

ACADEMIA NACIONAL DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

Buenos Aires - Arenales 1678

MESA DIRECTIVA

Presidente..... Ing. Agr. José María Bustillo
Vicepresidente Dr. José Rafael Serres
Secretario General..... Dr. Osvaldo A. Eckell
Secretario de Actas..... Dr. Alejandro C. Baudou
Tesorero Ing. Agr. Eduardo Pous Peña

ACADEMICOS DE NUMERO

Dr. Baudou, Alejandro C.
Ing. Agr. Bordelois, Gastón
Ing. Agr. Brunini, Vicente C.
Ing. Agr. Burgos, Juan Jacinto
Ing. Agr. Burkart, Arturo E.
Ing. Agr. Bustillo, José María
Dr. Cárcano, Miguel Angel
Ing. Agr. Casares, Miguel F.
Dr. Eckell, Osvaldo A.
Dr. Fernández Ithurrat, Edilberto
Dr. García Mata, Enrique
Dr. Helman, Mauricio B.
Ing. Agr. Ibarbia, Diego J.
Ing. Agr. ICugler, Walter F.
Dr. Monteverde, José Julio
Dr. Newton, Oscar M.
Dr. Pires, Antonio
Ing. Agr. Pous Peña, Eduardo
Ing. Agr. Ragonese, Arturo E.
Dr. Rottgardt, Abel A.
Dr. Serres, José Rafael
Dr. Solanet, Emilio
Ing. Agr. Soriano, Santos

ACADEMICO HONORARIO

Ing. Agr. Borlaug Norman E.

ACADEMICOS CORRESPONDIENTES

Dr. Bonadonna, Telésforo
Dr. Cinotti, Felice
Ing. Agr. Covas Guillermo
Ing. Agr. Horovitz Yarcho Salomón

ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

Diagnóstico serológico específico *

Jose Julio Monteverde**

Sr. Presidente.

Sres. Académicos:

Tengo el honor de dirigirme a ustedes para referirme a un tema relacionado con una enfermedad ya tratada en esta Academia

En su preparación se ha apelado a la experiencia acumulada en los últimos años ¹³¹¹, una parte de la cual publicamos ¹⁴y otra es aún inédita y formada por correspondencia particular, datos procedentes de trabajos ^{***} y contactos personales ^{****}.

Si algunos vaticinios ¹²- se cumplen, en estos últimos 10 años la AIE en el país debe haber variado en extensión e incidencia, lo que se apreciará mejor cuando la serología específica se aplique a la epi-

* Comunicacin efectuada en la sesión del 12 de setiembre de 1973. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Buenos Aires, Argentina.

** Académico de Número en la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Argentina. Profesor titular de Microbiología en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (1973).

*** En colaboración con H. J. Monteverde y M. C. Monteverde.

**** Dr. J. B. Teigland, Florida, USA (H. J. M., 1973); Prof. V. Saurino. Atlantic. Univ., Florida, USA (J. J. M., 1965); Dr. L. Coggins, Cornell Univ. Jthaca, New York, USA (H. J. M., 1973); Dres. W. L. Sippel y J. H. Gainer. Agr. Exp. St. Kissimmee, Florida, USA (J. J. M., 1965); Prof. Dr. B. Toma. Picole Méd. Vét., Afort, París (H. J. M., 1973; J. J. M!, 1955); Dres. R.W. Moore y C. Livingston, Texas Univ.. College Station. USA (J. J. M., 1965); Prof. C. Corst, Hannover (J. J. M., 1965).

zootiología. Parejamente es comprensible de que al incremento de casos clínicos deba corresponderá uno superior de enfermos asintomáticos.

Son varios los criadores que poseen experiencia acerca del significado de la AIE y algunos han abandonado la actividad después de sufrir severas pérdidas. Merece destacarse que quienes, entendiendo el problema, implantaron en las explotaciones las medidas pertinentes. es porque tal vez debe haber influido el criterio de que las improvisaciones, al menos en este caso, deben ser inexorablemente eliminadas.

Quienes actúan con equinos destinados a diferentes actividades deportivas suelen ahora tener conocimientos más apropiados sobre las consecuencias de la AIE; algunos han sido testigos de pérdidas por animales enfermos y muertos y tienen de ello recuerdos que los llevan a una situación angustiante al sólo pensar que entre los animales a su cuidado pueda presentarse algún enfermo o hallarse un infectado con virus de AIE.

Ha sido alentador comprobar que en nuestro país existen eficaces colaboradores en la lucha contra la AIE y todo parecería indicar que si antes a veces se trataba de evitar o suplantar al veterinario, ahora esta actitud está variando.

Con el propósito de situar a los oyentes en el tema, se citarán, someramente, algunos aspectos de la AIE referentes a datos clínicos y semiológicos. infección viral y anticuerpos específicos (Apéndice).

Las pruebas serológicas aplicadas al diagnóstico de la AIE ^{16,16,111}

2'.i-3 6-3 7-39-4 0-41-45-46-17-49-50- 61-G2-66-67-68-75-79-80-87-90 hcin OCUJ)3(ÍO V 0CU)3H

la atención de investigadores de varios países, principalmente en aquellos donde la AIE prevalece (EE. UU., Canadá, Francia y Ja'pón); también en Argentina se ha presentado una nota previa al respecto En la presente comunicación solo se hará referencia al procedimiento específico recomendado por Coggins y Norcross (C-N), inspirado en el método de precipitación de doble difusión en gel de agar descrito por Outchterlony ⁷¹, en el que se produce la migración del antígeno desde un lado y la del anticuerpo específico desde otro y que permite observar la precipitación en la zona óptima de conjunción de ambos.

A continuación se presentarán varias figuras, que se irán explicando. para aclarar detalles técnicos y que se tratan con más extensión en el Apéndice.

Se ha demostrado que el procedimiento preconizado por C-N permite detectar reacciones específicas antígeno-anticuerpo en la AIE y de allí su justificada importancia. El antígeno de AIE preparado con pulpa esplénica y conteniendo virus activo, ha sido sometido a purificaciones que permitieron mejorar la prueba y aún se esperan perfeccionamientos; por otra parte, antígeno preparado con virus AIE procedente de cultivos "in vitro" en leucocitos equinos, también ha resultado apropiado 31-32-33-34-35-66-67-68 dando lugar a pruebas ostensibles frente a anticuerpos completos.

