando antígeno (Ag) produzido a partir de baço e NAKAJIMA & USHIMI (1971) utilizando Ag preparado em cultura de leucócitos de cavalo. O teste de IDGA é satisfatório na prática, acurado e revela Acs para o V-AIE com uma correlação direta com a viremia prévia, independente da amostra de vírus. Há uma exceção no caso de Acs maternos colostrais adquiridos pelo potro não infectado (COGGINS, 1981).

No Brasil, a IDGA passou a ser usada como teste oficial de diagnóstico em 1974. A partir de então, o "Kit" de

diagnóstico composto de Ag e soro reagente (SR) tem sido importado, representando um grande ônus no controle da doença. A Escola de Veterinária da UFMG vem desde 1973 tentando desenvolver o Ag mas sem resultados satisfatórios.

Segundo dados do Serviço de Defesa Sanitária Animal do Ministério da Agricultura (SERSA) no período de 1974 a 1984, não houve diminuição na porcentagem de equídeos positivos para AIE no Brasil (1,16 - 2,13%). A cada ano, 100.000 a 150.000 soros são testados por IDGA. Se considerarmos que cada soro pertence a um animal, teremos menos de 5% da população de equídeos testada no país. Faz-se, portanto premente a necessidade de desenvolvimento de uma produção industrial, de modo a diminuir ou evitar a importação do "Kit", facilitando assim a execução de testes em um número significativo do rebanho equídeo nacional.

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram: produzir experimentalmente e avaliar o antígeno para a prova de imunodifusão no diagnóstico da AIE a partir de baço de equinos inoculados e cultivo celular de derme equina persistentemente infectada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultivo do vírus da Anemia Infecciosa Equina (AIE) em sistemas celulares

A caracterização do V-AIE demorou a ser feita devido à falta de um método adequado de cultivo e manutenção do vírus. As primeiras tentativas de cultivo do V-AIE foram feitas em várias linhagens como: células de fígado, baço, linfonodos, rins, pulmão e outros tecidos de embriões eqüinos ou de potros (WATANABE, 1960a, 1960b; KOBAYASHI, 1961a), células de medula óssea de cavalo (KOBAYASHI, 1961b), leucócitos de cavalos, células de testículo de coelho, leucócitos de coelho, células de testículo de cavalo, células de bovino (MDBK), células de derme eqüina (E.D.NLB-6), células humanas (HeLa e KB), células de medula óssea de camundongo (MBM), células de rim de cavalo, coelho, cobaio, hamster, camundongo, leucócitos peritoneais de coelho, cobaio, hamster e camundongo e células de embrião de galinha (KOBAYASHI, 1961c; EL-ZEIN et alii 1968; KONO & YOKOMIZO, 1968). Entre todas as linhagens primárias e secundárias acima citadas, apenas as culturas de medula óssea, leucócitos e rim de cavalo (KOBAYASHI, 1961a, 1961b e KONO & YOKOMIZO, 1968) foram capazes de propagar o V-AIE. Apesar das dificuldades de manipulação e manutenção da cultura de leucócitos, devidos a variações individuais dos animais e da alta incidência de herpes

vírus tipo II em eqüinos, KOBAYASHI e KONO (1967) conseguiram com sucesso propagar e titular o V-AIE neste tipo de cultivo. A partir de então foram feitos os primeiros estudos sobre as características físicoquímicas e biológicas do vírus (NAKAJIMA et alii, 1968, 1969a, 1969b, 1969c, 1970; KONO et alii, 1970; USHIMI et alii, 1972) que estão resumidas no QUADRO 1.

MALMQUIST et alii (1973) conseguiram pela primeira vez infectar persistentemente uma linhagem contínua de derme e qüina (ED-ATCC57), possibilitando assim a obtenção de vírus em quantidade suficiente para uma análise bioquímica e imunológica. Até 1976, o V-AIE era relacionado aos vírus RNA oncogênicos principalmente por suas semelhanças com os mixovírus (TAJIMA et alii, 1969; NAKAJIMA et alii, 1974; ITO, 1974). Foi então que CHARMAN et alii (1976), baseados em características como RNA de alto peso molecular, presença de transcriptase reversa e uma composição polipeptídica similar aos retrovírus do tipo C, incluíram o V-AIE na família *Retroviridae*.

Estudos mais profundos sobre as características morfológicas e físicoquímicas do V-AIE foram feitos a partir de culturas de derme eqüina e cultivos primários de rim eqüino infectados com o vírus (MATHEKA et alii, 1976 e WEILAND et alii, 1977). Algumas destas características já permitiam diferenciar o V-AIE dos retrovírus do tipo C. GONDA et alii (1978) sugerem que o V-AIE deva ser incluído na sub família *Lentivirinae* da família *Retroviridae*.

ISHIZAKI et alii (1978) obtiveram o V-AIE a partir de linhagem de pele de mula (EMS) persistentemente infectada e através da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), identificaram a estrutura polipeptídica e glicoprotéica do vírus. Foram identificadas três proteínas não glicosiladas de peso molecular 25.000 (p25), 14.000 (p14) e 11.000 (p11) daltons e duas glicosiladas com 80.000 (gp80) e 40.000 (gp40) daltons. Por imunoprecipitação, demonstraram que Acs positivos para AIE reagem predominantemente com a p25 e em menor amplitude com a p14 e gp80. CHEEVERS et alii (1978) cultivaram o vírus em linhagem

QUADRO 1 - Resumo das propriedades fisicoquímicas e biológicas do vírus da Anemia Infecciosa Equina

- . Tipo de ácido nucléico = RNA mas DNA dependente
 - . Capsídeo-simetria = possivelmente helicoidal
 - . Envelope = possui envelope de aproximadamente 9 nm
 - . Partícula viral = 90-140 nm
 - . Forma da partícula = pleomorfa, predominantemente esférica
 - . Projeções na superfície = possui projeções, menos proeminentes que os mixovírus.
 - . Sensibilidade a solventes lipídicos = sensível ao éter
 - . Estabilidade ao pH = instável em pH alcalino e ácido
 - . Inativação pelo calor = inativado a 56°C por 60 minutos
 - . Sensibilidade à tripsina = resistente
 - . Irradiação ultravioleta = resistente
 - . Densidade = 1,15 g/ml, mas mostra ampla distribuição
 - . Coeficiente de sedimentação = entre 110 e 120 S
 - . Local e modo de formação da partícula = liberada da membrana plasmática por brotamento
 - . Taxa de multiplicação = baixa, requer aproximadamente 20 hs.
-

Fonte: NAKAJIMA (1973).

de derme eqüina (ED) e através de PAGE determinaram que 80% das proteínas estruturais estão representadas por cinco polipeptídeos, sendo duas não glicosiladas, p29 e p13 e três glicosiladas gp77/79, gp64 e gp40. Ainda descreveram oito polipeptídeos menores e de importância desconhecida. PAREKH et alii (1980) utilizaram as linhagens ED e rim de eqüino para propagar o V-AIE e empregando a filtração em gel de hidrocloreto de guanidina e PAGE encontraram quatro proteínas não glicosiladas (p26, p15, p11 e p9) e duas glicosiladas (gp90 e gp45) que, juntas, compreendem 95% do total das proteínas do vírion.

BENTON et alii (1981) conseguiram com sucesso infectar cronicamente cultura de células de cão (CF2Th) e de gato (FEA) com o V-AIE. Através de PAGE e IDGA, o vírus demonstrou identidade com o vírus multiplicado em linhagem ED. Os autores demonstraram pela primeira vez que o V-AIE pode replicar-se em linhagens celulares de espécies diferentes.

2.2. Técnicas de diagnóstico sorológico da AIE

A partir do desenvolvimento das técnicas de cultura de células eqüinas, de medula óssea inicialmente e de leucócitos e derme posteriormente por KOBAYASHI (1961a, b, c) e MALMQUIST et alii (1973), tornou-se possível a preparação de antígenos e a aplicação de técnicas sorológicas no diagnóstico da doença. Em consequência, vários testes sorológicos foram, então, desenvolvidos: fixação de complemento direta (FCD) e indireta (FCI), soroneutralização (SN), imunofluorescência (IF), inibição da hemoaglutinação (IH), hemoaglutinação indireta (HAI), "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA), Imunodifusão em gel de ágar (IDGA), Radioimunoensaio de fase sólida (SPRIA). Uma caracterização sumária desses testes é apresentada na TAB. I.

2.3. Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) no diagnóstico da AIE

COGGINS & NORCROSS (1970) desenvolveram o teste de

TABELA I - Comparação entre os vários testes sorológicos em Anemia Infecciosa Equina

T e s t e s	Referências básicas	Aparecimento de anticorpos (dias)	Persistência dos anticorpos	dos	Especificidade	Localização do Ag.
Fix. complemento direto (FCD)	KONO & KOBAYASHI (1966)	14	62 dias	Grupo-Exp.	Interna (P25)	
Fix. complemento indireto (FCI)	McGUIRE et alii (1971 b)	29	-	Grupo-Esp.	Interna (P15)	
Soroneutralização (SN)	KONO (1969)	45	Todo o curso	Cepa-Esp.	Ext. (Assoc. Envelope)	
Imunofluorescência (IF)	USHIMI et alii (1970) CRAWFORD et alii (1971)	14	?	Grupo-Esp.	Interna (P25)	
Imunodifusão (IDGA)	COGGINS & NORCROSS (1970) NAKAJIMA & USHIMI (1971)	14	Todo o curso	Grupo-Esp.	Interna (P25)	
Inibição da hemaglutinação (IH)	SENTSUI & KONO (1976)	40	270 dias no mínimo	Cepa-Esp.	Ext. (Assoc. Envelope)	
Hemaglutinação indireta (HAI)	SUGIURA & NAKAJIMA (1982)	14	Todo o curso	Grupo-Esp.	Interna (P25)	
ELISA	SUZUKI et alii (1982) GIELKENS & TOMA (1982)	10	?	Grupo-Esp.	Interna (P25)	
SPRIA	HORENSTEIN & FEINSTEIN (1985)	?	?	Grupo-Esp.	Interna (P25)	

Fonte: REIS (1984).

imunodifusão para evidenciar anticorpos precipitantes no soro de cavalos infectados. O teste baseia-se na migração de moléculas de Ag e de Ac em gel de ágar e formação de linhas de precipitação na região onde se encontrarem em proporções equivalentes (REIS, 1984). NAKAJIMA & USHIMI (1971) também descreveram o teste de imunodifusão e mostraram que os Acs apareciam no soro uma a duas semanas após o primeiro ataque febril e persistiam por no mínimo cinco meses.

No QUADRO 2 e nas FIG. 1 e 2 estão relacionados a característica e a disposição dos reagentes nas duas técnicas. A leitura do teste de imunodifusão é feita sob uma fonte de luz intensa, com foco reduzido, contra um fundo escuro, a partir de 24 horas após a execução do teste. O aparecimento ou não de uma linha de precipitação que tenha identidade com o SR irá determinar se o soro teste é ou não positivo (COGGINS & PATTEN, 1970; PEARSON et alii, 1971; COGGINS et alii, 1972; NAKAJIMA, 1974; REIS, 1984).

COGGINS et alii (1972) detectaram Acs precipitantes no soro de 111 pôneis inoculados experimentalmente, o mesmo não ocorreu com o soro de 77 pôneis mantidos como controle. Na maioria dos soros, os Acs foram detectados em torno de três semanas após a inoculação. A relação entre presença de Acs e a infecção com o vírus foi determinada através da inoculação do sangue de 84 cavalos sorologicamente positivos em 84 pôneis, reproduzindo-se a doença. Quando foram inoculados os sangues de 77 cavalos negativos, não ocorreu a infecção nem a produção de Acs. Antissoros preparados contra piroplasmose, vírus da arterite eqüina, aborto eqüino a vírus, peste eqüina africana não reagiram com o Ag de imunodifusão. Baseados em procedimentos estatísticos, os pesquisadores concluíram que o teste possui, pelo menos 95% de precisão para o diagnóstico da AIE. NAKAJIMA & USHIMI (1972) detectaram através do teste de IDGA a presença de Acs precipitantes em cavalos infectados com quatro amostras diferentes do V-AIE, não observando nenhuma diferença na reatividade. Em sete animais, foi pesquisada a presença de Acs no cur-

QUADRO 2 - Comparação entre as técnicas de imunodifusão desenvolvidas por COGGINS & NOR-CROSS (1970) e NAKAJIMA & USHIMI (1971), para o diagnóstico da AIE

	COGGINS	NAKAJIMA
Técnicas		
Características		
Distribuição do Ágar	Placa de Petri 100 mm	Lâminas microscopia 26 x 76 mm
Concentração -	Camada inferior 2% - 5ml	Camada única 0,8% - 4,5ml
Volume do Ágar Noble	Camada superior 1% - 15 ml	
Tampão	Borato pH 8,6	Salina tamponada em fosfato 0,01M pH 7,4
Diâmetro dos orifícios	7mm, distanciados entre si de 3mm	5mm, distanciados entre si de 3mm

IMUNODIFUSÃO EM PLACA (COGGINS e NORCROSS, 1970)

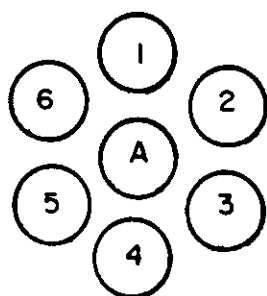


FIG. 1 - Disposição dos reagentes na placa
 1, 3 e 5 - Soros a testar
 2, 4 e 6 - Soro de referência (controle)
 A - Antígeno

IMUNODIFUSÃO EM LÂMINA (NAKAJIMA e USHIMI, 1971)

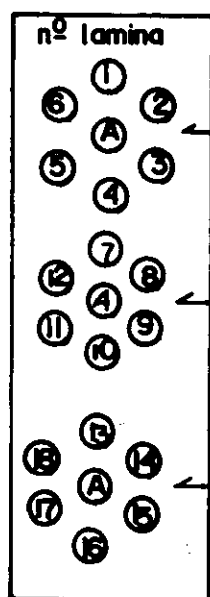


FIG. 2 - Disposição dos reagentes na lâmina
 1, 4, 7, 10, 13 e 16 - Soro de referência
 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17 e 18 - Soros a testar
 A - Antígeno

so da doença. Os Acs começaram a ser encontrados a partir de dois a 10 dias após o primeiro pico febril e permaneceram por mais de um ano. A aplicação da IDGA, ao nível de campo, foi testada por NAKAJIMA et alii (1972a) com 123 soros de animais diagnosticados por critérios clínicos, hematológicos e histopatológicos como positivos para AIE e 1.782 negativos. Dos 123 soros, 78% foram positivos e dos 1.782 soros 1,5% foram positivos por IDGA. Os autores concluíram que a IDGA é um método eficiente o bastante para ser aplicado no diagnóstico da AIE.

