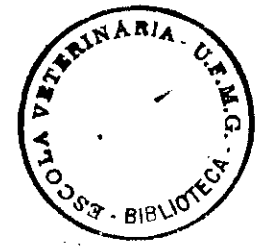


T664  
27531  
1981

FABIANO SEBASTIÃO DE SOUZA

**PESQUISA DE IMUNÓGENOS PARA PRODUÇÃO DE ANTI-SOROS  
UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE CARNES  
BOVINA E EQUINA**



TESE APRESENTADA À ESCOLA DE VETERINÁRIA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS,  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO  
DE GRAU DE MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA,  
ÁREA + MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

**U.F.M.G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA**



27/2 103/09/80

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

Belo Horizonte  
Minas Gerais  
1981



M6000190179

0124-46260

Souza, Fabiano Sebastião de

Pesquisa de imunógenos para produção de anti-soros utilizados da identificação de carnes bovina e equina. Belo Horizonte, 1981.

34p.

Tese (mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais,

Bibliografia no fim do volume.

I - Carne - Inspeção I. Título

CDD 664.907

APROVADA EM 11 DE MARÇO DE 1981

BANCA EXAMINADORA:

*P. C. Brant*

Prof.: Paulo Caldeira Brant, M.S., PhD

*B. Bolivar Mendes*

Prof.: Bolivar Mendes, M.M.V.

*N. da Silva*

Prof.: Nivaldo da Silva, M.M.V.

Dedico este trabalho aos meus pais, a minha esposa Albaniza e aos meus queridos filhos, Fábea, Fábio e Fabrício.

## AGRADECIMENTOS

Ao Ministério da Agricultura, na pessoa do Dr. ÉZIO FABRI DOS ANJOS – Chefe do GEIPOA em Minas Gerais pela oportunidade de realizarmos o Curso de Mestrado.

Aos professores PAULO CALDEIRA BRANT e BOLIVAR MENDES, nossos orientadores em todas as etapas de execução deste trabalho.

Aos professores ÉLVIO CARLOS MOREIRA, da Escola de Veterinária da UFMG e JOSÉ DE ALENCAR, Coordenador do Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo estímulo e amizade demonstrados.

Aos professores RONALDO REIS e NIVALDO DA SILVA, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, pelos ensinamentos recebidos.

Ao professor IVAN BARBOSA MACHADO SAMPAIO, do Departamento de Zootecnia da Escola Veterinária da UFMG, pela orientação nas análises estatísticas.

À Dra. LAURA DE SANCTIS VIANNA, Diretora da Associação Mineira de Criadores de Coelho, pela valiosa colaboração.

Aos colegas de curso. Drs. JOSÉ AUGUSTO GASPAR DE GOUVEIA e MARCOS DAMÁSIO DE GUSMÃO, pelo auxílio em algumas fases do experimento.

Ao professor RONON RODRIGUES, do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG, que nos facilitou a utilização dos recursos disponíveis naquele setor.

Ao Sr. LOURIVAL GOMES RIBEIRO, funcionário do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG, pela colaboração na limpeza e esterilização do material.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela ajuda econômica representada pela bolsa de pós-graduação.

À Escola de Veterinária da UFMG, abrigo incontestado de cultura científica.

A todos que, direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

Fabiano Sebastião de Souza, filho de Sebastião Raimundo de Souza e Maria Francisca de Souza, nasceu em Tibau – Município de Areia Branca, Rio Grande do Norte, aos 2 dias do mês de setembro de 1942.

Obteve o diploma de Médico Veterinário em 1968, pela Faculdade de Veterinária do Ceará.

Médico Veterinário do Ministério da Agricultura, por habilitação em concurso público.

## RESUMO

Coelhos foram inoculados pelas vias subcutânea e intramuscular, com imunógenos procedentes das espécies equina e bovina, num esforço para definir o melhor tratamento para a produção de anti-soros específicos, utilizáveis em provas de identificação de carnes.

Os imunógenos empregados foram:

- Soro sanguíneo normal;
- Soro sanguíneo inativado por aquecimento;
- Soro sanguíneo precipitado pelo alúmen;
- Extrato de carne normal;
- Extrato de carne fervida e autoclavada.

Utilizou-se cinco doses de 2 ml de imunógeno, acrescidas de igual quantidade de adjuvante incompleto de FREUND, administradas a intervalos de sete dias sangrando-se os animais sete dias após a última inoculação.

Em testes de gel-imunoprecipitação, frente ao soro homólogo, os anti-soros obtidos pela administração de extrato de carne normal por via intramuscular, determinam os valores médios mais altos à titulação, sendo estes valores de 1:13.200 para a espécie equina e de 1:9.000 para a espécie bovina.

## SUMMARY

Rabbits have been inoculated by subcutaneous and intramuscular ways, with immunogens from equine and bovine species, as an attempt to determine the best handling to produce specific antiserum usable in tests to identify meats.

The following immunogens were applied:

- Normal blood serum;
- Blood serum inactivated by heating;
- Blood serum precipitated by alum;
- Normal meat extract;
- Boiled Autoclaved meat-extract

Five doses of immunogen were used, added to the same quantity of Freund's incomplete adjuvant, inoculated in seven day intervals. The animals were bled five days after the last inoculation.

In gel-immunoprecipitation tests applied to homologous serum, the antiserum obtained from the administering of normal meat extract by intramuscular way, showed the highest average results to titulation, The results were 1:13.200 from equine species and 1:9.000 for bovine species.



**SUMÁRIO**

<b>1 – INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>1</b>
<b>2 – LITERATURA CONSULTADA.....</b>	<b>3</b>
<b>3 – MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>7</b>
3.1 – <u>Preparo dos Imunógenos</u> .....	7
3.1.1 – Soros Sanguíneos Normais.....	7
3.1.2 – Soros Sanguíneos Inativados por Aquecimento.....	7
3.1.3 – Soros Sanguíneos Precipitados pelo Alúmen.....	7
3.1.4 – Extratos de Carne Normal.....	8
3.1.5 – Extrato de Carne Fervida e Autoclavada.....	9
3.2 – <u>Imunização dos Animais</u> .....	9
3.3 – <u>Titulação dos Anti-Soros</u> .....	10
<b>4 – RESULTADOS.....</b>	<b>12</b>
<b>5 – DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>6 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>31</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>32</b>

## TABELAS

## TABELA I

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com soro sanguíneo normal de equino, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo das espécies estudadas.