Conviene recordar que el antígeno específico también se puede obtener de tejidos tales, como por ejemplo, pulmón, timo y ganglios linfáticos de animales experimentalmente infectados con una cepa muy agresora de virus AIE como lo es la cepa Wyoming. Aspectos importantes en la obtención de un buen antígeno son: el momento adecuado para extraer el órgano elegido, la forma de obtenerlo, el procesado y los controles a que debe ser sometido.

En general la lectura de las pruebas precipitantes se realiza luego de 48 y 96 horas, a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) aunque no hay que desechar la aparición de reacciones tardías a los 6-9 días.

La concepción del acantonamiento o concentración de virus patógenos en determinadas áreas del organismo de especies animales susceptibles y en momentos definidos de la actividad viral, es conocida desde hace tiempo y el mérito de C-N es el haberla aplicado para AIE. Lo que es válido para la multiplicación y acantonamiento del virus de AIE en el organismo equino puede aplicarse también para el anticuerpo específico, es decir que en un animal infectado puede aceptarse que también el anticuerpo sufrirá concentraciones en algunas áreas.

Está demostrado ⁸⁷ que. en el organismo infectado experimentalmente. a medida que transcurre el tiempo se forma anticuerpo específico, detectable por el método C-N. Es así que. efectuando

valoraciones periódicas en el suero sanguíneo de animales con o sin sintomatología clínica, se ha podido tener una idea al respecto y así para un mismo animal se ha hallado $< 1:16$ o $1:128$ como título precipitante del suero. (Figura H).

Hasta ahora no se han presentado pruebas documentadas de que exista comunidad antigénica con otros virus patógenos para equinos; sin embargo en este punto lo aconsejable es no ser categórico ya que sólo se ha investigado en forma ciertamente restringida. Con respecto a bacterias y hongos inferiores o a respuestas por introducción de sustancias complejas (terapia celular, etc.) aún queda bastante por conocer y lo prudente es no apresurarse. Si en algún momento se demostrara por ejemplo, algún defecto en la especificidad por comunidad antigénica. entonces las valoraciones de tipo cualitativo podrían disminuir su actual relevancia.

No se conoce mucho sobre la influencia que tiene en la infección experimental la raza, edad, características del área de mantenimiento, alimentación, estado sanitario, dosis, cepa de virus y vía de penetración; influyen, sin embargo, separada o conjuntamente, entre otras cosas, en la aparición y concentración del anticuerpo circulante, revelable por el método de C-N o en la concentración viral en determinados territorios orgánicos.

La prueba C-N revela el anticuerpo específico recién alrededor de 20 días después de la inoculación experimental de virus. Esto requiere aclaraciones ya que se ha demostrado que este período varía y que a veces la aparición del anticuerpo específico puede adelantarse en unos días o retrasarse en otros; aún después de 45 días puede, excepcionalmente, no detectarse.

Hay autores que sostienen ⁸ que una vez que el anticuerpo AIE se revela, se mantiene en el organismo infectado. Una afirmación de este tipo necesita confirmación más amplia, pero lo aconsejable es tomarla con cautela si es que ello implica "de por vida". No debería extrañar que, en determinados momentos de la infección en que se esperaría la presencia de anticuerpos circulantes, se demostrara que estos, por fluctuación en la concentración, no fueran detectables por la prueba de C-N; además en algunos sujetos y aún si se quiere como excepción, puede ocurrir que estando infectados y en tiempo adecua-

do, no se detecten anticuerpos. Es correcto entonces sospechar que, tanto el virus ATE como su respectivo anticuerpo circulante, en el organismo infectado fluctúan.

Está claro que existe un lapso en que el método serológico C-N no revela anticuerpos específicos en el animal infectado, es (iecir que éste resulta serológicamente negativo. Quien desconociendo este antecedente deba emitir diagnóstico de certeza a propósito de AIE debe conocer estas limitaciones. De no ser así un ejemplar que constituye una fuente de virus activo puede ingresar en un establecimiento de cría o ser destinado a otras actividades (deporte, trabajo).

Otro aspecto que requiere más información y estudio es el de saber si los casos de AIE de infección natural, en diferentes lugares, reaccionan positivamente en la prueba de C-N de la misma manera que los casos de infección experimental.

Podría existir apresuramiento si se llegara a afirmar las bondades de un procedimiento diagnóstico y no está de más expresar que lo que como reactivo biológico funciona bien en una determinada área del globo, en otra no tendría tanto éxito.

También después de haberse realizado en un país centenares o millares de pruebas serológicas por el método de C-N. empleando un antígeno preparado por ejemplo con la cepa Wyoming puede no llegarse a descubrir su justa utilidad. Por lo tanto no convendría hacer afirmaciones en forma generalizada; en efecto, si bien puede llegarse a detectar casos positivos confirmados, también podrían presentarse casos confirmados como serológicamente negativos. No debe excluirse la posibilidad de que existan enfermos de AIE capaces de reaccionar con otros antígenos distintos de los preparados con la cepa Wyoming.

En materia de agentes virales y bacterianos patógenos, el concepto de pluralidad no es nuevo, como tampoco lo es el de unidad.

Para el caso de Argentina se puede sostener que un antígeno preparado con pulpa de bazo equino (cepa Wyoming) funciona correctamente para detectar algunos casos de AIE. pero sería prematuro afirmar su eficiencia en todos *. Debe entenderse que no se está negando que un reactivo así pueda funcionar satisfactoriamente en todos los casos, sino diciendo que sería prudente investigar más.

* J. J. Monteverde (inédito).

Se evitará entrar en otros aspectos relativos al lapso en que se puede apreciar ausencia de anticuerpo circulante en sujetos experimentalmente infectados por virus AIE (dosis bajas de ciertas cepas de virus en animales de determinadas razas o con defectos de síntesis de anticuerpo, edades variables, etc.), para considerar solamente el registro de anticuerpos específicos para AIE en sujetos que no están infectados por virus activo de AIE.

Se ha demostrado que cuando una yegua infectada, que posee anticuerpo circulante para AIE, amamanta una cría virgen de infección, el calostro le transfiere a ésta anticuerpo específico el que se revela hasta alrededor de los 6 meses de edad por la prueba de C-N que resulta positiva sin que por ello la cría esté infectada con virus AIE. Se puede obtener así un animal positivo serológico, que no tiene infección demostrable de AIE, pero cuya reacción C-N positiva, franca al principio, se va debilitando para desaparecer unos 6 meses después. Esto no significa que una madre infectada no sea capaz, en circunstancias especiales, de infectar a la cría.