A caracterização dos Acs envolvidos na reação de imunodifusão foi feita por NAKAJIMA et alii (1971) e Mc GUIRE (1977). Os Acs precipitantes estão presentes na fração da gama globulina 7S do soro de cavalos infectados, sendo a IgG a principal classe envolvida na reação.

O teste de IDGA apresenta algumas limitações, a saber: cavalos infectados não reagem por IDGA durante o período de incubação. Potros filhos de éguas positivas reagem positivamente, devido à presença de Acs maternos, durante cerca de seis meses.

O aparecimento de Acs precipitantes no soro de animais infectados foi estudado por muitos autores (COGGINS & NORCROSS, 1970; NAKAJIMA & USHIMI, 1971; COGGINS et alii, 1972; NAKAJIMA & USHIMI, 1972; NAKAJIMA, 1973; NAKAJIMA, 1974; NAKAJIMA et alii, 1974), podendo-se considerar que os Acs são detectados inicialmente 14 a 38 dias após a inoculação e persistem por toda a vida do animal (HENSON & Mc GUIRE, 1974; NAKAJIMA, 1974).

Como o teste de IDGA não diferencia Acs passivos de Acs ativos, potros filhos de éguas positivas poderão reagir positivamente pelo teste estando ou não infectados. KEMEN & COGGINS (1972), estudando a transmissão da AIE de éguas infectadas, encontraram potros negativos antes de mamar o colostro e que se tornaram positivos depois, mas nem todos haviam se infectado. BURNS (1974), entre 20 potros filhos de éguas positivas, encontrou 18 soros positivos que se tornaram negativos com 65 a 182 dias de idade. Sendo assim, os soros de potros devem ser retes-

tados após seis meses.

Com o reconhecimento internacional de teste de IDGA para o diagnóstico de rotina da AIE, tem havido um esforço para sua padronização, através de "check tests", efetuados periodicamente. Estes "check tests" consistem na comparação dos resultados do teste, obtidos pelos laboratórios participantes, em baterias de 30 soros codificados, enviados por um dos laboratórios de referência (Alfort, Ames). Iniciados em 1977 e realizados em vários países, inclusive no Brasil, tem sido demonstrado uma discordância bem elevada entre os resultados obtidos, relativos aos soros fracamente positivos (REIS, 1984).

2.4. Técnicas de produção de antígeno (Ag) para o teste de IDGA

O antígeno precipitante para imunodifusão foi inicialmente produzido por COGGINS & NORCROSS (1970), a partir de triturado de baço de um pônei inoculado experimentalmente com a amostra "Wyoming" do V-AIE. Cinco dias após a inoculação, o animal apresentou febre, sendo sacrificado no 10º dia. A sensibilidade e especificidade do antígeno foram testados frente a soros de animais sadios e animais inoculados com várias amostras do V-AIE. Segundo os autores, é importante selecionar animais que reajam severamente, apresentando febre três a cinco dias após a infecção. Ags preparados a partir de baços, 18 dias após a inoculação, irão apresentar reações fracas devido aos Acs circulantes.

NAKAJIMA & USHIMI (1971), utilizando processos de purificação como ultracentrifugação e cromatografia de troca iônica, obtiveram um antígeno purificado a partir de cultura de leucócitos infectada com amostra p337 do V-AIE. Testes feitos com soros de animais inoculados experimentalmente com amostras antigenicamente diferentes demonstraram que todos reagiam com o Ag, evidenciando-se, assim, a presença de componentes grupo específicos no vírus. O antígeno produzido foi submetido aos tra

tamentos: éter, congelamento, descongelamento e homogeneização por mais de 10 vezes. O antígeno purificado mostrou o mesmo padrão de reatividade que após os tratamentos.

HENSON et alii (1971), além de congelar e descongelar fragmentos de baços de animais inoculados experimentalmente, utilizaram triclorofluoretano e precipitações com soluções saturadas de sulfato de amônia para produzir Ag de imunodifusão. Os antígenos foram testados frente a 110 soros de animais entre negativos e soros de animais inoculados experimentalmente com diferentes amostras de vírus. Apenas 12 entre 83 soros de animais inoculados não reagiram com os Ags, sendo 10 colhidos com 14 dias de inoculação e dois com 14 e 25 dias.

Na França, TOMA et alii (1971) também desenvolveram o Ag inoculando quatro eqüinos com a amostra "Wyoming". Foram feitos vários ciclos de congelamento e descongelamento seguidos de trituração e ultracentrifugação. Foi feita também uma titulação do Ag e do soro de referência para padronização. Este Ag resistiu ao tratamento com éter, clorofórmio e tripsina, diminuindo a sua atividade após ação da papaína e desaparecendo a atividade quando submetido a 50°C por 20 minutos ou mais. A primeira caracterização do Ag extraído de baço foi feita por NORCROSS & COGGINS (1971): submetido a uma eletroforese e cromatografia, o antígeno precipitante foi descrito como uma proteína pequena com peso molecular de 27.500 daltons, coeficiente de sedimentação de 2,1 S, densidade de 1,18 e ponto isoelétrico no pH 5,8.

Um antígeno mais concentrado foi preparado por NAKAJIMA & USHIMI (1972), a partir de cultura de leucócitos. O antígeno foi concentrado em cem vezes por ultracentrifugação, tratado com éter e demonstrou antigenicidade igual ao vírus purificado. Não foi observada diferença nos soros de animais infectados com diferentes amostras do V-AIE e não ocorreu reação quando testado frente a soros de animais infectados com os vírus da rinopenumonite e influenza eqüina.

BOULANGER et alii (1972), utilizando processos de ex

tração com éter e acetona, prepararam um antígeno a partir de baço e utilizaram o teste de FC para padronização do Ag. CARRIER et alii (1972) compararam 29 partidas de antígenos preparados segundo a técnica acima descrita a partir de 11 baços. Observaram que em cinco baços foi possível obter Ag com boa a ótima atividade antigênica, quatro apresentaram uma fraca atividade e dois não apresentaram atividade mesmo após concentração. Apesar de utilizarem a FC para padronização enfatizam a importância da titulação frente ao soro de referência a ser utilizado no teste, como o melhor método para avaliar o Ag.

A demonstração da identidade antigênica entre o Ag purificado a partir de cultura de leucócitos e o Ag extraído de baço foi feita por NAKAJIMA et alii (1972b), comparando-os por imunodifusão frente ao soro controle positivo.

UEDA et alii (1973) também compararam os Ags produzidos a partir de baço e de cultura de leucócitos. Utilizando filtração em Sephadex G100 e imunoeletroforese, observaram que o Ag derivado de baço era uma molécula menor do que o Ag derivado de cultura de leucócitos, mas que possuíam determinantes antigênicos em comum.

O tiocianato foi empregado para extrair Ag de baço por HART & BROSSARD II (1973). Por processos de congelamento e descongelamento, muitos baços não se mostraram como boas fontes de Ag. Após tratamento com tiocianato, a recuperação de Ag aumentou significativamente, mesmo nos baços considerados inadequados para a produção de Ag. A concentração de tiocianato recomendada (0,5 M) não afetou a reatividade do Ag.

Com um simples processo, que incluía ultracentrifugação, tratamento com éter e Tween 80, NAKAJIMA et alii (1973) conseguiram obter um volume considerável de Ag (20 ml) a partir de 3000 ml de sangue de cavalo. Este Ag apresentou um título por IDGA de 1:32, considerado excelente pelos autores. Ainda no mesmo trabalho foi preparado Ag a partir de soro, fígado, baço, pulmão, medula óssea, rins linfonodos, timo e músculo cardíaco de um cavalo inoculado experimentalmente. Os melho

res resultados foram obtidos com baço e fígado.

Com os objetivos de eliminar o risco de contaminação com outros vírus e a variação individual dos doadores de leucócitos e de baços, MALMQUIST et alii (1973) desenvolveram, pela primeira vez, o Ag a partir de linhagem contínua. Uma linhagem de derme eqüina (ED-ATCC57) foi infectada com a amostra "Wyoming" do V-AIE e replicada a cada cinco a dez dias. Foram preparados dois tipos de Ag, um a partir das células e outro a partir do sobrenadante dos cultivos. O sobrenadante, que demonstrou ser a melhor fonte de Ag, foi tratado com polietileno glicol (Peso Molecular = 20.000, 6.000 ou 4.000) e com éter. As diluições, quando necessárias, eram feitas com tampão borato pH 8,6. A concentração relativa dos Ags foi determinada por IDGA com o soro de referência e por imunodifusão radial. Durante o período (25 passagens) em que a linhagem persistentemente infectada foi replicada, não foi observado nenhuma mudança significativa na taxa ou padrão de crescimento das células, assim como não foi observado o aparecimento de efeito citopático. A liberação de Ag no sobrenadante ocorreu entre o sexto ao oitavo dia após o replique das células persistentemente infectadas.

MALMQUIST & BECVAR (1975) identificaram, por IDGA e imunodifusão radial, a presença de dois componentes antigênicos diferentes, quando compararam o Ag produzido a partir de sobrenadante e a partir das células dermais persistentemente infectadas.

KONO (1976) também desenvolveu o Ag para IDGA a partir de cultivo celular, só que usando uma cultura de células de rim de cavalo. A linhagem persistentemente infectada com o V-AIE era replicada a cada sete dias e o sobrenadante concentrado com 6 a 8% de polietileno-glicol (PM = 6.000) ou por ultracentrifugação. O título do Ag foi determinado por IDGA e FC e demonstrou o mesmo padrão de reatividade do Ag preparado a partir de cultura de leucócitos quando testados frente a 111 soros.

HART et alii (1976) empregaram pela primeira vez a

cromatografia de afinidade com o objetivo de purificar o Ag produzido a partir de baço. Testaram ainda a estabilidade do Ag em diferentes pH e determinaram o peso molecular do Ag purificado. Um Ag parcialmente purificado pelo método descrito por HART & BROUSSARD II (1973) teve o seu pH ajustado para 4,5 e foi precipitado com solução saturada de sulfato de amônia. Após conjugação com Sepharose 4B ativada com CNBR* já ligada ao Ac anti V-AIE, o Ag purificado foi eluído da coluna com o tampão fosfato 0,1 M, cloreto de sódio 0,15 M e tiocianato 3,0 M pH 7,3, sendo as frações que apresentavam absorvância \geq a 0,1 (leitura em 280 nm) dializadas frente a tampão borato 0,15 M pH 8,7. Após a diálise, as frações eram concentradas com polivinilpirrolidona e testados por IDGA. O Ag purificado tinha concentração final de 0,8 mg/ml e PM de 7.600 daltons e não teve perda de atividade sorológica quando submetido a pH 4,5 a 10,0 durante 24 horas mas em pH 4,0 teve perda parcial e pH 3,0 perda total.

A técnica de purificação por cromatografia de afinidade foi também empregada por SUGIURA & NAKAJIMA (1977) em Ag preparado a partir de cultura de derme eqüina persistentemente infectada com V-AIE. Após concentração com polietilenoglicol (20.000) a 4% o Ag, foi tratado com éter e aplicado à coluna de Sepharose 4B ativada com CNBr 4B*, previamente conjugada com Ac anti V-AIE. O Ag foi eluído da coluna com cloreto de magnésio 5 M e demonstrou estar 50 vezes ou mais purificado do que o Ag inicial. A recuperação do Ag foi completa e, para comprovar o seu grau de pureza, foi testado frente a soro anti-bovino, considerado o maior contaminante no Ag inicial, não sendo observada nenhuma reação por IDGA. Isto indicou que o Ag obtido por cromatografia de afinidade estava livre de soro bovino. Para pesquisar a influência do soro bovino em antígenos derivados de cultivo celular na formação de linhas de precipitação com alguns soros, GASKIN et alii (1977) testaram vários

* Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Sweden.

soros de animais vacinados com vacinas comerciais contra viroses eqüinas. O trabalho demonstrou que as proteínas do soro bovino presentes nas vacinas produzidas a partir de cultura de tecidos induziram o aparecimento de Acs precipitantes que reagiam com as proteínas de soro bovino, também presentes nos Acs derivados de derme eqüina. Por imunoeletroforese, demonstraram que os principais componentes do soro bovino que reagiam com Acs eram a albumina e várias globulinas.

Utilizando uma amostra do V-AIE isolada na Argentina (Cepa MAG-78), PAULI et alii (1982) inocularam cinco eqüinos e cultivos primários de células renais de feto eqüino para produção do Ag. Com o sobrenadante dos cultivos ultracentrifugados e tratados com éter, não conseguiram obter Ag precipitante. A partir dos baços foi feita uma purificação parcial que compreendia: congelamento e descongelamento, centrifugação, precipitação com solução saturada de sulfato de amônia, diálise frente a tampão pH 5,0 e concentração com triton 0,1%. Foi possível, assim, obter um Ag de ótima qualidade. Uma maior purificação foi obtida por cromatografia de afinidade onde os autores empregaram a mesma metodologia descrita por SUGIURA & NAKAJIMA (1977). O Ag purificado apresentou um baixo conteúdo protéico inespecífico e excelentes perfis de identidade com os padrões internacionais.

NAKAJIMA¹, em uma revisão sobre virologia, sorologia e diagnóstico da AIE, afirma que uma ótima relação Ag/Ac deve ser conseguida no teste de imunodifusão. Para isto o Ag deverá possuir uma concentração tal que possa ser ajustado para oito unidades (diluição 1:4) antes de ser utilizado frente a soros de campo. Relaciona ainda as qualidades que um Ag precipi-

¹ NAKAJIMA, H. Equine Infectious Anemia. Recent research on the virology, serology and diagnosis. Comunicação Pessoal. 1984. Tsukuba-Gun, Japan (National Institute of Animal Health, Kamondai 3.1.1, Yatabe-machi, Tsukuba-Gun Ibaraki-Ken, Japan-30b).

tante para o diagnóstico da AIE: 1) o Ag deve ser idêntico em sua reatividade ao Ag preparado a partir de V-AIE, altamente purificado; 2) deve reagir identicamente contra as amostras de soro de cavalos infectados com qualquer amostra de V-AIE; 3) formar somente uma linha distinta de precipitação contra o soro de referência positivo; 4) reagir com qualquer amostra de soro que contenha Acs precipitantes, variando de alta a baixas taxas de título; 5) não mostrar qualquer reação específica contra amostras de soro de cavalos não infectados.