## TABELA II

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com soro sanguíneo de equino, inativado por aquecimento, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo das espécies estudadas.

## TABELA III

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com soro sanguíneo de equino, precipitado pelo alúmen, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo das espécies estudadas.

## TABELA IV

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com extrato de carne crua de equino, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo das espécies estudadas.

## TABELA V

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com extrato de

carne equina fervida e autoclavada, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo das espécies estudadas.

#### TABELA VI

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com soro sanguíneo normal de bovino, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo das espécies estudadas.

#### TABELA VII

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com soro sanguíneo de bovino, inativado por aquecimento, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo das espécies estudadas.

#### TABELA VIII

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com soro sanguíneo de bovino precipitado pelo alúmen, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo das espécies estudadas.

#### TABELA IX

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com extrato de carne crua de bovino, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo das espécies estudadas.

#### TABELA X

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com extrato de carne bovina fervida e autoclavada, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo das espécies estudadas.

## TABELA XI

Valores médios dos títulos encontrados ao teste de geldifusão, para os soros anti-equino, utilizando-se como antígeno o soro sanguíneo homólogo.

## TABELA XII

Valores médios dos títulos encontrados ao teste de geldifusão, para os soros anti-bovino, utilizando-se como antígeno o soro sanguíneo homólogo.

## TABELA XIII

Análise da variância dos resultados encontrados na titulação dos soros anti-equino frente ao soro sanguíneo homólogo, em teste de gel-  
imunoprecipitação.

## TABELA XIV

Análise da variância dos resultados encontrados na titulação dos soros anti-bovino, frente ao soro sanguíneo homólogo, em teste de gel-  
imunoprecipitação.

## 1 - INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A identificação específica das carnes de consumo é de reconhecida importância, considerando-se a possibilidade de fraudes comerciais, incentivadas principalmente pela variação de preços entre as carnes das diferentes espécies de animais de açougue.

O reconhecimento de músculos esqueléticos em carnes moídas ou picadas, pela destruição das formas anatômicas, apresenta dificuldades que determinam a procura de técnicas especiais para a adoção desta prática.

Diversos são os métodos encontrados na literatura para identificação de carnes, tais como: índice de iodo THORNTON (1969); teste do glicogênio GINSBERG (1948); valor hexabrometo CROWELL (1944); conteúdo de ácidos graxos THORNTON (1969); anafilato reação SILVEIRA et alii (1969); padrões eletroforéticos CODURI JR & RAND JR (1972); índice de refração das gorduras THORNTON (1969); fixação do complemento FURTH (1925); cromatografia gasosa PHILBECK (1967); gel - imunoprecipitação OUCHTERLONY (1949) e MENDES & RIBEIRO (1971). Dentre os métodos citados, o de gel - imunoprecipitação é considerado de comprovada eficiência, simplicidade de execução e acentuada sensibilidade, sendo recomendado pelo INSTITUTO ADOLFO LUIZ (1976).

Trabalhos efetuados por vários pesquisadores, mostraram variações quanto ao imunógeno, dose a ser inoculada, intervalos entre as inoculações, via de eleição para a administração do imunógeno e espécie a ser inoculada para a produção de anti-soros usados na identificação de carnes. Devido às variações, o presente estudo visa levantar a especificidade e o título precipitante de anti-soros de coelhos, inoculados por vias muscular e subcutânea, usando os imunógenos descritas abaixo, obtidos das espécies bovina e equina:

- 1 - soro sanguíneo normal;
- 2 - soro sanguíneo inativado por aquecimento;
- 3 - soro sanguíneo precipitado pelo alumínio;
- 4 - extrato de carne crua;

5- extrato de carne fervida e autoclavada.

A escolha dos imunógenos, vias de inoculação e doses utilizadas, obedeceram recomendações contidas na literatura consultada.



## 2 - LITERATURA CONSULTADA

FURTH (1925); estudando a especificidade de anti-soros produzidos com a utilização de imunógenos normais e aquecidos, inoculou coelhos a intervalos de cinco dias com doses de 0,5 a 1 ml de soros sanguíneos de bovino e equino. As duas primeiras inoculações foram feitas por via intravenosa, seguindo-se cinco outras, por via subcutânea. Os anti-soros obtidos apresentaram títulos de até 1:100.000, frente a antígenos homólogos e heterólogos em teste de soro-precipitação em tubos.

O autor ressalta a importância de uma série de diluições dos antígenos e anti-soros para os testes de soro-precipitação, com o objetivo de evitar resultados negativos falsos, decorrentes do fenômeno de pré-zona.

MUCCIOLO (1940), administrando a coelhos soro sanguíneo normal de equino, em um total de quatro inoculações com doses de 1 ml, a intervalos de seis dias e sangrando os animais no 26º dia após a primeira inoculação, obteve anti-soros com títulos precipitantes de 1:500 frente ao antígeno homólogo. Não foi citada a via de inoculação utilizada.

PROOM (1943) igualmente, estudou a resposta imunológica de coelhos, imunizados com duas doses de soro sanguíneo normal de equino, e com o mesmo soro precipitado pelo alúmen, inoculados pelas vias intramuscular, subcutânea, intraperitonal e endovenosa. Concluiu que os melhores anti-soros para a identificação de carnes são obtidos com a utilização do soro sanguíneo precipitado pelo alúmen, administrado por via intramuscular, em doses de 10 ml, com intervalos de 30 dias, efetuando-se a sangria dos animais 12 dias depois da última inoculação. A média dos títulos obtidos para os anti-soros resultantes deste tratamento, frente ao antígeno homólogo em teste de soro-precipitação em tubos, foi de 1:16.000.

O autor considerou específicos, anti-soros que não reagiram positivamente com soros sanguíneo heterólogos em diluições superiores e 1:50.

KAPLAN & BUCK JR (1951) para a produção de anti-soros, recomendaram imunizar coelhos adultos através da veia marginal da orelha,

inoculando-os durante cinco ou seis dias com soro estéril de equino, livre de preservativos, sendo a primeira dose de 0,5 ml e as seguintes de 2,0 ml cada, sangrando-se os animais quatro dias após a última inoculação. Consideraram adequadas para as provas de identificação de carnes, anti-soros capazes de identificar o soro homólogo em diluições de 1:1.000.