Si una madre es C-N positiva, su cría debe ser controlada seriamente a partir del primer mes de edad y hasta el sexto mes, antes de decidir un diagnóstico de infección.

Aparte de esto sería aventurado sostener que un animal, repetidas veces inoculado con materiales conteniendo virus inactivado de AIE, no presentará algún tipo de reacción precipitante específica, sin estar infectado por AIE. Es así que la vacunación profiláctica de la AIE, campo sobre el que se trabaja, probablemente influirá sobre los métodos serológicos de diagnóstico. La vacunación profiláctica de equinos, presumiblemente se hará empleando virus de alguna manera modificado o inactivado lo que puede generar anticuerpos similares a los que ahora resultan útiles para el diagnóstico.

Repetimos: un equino experimentalmente infectado con virus de AIE, con o sin síntomas de AIE, puede presentar una reacción de C-N negativa pero después de un lapso prudencial puede darla positiva. Lo precedente señala una limitación ya que podría tratarse de un caso que, si es mantenido aislado, sin riesgo para otros animales, hasta el momento en que la repetición de la prueba de C-N demuestra que es positivo, no supone mayor peligro de contagio; pero un

animal en estas condiciones debe ser eliminado o debidamente marcado y aislado.

Lo precedente se refiere al caso de un animal deliberadamente infectado con virus AIE. pero esto mismo puede ocurrir en casos de infección natural, aún cuando muchos de ellos sean en realidad casos de infección provocada en los que han ocurrido descargas de virus activo relativamente pequeñas (por ignorancia o incumplimiento de las medidas que se deben tener presentes para no propagar esta enfermedad).

Respecto a esto, en algunos países no siempre se consulta al veterinario para la atención de equinos, por lo que a veces intervienen en el tratamiento de enfermos de AIE personas no habilitadas que pueden, a veces, obtener aparente éxito.

Un animal en esas condiciones es peligroso si está en contacto con otros a los que podría infectar por intermedio de mosquitos, moscas bravas, tábanos, contactos con mucosas, heridas, coito, gestación, medicamentos, instrumentos, maniobras semiológicas. comederos, bebederos, medios de transporte, mangas, boxes. baldes, etc. Un animal recientemente infectado podría darse como sano y aún serológicamente negativo (C-N). situación que cambiaría al conocerse los resultados de la repetición de las pruebas de C-N, 15 a 30 días más adelante. Se suelen presentar aspectos colaterales entre los que merecen citarse la resistencia a admitir que un animal aparentemente normal pueda estar infectado, originándose dudas, ocultamientos y consultas de opiniones diversas, todo lo que a veces conduce a una pérdida de tiempo que puede obrar favoreciendo el contagio.

En estas situaciones la inoculación experimental puede a veces ayudar, pero es necesario realizarla con ciertos requisitos para que sea válida o aún para interpretar correctamente los resultados.

En el supuesto que se decida tratar animales, que se sabe están infectados con AIE. la autoridad sanitaria deberá estar enterada y otorgar la respectiva autorización.

Nadie deberá asombrarse que algunos animales infectados mejoren y aún que aparezcan como aparentemente curados y. más aún. que sean ganadores de carreras u otros eventos; pero esos animales

pueden dar origen a contagios siendo así que en algunas partes se han muerto o se ha debido eliminar a todos los animales alojados en un mismo stud dedicado a animales de carrera o se han diezmado o destruido los existentes en establecimientos de cría. Es conocido el caso de animales destinados a competencias internacionales que debieron ser eliminados por estar enfermos con AIE.

Los países que tengan AIE deberán meditar detenidamente la política sanitaria a seguir en el área interna y en la internacional.

La prueba serológica según el procedimiento de C-N es una importante herramienta para el diagnóstico específico de la AIE a la que se otorga un elevado porcentaje de seguridad, como toda prueba biológica tiene sin embargo limitaciones y debe conocerse su apropiada utilización en la lucha contra la AIE.

APENDICE (*)

GENERALIDADES

En la anemia infecciosa equina (AIE) se han señalado los cursos agudo, subagudo y crónico, pudiendo también presentarse animales infectados asintomáticos (formas latentes). Algunos animales pueden haber tenido antecedentes clínicos de AIE y presentar aparente normalidad, en forma espontánea o provocada, por tratamiento de los síntomas ya que aún no se conoce la existencia de tratamiento específico. La AIE es una enfermedad que, a medida que transcurre, suele originar crisis revelables.

El descubrimiento de los animales asintomáticos no es sencillo aunque ahora su hallazgo se ha simplificado aplicando el método de Coggins-Norcross (C-N). Debe recordarse que el descubrimiento de animales asintomáticos mediante inoculaciones experimentales a equinos tiene varias exigencias, entre éstas que si el material infectante es suero sanguíneo y la dosis no es apropiada (puede requerirse una tan voluminosa como de unos 100 cc.) los resultados pueden ser negativos; que a veces se requiere el empleo de volúmenes elevados de sangre total siendo mejor que aplicar suero sanguíneo solo; que se requieren animales susceptibles que se haya demostrado que no están infectados con virus AIE, por lo que se debe ser precavido al emplear animales procedentes de áreas donde la AIE es prevalente. Los animales inoculados, a su vez, deberán controlarse cuidadosamente, en ambientes adecuados, pudiendo ocurrir que no necesariamente en todos los casos se produzca la reproducción de la enfermedad con típicas evidencias extra-serológicas.

En animales inoculados con virus AIE a veces no se producen respuestas clínicas en lapsos inferiores a 60 días lo que obliga a suponer que en condiciones naturales también podría ocurrir y tal vez con frecuencia, pero aún así no podría sostenerse que no se presentarán crisis de AIE.

La reacción de C-N en asintomáticos puede presentarse como débil o dudosa no debiendo descariarse la existencia de períodos en que el anticuerpo no sea detectable por este procedimiento.