BOUILLANT et alii (1986) conseguiram adaptar o V-AIE a linhagem celular de timo de cão (CF2Th-ATCC-CRL 1430) e obter Ag por 100 passagens seriadas. Baseados nas pesquisas de BENTON et alii (1981), que conseguiram infectar linhagens celulares tumorais originárias de cão e de gato, estes pesquisadores demonstraram que seria possível produzir grande quantidade de Ag a partir de uma linhagem infinita e persistentemente infectada. A pesquisa do vírus nas células era feita por imunofluorescência, microscopia eletrônica e imunodifusão, não sendo observada nenhuma alteração morfológica celular e nem o aparecimento de efeito citopático.

2.5. Diagnóstico da A.I.E. no Estado de Minas Gerais

A AIE foi diagnosticada pela primeira vez no Estado de Minas Gerais por BATISTA & FONSECA (1971) em um cavalo da raça PSI de sete anos de idade, através de exames clínicos, laboratoriais e inoculação em equino sadio.

Os trabalhos de diagnóstico por IDGA foram iniciados em novembro de 1973 no departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG. No Brasil a IDGA foi reconhecida como teste oficial de diagnóstico em 1974.

REIS (1974) pesquisando o título de Acs precipitantes em 63 amostras de soros positivos à IDGA e colhidos a cam-

po, em Minas Gerais, encontrou o máximo de 1:28. Mais de 40% dos títulos estavam entre 1:32 e 1:128.

O SERSA controla desde 1974 os laboratórios credenciados a executar o teste de IDGA para AIE. Na TAB. II estão relacionados os dados relativos a aplicação da IDGA no Estado. Os dados de 1989 foram computados até o mês de agosto e em 17 anos foram testados 288.645 soros sendo 2.914 positivos para AIE.

TABELA II - Aplicação do teste de imunodifusão em AIE, em eqüideos, no Estado de Minas Gerais, no período de 1973-1989

A n o	Total de testes	Positivos	% positivos
73	147	19	12,9
74	1.777	133	7,48
75	2.534	26	1,0
76	2.773	09	0,32
77	5.144	39	0,76
78	6.690	09	0,13
79	10.252	210	2,05
80	14.317	275	1,92
81	12.808	193	1,51
82	16.864	130	0,77
83	20.377	332	1,63
84	24.091	182	0,75
85	30.062	329	1,09
86	44.945	559	1,24
87	39.604	266	0,67
88	31.764	134	0,42
89	24.496	69	0,28
Total	288.645	2.914	1,01

* Fontes: REIS (1984) e SERSA - Ministério da Agricultura

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção de Ag a partir de baço

3.1.1. Vírus

Foi utilizado, como fonte de vírus, sangue infectado com a amostra "Wyoming" do V-AIE cedido pelo Dr. L. Coggins. Foram feitas passagens (de número desconhecido) em eqüinos jovens e negativos para AIE pelo teste de IDGA. O sangue foi mantido a -70°C até o momento da inoculação.

3.1.2. Animais

Foram doados pela Polícia Militar do Estado cinco cavalos com idade variando de seis a dezoito anos. Os animais eram mantidos em baias teladas na cavalaria do Laboratório Nacional de Referência Animal - Divisão Técnica - Pedro Leopoldo - MG e, ao chegar, foram vermifugados e testados para AIE, através da prova de IDGA. Durante um período mínimo de cinco dias era feito o controle térmico dos animais, com a tomada de temperatura pela manhã e à tarde, com a finalidade de determinar a curva térmica normal de cada animal.

3.1.3. Inoculação

Foi feita a inoculação intra-venosa, com um volume

de 100-150 ml de sangue infectado, previamente desfibrinado, congelado e descongelado três vezes e centrifugado a 1500g por 15 minutos. O sobrenadante era utilizado como inóculo.

3.1.4. Acompanhamento dos animais

Diariamente era feita uma observação no quadro clínico dos animais, assim como termometria, pela manhã e à tarde. Os animais foram mantidos por um período que variou de nove a onze dias dependendo da apresentação de pico febril (temperatura $\geq 39^{\circ}\text{C}$).

3.1.5. Sacrifício dos animais

O sangue dos cavalos era colhido em erlenmeyer de dois litros, contendo pērolas de vidro para desfibrinar. Em seguida, eram injetados 6 ml de adrenalina por via endovenosa na diluição de 1:100. Passados 30 minutos os animais eram sacrificados por eletrocução (110 volts).

Após o sacrifício o abdômen era aberto e o baço colhido assepticamente e transportado em isopor para o laboratório.

3.1.6. Processamento do baço e extração do Ag

No laboratório, o baço era fragmentado em pedaços de 50 a 100 g, embalado em sacos plástico e armazenado a -70°C .

Fragmentos contendo um total de 85 a 180 g eram congelados (-70°C) e descongelados (37°C) no mínimo dez vezes antes de iniciar a extração. Em seguida era retirada a cápsula do baço, com auxílio de pinça e tesoura e os fragmentos picados até formar uma massa homogênea.

Baseada na técnica descrita pelo Instituto Columbia no Agropecuário*, foi feita a extração do Ag com algumas modi-

* Instituto Colombiano Agropecuário, Bogotá. Purificação de antígenos especiais: Anemia Infecciosa Equina (AIE), a partir de bazo equino.

ficações, compreendendo:

. trituração e homogeneização em liquidificador, com pequenas quantidades de tampão borato pH 8,6 (1,0 ml/g de baço), três ciclos de três minutos, interclados com resfriamento durante cinco minutos a -70°C ;

. a seguir, a suspensão de baço foi submetida a dois ciclos de congelamento (-70°C) e descongelamento (37°C);

. centrifugação a 16.300 g por 15 minutos a 4°C ;

. o sobrenadante era tratado com éter etílico (um volume para dois volumes de sobrenadante) e mantido sobre agitação magnética por 24 horas a 4°C ;

. após 24 horas o éter era extraído com auxílio de uma bomba de vácuo, com 600 mm Hg de pressão, intercalando-se com agitação magnética;

. extraído o éter, completamente, a suspensão de baço era centrifugada a 12000 g por 15 minutos a 4°C ;

. o sobrenadante era precipitado com solução saturada de sulfato de amônia, na proporção de 50%, gota a gota, e deixando em agitação por uma hora a 4°C ;

. centrifugação da suspensão a 12000 g por 15 minutos a 4°C e reconstituição do sedimento com tampão borato pH 8,6;

. segundo tratamento com solução saturada de sulfato de amônia, na proporção de 45%, deixado em agitação por uma hora a 4°C ;

. a suspensão era centrifugada a 1020 g por 30 minutos a 4°C ;

. reconstituiu-se o sedimento para a metade do volume inicial com tampão borato pH 8,6. A suspensão resultante era dializada frente a solução salina 0,15 M a 4°C até a completa eliminação do sulfato de amônia;

. concentrava-se com polietilenoglicol (PEG-6000) se

guido quando necessário de centrifugação a 27.000 g por 30 minutos a 4°C.

3.1.7. Purificação do Ag por cromatografia de afinidade

Devido ao alto conteúdo protéico inespecífico do Ag extraído de baço, foi empregada a técnica de purificação por cromatografia de afinidade com sepharose 4 B ativada com CNBR*, compreendendo as seguintes etapas:

. purificação de imunoglobulinas a partir de um soro forte positivo para AIE, com título 1:32 por IDGA: foi empregada a técnica de purificação de imunoglobulinas descrita por LIMA & SILVA (1970) utilizando DEAE-celulose. Após a recuperação das imunoglobulinas era feita a determinação da concentração protéica pelo método de Lowry, modificado por HARTREE (1972). Em cada dosagem foi utilizada uma solução padrão de albumina que representava o ponto médio na curva de calibração. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro**;

. preparação do gel - a sepharose ativada foi hidratada com ácido clorídrico 1 mM e lavada com tampão de ligação (tampão borato pH 8,6) segundo a técnica descrita por PHARMACIA FINE CHEMICALS (1974);

. conjugação do gel à solução de imunoglobulinas - a solução de imunoglobulinas foi dializada frente a tampão borato pH 8,6 e em seguida ligada ao gel numa proporção de aproximadamente 20 mg por grama de gel, dissolvida em tampão borato pH 8,6. Foram em seguida mantidos sob agitação por 18 horas a 4°C;

. bloqueio dos sítios ativos residuais - após centrifugação a 120 g por 15 minutos à temperatura ambiente era

* Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden.

** Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan/Modelo UV-240.

feito o bloqueio com etanolamina* (2 amino etanol) 1 M pH 9,0, sob agitação a 4°C durante duas horas. Em seguida, o gel era lavado por dois a três ciclos consecutivos com tampão borato pH 8,6, cloreto de sódio 0,5 M e tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,0, cloreto de sódio 0,5 M;

. preparação da coluna - em uma seringa plástica medindo 9,5 cm de altura por 2,0 cm de diâmetro interno foram colocados de 5 a 10 ml de gel. A coluna assim preparada foi armazenada a 4°C até o momento de uso;

. aplicação do Ag - após dosar a concentração proteica do Ag, este era aplicado à coluna na proporção de 4 a 10 mg por ml de gel e deixado durante 18 horas a 4°C;

. eluição do Ag - era feita utilizando-se os seguintes tampões: tampão fosfato 0,01 M pH 6,5; tampão fosfato 0,01 M pH 4,5; tampão cloreto 0,06 M pH 2,0; tampão fosfato 0,01 M pH 7,5; tampão Tris 0,01 M pH 8,0; tampão Tris 0,01 M pH 10,0. Todos os tampões possuíam cloreto de sódio 0,15 M. Os tampões eram aplicados até que a densidade ótica a 206 nm fosse praticamente nula. Eram colhidas frações de 2 ml em um fluxo de 30 ml/hora a temperatura ambiente. As frações cujas densidades óticas fossem maior do que 0,01 eram reunidas, dializadas frente à salina tamponada (PBS) e concentradas com PEG6000 até obter-se, no teste de IDGA, uma linha de precipitação. Em um experimento piloto foi determinado o pico de eluição do Ag purificado e a partir de então, apenas as frações que eluíam neste pico eram colhidas. As frações reunidas e dializadas passaram a ser liofilizadas e reconstituídas com o volume mínimo necessário para o aparecimento de linhas de precipitação. Uma vez demonstrada a presença do Ag por IDGA, este era diluído ao dobro e testado frente aos soros de referência, negativos e positivos.

. recuperação do gel - tampão Tris 0,1 M pH 8,5, tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,5, ambos com cloreto de sódio

* Ridel-de Haen.

0,5 M foram aplicados em um volume de dez vezes o volume do gel. O gel foi armazenado com tampão borato pH 8,6 cloreto de sódio 0,5 M a 4°C.

3.2. Obtenção de Ag a partir de linhagem celular

3.2.1. Vírus

A amostra utilizada foi a cepa "Wyoming", originária de sangue de pôneis com a forma típica da doença, adquirida junto à American Type Culture Collection (ATCC)* sob o número 778, tendo sido replicada em linhagem celular de derme eqüina por 20 vezes, com título de 10^5 TCID₅₀/ml.

3.2.2. Linhagem celular

Foi utilizada a linhagem celular-Equine Dermis (ED)-ATCC-57*, recebida na 14ª passagem, com um número estimado de $2,1 \times 10^6$ células.

3.2.3. Estoque de células

Após o descongelamento da linhagem ED foram feitos três subcultivos consecutivos até o primeiro congelamento na 17ª passagem com a concentração de $3,0 \times 10^6$ células por ml.

Meio de crescimento das células - foi utilizado o meio mínimo Essengial Eagle (modificado) - MEM** com 10% de soro fetal. Meio de manutenção das células MEM com quantidades de crescentes de soro fetal até as últimas passagens mantidas sem soro fetal. Foram acrescentados aos meios glutamina - 584 mg, penicilina G potássica - 200.000 UI, sulfato de estreptomicina

* American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA.

** Interlab - Distribuidora de Produtos São Paulo - SP.

- 200 mg e fungizona - 0,5 mg por litro de meio.

3.2.4. Inoculação do vírus

Na 19ª passagem da linhagem ED, com um número estimado de $4,0 \times 10^5$ células, foi feita a inoculação de 0,3 ml do vírus em garrafa de 5,0 x 5,5 cm, deixado adsorver por uma hora a 37°C. Após este período, a monocamada foi lavada com PBS e acrescentado o meio MEM contendo 3% de soro fetal. Paralelamente, foi mantido um controle.

O cultivo infectado e o controle foram mantidos por um período de 13 dias a 37°C, com observações diárias. Após este período foi feito o primeiro subcultivo da linhagem celular já infectada.

3.2.5. Subcultivos da linhagem infectada

Foram feitos subcultivos semanais da linhagem ED infectada. O sobrenadante colhido era fracionado para teste.

A partir do oitavo subcultivo da ED infectada, foram introduzidos três novos procedimentos:

- . diferenciação dos meios para crescimento e manutenção das células em filtrado e autoclavado segundo YAMANE et alii (1968);

- . duas coletas de sobrenadante - uma com o meio de crescimento, contendo 10% de soro fetal, sete a oito dias após o repique. Outra, quatorze dias após o repique, quando era utilizado o meio de manutenção;

- . introdução de células não infectadas no sistema (cocultivo), a partir do nono subcultivo para impedir que a contínua passagem da linhagem ED infectada pudesse alterar a taxa de crescimento do cultivo.

Foram mantidas também linhagens persistentemente infectadas sem cocultivo assim como um controle de células não infectadas.

3.2.6. Pesquisa do Ag no sobrenadante

Baseado na técnica descrita por AMBOROSKI et alii (1979), foi feita a pesquisa de Ag nos sobrenadantes colhidos após o terceiro subcultivo da linhagem ED infectada. Era retirada uma alíquota para teste e o restante armazenado em freezer a -10°C .

A técnica compreendia:

Um volume de 10 ml era tratado com uma solução de PEG 6000 a 40% e deixado em repouso por 18 horas a 4°C . A suspensão era a seguir centrifugada, 12.000 g durante 30 minutos a 4°C e o sedimento ressuspensão em 0,4 ml de tampão borato pH 8,6. Um volume igual de éter etílico era adicionado à suspensão e mantidos sob agitação durante 18 horas a 4°C . A remoção do éter foi feita utilizando-se uma bomba de vácuo com pressão de 600 mm Hg. A suspensão resultante era testada por IDGA frente ao soro referência.