OSWALD (1953) afirma que o teste de soro precipitação em tubos é correntemente usado pelo "Food and Drug Administration", mediante adaptação do método de preparação do anti-soro recomendado por PROOM (1943).

A autora considera satisfatório para provas de identificação de carnes, o anti-soro capaz de identificar o antígeno homólogo a uma diluição de 1:1.000 e que, não apresente reações cruzadas com antígenos diluídos a 1:50; para evitar tais reações, recomenda neutralizá-las por adsorção de pequenas quantidades do antígeno, com o qual ocorreu a reação indesejável, removendo-se o precipitado por filtração ou centrifugação.

NEFF & BECKER (1954) estudaram o efeito da ordem de adição de antígenos e anti-soros em teste de precipitação em tubos, para definir, qual a sua influência nos resultados obtidos, concluindo que menos precipitado é obtido quando o anti-soro é adicionado ao antígeno do que quando o antígeno é adicionado ao anti-soro.

SCHANG & CAMPION (1958) inocularam coelhos, com soro sanguíneo normal de equino, administrado em duas doses de 1 ml com intervalos de 43 a 347 dias, combinando as vias intra-raquídea e endovenosa, sangrando os animais 11 dias após a última inoculação. Obtiveram anti-soros com títulos de até 1:30.000 frente ao soro sanguíneo homólogo, em teste de precipitação sorológica em tubos.

LA ROSA & MORO (1959) injetaram galos por via intramuscular, com uma única dose de 5 ml de soros sanguíneos precipitados pelo alúmen, procedentes de alpaca, lhama, vicunha, cabra, boi, cavalo, suino, cão, gato, puma, tigre e homem. Sangrando os galos no 15º dia após a inoculação conseguiram anti-soros com títulos de 1:655.360 frente aos soros sanguíneos homólogos e, de 1:10.240 com antígenos preparados com a carne da mesma espécie, em teste de soro precipitação em tubos.

PINTO (1961) administrou a coelhos, por via intra-peritoneal, suspensão de proteínas de soros sanguíneos de bovinos, bubalinos,



caprinos e cervídeos, em doses crescentes de 5, 10 e 15 ml, durante três dias consecutivos e sangrou os animais no 10º dia após o início do experimento. Produziu, assim, anti-soros que reagiram positivamente com os soros homólogos diluídos até 1:10.000, em testes de soro precipitação em tubos.

KATSUBE & IMAIZUMI (1968) trataram coelhos, por via intramuscular com: extrato de carne crua; extrato de carne fervida e autoclavada; soro sanguíneo inativado por calor; soro sanguíneo fervido e soro sanguíneo fervido e autoclavado. Efetuaram quatro aplicações do imunógeno, em doses de 2 ml, a intervalos de uma semana, sangrando os animais duas semanas após a última inoculação. Concluíram que dos anti-soros obtidos, o mais específico frente a extratos de carne crua, em teste de soro precipitação em tubos, foi o conseguido pela injeção do soro sanguíneo fervido, tendo o alúmen como adjuvante imunológico. As reações positivas ocorreram com o antígeno em diluições de até 1:12.800.

WARNECKE & SAFFLE (1968) estudaram a produção de anticorpos para a identificação de carnes de bovino, ovino, equino e suíno, em teste de gel-immunoprecipitação. Para a produção dos anti-soros, foram inoculados coelhos pelas seguintes vias: endovenosa, subcutânea, intraperitoneal e intramuscular. Os imunógenos foram: actomiosina, soro sanguíneo precipitado pelo alúmen, extrato muscular salino; extrato muscular precipitado pelo alúmen e extrato muscular liofilizado. Concluíram que o extrato muscular liofilizado aplicado por via intramuscular, na dose de 150 mg, dissolvidas em 2 ml de salina fisiológica e em emulsão com 5 ml de adjuvante completo de Freund, determinou a produção dos melhores anti-soros para a identificação de carnes. Cada coelho foi imunizado, injetando-se duas doses de 3,5 ml de imunógeno em cada perna, com intervalo de um dia entre as inoculações. O tratamento foi repetido 22 dias após a segunda injeção e, os animais sangrados 21 dias depois da última inoculação.

KARPAS et alii (1970) trataram coelhos por via subcutânea, intradérmica e intramuscular com imunoglobulinas G (IgG) obtidas do soro sanguíneo de galos, bovinos, ovinos, equinos e suínos. Utilizaram como adjuvante imunológico o incompleto de Freund, em igual quantidade com a solução salina que continha as imunoglobulinas. Os anti-soros obtidos apresentaram títulos de até 1:10, resultados considerados satisfatórios nas provas de identificação de carnes por teste de hemaglutinação,

embora apresentassem reações cruzadas, as quais foram neutralizadas por adsorção dos antígenos heterólogos.

MENDES & RIBEIRO (1971) elaboraram anti-soros para identificação de carnes de bovino, equino, suíno, cão e gato, através da inoculação de coelhos com soro sanguíneo precipitado pelo alumínio. Os animais produtores dos anti-soros foram inoculados com doses de 2 ml do imunógeno, acrescidas de igual quantidade do adjuvante incompleto de Freund, num total de cinco inoculações por via subcutâneas, com intervalos de sete dias, efetuando-se a sangria no oitavo dia após a última administração do imunógeno. Em testes de gel-imunodifusão, os anti-soros obtidos apresentaram títulos de 1:400 e 1:3.200 frente ao Extrato de Carne e Soro Sanguíneo da espécie homóloga, respectivamente.

GOMES (1976) recomenda a D M S, para a comprovação estatística de tratamentos em delineamentos inteiramente casualizados.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Preparo dos Imunógenos

As amostras de sangue e de carne, que serviram à preparação dos imunógenos, foram obtidas em matadouros frigoríficos localizados próximos à cidade de Belo Horizonte - MG.

##### 3.1.1 - Soros Sanguíneos Normais

Cinco bovinos e cinco equinos adultos foram sangrados na jugular, coletando-se 2.000 ml de sangue de cada animal.