Hay publicaciones 9-15-16-21-23-24-25-28-30-52-55-56-64-65-80-81-82-84-86 que se refieren a la sintomatología de la AIE: fiebre intermitente, respiración y latidos cardíacos acelerados, pérdida de peso, edemas, anemia, astenia, epistaxis, petequias sublinguales, hemorragias en membranas clíngotantes, mucosas pálidas, facies infecciosa, materias fecales hemorrágicas, diarrea.

El nombre dado a la enfermedad señala un síntoma contundente: la anemia; sin embargo debe señalarse que en el curso de la misma no siempre se registra anemia (Figuras E, F y G), es decir que este dato no es constante siendo entonces perfectamente posible que la información de: hematocrito, hemoglobina y gló-

(*) Algunas partes del Apéndice corresponden al contenido de trabajos citados en la bibliografía.

bulos rojos x mm^3 pueda ser similar a la de animales aparentemente normales. Lo precedente también es válido respecto de fórmula leucocitaria, cuenta por mm^3 de glóbulos blancos, eritrosedimentación, siderofagos circulantes, valor aldolasa, valor dehidrogenasa láctica, proporción albúmina/globulina y contenido de lipoproteínas en suero.

Es aceptado por especialistas que la AIE es una enfermedad que presenta una proteica sintomatología clínica como también variedad en las lesiones 12-16-2-1-28-51-55-SJ-85-91 por lo que en algunas ocasiones se la considera de difícil diagnóstico.

INFECCION

En el texto que precede este Apéndice se han señalado aspectos de la infección natural; esta se produciría de diversas maneras aunque sobre este punto se necesitan más investigaciones ya, que no está claro el conocimiento que se posee acerca del momento y tiempo inmediato en que se produce la infección, como tampoco se posee un registro apropiado, sobre suficiente número de animales, para interpretar el efecto de variaciones individuales en relación con la susceptibilidad.

También se necesita más información sobre la infección natural acerca de su distribución y replicación del virus después de su ingreso en un equino susceptible o poco susceptible, por una determinada vía de penetración y de los mecanismos que se movilizan en la producción de anticuerpos específicos —completos o incompletos— que de alguna manera sean capaces de reaccionar con el antígeno tanto "in vivo" como "in vitro".

Faltan más datos acerca de como el virus AIE gana acceso a las células susceptibles y principalmente sus requisitos en cuanto a concentración para obtener el ingreso a las células a través de las barreras antivirales.

Ciertamente se ignora bastante acerca de la actividad patogénica inicial del virus de la AIE en el huésped natural susceptible lo que se debe en parte a que para realizar estudios en este campo es preciso contar con muchos elementos humanos y materiales para poder sostener generalizaciones explicativas. Mientras esto no ocurra el conocimiento de la infección natural de la AIE tendrá bastantes limitaciones y tales consideraciones merecerían ser tenidas en cuenta cuando se trata del diagnóstico específico de la AIE por método serológico.

En cuanto a la infección experimental se ha comprobado que después de la inoculación de una dosis apropiada de virus activo, se produce generalmente un período de incubación de aproximadamente 10 a 14 días en que los inoculados pueden encontrarse aparentemente normales presentando luego una elevación de temperatura $1,5^{\circ}\text{C}$ - $2,5^{\circ}\text{C}$ aproximadamente, la que puede durar varios días. Estos ciclos térmicos suelen repetirse, pero para el presente estudio debe destacarse que en el momento en que el animal se halla en el primero de ellos habría suficiente virus en el bazo como para permitir su utilización en la preparación del antígeno según C-N. En ese momento el animal infectado presenta síntomas, aunque a veces no muy típicos, existe virus circulante y se convierte en un eliminador de virus que debe ser mantenido y controlado apropiadamente.

ANTIGENO

En la preparación del antígeno con pulpa esplénica según Norcross y Coggin, 5-6-8-75 se inoculan ponics con virus AK (cepa Wyoming); luego de 8 a 11

días post inoculación y de 3 a 5 días de comprobar fiebre alta se sacrifican y se extraen los bazo, previa inoculación de adrenalina. La pulpa esplénica se pica, congela, descongela y se mezcla con un volumen igual (p/v) de buffer fosfato en solución fisiológica de pH 7.2; se homogeniza y centrifuga a 27.000 g durante 30 minutos descartando el precipitado; el líquido sobrenadante se lleva a 50 % de saturación con un volumen igual de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 5°C y se centrifuga nuevamente a 27.000 g durante 1 hora descartando el sobrenadante; el precipitado se disuelve en una cantidad mínima de suero fisiológico-buffer fosfato pH 7.2 y se centrifuga a 105.400 g durante 30 minutos; el sobrenadante contiene el antígeno crudo.

El antígeno crudo se purifica por electroforesis (modelo FF4. Brikmann Instruments, Inc., Westbury, N. Y.) en el que el antígeno es continuamente agregado en la cámara a razón de 1.7 ml por hora. En estas condiciones queda sujeto a un campo eléctrico de 200 ma por alrededor de 10 minutos. El buffer en la cámara de separación es tris (hidroximetil) aminometane (tris)-citrato 0.008M/ pH 8.6, regulando la temperatura a 10°C.

Las fracciones conteniendo antígeno son combinadas, dializadas y liofilizadas para su concentración, efectuándose nuevos ciclos de purificación.

El antígeno se concentra por liofilización una segunda vez y se pasa por columna (2,5 por 100 cm) de Sephadex G 200; 0,5 ml de antígeno se agrega al flujo ascendente y la filtración se realiza con tris - 0,5 M NaCl buffer a pH 7,2; el flujo se mantiene a razón de 0,5 ml/minuto y el efluente se controla continuamente a 280 mm con un aparato LKB Unicord con registro. Las muestras con actividad antigénica, según prueba de inmunodifusión. se dializan, se concentran por liofilización y se utilizan para efectuar las siguientes pruebas: gradiente de densidad, mediciones por ultracentrifugación, punto isoeléctrico, termocstabilidad, filtración, fijación de complemento e inmunodifusión.

Se sabe que la actividad antigénica se pierde cuando este antígeno se mantiene 60°C-30 minutos y se reduce a 45°C-30 minutos; que el antígeno filtrado por membrana de 1 μ ; a no es infeccioso, siéndolo en cambio si no se filtra; que su tamaño se calcula en el orden 2.1 S. su peso molecular en 27.500 y que por ello no corresponde al de antígenos víales entre 110 y 120 S.