3.2.7. Extração, concentração e purificação do Ag

A obtenção do Ag a partir da linhagem ED infectada foi baseada na técnica descrita por MONTELARO et alii (1982) para obtenção das proteínas virais, com algumas modificações.

Eram utilizados entre 380 a 500 ml de sobrenadante de diferentes passagens. Um tratamento com uma solução a 40% de PEG 6000 era feito durante 18 horas a 4°C . Seguia-se centrifugação a 12.000 g durante 70 minutos. O sedimento era ressuspensão em tampão borato pH 8,6 para um volume 50 vezes menor do volume original. A suspensão concentrada era submetida a ultracentrifugação (39.000 g) em uma solução de sacarose a 10% durante duas horas a 4°C . O sedimento, suspenso em tampão fosfato 1 mM pH 7,2 era tratado com éter etílico, na proporção de 1:10, sob agitação constante, 45 minutos a 4°C . O éter era removido com auxílio de uma bomba de vácuo e a suspensão armazenada a -70°C até a realização dos testes.

3.3. Purificação parcial da solução de Imunoglobulina G (IgG) para utilização como referência

O soro de um cavalo positivo para AIE pelo teste de IDGA foi utilizado para purificação de imunoglobulinas. A partir da técnica descrita por McKINEY & PARKISON (1987), com algumas modificações, foi feita a purificação conforme descrito a seguir:

Foi ajustada a concentração protéica do soro para 70 mg/ml com H₂Odd e em seguida aquecido a 56^oC durante 15 minutos. Centrifugado a 650 g durante 15 minutos, o sobrenadante teve o seu pH ajustado para 4,5 com ácido acético 0,1 M. A precipitação das proteínas do soro foi feita com ácido caprílico*, adicionado gota a gota, a 8,7% sob agitação vigorosa durante 30 minutos a 4^oC. A suspensão foi em seguida centrifugada a 16.300 g por 30 minutos a 4^oC e o sobrenadante dializado frente a salina 0,85% ou PBS durante 18 horas. A solução foi a seguir precipitada com sulfato de amônia a 45%, sob agitação durante 30 minutos a 4^oC. O precipitado foi centrifugado a 5.000 g por 15 minutos a 4^oC e o sedimento ressuspenso com PBS para 10% do volume original. A suspensão resultante foi dializada frente a PBS, durante 18 horas a 4^oC e centrifugada a 5000 g a 4^oC. O sobrenadante colhido foi testado por IDGA e concentrado com PEG 6000. Foi feito ainda um PAGE do soro e da solução de IgG resultante. A padronização com os Ags foi feita pela titulação em bloco.

3.4. Testes com os Ags

3.4.1. IDGA

Baseado nas técnicas descritas por COGGINS & NORCROSS (1970) e NAKAJIMA & USHIMI (1971), REIS¹ adaptou as duas téc-

* Ridel.

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - EV/UFMG.

nicas, resultando:

. Preparação do Ágar Noble* a 1% - era dissolvido em tampão borato pH 8,6, sob fervura durante 30 minutos.

. Preparação das lâminas - lâminas de microscopia comuns (26 x 76 mm) isentas de arranhaduras e mantidas em solução álcool-éter (50%) eram usadas para distribuição de 4,5 ml do ágar. Após solidificação, o ágar era perfurado com furador composto de sete orifícios, sendo um central e seis periféricos ao redor, em círculo. Os orifícios distam 3 mm um do outro e possuem de 3,5 a 4,0 mm de diâmetro. Eram feitos três conjuntos de perfurações por lâmina. Após a remoção do ágar, com o auxílio de uma bomba de sucção, as lâminas eram mantidas em câmaras úmidas a 22-25°C.

. Teste dos antígenos - os Ags eram diluídos ao dobro em tampão borato pH 8,6 até a diluição 1:16 e testados frente ao soro reagente**, soros negativos e soros positivos.

A leitura das lâminas era feita 24, 48 a 72 horas após, com auxílio de uma fonte de luz indireta.

3.4.2. Titulação em bloco

Para padronizar o Ag e a IgG anti V-AIE (a ser utilizada como referência nos testes), foram feitas diluições da IgG de 1:2 até 1:128 e dos Ags até 1:32. Em lâminas preparadas conforme o item 3.4.1., as diluições da IgG foram distribuídas nos orifícios centrais e as diluições dos Ags, nos orifícios periféricos. Foram escolhidas as diluições de Ag e IgG que formaram linhas mais claras e nítidas tanto frente a altas quanto a baixas diluições.

3.4.3. Teste frente a soros de campo

Padronizadas as diluições do Ag com a IgG, foi feito

* Difco Laboratories - Detroit. Michigan-USA

** "Kit" de diagnóstico - Pitman-Moore-Inc. Washington crossing, PVJ.,USA.

o teste de IDGA frente a soros de campo. Foi escolhida uma bateria de 120 soros, dentre os soros recebidos pelo Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária, para o diagnóstico de AIE. Esta bateria era composta de 60 soros negativos e 60 soros positivos. Entre os últimos, havia uma variação de fracos, positivos e fortemente positivos, estando também incluído o soro internacional de referência (S.I.R.), fornecido pela Universidade de Alfort na França. À leitura o soro referência (IgG anti V-AIE) formou uma linha de precipitação visível, equidistante do Ag e os soros positivos formaram linhas de identidade com a do soro de referência. Quando a linha de referência continuou em direção ao soro teste sem se curvar, este foi considerado negativo. Soros com reações fracas não foram identificados antes de 48 horas, podendo aparecer apenas um ligeiro desvio para dentro da linha de referência, em direção ao soro teste. Em soros com altos títulos, a reação apareceu apenas como uma faixa clara de precipitação, neste caso a linha de referência terminou no meio do seu trajeto normal. Reações fracas e duvidosas foram retestadas.

3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

Os Ags obtidos a partir de baço, cromatografia de afinidade e linhagem ED infectada foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida.

O PAGE em presença de duodecilsulfato de sódio (SDS) foi realizado segundo LAEMMLI (1970) em placas de vidro medindo 21 cm de largura com um espaço de 1,5 mm entre as mesmas. Os geis de separação contínua e de empilhamento foram usados nas concentrações 12,5% e 5% respectivamente.

Utilizou-se um pente para moldar o gel de empilhamento com 11 escaninhos (6 mm x 0,8 mm) onde as amostras foram aplicadas. As preparações foram diluídas (volume a volume) em tampão de amostra: Tris hidroximetil aminometano (Tris) 0,025 mM pH 6,8; SDS 2%; glicerol 10%; beta mercaptoetanol 2,4%, e azul de bromofenol 0,6%.

O volume aplicado foi de 50 μ l. Os seguintes padrões de proteína foram utilizados: lisozima, ovo (14.300), beta-lactoglobulina, bovina (18.400), tripsinogênio, bovino (24.000), albumina, ovo (45.000), albumina, bovina (66.000)*.

O tampão de corrida (glicina 4,4%; Tris 3% e SDS 0,5%) foi diluído a 1:10 no momento de uso. As corridas duravam cinco a seis horas, com voltagem constante (100 volts) em temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi fixado em metanol 40% e ácido acético 10% por 30 minutos e 10% de metanol e 5% de ácido acético durante 12 a 18 horas. Foi corado pelo método da prata, segundo MERRIL et alii (1981).

* Sigma Chemical Company - Saint Louis, Missouri, USA.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção de Ag a partir de baço

Na FIG. 3, estão demonstradas as curvas térmicas dos cinco cavalos inoculados com o V-AIE. Os animais foram sacrificados um dia após terem apresentado o pico de temperatura, e os baços foram extraídos para produção do Ag.

Na TAB. III estão caracterizados os Ags produzidos a partir dos cinco baços utilizados, relacionando-se o peso dos fragmentos com o volume final obtido. O título dos Ags foi determinado comparando-se diluições dos Ags frente ao SR e a classificação foi feita baseada na nitidez das linhas de precipitação.

Os Ags 21 e 23 que apresentaram reação classificada como excelente, foram titulados frente a IgG purificada, para padronização. Os Ags foram padronizados na diluição 1:2 e a IgG na diluição 1:16. Os resultados da titulação dos dois Ags estão na TAB. IV. O teste dos Ags 21 e 23 frente aos 120 soros apresentou o mesmo resultado obtido com o Ag de referência, inclusive com o S.I.R. Apenas as linhas de precipitação não foram tão nítidas quanto comparadas com o Ag de referência, o que pode ser observado na FIG. 4. Nos Ags submetidos ao PAGE pode-se observar a presença de uma banda de migração na mesma altura do padrão de peso molecular 24.000. Na FIG. 5 podemos analisar o perfil eletroforético do Ag 13.

Os Ags que foram submetidos a cromatografia de afinidade estão caracterizados na TAB. V. Na FIG.6, está demonstrado um perfil típico de eluição do Ag purificado por cromatografia de afinidade. As frações com densidade ótica a 206 nm que integraram o pico que eluiu com tampão cloreto pH 2,0 foram reunidas e tratadas de acordo com o descrito em materiais e métodos. O Ag purificado apresentou-se claro, límpido e com baixo conteúdo protéico. Todos os Ags purificados demonstraram uma antigenicidade excelente e específica quando testados frente a soros positivos. Na titulação com o SR, obteve-se títulos que variaram de 1:1 a 1:4.

Os Ags purificados apresentaram uma banda de migração difusa, localizada um pouco acima do padrão de peso molecular 24.000. Na FIG. 5 podemos observar o Ag 13 purificado por cromatografia de afinidade.

4.2. Obtenção de Ag a partir de linhagem celular

A linhagem celular ED foi infectada na 19ª passagem e mantida por mais 16 passagens. No total de 35 passagens, não foi observada nenhuma alteração nas células. Após a inoculação do V-AIE, foi mantido um controle com células não infectadas. Nenhum efeito citopático foi observado durante as 16 passagens, mas a contínua replicação do vírus foi confirmada a partir da quinta passagem, pela presença do Ag no sobrenadante das células.

Quando começaram a ser feitas duas colheitas de sobrenadante na linhagem ED persistentemente infectada e os meios utilizados para crescimento e manutenção das células passaram a ser diferenciados em filtrado e autoclavado, pode-se observar algumas diferenças na pesquisa dos Ags por IDGA. Na TAB. VI é feita a comparação entre os meios, baseada na pesquisa do Ag no primeiro sobrenadante colhido entre a oitava e a 16ª passagens. No segundo sobrenadante colhido em cada passagem já com o meio de manutenção e onde a quantidade de soro fetal variou de zero a 5%, não foi observada diferença entre os

dois tipos de meio. Tanto no meio autoclavado quanto no filtrado a porcentagem de reação negativa ou fraco positiva foi de 42,31% e de reação positiva ou forte positiva 7,69%.

O cocultivo, iniciado na nona passagem da linhagem infectada, não alterou a produção do Ag, que continuou a ser detectado no sobrenadante na mesma proporção do cultivo mantido com as células originais.

Na TAB. VII, estão caracterizados os Ags produzidos a partir da linhagem ED persistentemente infectada. Estão relacionados os sobrenadantes que deram origem aos Ags com seus volumes e classificações quando testados frente ao SR. A titulação do Ag obtido foi feita frente ao SR.

Três Ags (4, 5 e 12) que apresentaram título 1:16 quando testados frente ao SR foram titulados frente a IgG purificada para padronização. Os Ags 4, 5 e 12 foram padronizados na diluição 1:4 e a IgG na diluição 1:8. Os resultados da padronização dos três Ags estão apresentados na TAB. VIII.

Os Ags 21 e 23, de baço e 4, 5 e 12 de linhagem celular quando testados frente aos 120 soros apresentaram resultados excelentes. Todos os cinco Ags reagiram frente ao S.I.R. As linhas de precipitação formadas apresentaram-se nítidas e com uma correlação direta com os resultados obtidos com o Ag de referência, conforme observado na FIG. 4.

O PAGE dos Ags demonstrou a presença de 14 a 16 bandas de migração, formando-se em todos uma banda nítida na altura do padrão de peso molecular 24.000. Na FIG. 5 pode-se observar o PAGE dos Ags 4 e 16.

4.3. Purificação parcial da solução de IgG, para utilização como referência

A solução de IgG foi obtida a partir de soro com uma concentração protéica de 82 mg/ml e título por IDGA de 1:4 e apresentou uma concentração final de 116 mg/ml e um título de 1:32.

O PAGE do soro e da IgG estão demonstrados na FIG.

5, onde pode-se observar uma banda difusa localizada entre os padrões de peso molecular 24.000 e 42.000 no escaninho correspondente a IgG parcialmente purificada.

A padronização da IgG parcialmente purificada com os Ags preparados neste experimento está demonstrada nas TAB. IV e VIII. Uma vez padronizada, a IgG foi utilizada como referência nos testes com os 120 soros (FIG. 4).

TABELA III - Caracterização dos antígenos para IDGA em AIE obtidos a partir dos baços de cinco cavalos inoculados experimentalmente

Cavalo número	Antígeno número	Peso/volume*		Volume final (ml)	Título**	Característica da reação
		Antes conc ¹	Pos conc ²			
1	9	NT	1,3	20,0	1:1	Ruim
	12	20,0 ³	0,91	5,5	1:1	Ruim
2	11	NT	2,28	8,0	1:1	Ruim
3	13	3,5	2,3	20,0	1:4	Excelente
	21	7,0	3,5	35,0	1:4	Excelente
	23	4,4	2,2	35,0	1:2	Excelente
4	14	NT	1,4	20,0	1:2	Bom
	16	NT	1,4	20,0	1:2	Bom
5	15	NT	2,10	20,0	1:2	Bom

* = Relação 10 g de baço/ml de Ag.

** = Título frente ao SR.

¹ = Antes de concentrar

² = Pós concentração com PEG-6000

NT = Não testado.

³ = Negativo por IDGA

TABELA IV - Titulação de dois antígenos de IDGA em AIE obtidos a partir de baço de cavalo, frente a solução imunoglobulina G (IgG), por imunodifusão em bloco

Ag	Diluições Ag	Diluições IgG				
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
21	1:1	+++	+++	+++	++	-
	1:2	++	+++	+++	++	+
	1:4	+	+	+	++	+
	1:8	+	-	-	±	+
	1:16	-	-	-	-	-
23	1:1	+++	+++	+++	++	+
	1:2	++	+	++	++	+
	1:4	+	+	+	++	+
	1:8	-	-	-	±	+
	1:16	-	-	-	-	-

+++ = Reação muito forte.