O sangue foi deixado em refrigerador à temperatura de 4°C, durante uma noite; após este período foi centrifugado a 1.400 r.p.m durante 30 minutos, Desprezou-se o sedimento, conforme recomendação de WARNECKE & SAFFLE (1968).

##### 3.1.2 - Soros Sanguíneos Inativados por Aquecimento

Para a obtenção destes soros, o procedimento foi o mesmo descrito para a preparação dos soros sanguíneos normais.

A inativação foi efetuada por aquecimento em banho-maria a 56°C, durante 30 minutos, de acordo com KATSHBE & IMAIZUMI (1968).

##### 3.1.3 - Soros Sanguíneos Precipitados pelo Alúmen

Os soros sanguíneos foram obtidos como está descrito em 3.1.1

A cada 25 ml do soro foram acrescentados 80 ml de água destilada e 90 ml de uma solução de alumínio a 10%. o pH da solução final foi ajustado com hidróxido de sódio 5 N ao ponto isoelétrico específico para o soro utilizado, ou seja, 6,5 para o soro sanguíneo de equino e 5,6 para o soro de bovino.

O precipitado foi coletado por centrifugação a 1.500 r.p.m durante cinco minutos, a seguir lavado por três vezes com 200 ml de uma solução de merthiolate<sup>1</sup> a 1:10.000 e novamente submetido à centrifugação nas mesmas condições anteriores, após cada lavagem.

O volume final do sedimento foi completado para 100 ml com a solução de Merthiolate a 1:10.000.

Na preparação destes imunógenos foram seguidas as recomendações de PROOM (1943), WARNECKE e SAFFLE (1968) e MENDES & RIBEIRO (1971).

#### 3.1.4 - Extratos de Carne Normal

Músculos esqueléticos resfriados, procedentes de cinco bovinos e de cinco equinos adultos, após retirada da gordura e aponevroses, foram cortados com faca, em pequenos fragmentos e triturados em graal, acrescentando-se 20 ml de solução salina fisiológica a cada 10 g de tecido muscular. A mistura foi deixada em refrigerador a 4°C, durante uma noite e depois filtrada em flanela. O filtrado foi ajustado para pH 7 com a adição de hidróxido de sódio a 4%, efetuando-se em seguida a sua centrifugação a 5.000 r.p.m durante trinta minutos.

O sobrenadante foi filtrado com papel filtro<sup>2</sup> Nº 595, em acordo com KATSUBE & IMAIZUMI (1968).

<sup>1</sup> Marca Lilly, fornecido por Eli Lilly do Brasil Ltda, Avenida Morumbi, 8 264 - São Paulo - Brasil.

<sup>2</sup> Marca Carl Schleicher & Schull, fornecido por H. Reeve Angel & Co Ltda, 14 New Bridge Street, London, E.C.4.

### 3.1.5 - Extrato de Carne Fervida e Autoclavada

As carnes de equino e bovino foram obtidas como descrito no item anterior. Durante a sua trituração em graal, foram acrescentados 30 ml de salina fisiológica a cada 10 g de tecido muscular.

A mistura foi fervida em banho-maria à temperatura de 100°C durante sessenta minutos e autoclavada a 110°C com vapor aberto pelo mesmo período. A seguir foi deixada em geladeira durante uma noite, em obediência às mesmas recomendações feitas para o preparo dos extratos de carne normal, conforme KATSUBE & IMAIZUMI (1968).

De cada imunógeno foi obtida uma amostra representativa. A todas, com exceção dos soros precipitados pelo alúmen, foram acrescentadas doses de Merthiolate até uma concentração final de 1:10.000.

Os imunógenos foram acondicionados em frascos com capacidade de 30 ml cada, dotados de tampa de borracha e lacrados com cápsula de alumínio, devidamente identificados, sendo estocados em congelados à temperatura de -20°C, até sua utilização.

### 3.2 - Imunização dos Animais

Cem (100) coelhos machos, em bom estado de saúde, mestiços das raças Noza Zelândia e Gigante Branco, pesando em média 2,5 Kg aos quatro meses de idade, foram adquiridos da Associação Mineira dos Criadores de Coelhos, com observância da máxima homogeneidade possível entre os animais.

Sorteados ao acaso, os coelhos foram colocados em gaiolas individuais, identificados com tatuagem na orelha e numeração da gaiola.

Transcorrida uma semana, considerada como período razoável de adaptação às novas instalações, cada imunógeno foi administrado a dois lotes de cinco animais, sendo um tratamento por via intramuscular e outro por via subcutânea, num total de cinco inoculações, com intervalos de sete dias. Em cada inoculação usou-se 2 ml de imunógeno, acrescidos de igual volume do adjuvante incompleto de FREUND, conforme DAWE et alii (1965) e MENDES & RIBEIRO (1971).

A emulsão era preparada imediatamente antes da inoculação dos animais, colocando-se o imunógeno e o adjuvante em duas seringas acopladas por uma agulha de canhão duplo. Efetuou-se a passagem do conteúdo de uma seringa para outra até adquirir consistência semelhante à da vela de cera, quando pingada em um recipiente com água, conforme OLIVEIRA LIMA & DIAS DA SILVA (1970).

Cada aplicação do imunógeno nos coelhos, era distribuída em dois pontos: nos músculos dos membros posteriores as injeções intramusculares e, nas partes laterais do tórax as injeções subcutâneas.

Sete dias após a última inoculação, os animais sofreram sangria total. O sangue foi coletado em tubos de ensaio, sendo deixado em refrigerador a 4°C durante uma noite. De cada animal obteve-se cerca de 6 ml de soro sanguíneo, que foram acondicionados em frascos dotados de rolha de borracha. Após lacrados com cápsula de alumínio e devidamente identificados os frascos foram estocados a -20°C.

### 3.3 - Titulação dos Anti-Soros

Para a titulação dos anti-soros foi utilizado o método da dupla difusão em gel, conforme OUCHTERLONY (1949) WARNECK & SAFFLE (1968) e MENDES RIBEIRO (1971).

IONAGAR nº 2<sup>3</sup> diluído em salina fosfatada pH 7,2, na proporção de 1,5%, foi fundido por aquecimento, conforme FUGATE JR. e PENN (1971).