Los sueros sanguíneos de elevado título precipitante probados con estos antígenos a veces dieron bajos títulos por fijación de complemento (FC) y algunos negativos. Los sueros de animales infectados experimentalmente, 90 días post infección, dieron FC negativa, aún cuando los mismos sueros fueron PC positivos en los estadios iniciales de la infección (1er. mes).

Se considera que se ha hallado un diminuto antígeno específico para AIE. Este antígeno exhibe algunas similitudes con la asociación virus-antígeno, fenómeno descrito en fiebre aftosa por Covvan y Graves (Virology 30 (1966) 528-540) quienes piensan que podrían ser formados por componentes de células normales alteradas por la infección o por una posible enzima implicada en la replicación viral.

PRECIPITACION

La reacción precipitante según Outchterlony⁷⁰ se conoce como procedimiento de doble difusión en gel debido a que el antígeno migra desde un área hacia el anticuerpo y que éste, a su vez, migra desde la suya hacia el antígeno; es así que cuando se emplea un anticuerpo frente a su antígeno homólogo puede observarse una reacción ostensible que se presenta después de un tiempo pruden-

cial y que se traduce por una línea blanquecina que ocupa un lugar en el agar entre el antígeno y el anticuerpo. A veces la complejidad antigénica da origen frente a sus correspondientes anticuerpos, a la aparición de más de una línea o bñññda de precipitación. En otras oportunidades entre antígenos y anticuerpos se observa la aparición de bandas no específicas, las que se hallan situadas en sitios diferentes al de las específicas por lo que las líneas de precipitación respecto de los controles no coinciden o se cruzan. También pueden no presentarse bandas de precipitación lo que puede ocurrir cuando antígeno y anticuerpo no se corresponden o cuando las proporciones de antígeno y anticuerpo homólogos no son óptimas.

En las figuras 1 al 10 se presenta parte de lo expresado.

Para llevar a cabo el método de C-N se requiere disponer del antígeno y del anticuerpo específico los cuales deben reaccionar en forma ostensible. En las figuras 1 al 10 el antígeno está indicado como Ag y el anticuerpo específico como: I y II; a partir de las bandas precipitantes formadas entre estos reactivos se controlan otros similares desconocidos, por ejemplo sueros sanguíneos de animales sospechosos o no de AIE.

Ei gel de agar debe estar contenido en un recipiente límpido y transparente que no presente rayaduras; para ello se eligen cajas de Petri de vidrio o plástico de diferentes diámetros. Es usual emplear cajas de aproximadamente 10 cm de diámetro ya que en ellas pueden realizarse varias pruebas. En la figura D se indica la posibilidad de probar 16 sueros (S) diferentes y 8 sueros testigos (I y II) frente a 4 receptáculos conteniendo antígeno (Ag).

A cada caja de Petri, estando en una superficie nivelada, se agrega una capa de agar buffer borato (duro) de fórmula:

Acido bórico (H3 B03)	9 g	
Hidróxido de Sodio (NaOH)	2 g	
Agar de buena calidad	2 g	
Agua destilada	100 ml	pH 8.6

Esta capa de agar tiene por objeto formar un fondo plano con un espesor de aproximadamente 1 mm (cajas de Petri de 10 cm de diámetro con 6 ml de agar fundido a 60°C que se deja gelificar), las que se pueden mantener, evitando evaporaciones excesivas, hasta 3 semanas y quizá más a 4-8°C.

En el momento en que se desean realizar pruebas de precipitación, a la caja se le agregan de 15 a 17 ml de agar buffer borato (a unos 60°C) al 1 % (blando) formándose así una segunda capa de agar que se deja gelificar (figuras A 1, 2, 3 y 4).

Con un sacabocados de 7 mm de diámetro se perforan los receptáculos presionando de tal manera que solamente se interese la capa de agar blando. Esto se realiza marcando un receptáculo central rodeado, a una distancia de 3 mm, de 6 receptáculos. En el agar contenido en una caja de 10 cm de diámetro esto se puede repetir 4 veces con lo que se dispondrá de hasta 28 receptáculos (figura D).

Una vez perforados los receptáculos, se retira el agar contenido dentro de cada uno de ellos usando un alambre en asa o mediante aspiración suave con bomba de vacío cuidando que la presión negativa no separe las 2 capas de agar; una vez retirado el agar quedan a la vista los receptáculos.

No es aconsejable usar cajas con las 2 capas de agar preparadas con más de 48 horas, puesto que esto no favorece los resultados finales.

Como conservador del agar buffer-borato puede utilizarse merthiolate aunque en el tiempo normal de lectura, en general, no se produce contaminación entorpecedora.

Al terminar las pruebas las cajas deben ser esterilizadas puesto que hay virus activo en el antígeno y también este puede hallarse en los sueros en ensayo.

En la prueba de C'-N el antígeno (Ag) se coloca en el receptáculo central y los sueros testigos en 3 de los 6 receptáculos o sólo en 2 de ellos (I y II) tal como aparecen en las figuras 1 al 10. Los sueros en prueba se ubican en los 4 estantes receptáculos.

El llenado de estos debe hacerse de tal manera que no se produzcan desbordes y tanto para el antígeno como para los sueros testigos deberán respetarse las proporciones que indiquen las pruebas a que ambos reactivos deben someterse o las dadas por los fabricantes. En nuestro caso seguimos las indicaciones aportadas por nuestros protocolos y cuando se emplearon antígenos preparados por otras personas nuestros resultados muchas veces resultaron coincidentes.

Introducidos los reactivos en los receptáculos, las cajas se incuban aproximadamente a 25°C en cámara húmeda haciéndose las lecturas cada 24 horas durante aproximadamente 6 días. Por lo general entre 48 y 96 horas se obtienen resultados, excepcionalmente estos varían después de 96 horas; a veces se aprecian resultados a las 24 horas y aún antes.

Es conveniente hacer las lecturas frente a una fuente luminosa suficiente, imprimiendo suaves desplazamientos giratorios a la placa y colocándola en diferentes ángulos con respecto a la fuente de luz, que incidirá, de abajo hacia arriba.

En las apreciaciones será necesario poseer alguna experiencia, aconsejándose el entrenarse en la lectura de resultados.

Para la repetición de pruebas son útiles los antecedentes clínicos, epidemiológicos, bioquímicos y hematológicos.