++ = Reação forte.

+ = Reação positiva.

± = Reação fraca, linha de precipitação não formou-se totalmente.

TABELA V - Caracterização dos antígenos para IDGA em AIE, obtidos a partir de baço de cavalos, purificados por cromatografia de afinidade

Nº	Ag	A n t ĩ g e n o					
		Inicial			Purificado		
		Volume/ml	Título ¹	Concentração ²	Volume/ml	Título ¹	Concentração ²
1	13	5,0	1:4	21,0	1,0	1:2	1,5
2	15	2,5	1:2	35,0	1,0	1:4	1,8
3	21	5,0	1:4	35,0	1,5	1:1	0,2
4	23	5,5	1:2	34,4	1,0	1:2	0,22
5	13	5,0	1:4	21,0	1,0	1:1	0,37
6	21	4,2	1:4	35,0	1,0	1:1	0,43
7	23	4,0	1:2	34,4	1,0	1:1	0,67
8	21	4,7	1:4	35,0	1,0	1:1	0,31

¹ = Por IDGA, frente ao SR.

² = Concentração protéica - mg/ml.

TABELA VI - Comparação entre dois processos de esterelização do meio MEM, através do teste de IDGA, com o sobrenadante dos cultivos de ED persistentemente infectados com o V-AIE, entre a 8ª e a 16ª passagens

M e i o	Reação negativa ou fraco positiva (%)	Reação positiva ou forte positiva (%)
Autoclavado	10 (29,41)	7 (20,59)
Filtrado	2 (5,88)	15 (44,12)

TABELA VII - Caracterização dos antígenos para IDGA em AIE obtidos a partir de linhagem celular ED persistentemente infectada com o V-AIE

Antígeno número	S o b r e n a d a n t e			A n t í g e n o		Título (IDGA)
	Volume ml	Origem ¹	Classificação ² frente SR	Volume ml	Concentração ³ (mg/ml)	
2	460	1ª sob 100% M-Aut	+	1,7	0,6	1:4
3	570	1ª e 2ª sob cocult M-Filt e Aut	+++	1,8	2,4	1:4
4	500	1ª sob 100% M-Filt	+++	2,0	5,4	1:16
5	500	1ª sob 100% M-Filt	+++	2,0	4,0	1:16
6	500	1ª sob 100% M-Aut	+++	1,4	3,4	1:2
7	500	1ª sob cocult M-Aut	+++	1,3	3,1	1:16
8	500	1ª sob 100% e cocult M-Filt	+++	1,5	NT	1:16
9	500	1ª sob 100% e cocult M-Aut	+++	1,3	NT	1:4
10	500	1ª sob cocult M-Filt	+++	1,4	NT	1:8
11	500	1ª sob cocult M-Aut e Filt	+++	1,5	NT	1:16
12	500	1ª sob 100% M-Filt	+++	1,8	4,8	1:16
13	500	2ª sob cocult M-Aut	++	1,5	3,0	1:2
14	470	1ª sob 100% e cocult M-Filt	+++	1,3	2,3	1:4
15	450	1ª sob 100% e cocult M-Filt	++	2,0	2,4	1:2
16	380	1ª e 2ª sob cocult M-Aut	++	1,6	1,3	1:2

Sob = sobrenadante

100% = células originais

Cocult = cocultivo

M-Aut = meio autoclavado

M-Filt = meio filtrado

NT = não testada

²+++ = muito forte

++ = forte

+ = positivo

³ = concentração protéica

TABELA VIII - Titulação de três antígenos para IDGA em AIE obtidos a partir de linhagem celular ED, persistentemente infectada, frente a solução imunoglobulina G (IgG) por imunodifusão em bloco

Ag	Diluições Ag	Diluições IgG			
		1:2	1:4	1:8	1:16
4	1:1	+++	+++	++	-
	1:2	+++	+++	++	-
	1:4	+++	+++	++	+
	1:8	+++	+++	++	+
	1:16	+	+	++	+
	1:32	+	+	++	+
5	1:1	+++	+++	+	
	1:2	+++	+++	+	+
	1:4	+++	+++	++	+
	1:8	+++	+++	++	+
	1:16	<u>+</u>	<u>+</u>	+	+
	1:32	<u>+</u>	<u>+</u>	+	-
12	1:1	+++	+++	+	<u>+</u>
	1:2	+++	+++	+	+
	1:4	++	+++	+	+
	1:8	+	+	+	+
	1:16	+	+	+	+
	1:32	+	+	+	+

+++ = Reação muito forte.

++ = Reação forte.

+ = Reação positiva.

+ = Reação fraca, linha de precipitação não formou-se totalmente.

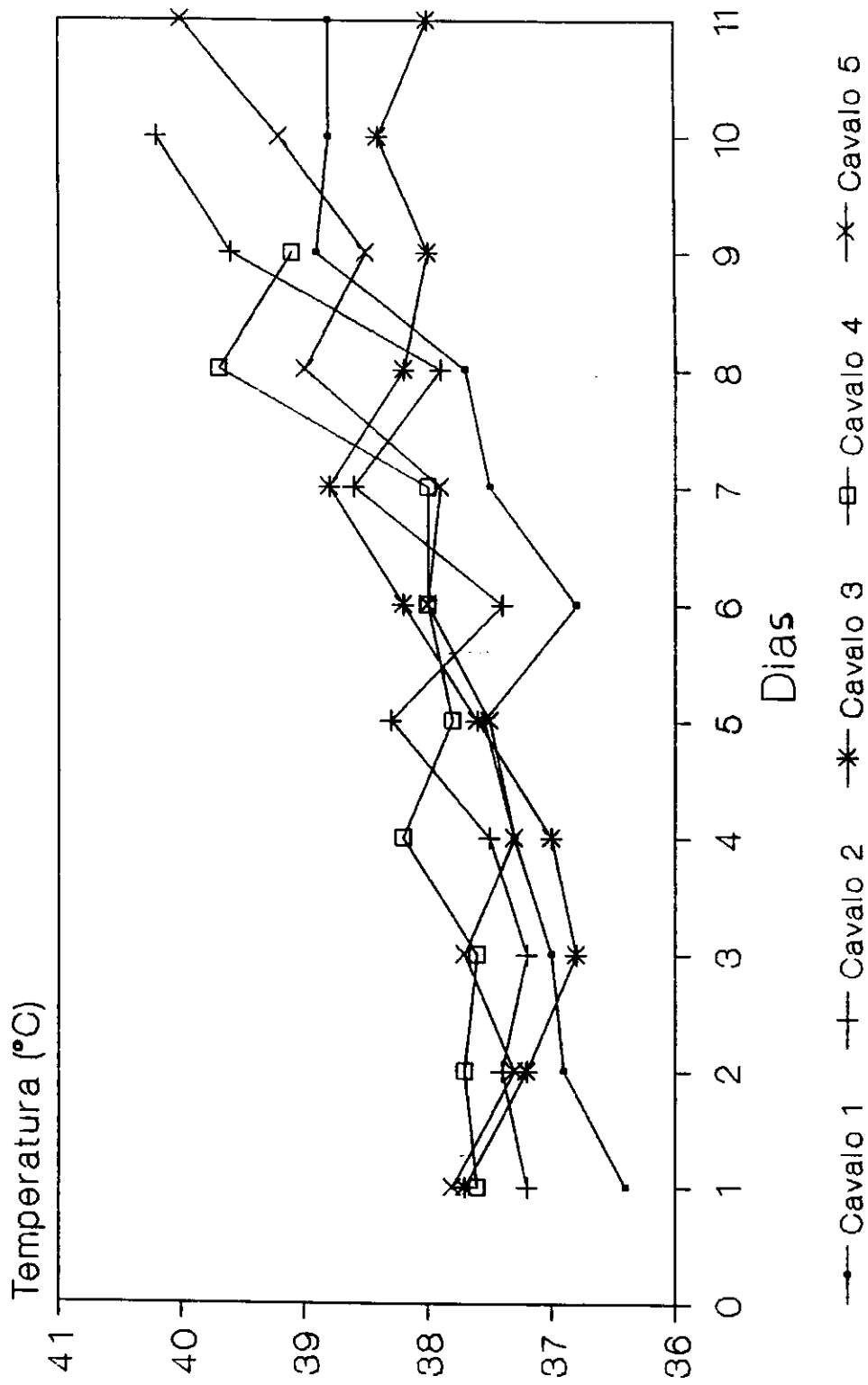


FIGURA 3 - Resultado da termometria dos cinco cavalos inoculados com a cepa "Wyoming" do vírus da AIE.

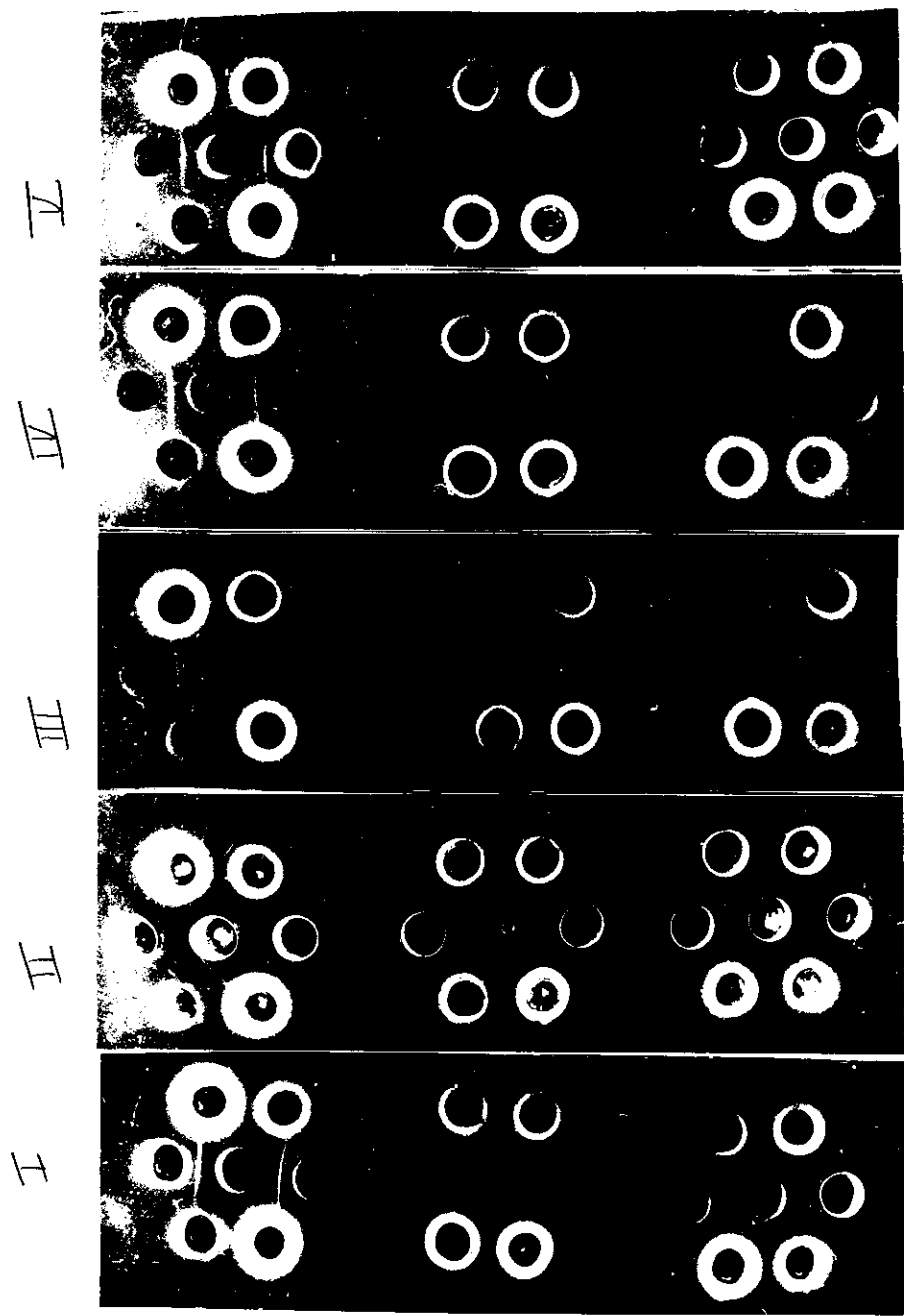


FIGURA 4 - IDGA em lâmina dos Ags experimentais: Pitman-Moore (Referência) (I); 21 (baço) (II); 4 (celular) (III); 5 (celular) (IV); 12 (celular) (V). Soros: 1, 4, 7, 10, 13, 16-SR na lâmina I e IgG nas lâminas II, III, IV e V; 2, 3, 5, 9, 15 e 18 negativos; 6*, 8, 11, 12, 14 e 17 positivos.

* S.I.R.