Com a utilização de pipetas de 5 ml foram colocados 4 ml da solução gelatinosa sobre lâmina de vidro de 26 x 76 mm. Após cerca de 15 minutos, quando a camada gelatinosa já havia adquirido a consistência necessária, nela foram feitos orifícios com o perfurador apropriado, escolhido em ensaios efetuados.

---

<sup>3</sup>Marca Merck, Fornecido por Merck S.A. Indústrias Químicas Est. dos Bandeirantes, 1099 - Rio de Janeiro, R.J. - Brasil.

Em cada lâmina foram executados dois conjunto de sete perfurações, compreendendo cada um deles um orifício central de 4 mm de diâmetro, circundado por seis orifícios de igual dimensão, distando daquele 3 mm.

Os anti-soros (soros de coelho anti-espécie), puros e diluídos em salina fisiológica até 1:20.000, foram colocados nos orifícios centrais, enquanto nos periféricos foram colocados soros sanguíneos homólogos e heterólogos, puros e diluídos em salina fisiológica até 1:20.000. Fez-se titulação radial, conforme recomendação de FURTH(1925).

As lâminas preparadas como descrito foram colocadas horizontalmente em câmara úmida, à temperatura ambiente de 18 a 26°C, para a difusão dos antígenos e anti-corpos através da gelatina.

Nas reações positivas formaram-se linhas de precipitação na camada gelatinosa, visíveis a olho nu. Nos casos negativos essas linhas eram ausentes.

Para uma melhor leitura das reações, a observação das lâminas era feita sob luz indireta, contra fundo escuro 12, 24 e 48 horas após o início do teste.

Foram repetidas cinco análises para cada diluição do anti-soro e dos soros homólogos e heterólogos. Considerou-se como título do anti-soro, a diluição mais alta do antígeno que com ele produzisse reação positiva, confirmando-se o resultado pelos testes de repetição.

Utilizou-se a DMS para a comparação estatística dos resultados encontrados, conforme GOMES (1976).



#### 4 - RESULTADOS

Os resultados estão apresentados nas Tabelas I a X, constando as apreciações estatísticas das tabelas XI, XII, XIII e XIV.

Observa-se que durante o experimento morreram os coelhos de números: 6, 11, 22, 30, 44, 62 e 87, não tendo sido possível recuperar o soro sanguíneo destes animais.

As diferenças estatísticas entre os tratamentos efetuados, foram estabelecidas pelo cálculo da DMS.



TABELA I

Títulos ao teste de gelfusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com soro sanguíneo normal de equino, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo bovino e equino.

Via Subcutânea			Via Intramuscular		
Nº do Anti-Soro	Antígenos		Nº do Anti-Soro	Antígenos	
	Equino	Bovino		Equino	Bovino
1	1:7.000	1:10	7	1:1.000	1:1
2	1:7.000	1:10	8	1:1.000	1:1
3	1:7.000	1:10	9	1:3.000	1:1
4	1:6.000	1:10	10	1:1.000	1:1
5	1:6.000	1:1*			

\* Não diluído

TABELA II

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com soro sanguíneo de equino, inativado por aquecimento, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo bovino e equino.

Via Subcutânea			Via Intramuscular		
Nº do Anti-Soro	Antígenos		Nº do Anti-Soro	Antígenos	
	Equino	Bovino		Equino	Bovino
12	1:3.000	1:10	16	1: 9.000	1:10
13	1:3.000	Negativo <sup>1</sup>	17	1:10.000	1:10
14	1:3.000	Negativo	18	1: 8.000	1:100
15	1:6.000	1:1 <sup>2</sup>	19	1: 9.000	1:1
			20	1: 8.000	1:1

1 - Não houve reação

2 - Não diluído

TABELA III

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com soro sanguíneo de equino, precipitado pelo alúmen, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo bovino e equino.

Via Subcutânea			Via Intramuscular		
Nº do Anti-Soro	Antígenos		Nº do Anti-Soro	Antígenos	
	Equino	Bovino		Equino	Bovino
21	1:11.000	Negativo*	26	1: 9.000	Negativo
23	1:11.000	Negativo	27	1: 9.000	Negativo
24	1:11.000	Negativo	28	1: 9.000	Negativo
25	1:12.000	Negativo	29	1:10.000	Negativo

\* Não houve reação

TABELA IV

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com extrato de carne crua de equino, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo bovino e equino.

Via Subcutânea			Via Intramuscular		
Nº do Anti-Soro	Antígenos		Nº do Anti-Soro	Antígenos	
	Equino	Bovino		Equino	Bovino
31	1.10.000	Negativo *	36	1:12.000	Negativo
32	1:10.000	Negativo	37	1:15.000	Negativo
33	1:12.000	Negativo	38	1:15.000	Negativo
34	1:12.000	Negativo	39	1:12.000	Negativo
35	1:10.000	Negativo	40	1:12.000	Negativo

\* Não houve reação

TABELA V

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com extrato de carne equina fervida e autoclavada, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo bovino e equino.

Via Subcutânea			Via Intramuscular		
Nº do Anti-Soro	Antígenos		Nº do Anti-Soro	Antígenos	
	Equino	Bovino		Equino	Bovino
41	1:15.000	Negativo*	46	1:8.000	Negativo
42	1:10.000	Negativo	47	1:8.000	Negativo
43	1:10.000	Negativo	48	1:8.000	Negativo
45	1:7.000	Negativo	59	1:7.000	Negativo

\* Não houve reação

TABELA VI

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com soro sanguíneo normal de bovino, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo bovino e equino.

Via Subcutânea			Via Intramuscular		
Nº do Anti-Soro	Antígenos		Nº do Anti-Soro	Antígenos	
	Bovino	Equino		Bovino	Equino
51	1:4.000	1:10	56	1:5.000	1:1
52	1:4.000	1:10	57	1:4.000	1:1
53	1:5.000	1:10	58	1:4.000	1:1
54	1:4.000	1:10	59	1:4.000	1:1
55	1:3.000	1:1*	60	1:5.000	1:1

\* Não diluído

TABELA VII

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com soro sanguíneo de bovino, inativado por aquecimento, utilizando-se como antígeno o soro sanguíneo equino e bovino.