PRUEBA DE REACTIVOS

Sin entrar a detallar fundamentos de la reacción de precipitación se puede expresar que es conveniente tener conocimiento previo del comportamiento de los reactivos que se harán interaccionar; es así que se afrontarán diluciones del antígeno a diluciones del anticuerpo para conocer las concentraciones óptimas de uso.

Antígeno AIE	ANTICUERPO ESPECIFICO (Dilución AIE)						
	Sin diluir	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Sin diluir	++	++	++	++	++	++	++
Diluido 1:2	++	++	++	++	++	++	++
1:3	++	+	+		++	++	iii
1:4					++	++	iii
1:5	—	—	—		—	—	—

En este caso, con respecto a la valoración de anticuerpos para sueros que sobrepasan 1:16, es conveniente realizar interpolaciones puesto que un suero que

sea positivo 1:32 y negativo 1:64 puede ser positivo hasta 1:50 y siendo así el valor 1:32 está alejado de éste.

Los reactivos se utilizarán de acuerdo a los resultados; es decir que según el protocolo precedente sería inadecuado emplear antígeno específico diluido 1:4 o suero testigo diluido 1:32 pero sería apropiado usar antígeno 1:2 y suero testigo 1:4 ó 1:8.

Los reactivos deben conservarse a baja temperatura (de 0°C a -20°C) y para evitar congelarlos y descongelarlos repetidamente deben fraccionarse en alícuotas.

ANOTACIONES COMPLEMENTARIAS *

- Equinos susceptibles inoculados con sangre de caballos C-N: + no siempre presentaron ATE. Cuando esto ocurrió se ha pensado en posibles errores metodológicos.
- En experiencias de infección de equinos con virus AIE pudo demostrarse presencia de anticuerpos específicos (C-N: +) ya a los 14 días de la inoculación, si bien esto no fue frecuente; también se ha demostrado que la primera aparición de anticuerpos específicos recién puede ocurrir 45 días después de la inoculación viral (1 caso sobre 57). Después de 21 días de la inoculación infectante se obtuvo, en 65 %, C-N: +, a los 28 días 88 % y a los 35 días 93 por ciento.
- Si bien en la inoculación de equinos susceptibles con virus activo AIE no siempre se presentan evidencias clínicas de AIE, en uno de los ensayos cumplidos todos los animales produjeron anticuerpos específicos (C-N: +) dentro de los 45 días. Uno de los animales inoculados con la sangre de un equino C-N: — (negativo) y clínicamente sano, resultó infectado y C-N: \square +. Esto sirve para advertir acerca del peligro de emplear la sangre de “donadores” no suficientemente fiscalizados.
- Los fracasos que se comprueban en la serología específica de AIE pueden tener satisfactorias explicaciones aún cuando algunos de estos puedan originar pérdidas cuantiosas.
- Cuando a una prueba, como la de C-N, se le atribuye un elevado porcentaje de seguridad (superior al 90 %) puede tenerse como satisfactoria para ciertos propósitos aún cuando el porcentaje de inseguridad, si bien bajo, pueda no ser todo lo tranquilizador que se desea para ciertas circunstancias.
- La seguridad que pueda atribuirse a la prueba de C-N deberá estar basada en un amplio conocimiento de su funcionamiento en los casos de infección natural y experimental, agregando los factores que en ellas puedan incidir y con apropiados muestreos.
- En casos de AIE, de curso agudo, ocurridos en la infección natural, pueden observarse reacciones de C-N negativas, dudosas y positivas. Las reacciones positivas pueden presentarse como débiles, aunque en el mismo animal después de alrededor de 15 días la reacción suele presentarse franca.
- En portadores inaparentes de AIE, la prueba de C-N —generalmente— da resultados dudosos o positivos lo que implica la posibilidad de hallar resultados negativos.

* Surgidas de la bibliografía y propias del autor.

- En casos de infección natural de AIE. de cursos sub-agudo o crónico, la prueba de C-N —generalmente— es positiva aunque pueden registrarse resultados dudosos y con menos frecuencia negativos.
 - Cuando un potrillo lactante, cuya madre es C-N negativo, presenta C-N: +, es probable que se encuentre infectado, aunque esto deberá decidirse detenidamente tanto para juzgar a la madre libre de AIE como para decidir si el potrillo está infectado.
 - Puede ocurrir que potrillos lactantes nacidos de madres C-N: -f- al nacer sean C-N: — (negativos) pero después de la ingestión de calostro con anticuerpos específicos presenten reacción C-N: + sin que por ello estén infectados y esto puede, ocurrir hasta 5 meses después de la mencionada ingestión. Las pruebas de C-N durante este lapso varían de dudosas a positivas, débiles y negativas.
 - Cuando la madre y su hijo lactante presentan reacción C-N: +, la yegua se considera con AIE, pero con respecto al hijo habrá que aclarar la situación ya que puede no estar infectado. Para ello se fiscalizará serológicamente en el destete y a los 30 días de ocurrido éste y aún después de los 30 días.
 - Cuando se observan reacciones C-N dudosas o muy débiles, es aconsejable repetir las pruebas con la misma muestra y si persisten extraer nuevas muestras en ayunas y sin tratamientos terapéuticos, 15 a 20 días después.
 - Animales con sintomatología de AIE y C-N: +• Q^{ue} alcanzan la recuperación clínica, pueden —excepcionalmente— presentar reacciones C-N: — (negativa) siendo así indistinguibles de sanos; en repeticiones la prueba C-N puede presentarse dudosa, débil o positiva. En sangre de estos animales contiene virus activo.
 - No hay que asombrarse que caballos ganadores de carreras, salto, trote, etc., y en actividad estén infectados con AIE y su sangre produzca la muerte de equinos susceptibles.
 - La persistencia del anticuerpo específico AIE en sujetos que han padecido AIS puede no ser 100 %, aplicando C-N.
 - El diagnóstico específico de la AIE ha mejorado con la introducción del antígeno según C-N o con antígenos preparados "in vitro". Para conducir e interpretar las pruebas se requiere experiencia, salvo esto, el resto no es mayormente complicado.
 - En AIE la sospecha clínica es de valor pero el diagnóstico de certeza viene del laboratorio que, entre otras cosas, puede incluir la serología.
 - Cuando se hacen valoraciones del anticuerpo específico para AIE en el suero sanguíneo, según C-N, puede comprobarse que o no se detecta o que su contenido fluctúa. Esto se observa en casos de infección experimental donde las fiscalizaciones se repiten con menos de 1 semana de intervalo y durante lapsos no menores de 4 meses. Es aconsejable disponer de suficientes datos antes de tentar generalizaciones y no debe desecharse la posibilidad que, en un mismo caso subagudo, crónico o inaparente, el anticuerpo en un determinado momento no sea revelado.
- La edad, raza, vía de inoculación, dosis, cepa de virus, estado del animal receptor y condición ecológica, influyen en la reproducción experimental de la AIE y en la detección del anticuerpo específico.
- Aunque aún no se ha demostrado comunidad antigénica en AIE. ésta ha sido frecuentemente demostrada en otros organismos vivos, taxonómicamente cercanos o no.