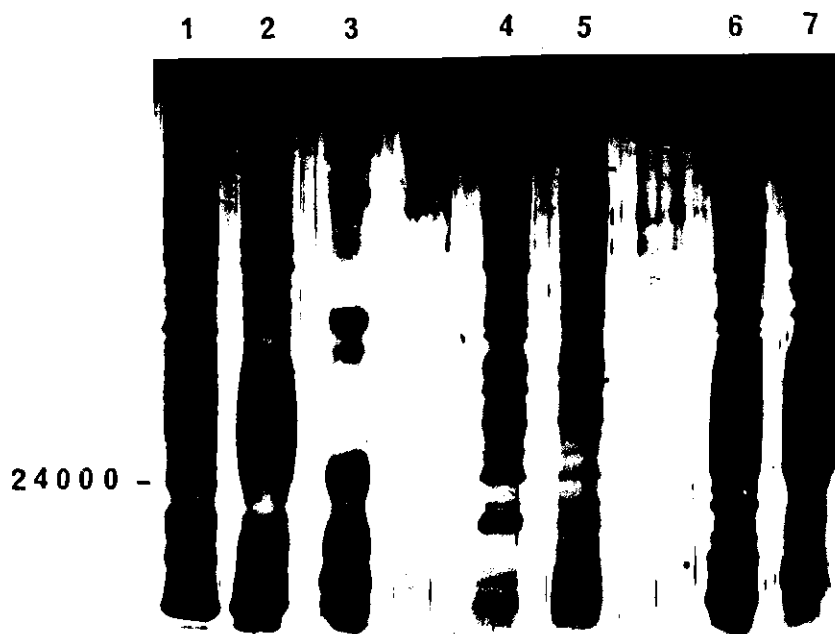
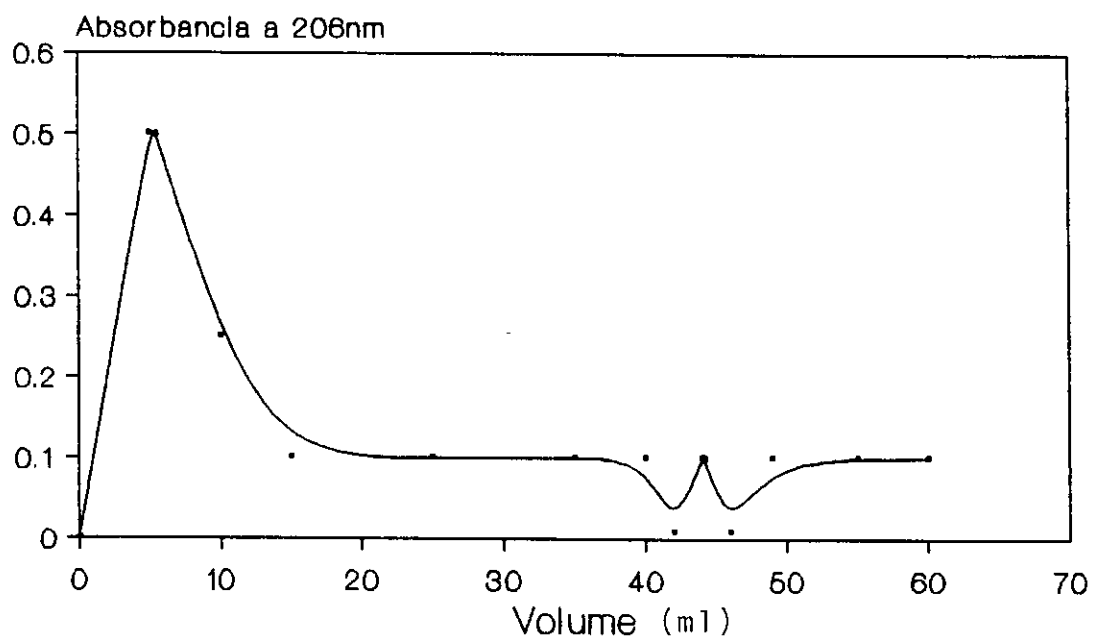


FIGURA 5 - PAGE dos Ags, soro e solução de IgG anti V-AIE: (1) Ag 13 (baço); (2) Ag 13 após cromatografia de afinidade; (3) Padrões de peso molecular: 66.000, albumina bovina; 45.000, albumina, ovo; 24.000, tripsinogênio bovino; 18.400, beta-lactoalbumina, bovina; 14.300, lisozima, ovo; (4) Ag 4 (celular); (5) Ag 16 (celular); (6) Soro anti V-AIE; (7) Solução IgG, anti V-AIE.



* Sensibilidade 1

FIGURA 6 - Perfil de eluição dos antígenos para IDGA em AIE purificados por cromatografia de a finidade.

5. DISCUSSÃO

Os cavalos inoculados com o V-AIE começaram a apresentar febre entre o sétimo e o oitavo dia pós-inoculação, apresentando o pico febril em torno do oitavo ao 10º dia (FIG. 3).

Resultados semelhantes foram obtidos por KEMENY et alii (1971), COGGINS & NORCROSS (1970), COGGINS & PATTEN (1970), Mc GUIRE et alii (1971a), HENSON et alii (1971), NORCROSS & COGGINS (1971), BOULANGER et alii (1972) e CRISTESCU et alii (1986), principalmente quando o volume de sangue inoculado variou entre 80 a 200 ml, uma vez que volumes maiores têm demonstrado que o período de incubação será menor.

Na TAB. III, em que estão relacionados os cavalos utilizados no experimento com os Ags produzidos a partir de seus baços, podemos observar que, apesar dos números um e dois terem apresentado picos febris maiores (40,0°C e 40,2°C respectivamente), os Ags não apresentaram boa antigenicidade. Somente a partir do terceiro cavalo que, inclusive, apresentou um pico febril inferior (39,2°C), puderam ser obtidos Ags com melhor antigenicidade. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por HENSON et alii (1971) onde, 12 cavalos inoculados e que apresentaram febre três a cinco dias após a inoculação, em apenas dois baços foi possível obter Ag suficiente para o teste de IDGA.

Nos primeiros trabalhos sobre produção de Ag a partir de baço, nenhum tratamento a não ser congelamento e descongelamento eram empregados (COGGINS & NORCROSS, 1970; TOMA et alii 1971; JIVION et alii, 1977). NAKAJIMA & USHIMI (1971), produzindo Ag a partir de cultura de leucócitos tratada com éter, foram os primeiros a demonstrar que o Ag envolvido na reação de precipitação era um componente interno do virion, sendo portanto grupo específico. Os vários tratamentos em seguida propostos para produção de Ag a partir de baço, como: precipitação com sulfato de amônia saturado a 50% e seguido de eletroforese em sephadex G-200 (NORCROSS & COGGINS, 1971), uso de trichlorotrifluoretano seguido de precipitações com sulfato de amônia saturado a 50% e a 45% (HENSON et alii, 1971), tratamentos consecutivos com acetona seguido de éter anidro (BOULANGER et alii, 1972); precipitações com soluções saturadas de sulfato de amônia nas proporções de 20 e 50% (UEDA et alii, 1973); extração do Ag com tiocianato 0,5 M seguido de precipitação com sulfato de amônia saturado (HART & BROUSSARD, 1973) apresentaram resultados diversos. Neste experimento, a técnica empregada para produção de Ag a partir de baço foi uma adaptação de várias técnicas acima citadas. A antigenicidade determinada por IDGA frente aos soros positivos e negativos e a qualidade dos Ags avaliada através da comparação da intensidade das linhas de precipitação dos Ags deste experimento, com o Ag de referência, está de acordo com a maioria dos trabalhos citados.

A atividade dos Ags, determinada por titulação frente ao soro de referência, não pode ser comparada com alguns dos trabalhos (CARRIER et alii, 1972; BOULANGER et alii, 1972; UEDA et alii, 1973) onde a atividade foi determinada por FC. Já a concentração final dos Ags pode ser comparada, através da relação do peso do fragmento de baço com o volume final obtido. HENSON et alii (1971) obtiveram a partir de 10 g, de baço 2 a 4 ml de Ag; BOULANGER et alii (1972) de 10 g conseguiram 10 a 15 ml; CARRIER et alii (1972), a partir de 10 g, obtiveram 5 a 7,5 ml. Os resultados obtidos neste experimento são semelhan-

tes aos de HENSON et alii (1971) mas, quando analisamos os antígenos 21 e 23 antes da concentração final, observa-se que estes dados podem ser comparados aos de CARRIER et alii (1972).

Na titulação em bloco, feita com os Ags 21 e 23 (TAB. IV) frente a IgG anti V-AIE purificada, obteve-se o título de 1:8 para os Ags e 1:32 para a IgG. TOMA et alii (1971) testaram o Ag positivo a partir de baço diluído até 1:4 frente a um soro, que chamaram de soro de referência, diluído até 1:30. Os títulos obtidos foram para o Ag 1:3 e para o soro 1:20. Também JIVOIN et alii (1977) conseguiram resultados inferiores quando testaram o Ag diluído até 1:8 frente a soros positivos não diluídos, obtendo para o Ag o título máximo de 1:4.

A correlação entre os resultados da IDGA, dos Ags 21 e 23 com o Ag de referência demonstrou a sensibilidade e especificidade dos Ags preparados neste experimento. O S.I.R. incluído nesta bateria, por apresentar baixo título de Acs e consequentemente uma maior dificuldade na interpretação da sua reação, foi claramente identificado (lâmina 2, FIG. 4). UEDA et alii (1973), utilizando o Ag preparado a partir de precipitações com solução saturada de sulfato de amônia, testaram 508 soros previamente testados com um Ag de referência, e encontraram identidade nas reações detectando 13 soros positivos. O mesmo não ocorreu com JIVOIN et alii (1977) que, comparando o Ag preparado a partir de baço com o Ag preparado a partir de cultivo celular pela PITMAM-MOORE, encontraram 40,98% de positivos, contra 44,26% em 122 soros testados por IDGA. PAULI et alii (1982), com o Ag parcialmente purificado, testaram 300 soros, 150 positivos e 150 negativos, e encontraram uma correlação direta com os resultados do Ag comercial. Não foi detectada a diminuição na atividade antigênica quando os Ags 21 e 23 foram mantidos por um período de um ano e seis meses a -10°C .

Através do PAGE foi possível evidenciar nos Ags extraídos de baço, a presença da proteína precipitante através do aparecimento de bandas de migração na altura do peso molecular 24.000. Como pode ser observado na FIG. 5, o Ag 13 apresentou número elevado de bandas, o que demonstra o seu alto con-

teúdo protéico. Em nenhum dos trabalhos de preparação de Ag a partir de baço foi feito o PAGE.

Um menor conteúdo protéico inespecífico foi conseguido através do emprego da cromatografia de afinidade, conforme pode-se observar na TAB. V. HART et alii (1976), purificando o Ag preparado a partir de baço, conseguiram obter 0,8 mg/ml de conteúdo protéico, aumentando em 36 vezes a pureza do Ag. SUGIURA & NAKAJIMA (1977), purificando o Ag preparado a partir de cultura de leucócitos, aumentaram em mais de 50% o grau de purificação do Ag, por cromatografia de afinidade. Neste experimento foi possível purificar o Ag em níveis inferiores e superiores aos autores citados.

A metodologia empregada para purificação e ligação dos Acs anti-AIE à coluna de sepharose 4B ativada com CNBr foi semelhante a utilizada por SUGIURA & NAKAJIMA (1977) e PAULI et alii (1982). Na eluição do Ag, HART et alii (1976) empregaram tampão fosfato com tiocianato 3M, SUGIURA & NAKAJIMA (1977) e PAULI et alii (1982) utilizaram cloreto de magnésio 5 M. O tampão cloreto empregado neste experimento com baixa molaridade e pH ácido foi capaz de liberar o Ag. Apesar das frações terem sido submetidas a diálise frente a PBS ou salina a 0,85% pH 7,0-7,2 em um prazo máximo de três horas após eluídas, o baixo pH do tampão cloreto parece ter afetado a atividade sorológica de alguns Acs. Na TAB. V, pode-se observar que seis Acs tiveram o seu título determinado por IDGA frente ao SR diminuído. Outro fator importante é a eficiência das colunas de cromatografia. No primeiro e no segundo experimentos, foi utilizada a mesma coluna e do terceiro ao oitavo, foi utilizada uma outra coluna. Esta última coluna não se mostra eficiente desde a primeira vez em que foi empregada. SUGIURA & NAKAJIMA (1977) e PAULI et alii (1982) utilizaram uma coluna por mais de uma vez sem que houvesse diminuição da eficiência.

Todos os Acs apresentaram um perfil de eluição semelhante ao demonstrado na FIG.6 . Os tampões, fosfato pH 7,5,

Tris pH 8,0 e Tris pH 10,0 não foram empregados depois que se determinou o pico de eluição.

HART et alii (1976) avaliaram o Ag purificado através de imunodifusão radial, SUGIURA & NAKAJIMA (1977) utilizaram o teste de fixação de complemento e PAULI et alii (1982) testaram o Ag por IDGA frente ao soro positivo padrão e ao SIR. Assim como aconteceu com HART et alii (1976) e PAULI et alii (1982), foi necessário concentrar as frações eluídas dos Ag até obter-se por IDGA uma linha de precipitação idêntica ao Ag de referência.

Os Ags purificados não apresentaram, como esperado, apenas uma banda de migração no PAGE. Na FIG. 5, pode-se observar que, além da banda difusa localizada um pouco acima do padrão de peso molecular 24.000, outras bandas também aparecem. Mas, quando comparados aos Ags parcialmente purificados, pode-se notar que o número de bandas é bem inferior. HART et alii (1976) por sedimentação, encontraram o peso molecular do Ag purificado de 7.600 daltons e atribuíram este baixo peso a uma mais completa dissociação da proteína pelo tratamento com o tiocianato. O aparecimento de uma banda difusa no PAGE também poderia estar relacionada a uma dissociação.

A linhagem celular ED empregada neste experimento para produção do Ag mostrou-se plenamente viável até a 35ª passagem. Não apresentou nenhuma alteração morfológica, como a presença de granulações ou vacuolizações. AMBOROSKI et alii (1979) conseguiram manter a linhagem ED infectada até a 30ª passagem, quando as células começaram a apresentar declínio na sua taxa de crescimento, vacuolizações e os resultados obtidos com o Ag começaram a apresentar variações.

Um estoque de células não infectadas e o seu cocultivo com a linhagem infectada foram feitos neste estudo conforme recomendado por MALMQUIST (1973). A introdução de células não infectadas não alterou significativamente a produção do Ag no sistema, uma vez que foi possível detectar Ag no sobrenadante já no primeiro teste após o início do cocultivo. Na TAB. VII

pode-se observar que Ags com títulos 1:16 foram também obtidos de sobrenadantes de cocultivos.

A detecção de Ag no sobrenadante, feita a partir da quinta passagem da linhagem ED infectada, não se afasta muito do descrito pela AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (1986), onde células de derme eqüina expostas ao V-AIE devem ser subcultivadas mais de três vezes antes que o Ag seja obtido.

Foram observadas variações na pesquisa de Ag da quinta passagem até a 16ª passagem da linhagem infectada, onde foi levado este experimento. Estas variações foram maiores quando na oitava passagem foi feita a diferenciação dos meios em filtrado e autoclavado. YAMANE et alii (1968) recomendaram a substituição da esterilização do meio MEM através de filtração por outro menos laborioso e que consome menos tempo que é o de autoclavagem. Segundo os autores, apenas a glutamina era perdida neste processo, sendo necessária acrescentá-la antes de usar o meio. Neste experimento, podemos observar na TAB. VI que houve uma diferença significativa na pesquisa de Ag quando comparamos os dois processos. Apesar de não ter havido diferença nas células que se apresentaram com as mesmas características, o meio MEM autoclavado parece ter interferido na produção do Ag. É importante ressaltar que o 1º sobrenadante colhido possuía 10% de soro fetal, o que não ocorreu quando iniciamos a manter as células infectadas por mais tempo, apenas trocando o meio e utilizando quantidades decrescentes de soro fetal. Neste segundo sobrenadante colhido, em cada passagem, não foi possível observar diferença entre os dois tipos de meio MEM empregados, ambos apresentaram resultados inferiores ao primeiro sobrenadante. Estes resultados evidenciam a importância do soro fetal em quantidades de no mínimo 2% para replicação do V-AIE, conforme descrito por KLEVJER-ANDERSON (1979), em que culturas de ED infectadas com o V-AIE não mantiveram a replicação do vírus quando privadas de soro fetal. A manutenção de linhagem celular ED infectada, apenas trocando-se o meio semanalmente, com 5 a 10% de soro fetal durante 10 semanas, mostrou-se eficiente na pro-

dução de Ag segundo BARTA & ISSEL (1978) e AMBOROSKI et alii (1979).