Via Subcutânea			Via Intramüscular		
Nº do Anti-Soro	Antígenos		Nº do Anti-Soro	Antígenos	
	Bovino	Equino		Bovino	Equino
61	1:5.000	1:10	66	1:3.000	1:100
63	1:5.000	Negativo *	67	1:3.000	1:100
64	1:5.000	Negativo	68	1:3.000	1.10
65	1:3.000	Negativo	69	1:4.000	1:100
			70	1:3.000	1:10

\* Não houve reação

TABELA VIII

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com soro sanguíneo de bovino, precipitado pelo alúmen, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo bovino e equino.

Via Subcutânea			Via Intramuscular		
Nº do Anti-Soro	Antígenos		Nº do Anti-Soro	Antígenos	
	Bovino	Equino		Bovino	Equino
71	1:5.000	Negativo*	76	1:5.000	Negativo
72	1:3.000	Negativo	77	1:4.000	Negativo
73	1:5.000	Negativo	78	1:3.000	Negativo
74	1:5.000	Negativo	79	1:3.000	Negativo
75	1:3.000	Negativo	80	1:5.000	Negativo

\* Não houve reação



TABELA IX

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com extrato de carne crua de bovino, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo bovino e equino.

Via Subcutânea			Via Intramuscular		
Nº do	Antígenos		Nº do	Antígenos	
Anti-Soro	Bovino	Equino	Anti-Soro	Bovino	Equino
81	1:6.000	Negativo *	86	1: 5.000	Negativo
82	1:5.000	Negativo	88	1: 5 000	Negativo
83	1:2.000	Negativo	89	1:13.000	Negativo
84	1:2.000	Negativo	90	1:13.000	Negativo
85	1:5.000	Negativo			

\* Não houve reação

TABELA X

Títulos ao teste de geldifusão dos anti-soros obtidos pela imunização de coelhos por vias subcutânea e intramuscular, com extrato de carne bovina fervida e autoclavada, utilizando-se como antígeno soro sanguíneo bovino e equino.

Via Subcutânea			Via Intramuscular		
Nº do Anti-Soro	Antígenos		Nº do Anti-Soro	Antígenos	
	Bovino	Equino		Bovino	Equino
91	Negativo*	Negativo	96	1:13.000	Negativo
92	1:14.000	Negativo	97	Negativo	Negativo
93	Negativo	Negativo	98	Negativo	Negativo
94	Negativo	Negativo	99	Negativo	Negativo
95	Negativo	Negativo	100	1:14.000	Negativo

\* Não houve reação

TABELA XI



Valores médios dos títulos encontrados ao teste de geldifusão, para os soros anti-equino, com a utilização do soro sanguíneo homólogo, como antígeno.

Imunógeno	Via de Inoculação	Média ã Titulação
Soro Sanguíneo Normal	Subcutânea	1: 6.600
Soro Sanguíneo Normal	Intramuscular	1: 1.500
Soro Sanguíneo Inativado	Subcutânea	1: 3.750
Soro Sanguíneo Inativado	Intramuscular	1: 8.800
Soro Sanguíneo Precipitado	Subcutânea	1:11.250
Soro Sanguíneo Precipitado	Intramuscular	1: 9.250
Extrato Carne Normal	Subcutânea	1:10.800
Extrato Carne Normal	Intramuscular	1:13.200
Extrato Carne Ferv.Autoclavada	Subcutânea	1:10.500
Extrato Carne Ferv.Autoclavada	Intramuscular	1: 7.750

TABELA XII

Valores médios dos títulos encontrados ao teste de geldifusão, para os soros anti-bovino, com a utilização do soro sanguíneo homólogo, como antígeno.

Imunógeno	Via de Inoculação	Média ã Titulação
Soro Sanguíneo Normal	Subcutânea	1:4.000
Soro Sanguíneo Normal	Intramuscular	1:4.400
Soro Sanguíneo Inativado	Subcutânea	1:4.500
Soro Sanguíneo Inativado	Intramuscular	1:3.200
Soro Sanguíneo Precipitado	Subcutânea	1:4.200
Soro Sanguíneo Precipitado	Intramuscular	1:4.000
Extrato Carne Normal	Subcutânea	1:4.000
Extrato Carne Normal	Intramuscular	1:9.000
Extrato Carne Ferv.Autoclavada	Subcutânea	1:2.800
Extrato Carne Ferv.Autoclavada	Intramuscular	1:5.400



TABELA XIII

Análise da variância dos resultados encontrados na titulação dos soros anti-equino frente ao soro sanguíneo homólogo, em teste de gel-immunoprecipitação.

FV	GL	SQ	QME
Total	43	556.977.272.727	
Tratamento	9	492.377.272.727	
Erro	34	64.600.000.000	1.900.000.000

Coefficiente geral de variação igual a 16,3%

DMS encontradas para a comparação das médias dos títulos, obtidos para os soros anti-equino X soro homólogo, nos dez tratamentos efetuados:

$$\text{DMS}_{5 \times 5} = 1.769$$

$$\text{DMS}_{5 \times 4} = 1.877$$

$$\text{DMS}_{4 \times 4} = 1.978$$

TABELA XIV

Análise da variância dos resultados encontrados na titulação dos soros anti-bovino, frente ao soro sanguíneo homólogo, em teste de gel-immunoprecipitação.

FV	GL	SQ	QME
Total	47	581.916.666.667	
Tratamento	9	112.116.666.667	
Erro	38	469.800.000.000	12.363.158.000

Coefficiente geral de variação a 27,7%

DMS encontrados para a comparação das médias dos títulos para os soros anti-bovino X soro homólogo, nos dez tratamentos efetuados:

$$\begin{array}{l} \text{DMS} \\ 5 \times 5 \end{array} = 4.492$$

$$\begin{array}{l} \text{DMS} \\ 5 \times 4 \end{array} = 4.764$$

$$\begin{array}{l} \text{DMS} \\ 4 \times 4 \end{array} = 5.022$$

## 5 - DISCUSSÃO

Para a titulação dos anti-soros foi preferido o teste de gel-  
imunoprecipitação, pela sua simplicidade e sensibilidade, conforme as-  
sinalado por WARNECKE & SAFFLE (1968) e MENDES & RIBEIRO (1971), inclu-  
sive não sofrendo o efeito da ordem de adição do antígeno e anti-soro,  
descrito por NEFF & BECKER (1954).