- El empleo de la prueba C-N puede ser de ayuda en epidemiología; cuando se aplica suelen surgir más animales infectados de los que se supone. Si del estudio surge una incidencia del 1‰, esta puede ser baja. Si se señala 27 % 46 % 90 % y 95 % el dato es poco alentador en el aspecto epidemiológico y deplorable para la explotación como negocio.
- En Canadá sobre 12.000 equinos se comprobó por C-N 6 % de incidencia en 1971 y 2 % sobre 20.000 equinos en 1972; en F.E. UU. 3 % sobre 100.000 muestras de suero; en Japón 1,4 ‰ sobre 2.000 equinos.
- En 3 animales sobre 12 de la delegación argentina que concurrió a Munich se halló AIE.
- El uso de los datos de incidencia es un arma de doble filo.
- La presencia de un enfermo o ur; infectado de AIE en un conjunto de equinos, lio significa necesariamente el contagio inevitable de los restantes, si se actúa como corresponde. El veterinario es el indicado para actuar.
- El antígeno de C-N debe ser manejado con precauciones, al realizar pruebas como durante su preparación, en razón de que en él interviene una cepa de virus de AIE exaltada en su virulencia. Esta cepa merecería estudios de homologación con el o los virus naturalmente hallados en Argentina.

BIBLIOGRAFIA

Para quienes deseen consultar trabajos en relación con el tema aquí considerado podrán recurrir a los siguientes, entre los que se encuentran varios que se citan en el texto:

1. *Altara, I., Serra, A. y Guarini, G.:* La desviación del complemento aplicada a la diagnosis dell'anemia infettiva dei cavallo. "Arch. Vet. Ital.". 4. (1953): 489-498.
2. *Arakawa, S.; Kaeneko, T Mulo, S.; Tsurumi, N.; Murakami. K. and Seki. T .* Experimental Studies on Equine Infectious Anemia (EIA). V. Complement fixed EIA virus antigen. "Jap. J. Microbiol.", 4, (1960): 249-263.
3. *Arakawa. S.; Kaneko, T.; Seki, T. and ?duto, S.:* Experimental studies on equine infectious anemia (EIA). III. Further outcomes in fixation of virus to mouse-brain and developing hen's eggs. "Jap. J. Microbiol.". 4, (1960) 25-34.
4. *Bettinotti, C. M.; Ibáñez, E. A. y Morel ti, O.* FEI diagnóstico serológico de la anemia infecciosa equina realizado por pruebas de inmunodifusión en agar. Comunicación previa. "Gaceta Vet.", 34, 263 (1972) 235-244.
5. *Coggins. L. y Patten.* VImmunodiffusion test for equine infectious anemia. Publicación de N.Y.S. Veterinary Coll., Cornell University. Ithaca, N.Y., USA., (1970).
6. *Coggins, L. and Norcross, N. L.* Immunodiffusion reaction in equine infectious anemia. Cornell Vet. 60, 330-335 (1970).
7. *Coggins, L., Norcross, N. L., and Nusbaum:* Diagnosis of equine infectious anemia by immunodiffusion test. Am. J. Vet. Res. 33, 11-18, (1972).
8. *Coggins, Lemy and Paiten,* VImmunodiffusion test for equine infectious anemia. Proc. 74th "Ann. Mtg. U.S. Animal Hlth. Ass.". 568-571, (1970) .
9. *Ditchfield, W. J. B.:* Equine infectious anemia. Proc. U.S. Livestock San. A. (1966): 219-223.
10. *Ditchfield, W. J. B.:* Equine Infectious Anemia: Circulating tissue antigens in normal and infected horses. Symposium on immunity to selected equine infectious diseases. "J.A.V.M.A.", 155, (Jul> 15, 1969): 349-351.
11. *Ditchfield, W. I. B.; Waddell, G. H.; Saurino, V. R.; and Teigland, M. B* A preliminary evaluation of serologic tests for equine infectious anemia. "J.A.V.M.A.", 151, 15, (1967): 1840-1846.
12. *Dreguss, M. N. and Lombard, L. S.:* Experimental studies in equine infectious anemia. University of Pennsylvania Press, Philadelphia, Pa., (1954).
13. *El Zein, A.; Myeres, W. L. and Segre, D.:* Behavior of equine infectious anemia virus in cell culture and development of a diagnostic test for the disease. "J. Infect. Dis.", 118 (1968): 473-480.
14. *Fortner, J. and Ulbrich, F.:* Etat actuel de nous experiences sur la transmission de l'anémie infectieuse des ¿quides á des petites ani.maux d'expérience. "Bull. Off. Internat. Epizoot.", 42, (1954): 737-742.
15. *Gainer, J. H A m s t e r, R. L H a l l, W. T.; Kuhns, L. J. and Nelson, S. L.* Research findings in equine infectious anemia. Proc. 69th Ann. Mtg. U.S. Animal Hlth. Ass. 254-269 (1965).