Uma produção de Ag praticamente uniforme era esperada, como ocorreu nos primeiros sobrenadantes colhidos nos cultivos em que foi utilizado o meio MEM filtrado. Segundo MALMQUIST et alii (1973), KONO (1976) e AMBOROSKI et alii (1979) quantidades uniformes de V-AIE extracelulares foram obtidas durante todo o ciclo celular, aumentando apenas quando o número de células aumentava.

O monitoramento dos sobrenadantes, feito através de IDGA, frente ao soro referência e descrito por NAKAJIMA & USHIMI (1971), KONO (1976) e AMBOROSKI et alii (1979), parece ter uma correlação com o título final dos Ags. Os Ags que apresentaram títulos mais altos foram obtidos de sobrenadantes com reações mais fortes por IDGA. Nenhum dos Ags apresentou título igual a 1:32 (TAB. VII), conforme indicado por NAKAJIMA (1974), mas os títulos obtidos foram superiores aos encontrados por NAKAJIMA & USHIMI (1971) e KONO (1976) na produção de Ag para IDGA a partir de cultivo de leucócitos e de células de rim de cavalo, respectivamente. Os títulos obtidos neste experimento se aproximam mais dos encontrados por SUGIURA et alii (1986) na titulação por IDGA, do Ag a ser utilizado no teste de ELISA.

Para se obter o Ag purificado foi necessário concentrá-lo cerca de 200 vezes (TAB. VII). Vários autores trabalharam com Ags concentrados 90 até 1000 vezes e obtiveram resultados favoráveis por IDGA, FC e ELISA (NAKAJIMA & USHIMI, 1971; GIELKENS & TOMA, 1982; SHANE et alii, 1984; SHEN et alii, 1984; BOUILLANT et alii, 1986).

A concentração protéica dos Ags (TAB. VII) apresentou valores semelhantes aos encontrados por BARTA & ISSEL (1978), quando purificaram vírus para produção de antissoro, MONTELARO et alii (1982), para isolamento das proteínas internas do vírus e SHANE et alii (1984), para produção do Ag para teste de ELISA.

Pode-se evidenciar através do teste frente a 120 soros de campo a sensibilidade e especificidade dos Ags 4,5 e 12,

reagiram de forma idêntica ao Ag de referência inclusive com o SIR, um soro com baixos níveis de Acs. Na FIG. 4, os Ags padronizados com IgG anti-AIE, nas diluições 1:4 e 1:8 respectivamente, formaram linhas de precipitação nítidas como o Ag de referência (Kit de diagnóstico).

O PAGE dos Ags (FIG. 5) revelou a presença de 14 a 16 bandas de migração estando nítida em cada Ag uma banda na altura do padrão de peso molecular 24.000. ISHIZAKI et alii (1978) analisando as proteínas do V-AIE através do PAGE, encontraram cinco proteínas de peso molecular 11.000, 14.000, 25.000, 40.000 e 80.000. CHEEVERS et alii (1978) encontraram 14 proteínas de peso molecular variando de 10.000 a 79.000. PAREKH et alii (1980) identificaram 10 proteínas de peso molecular 9.000 a 90.000.

A IgG purificada para ser utilizada como referência apresentou um resultado favorável frente aos Ags de baço e de linhagem celular. Os títulos máximos obtidos foram 1:32 com o Ag de referência e os Ags de baço e 1:16 com os Ags de cultivo celular.

COGGINS & PATTEN (1970), ao descreverem a técnica de IDGA com maiores detalhes, recomendaram o uso de um soro proveniente de cavalo portador da AIE que forme apenas uma linha densa e específica para AIE como soro de referência, TOMA et alii (1971) também recomendaram o uso de soro proveniente de um animal portador previamente titulado frente ao Ag. NAKAJIMA (1974) recomendou que o soro positivo controle tenha seu título ajustado para 1:4 antes de ser utilizado como referência. Neste experimento a IgG purificada foi ajustada para 1:2 com os Ags de baço e 1:4 com os Ags de cultivo celular (TAB. IV e VIII).

Em nenhum trabalho sobre produção de Ag para IDGA é empregada a IgG como referência. A técnica de purificação utilizada não resultou em uma solução de IgG totalmente purificada, como pode-se observar na FIG. 5. Uma banda de migração difusa aparece entre os padrões de peso molecular 24.000 e 44.000. MCKINNEY & PARKINSON (1987), ao purificarem IgG, a partir de

um soro hiperimune de coelho, obtiveram por PAGE uma única banda difusa entre os padrões de peso molecular 24.000 e 29.000.

As outras bandas que apareceram no gel podem ser traços de albumina e α e β -globulinas. Segundo MCKINNEY & PARKINSON (1987), o grau de contaminação no soro de cavalo pode ser grande devido principalmente ao alto conteúdo lipídico.

6. CONCLUSÕES

A técnica empregada para obtenção de antígeno a partir de baço é simples, não requer equipamentos e reagentes de alto custo. Apenas o baço de um cavalo, entre cinco empregados neste experimento, se mostrou eficiente para obtenção de antígeno. Os fatores idade e variação individual devem ser considerados.

A sensibilidade e especificidade do antígeno ficou demonstrada, no teste frente a 120 soros de campo.

A cromatografia de afinidade reduziu o conteúdo protéico inespecífico dos antígenos, mas a sua aplicação para o teste de IDGA não foi profundamente estudada.

O antígeno obtido a partir de cultivo celular se mostrou sensível e específico frente a 120 soros de campo, em bora o rendimento tenha sido insatisfatório. Os melhores resultados foram conseguidos com o meio MEM filtrado com 10% de soro fetal bovino. A técnica utilizada para pesquisa do antígeno no sobrenadante mostrou-se simples e eficiente, para seleção de sobrenadantes a serem trabalhados na etapa de extração do antígeno.

IgG anti V-AIE, parcialmente purificada, obtida de soros positivos, apresentou resultados comparáveis ao soro de referência à prova de IDGA, podendo ser usado como substituto em teste de rotina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMBORSKI, G.F.; JEFFERS, G.; AMBORSKI, R. L.; ISSEL, C.J. Equine infectious anemia virus: development of a simple reproducible method for titrating infectivity of the cell adapted strain. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 40(2):302-4, 1979.
2. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Rockville, *Catalogue of animal and plant viruses, chlamydiae, rickettsiae and virus antisera*. 5. ed. Rockville, 1986. p.129.
3. BARTA, V. & ISSEL, C.J. Simple method for preparation of specific antisera against viral-proteins: rabbit antisera against equine infectious anemia virus proteins p26 and p16. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 39(11):1856-7, 1978.
4. BATISTA Jr., J.A. & FONSECA, V.O. Anemia infecciosa dos eqüinos. *Arq. Esc. Vet. UFMG.*, Belo Horizonte, 23:281-9, 1971.
5. BENTON, C.V.; BROWN, B.L.; HARSHMAN, J.S.; GILDEN, R.V. In vitro host range of equine infectious anemias virus. *Intervirology*, Basel, 16(4):225-32, 1981.
6. BOUILLANT, A.M.P.; NIELSEN, K.; RUCKERBAUER, G.M.; SAMAGH, B.S.; HARE, W.C.D. The persistent infection of a caninethymus cell line by equine infectious anaemia virus and preliminary data on the production of viral antigens. *J.*

Virology Methods, Amsterdam, 13:309-21, 1986.

7. BOULANGER, P.; BANNISTER, G.L.; CARRIES, S.P. Equine infectious anemia: preparation of a liquid antigen extract for the agar-gel immunodiffusion and complement-fixation tests. *Can. J. Comp. Med.*, Ottawa, 36(2):116-23, 1972.
8. BURNS, S.J. Equine infectious anemia: plasma clearance times of passively transferred antibody in foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 164(1):64-9, 1974.
9. CARRIER, S.P.; BANNISTER, G. L.; BOULANGER, P.; Equine infectious anemia: activity of liquid antigen extracts in the agar-gel immunodiffusion and complement-fixation tests. *Can. J. Comp. Med.*, Ottawa, 36(4):377-9, 1972.
10. CHARMAN, H.P.; BLADEN, S.; GILDEN, R.V.; COGGINS, L. Equine infectious anemia virus evidence favoring classification as a reovirus. *J. Virol.*, Washington, 19(2):1073 - 1976.
11. CHEEVERS, W.P.; ACKLEY, C.M.; CRAWFORD, T.B. Structural proteins of equine infectious anemia virus. *J. Virol.*, Washington, 28(3):997-1001, 1978.
12. COGGINS, L. Carriers of equine infectious anemia virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 184(3):279-81, 1984.
13. COGGINS, L. Equine infectious anemia. In: KURSTAK, E. & KURSTAK, C. ed. *Comparative diagnosis of viral diseases*. New York. Academic Press, 1981. v.4, p.646-58.
14. COGGINS, L. & NORCROSS, N.L. Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornell. Vet.*, Ithaca, 60(2): 330-5, 1970.
15. COGGINS, L.; NORCROSS, N.L.; NUSBAUM, S.R. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 33(1):11-8, 1972.

16. COGGINS, L. & PATTEN, V. Immunodifusion test for equine infectious anemia. In: ANNUAL MEETING U.S. ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, 74., Riachmond, 1970. *Proceedings*. p.568-71.
17. CRAWFORD, T.B.; Mc GUIRE, T.C.; HENSON, J.B. Detection of equine infectious anemia virus in vitro by immunofluorescence. *Arch. Gesamte Virusforsch*, Heidelberg, 34:332-9, 1971.
18. CRISTESCU, P.; TETU, M.; GRADINARU, D. Valora e antigenica a extractelor de splina provenite de la minji infectati experimental cu virusul anemiei infectioase ecvine (AIE). *Lucr. Inst. Cercet. Vet. Bioprep. Pasteur*, Bucharest, 17: 221-30, 1986.
19. DUPONT, O.; DACORSO FILHO, P.; MUCHALUAT, M.A.; LANGENEGGER, J. Diagnóstico da anemia infecciosa equina no Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 11. & CONGRESSO FLUMINENSE DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1. Niterói, 1968. *Anais*. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1968. p.160-1.
20. EL-ZEIN, A.; MYRES, W.L.; SEGRE, D. Behavior of equine infectious anemia virus in cell culture and development of a diagnostic test for the disease. *J. Infect. Dis.*, Chicago, 118(5):473-80, 1968.
21. GASKIN, M.; NEAL, F.C.; RUBIN, H.L. Equine antibody to bovine serum induced by several equine vaccines as a source of extraneous precipitin lines in the agar gel immunodiffusion test for equine infectious anemia. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 38(3):373-7, 1977.
22. GIELKENS, A.L.J. & TOMA, B. Development of a serologic ELISA for equine infectious anemia. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA, 2. São Paulo, 1982. *Anais*. São Paulo, Instituto Biológico de São Paulo, 1982. p.91-8.

23. GONDA, M.A.; CHARMAN, H.P.; WALKER, J.L.; COGGINS, L. Scanning and transmission electron microscopic study of equine infectious anemia virus. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 39(5):731-40, 1978.
24. GUERREIRO, M.G.; BAUER, A.G.; GLOSS, R.M.; VIDOR, T.; FARIAS, M.T.; TREINE; MARCUSO, P.C. Simpósio sobre anemia infecciosa equina. *Bol. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor*, Porto Alegre, 1/2:3-4, 1968.
25. HART, L.T.; BRAYMER, H.D.; LARSON, A.D.; BROUSSARD II, E. A. Purification, characterization, and quantitation of the antigen employed in the immunodiffusion test for diagnosis of equine infectious anemia. *Prep. Biochem.*, New York, 6(2/3):193-211, 1976.
26. HART, L.T. & BROUSSARD II, E.A. Extraction of equine infectious anemia immunodiffusion antigen with the aid of the chaotropic agent, thiocyanate. *Appl. Microbiol.*, Washington, 25(2):190-4, 1973.
27. HARTREE, E.F. Determination of protein, a modification of the Lowry's method that give a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, New York, 48(2):422-7, 1972.
28. HENSON, J.B. & MCGUIRE, T.C. Equine infectious. *Prog. Med. Virol.*, Basel, 18:143-59, 1974.
29. HENSON, J.B.; MCGUIRE, T.C.; GORMAN, J.R. The detection of precipitating antibodies in equine infectious anemia and partial purification of the antigen. *Arch. Gesamte Virusforsch*, Heidelberg, 35:385-91, 1971.
30. HORENSTEIN, A.L. & FEINSTEIN. Rapid solid-phase radioimmunoassay for detection of equine infectious anemia viral antigen and antibodies parameters involved in standardization. *J. Virol. Methods.*, Amsterdam, 12:1-11, 1985.
31. ISHIZAKI, R.; GREEN, R.W.; BOLOGNESI, D.P. The structural polypeptides of equine infectious anemia virus. *Intervirology*, Basel, 9(5):286-94, 1978.

32. ISSEL, C.J.; ADAMS, W.V.; MEEK, L.; OCHOA, R. Transmission of equine infectious anemia virus from horses without clinical signs of disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 180(3):272-5, 1982.
33. ISSEL, C.J. & COGGINS, L. Equine infectious anemia: Current Knowledge. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 174(7): 727-33, 1979.
34. ITO, Y. Morphogenesis of equine infectious anaemia virus. *Acta Virol.*, Prague, 18(4):352-4, 1974.
35. JIVOIN, P.; CIRSTET, I.; VIOR, C.; TETU, M.; TIGAIERU, N.; NISTOR, G. Diagnosticul de laborator al anemiei infectioase prin aplicarea testului de imunodifuziune in gel de agar. *Lucr. Inst. Cercet. Vet. Bioprep. Pasteur.*, Bucharest, 13:141-7, 1977.
36. KEMENY, L.J. & COGGINS, L. Equine infectious anemia. Transmission from infected mares to foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 161(5):496-9, 1972.
37. KEMENY, L.J.; MOTT, L.O.; PEARSON, J.E. Titration of equine infectious anemia virus. Effect of dosage one incubation time and clinical signs. *Cornell Vet.*, Ithaca, 61(4):687-95, 1971.
38. KLEVJER-ANDERSON, P.; CHEEVERS, W.P.; CRAWFORD, T.B. Characterization of the infection of equine fibroblasts by equine infectious anemia virus. *Arch. Virol.*, Vienna, 60: 279-89, 1979.
39. KOBAYASHI, K. Studies on the cultivation of equine infectious anemia virus in vitro. I. Serial cultivation of the virus in the cultures of various horse tissues. *Virus*, Tokyo, 11:177-89, 1961a.
40. KOBAYASHI, K. Studies on the cultivation of equine infectious anemia virus in vitro. II. Propagation of the virus in horse bone marrow cell culture. *Virus*, Tokyo, 11:189-201, 1961b.