Comparando os nossos resultados com os obtidos por FURTH (1925),  
verificamos que aquele pesquisador obteve anti-soros mais potentes para  
provas de identificação de carnes embora os níveis de reações cruzadas  
fossem mais altos, especialmente quando utilizou antígenos aquecidos  
nos testes de soro precipitação.

O soro sanguíneo normal de equino, administrado a coelhos, no  
tratamento que efetuamos demonstrou maior eficiência imunológica, do que  
no tratamento efetuado por MUCCILOLO (1940) com o mesmo material. Ressal-  
te-se, entretanto que ele reconheceu que podem ser obtidos títulos mais  
altos, se for administrado aos coelhos solução de ácido ascórbico, por  
via parenteral.

Pela observação dos resultados apresentados por PROOM (1943)  
nota-se que o soro sanguíneo de equino, precipitado pelo alúmen, inje-  
tado em coelhos, conforme tratamento por ele recomendado, determina a  
produção de anti-soros de mais altos títulos, frente ao antígeno homó-  
logo em teste de soro precipitação em tubos, do que os que obtivemos  
com o mesmo imunógeno. Aqueles anti-soros são dotados de menor especi-  
ficidade, aumentando a ocorrência de reações cruzadas à medida que PROOM  
aumentou o número de injeções do imunógeno nos coelhos.

Seguimos, igualmente as recomendações de KAPLAN & BUCK JR (1951)  
e OSWALD (1953), que consideram adequados para provas de identificação  
de carnes, anti-soros que identifiquem o soro sanguíneo homólogo em di-  
luições de 1:1.000 e não permitam reações cruzadas com soros heterólo-  
gos em diluições superiores a 1:50. Assim os tratamentos que efetuamos  
determinaram a produção de anti-soros adequados para a identificação de  
carnes, exceto o de nº 18 tabela II, e os números 66, 67 e 69, constan-  
tes da tabela VII, por apresentarem reações cruzadas acima da

especificação. Também os anti-soros de números 91, 93, 94, 95, 97, 98 e 99 conforme tabela X, não apresentaram títulos precipitantes nos testes efetuados.

Os altos títulos obtidos por LA ROSA & MORO (1959), que diferem dos resultados que encontramos e também dos citados na literatura, podem ser explicados pela distância existente na escala zoológica entre a espécie "Gallus domesticus" e as produtoras dos imunógenos utilizados para os tratamentos.

PINTO (1961) obteve anti-soros de títulos aproximados dos nossos, com o tratamento efetuado com extrato de carne crua de bovino, administrado por via intramuscular. O soro sanguíneo de bovino, precipitado pelo alúmen, gerou a produção de anti-soros de títulos mais baixos do que os encontrados por aquele pesquisador. Entretanto, estes títulos foram aproximadamente iguais aos da pesquisa dele, quando administramos este último imunógeno procedente de equino.

Os resultados apresentados por KATSUBE & IMAIZUME (1968) para anti-soros procedentes de coelhos, imunizados com soros sanguíneos de equino e de bovino, inativados por aquecimento, foram superiores aos que encontramos para os mesmos imunógenos; contudo, não empregamos antígenos inativados por aquecimento nos testes de geldifusão.

Com os extratos de carne crua, aqueles pesquisadores conseguiram resultados inferiores aos que obtivemos com os mesmos imunógenos. Vale notar que, com extratos de carne fervida e autoclavada, eles não conseguiram resultados positivos com nenhum dos anti-soros produzidos.

Com estes últimos imunógenos, alcançamos resposta detectável por geldifusão, em todos os anti-soros dos coelhos inoculados com extratos de carne equina. Com os mesmos extratos procedentes de bovinos, apenas 3 dos 10 animais inoculados, produziram anti-soros precipitantes.

Os títulos constantes dos resultados apresentados por MENDES & RIBEIRO (1971) para anti-soros procedentes de coelhos imunizados com soro sanguíneo de equino, precipitado pelo alúmen, foram inferiores aos que obtivemos com o mesmo tratamento, talvez em decorrência do método adotado no preparo de emulsões, no qual fomos obedientes às recomendações de OLIVEIRA LIMA & DIAS DA SILVA (1970) e dos autores supracitados.

Pela observação da média dos resultados obtidos com os vinte tratamentos efetuados, em relação à via de inoculação, verifica-se que somente o soro sanguíneo precipitado pelo alúmen e o extrato de carne



normal, determinaram a produção de anti-soros de mais alto título frente ao soro sanguíneo homólogo, quando administrados por vias subcutânea e intramuscular, respectivamente, independentes em relação à espécie produtora do imunógeno. Não houve concordância de resultados para os demais tratamentos, considerando-se a via de inoculação no coelho e a espécie produtora do imunógeno. Em outras palavras, a média dos títulos obtidos para os anti-soros procedentes dos coelhos inoculados com soro sanguíneo normal de equino foi mais alta, com o tratamento por via subcutânea, enquanto a melhor média para o mesmo tratamento com imunógeno procedente de bovino foi obtida com a utilização da via intramuscular. Com soro sanguíneo inativado por aquecimento e extrato muscular fervido e autoclavado, ambos procedentes de equino, as médias mais altas foram obtidas com os tratamentos por vias intramuscular e subcutânea, respectivamente, acontecendo o inverso para os mesmos tratamentos efetuados com imunógenos procedentes da espécie bovina.

Os anti-soros cujos títulos apresentaram a mais alta média, foram os obtidos com o extrato de carne normal inoculado por via intramuscular, independentemente da espécie produtora do imunógeno. Utilizando-se a DMS para a comparação das médias, conforme GOMES (1976), foi este tratamento estatisticamente diferente de todos os outros, no caso dos imunógenos procedentes de equino. Para os imunógenos procedentes de bovino, o tratamento com extrato de carne normal, por via intramuscular, não apresentou resultado estatisticamente diferente dos encontrados com soro sanguíneo normal, por via intramuscular, soro sanguíneo inativado por aquecimento, via subcutânea, e extrato de carne fervida e autoclavada, por via intramuscular. O coeficiente de variação encontrado para os tratamentos efetuados com imunógenos procedentes de bovino sofreu significativa influência da variação experimentada para os títulos obtidos com os anti-soros procedentes dos coelhos inoculados com o extrato de carne fervida e autoclavada.