41. KOBAYASHI, K. Studies on the cultivation of equine infectious anemia virus in vitro III. Propagation of the virus in horse leukocyte culture. *Virus*, Tokyo, 11:249-56, 1961c.
42. KOBAYASHI, K. & KONO, Y. Propagation and titrations of equine infectious anemia virus in horse leukocyte culture. *Nat. Inst. Anim. Health Q.*, Tokyo, 7(1):8-20, 1967.
43. KONO, Y. Viremia and immunological responses in horse infected with equine infectious anemia virus. *Natl. Inst. Anim. Health. Q.*, Tokyo, 9(1):1-9, 1969.
44. KONO, Y. Viral antigen production in horse kidney cell cultures infected persistently with equine infectious anemia virus. *Nat. Inst. Anim. Health. Q.*, Tokyo, 16(1):31-2, 1976.
45. KONOY & KOBAYASKI, K. Complement fixation test of equine infectious anemia. 1. Specificity of the test. *Nat. Inst. Anim. Health. Q.*, Tokyo, 6(3):194-203, 1966.
46. KONO, Y. & YOKOMIZO, Y. Attempts to cultivate the equine infectious anemia virus in various types of cells. *Nat. Inst. Anim. Health Q.*, Tokyo, 8(4):182-6, 1968.
47. KONO, Y.; YOSHINO, T.; FUKANAGA, Y. Growth characteristics of equine infectious anemia virus in horse leukocyte cultures. *Archiv. Gesamte. Virusforsch.*, Heidelberg, 30:252-6, 1970.
48. LAEMMLI, W.R. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head to bacteriophage T₄. *Nature*, London, 227(5229):680-5, 1970.
49. LIGNEE, M. *Rec. Med. Vet.*, 20:30. 1843. apud COGGINS; L. Equine infectious anemia. In: KURSTAK, E. & KURSTAK, C. ed. *Comparative diagnosis of viral diseases*. New York, Academic Press, 1981. v.4, p.646-58.
50. LIMA, A.O. & SILVA, W.D. Purificação, titulação e fragmen

- tação das imunoglobulinas. In: _____. *Imunologia e imunopatologia, alergia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1970. p.23-55.
51. Mc GUIRE, T.C. Immunoglobulin G subclass [IgG and IgG(T)] interaction with the p26 group specific antigen of equine infectious anemia virus: immunodiffusion and complement fixation reactions. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 38(5): 655-8, 1977.
52. Mc GUIRE, T.C.; CRAWFORD, T.D.; HENSON, J.B. Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus on tissue. *Am. J. Pathol.*, Hagerstown, 62(2):383-83, 1971a.
53. Mc GUIRE, T.C.; Van HOOSTER, G.; HENSON, J.B. The complement fixation reaction in equine infectious anemia: demonstration of inhibition by IgG (T). *J. Immunol.*, Baltimore, 107(7):1738-44, 1971b.
54. Mc KINNEY, M.M. & PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, 96(2): 271-8, 1987.
55. MALMQUIST, W.A.; BARNETT, D.; BECVAR, C.S. Production of equine infectious anemia antigen in a persistently infected cell line. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, Heidelberg, 42: 361-70, 1973.
56. MALMQUIST, W.A. & BECVAR, C.S. Identification of multiple equine infectious anemia antigens by immunodiffusion reactions. *Can. J. Comp. Med.*, Ottawa, 39(4):411-5, 1975.
57. MATHEKA, H.P.; COGGINS, L.; SHIVELY, J.N.; NORCROSS, N. L. Purification and characterization of equine infectious anemia virus. *Arch. Virol.*, Vienna, 51(1/2):107-14, 1976.
58. MERRIL, C.R.; DUNAU, M.L.; GOLDMAN, D.A. Rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, New York, 110(1):201-7, 1981.

59. MONTELARO, R.C.; LOHREY, N.; PAREKH, B.; BLAKENEY, E. W.; ISSEL, C.J. Isolation and comparative biochemical properties of the major internal polypeptides of equine infectious anemia virus. *J. Virol.*, Washington, 42(3):1029-38, 1982.
60. MONTELARO, R.C.; ROBEY, W.G.; WEST, M.D.; ISSEL, C. J.; FISCHINGER, P.J. Characterization of the serological cross-reactivity between glycoproteins of the human immunodeficiency virus and equine infectious anaemia virus. *J. Gen. Virol.*, Reading, 69(7):1711-7, 1988.
61. NAKAJIMA, H. Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. *Jnp. Agric. Res. Q.*, Ibaraki, 8(1):47-53, 1974.
62. NAKAJIMA, H. Physicochemical and biological characteristics of equine infectious anemia virus. In: CONFERENCE EQUINE INFECTIOUS DISEASES, 3. Paris. 1972. *Proceedings*. Basel, S. Karger, 1973. p.162-74.
63. NAKAJIMA, H.; FUKUNAGA, Y.; USHIMI, C. Titration of precipitating antibody in equine infectious anemia. *Nat. Inst. Anim. Health Q.*, Tokyo, 14(1):1-8, 1974.
64. NAKAJIMA, H.; KOBAYASHI, K.; KONO, Y.; USHIMI, C. Field application of immunodiffusion and complement fixation tests for diagnosis of equine infectious anemia. *Nat. Inst. Anim. Health Q.*, Tokyo, 12(4):188-92, 1972a.
65. NAKAJIMA, H.; KONO, Y.; USHIMI, C. Characterization of precipitating antibody in equine infectious anemia. *J. Immunol.*, Baltimore, 107(3):889-94, 1971.
66. NAKAJIMA, H.; NORCROSS, N.L.; COGGINS, L. Demonstration of identity between purified equine infectious anemia virus and antigen extracted from infected horse spleen. *Infect. Immun.*, Washington, 6 (3):416-7, 1972b.
67. NAKAJIMA, H.; TANAKA, S.; USHIMI, C. Fraction of equine

- infectious anemia virus by diethylaminoethyl cellulose chromatography and sucrose density gradient centrifugation. *Nat. Inst. Anim. Health Q.*, Tokyo, 8(2):57-63, 1968.
68. NAKAJIMA, H.; TANAKA, S.; USHIMI, C. Physicochemical studies of equine infectious anemia virus. I. Buoyant density of the virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, Heidelberg, 26:389-94, 1969a.
69. NAKAJIMA, H.; TANAKA, S.; USHIMI, C. Physicochemical studies of equine infectious anemia virus II sensitivity of the virus to trypsin. *Arch. Gesamte. Virusforsch.*, Heidelberg, 26:395-97, 1969b.
70. NAKAJIMA, H.; TANAKA, S.; USHIMI, C. Physicochemical studies of equine infectious anemia virus III. Purification and electron microscopic observation of the virus. *Archiv. Gesamte Virusforsch.*, Heidelberg, 28:348-60, 1969c.
71. NAKAJIMA, H.; TANAKA, S.; USHIMI, C. Physicochemical studies of equine infectious anemia virus. IV. Determination of the nucleic acid type in the virus. *Archiv. Gesamte Virusforsch.*, Heidelberg, 31:273-80, 1970.
72. NAKAJIMA, H. & USHIMI, C. Detection of precipitating antibody in equine infectious anemia by concentrated virus antigen. *Nat. Inst. Anim. Health Q.*, Tokyo, 12(2):47 - 52, 1972.
73. NAKAJIMA, H. & USHIMI, C. Immunodiffusion studies of purified equine infectious anemia virus. *Infect. Immun.*, Washington, 3(3):373-7, 1971.
74. NAKAJIMA, H.; USHIMI, C.; FUKUNAGA, Y.; HIRASAWA, K. Preparation of equine infectious anemia virus antigen for immunodiffusion test. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, Heidelberg, 42:339-45, 1973.
75. NAKAJIMA, H.; YOSHINO, T.; USHIMI, C. Equine infectious anemia virus from infected horse serum. *Infect. Immun.*, Washington, 10(3):667-8, 1974.

76. NORCROSS, N.L. & GOGGINS, L. Characterization of an equine infectious anemia antigen extracted from infected horse spleen tissue. *Infect. Immun.*, Washington, 4(5):528-31, 1971.
77. OUCHTERLONY, O. Diffusion in gell methods for immunological analysis. In: KALLOS, P. ed. *Progress in Allergy*. Basel, Karger, 1968. V.5, P.1-78 apud OUCHTERLONY, O. & NELSON, L.A. Immunodiffusion and Immuno-electrophoresis. In: WEIR, P.M. ed. *Immunochemistry*. 3. ed., Oxford, Balckuwell, 1978. p.106-7.
78. PAREKH, B.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Equine infectious anemia virus, a putative lentivirus, contains polypeptides analogous to prototype-C-oncornaviruses. *Virology*, New York, 107(2):520-5, 1980.
79. PAULI, R.; PASSEGGI, C.; De TORRES, R.; VIRGILIO, J.; ENRIQUE, H.M. Aislamiento de virus de anemia infecciosa equina em Santa Fe y desarrollo de un antígeno para inmunodifusión por cromatografía de afinidad. *Rev. Med. Vet.*, Buenos Aires, 63(1):28-37, 1982.
80. PEARSON, J.E.; CARBREY, E.A.; BARNETT, D.; COGGINS, L.; GORHARN, J.R.; KADEL, W.L.; KIRKHAM, W.W.; ROTH, E. Protocol for the immunodiffusion (COGGINS) test for equine infectious anemia. In: ANNUAL MEETING US ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, 75, Richmond, 1971. *Proceedings*. p.649-59.
81. PHARMACIA FINE CHEMICALS. Uppsala. *Affinity Chromatography: Principles and Methods*. s.l., 1974.
82. REIS, R. Anemia infecciosa equina. *Diagnóstico sorológico e Padronização do teste de Imunodifusão*. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1984. 50p. (Dissertação, Professor Titular).
83. REIS, R. *Prevalencia y control de la aie en el estado de Minas Gerais, Brasil; resultados preliminares*. Separata do SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE ANEMIA INFECCIOSA DE LOS EQUINOS, 1. Caracas, 1974. p.169-73.

84. SENTSU, H. & KONO, Y. Hemagglutination by equine infectious anemia virus. *Infect. Immun.*, Washington, 14(2): 325-31, 1976.
85. SHANE, B.S.; ISSEL, C.J.; MONTELARO, R.C. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia virus p26 antigen and antibody. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, 19(3):351-5, 1984.
86. SHEN, D.T.; GORHAM, J.R.; Mc GUIRE, F.C. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine infectious anemia antibody to purified p26 viral proteins. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 45(8):1542-3, 1984.
87. SILVA, R.A.; SILVA, N.M.; FREITAS, W.M.; DEAK, M.H.R.; ANDRÉ, C.A.F. A ocorrência da anemia infecciosa no estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 11. & CONGRESSO FLUMINENSE DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1. Niterói, 1968. *Anais*. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1968. p.173-82.
88. SUGIURA, T.; MATSUMURA, T.; FUKUNAGA, Y. Diagnosis of equine infectious anemia by enzyme-linked immunosorbent assay with viral antigen purified by affinity chromatography. *Bull. Equine Res. Inst.*, Tokyo, (23):42-8, 1986.
89. SUGIURA, T. & NAKAJIMA, H. Purification of equine infectious anemia virus antigen by affinity chromatography. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, 5(6):635-9, 1977.
90. SUGIURA, T. & NAKAJIMA, H. Indirect hemagglutination test in equine infectious anemia. *Can. J. Comp. Med.*, Ottawa, 46(1):60-4, 1982.
91. SUZUKI, T.; UEDA, S.; SAMEJAMA, T. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of equine infectious anemia. *Vet. Microbiol.*, Amsterdam, 7:307-15, 1982.
92. TAJIMA, M.; NAKAJIMA, H.; ITO, Y. Electron microscopy of equine infectious anemia virus. *J. Virol.*, Washington, 4(4):521-7, 1969.

93. TOMA, B.; LUKA-ISKANDER, G.E.; GORET, E. Serodiagnostic de l'anémie infectieuse des équidés par précipitation in gélose. I. Muse au point de la technique. *Bull. Acad. Vet. FR.*, Paris, 44(9):403-13, 1971.
94. UEDA, S.; SAMEJIMA, T.; KURODA, S.; NAKAMURA, J. Preparation of equine infectious anemia antigens for diagnosis. *Jnp. J. Microbiol.*, Tokyo, 17(5):393-9, 1973.
95. USHIMI, C., HENSON, J.B.; GORHAM, J.R. Study of the one-step growth curve of equine infectious anemia virus by immunofluorescence. *Infect. Immun.*, Washington, 5(6):890-5, 1972.
96. USHIMI, C.; NAKAJIMA, H.; TANAKA, S. Demonstration of equine infectious anemia viral antigen by immunofluorescence. *Natl. Inst. Anim. Health. Q.*, Tokyo, 10(2):90-1, 1970.
97. WATANABE, S. Studies on equine infectious anemia virus in tissue culture II. Serial cultivations of equine infectious anemia virus in the tissue culture derived from the horse and its reversion test to the horse. *JPN. J. Vet. Sci.*, Tokyo, 22(2):79-88, 1960a.
98. WATANABE, S. Studies on equine infectious anemia virus in tissue culture. IV. Examination of a new methods of virus cultivation. *JPN. J. Vet. Sci.*, Tokyo, 22(3):215-22, 1960b.
99. WEILAND, F.; MATHEKA, H.D.; COGGINS, L.; HÄRTNER, O. Electron microscopic studies on equine infectious anemia virus (EIAV). *Arch. Virol.*, Vienna, 335-40, 1977.
100. YAMANE, I.; MATSUJA, Y.; JIMBO, K. An autoclavable powdered culture medium for mammalian cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, New York, 127(1):335-6, 1968.