Foi também observado que nos anti-soros de títulos mais altos são comuns os fenômenos de pré-zona, motivo porque há necessidade de uma série de diluições do antígeno e do anti-soro, conforme recomendação de FURTH (1925) para evitar falsos resultados negativos.

Observa-se que os intervalos de 43 a 347 dias entre as inoculações, recomendados por SCHANG & CAMPION (1958), por serem muito longos, dificultam a obtenção de anti-soros, embora os tratamentos permitam a

recuperação de anti-soros de alto título.

Os resultados apresentados por KARPAS et alii (1970) evidenciam anti-soros de baixos títulos, comparados aos que obtivemos.

## 6 - CONCLUSÕES

1. Entre os tratamentos efetuados, os que produziram anti-soros de mais alto título frente ao soro sanguíneo homólogo foram os de imunização dos coelhos, por via intramuscular, com extrato de carne normal.

2. O extrato de carne bovina fervida e autoclavada, administrado a coelhos por via subcutânea ou intramuscular, demonstrou não ser um bom imunógeno.

3. A inoculação de coelhos com imunógenos procedentes das espécies equina e bovina, pelas vias subcutânea e intramuscular, em alguns casos apresenta respostas imunológicas diferentes, considerando-se a via de inoculação e a espécie produtora do imunógeno.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - CODURI Jr. R.J. & RAND Jr. A.G. Vertical plate gel electrophoreses for the differentiation on meat species. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 55(3):461-463, 1972.
- 02 - CROWELL, G.K. Hexabromide method for detection of small quantities of linolenic Acid in animal fats. J. Assoc. Off. Agric. Chem., Washington, 27(3):448-451, 1944.
- 03 - DAWE, D.L. et alii. Passive transfer of the action of Freund's adjuvant by serum from rabbits injected with the adjuvant. J. Food Science, Chicago, 148:1345-1347, 1965.
- 04 - DEAN, H.R. & WEBB, R.A. The influence of optimal proportions of antigen and antibody in the serum precipitation reaction. J. of Pathology and Bacteriology, Edimburgh, 29:473-491, 1926.
- 05 - FUGATE Jr. H.G. & PENN, S.R. Immunodifusion Technique for the identification of animal species. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 54(5):1152-1156, 1971.
- 06 - FURTH, J. Antigenic character of heated protein. J. Immunology, Baltimore, 10:777-789, 1925.
- 07 - GINSBERG, A. The differentiation of meats by precipitation test, Vet. Rec., London, 60:683-685, 1948.
- 08 - GOMES F.P. Curso de Estatística Experimental. 6.ed. São Paulo, Nobel, 1976, 430p.
- 09 - INSTITUTE ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz; Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2.ed. São Paulo, Debora D. Estrella Rebocho, 1976. V.I.

- 10 - KAPLAN, E. & BUCK Jr. T.C. Detection of horse meat by the biological precipitin test. J. Milk Food Technol, Towa, 14:66-67, 1951.
- 11 - KARPAS, A.B. et alii. Serological identification of species of origin of sausages meats. J. Food Science. Chicago, 35:150-155, 1970.
- 12 - KATSUBE, Y. & IMAIZUMI, K. Serological Differentiation of animal meats, Jap. J. Vet. Sci., Tókió, 30:219-232, 1968.
- 13 - LA ROSA, V. & MORO, S.M. La prueba de precipitación en la diferenciación de las carnes de los mamíferos, Rev. Fac. Med. Vet. Lima, Lima, 13-14:158-168, 1959.
- 14 - MENDES, B. & RIBEIRO, R.M.P. Imunodifusão como método de diferenciação de carnes, Arq. Esc. Vet. Belo Horizonte, 23:263-267, 1971.
- 15 - MUCCILOLO, P. A prova de precipitação em inspeção de carnes: ação de ácido ascórbico na preparação de soros de alto título. Rev. Fac. Med. Vet., São Paulo, São Paulo 1(3-4):211-224, 1940.
- 16 - NEFF, J.C. & BECKER, E.L. The effect of the order of addition of antigen and antibody on the precipitin reaction. J. Immunology, Baltimore, 73:286-295, 1954.
- 17 - OLIVEIRA LIMA, A. & DIAS DA SILVA, W. Imunologia, Imunopatologia e alergia. Rio de Janeiro, Guanabara Khoogan, 1970, 673p.
- 18 - OSWALD, E.J. Serological methods in the regulatory control of foods. J. Assoc. Off. Agric. Chem., Washington 36(1):107-111, 1953.
- 19 - OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gels. Acta, Path. Microbiol. Scand. Escandinávia, 26, 507-515, 1949.

- 20 - PHILBECK, R.H. Meats and meat products. J. Assoc. Anal. Chem., Washington, 50(4):942, 1967.
- 21 - PINTO, F.C. Serological identification of ox, buffalo, goat and deer flesh. British Vet. J., London, 6(117):540-544, 1961.
- 22 - PROOM, H. The preparation of precipitating sera for the identification of animal species. J. Pathol. Bacteriol. Edimburgh, 7:103-110, 1943.
- 23 - SCHANG, P.J. & CAMPION, R.L. Obtencion de sueros precipitantes antiequino, em conejos, combinando las vias intraraquidea y endovenosa. Gaceta Veterinaria, Buenos Aires, 20(111):251-255, 1958.
- 24 - SILVEIRA, C. et alii. Pesquisa de carne de cavalo nos embutidos pelo método de anafilaxia "in vitro" Tribuna Farmacêutica, Curitiba, 37(2):91-94, 1969.
- 25 - THORNTON, H. Compendio de inspeção de carnes. 5.ed. São Paulo, Fremag, 1969, 665p.
- 26 - WARNECKE, A.O. & SAFFLE, R.L. Serological identification of animal proteins. 1. Mode of injection and proteins extracts for antibody production. J. Food. Sci. Chicago, 33:131-135, 1968.
- 27 - WEINSTOCK, A.A. Survey on the detection of horsemeat by the serological precipitin test. J. Milk Food technol. Towa 14:66-67, 1953.