16. Gore, P.; Michel, C et Toma, B. L'anemie infectieuse des equides. Ed. Expansion. Paris. 1 Vol. (1968). pp. 1-139.
17. Hart, L. T. and Broussard II.: Extraction of equine infectious anemia immunodiffusion antigen with the aid of the chaotropic agent, Thiocyanate. "Appl. Microb.", 25, 2 (1973) 190-194.
18. Hasumi, K.: Recent Studies on Equine infectious Anemia. Report II. Antigenicity of EIA Virus (complement-fixation test; its results compared with Tiselius pattern type and polarographic rate of horse serum). "J. Cancer & Virol.", 1. (1956): 20-39.
19. Hasumi, K.: Recent Studies on Equine infectious anemia. Report III. Antigenicity of EIA virus concerning the complement fixation tests between EIA virus antigen and serum of human, horse and rabbit; Immune activity of EIA virus. "J. Cancer & Virol.", (1956): 74-107.
20. Henson, J. B.; Gorham, J. B.; Kobayashi, K. and McGuire, T. C.-Immunity in equine infectious anemia. Symposium on Immunity to selected equine infectious diseases. "J.A.V.M.A.", 155 (July 15, 1969): 336-343.
21. Henson, J. B.; McGuire, T. C.; Kobayashi, K.; Banks, K. L., Davisy W. C. and Gorham, J. B.: Recent research on the virology, serology and pathology of equine infectious anemia. Proc. 2nd Int. Conf. Equine Infect. Dis. 178-199 (1970).
22. Henson, J. B.; McGuire, T. C.; Kobayashi, K. and Gorham, J. R.: The diagnosis of Equine Infectious Anemia using the complement fixation test, side-reocyte counts, hepatic biopsies, and serum protein alterations. "J.A.V.M.A.", 151. (Dec. 15, 1967): 1830-1839.
23. Hyslop, N. St. G.: Equine infectious anemia (Swamp fever); A review Vet. Rec. 78, 858-864 (1966).
24. Ishii, S.: Equine Infectious anemia or Swamp Fever. In Advances in Veterinary Science. Vol. 8. Edited by C. A. Brandly and T. L. Jungherr. Academic Press.. New York (1963): 263-298.
25. Ishitani, R.: Research in Japan on control of equine infectious anemia. Proc. 1st. Int. Conf. Equine Infect. Dis. 1-21 (1966).
26. Ishitani, R.: Equine infectious anemia. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 10. Suppl. 1-28 (1970).
27. Iskander, G. E. L. u. c. a., Toma B. and Goret, P.: Recherches sur l'anemie infectieuse des equides: III. Mise au point d'une technique de culture des leucocytes de cheval. Rec. Med. Vet., Tome CXLVI (April 1970).
28. Johnson, A. W.: Equine infectious anemia: An annotation. "Vet. Bull." 6. 465-469 (1956).
29. Kemeny, L. J.; Mott, L. O. and Pearson, J. E.: Titration of equine infectious anemia virus: Effect of dosage on incubation time and clinical signs. "Cornell Vet.", 61, 687-695 (1971).
30. Knoules, A.: Equine infectious anemia (EIA): The facts before the furor. "Jour. Am. Vet. Med. Assoc.", 1955 (2): 327-331. (1969).
31. Kobayashi, K.: III. Propagation of the virus of EIA in horse leukocyte culture. "Virus", 11. (1961): 249.
32. Kobayashi, K.: Studies on the cultivation of equine infectious anemia virus "in vitro". I. Serial cultivation of the virus in the culture of various horse tissues. "Virus", 11, 177-189 (1961).
33. Kobayashi, K. and Kono, Y.: Propagation and titration of equine infectious anemia virus horse leukocyte culture. Nat. Inst., Anim. Health Quart. Tokyo, Japan 7, (1967): 8-20.
34. Kobayashi, K. and Kono, Y.: Propagation of several strains of EIA in horse leukocyte culture. "Jap. J. Vet. Sci.", 24. (1962): 376.
35. Kobayashi, K. and Kono, Y.: Serial passage of equine infectious anemia virus in horse leukocyte culture. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 7, 1-7 (1967).
36. Kono, Y.: Characteristics of complement fixing antigen of equine infectious anemia virus. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. S. 117-121 (1968).

37. *Kono, Y.*: Virmia and immunological responses in horses with equine infectious anemia virus. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart* 9. 1-9 (1969).
38. *Kono, Y. and Kobayashi, K.*: Studies on the culture of equine infectious anemia virus. V: C. F. Antigenicity of virus serially cultured en horse leukocytes. "*Jap. J. Vet. Sci.*", 25, (1963): 500.
39. *Kono, Y. and Kobayashi, K.* Complement fixation test of equine infectious anemia. I. Specificity of the test. *Nat. Inst. Anim. Health Quart. Tokyo, Japan*, 6, (1966): 194-203.
40. *Kono, Y. and Kobayashi, K.* Complement fixation test of equine infectious anemia. II. Relationship between CF antibody response and the disease. *Nat. Inst. Anim. Health Quart. Tokyo, Japan*, 6, (1966): 204-207.
41. *Kono, Y. and Kobayashi, K.*: Specificity of assay of equine infectious anemia virus in horse leukocyte culture. *Nat. Inst. Anim. Health. Quart.* 7. (1967): 138-144.
42. *Kono, Y. and Kobayashi, IC. and Fukunaga, Y.* Immunization of horses against equine infectious anemia (EIA) virus with an attenuated EIA virus. *Nat. Inst. Anim. Health. Quart.* 10, (1970): 113-122.
43. *Kono, Y.; Yoshino, T. and Fukunaga, Y.*: Growth characteristics of equine infectious anemia virus in horse leukocyte cultures. "*Arch. Ges. Virusforsch.*" 30, (1970): 252-256.
44. *Lehnarl, E. and Viriden, P.-.* Kritische bemerkungen zuder von Altara, Serra and Guarini sue diagnoser der infectiosen pferdae namie emgohlene Kom pie. mentbindungsmethode. "*Nord. Vet. Med.*", 6, (1954): 707-716.
45. *Lewis, D. H.; Moore, R. W. and Grumbles, L. C.-.* Relation of hemagglutinating substance of leukocyte cell culture origin to hemagglutinins in serum from horses with equine infectious anemia. "*Am. J. Vet. Res.*". W, (1969): 642-651.
46. *Livingston, C. W.*: A diagnostic precipitin test for equine infectious anemia. "*The Southwestern Vet.*". 19 (3) 1966): 221-222.
47. *Livingston, C. W., Jr.; Moore, R. W. and Redmond, H. E.* A diagnostic precipitin test for equine infectious anemia. "*Southwest Vet.*". 19, (1966): 221-223.
48. *McGuire, T. C.-.* Hemolysis in equine infectious anemia. "*Fed. Proc.*". 27, (1968): 723.
49. *McGuire, T. C.; Craford, T. B. and Henson, J. G.* Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus in tissue. "*Am. J. Path.*", 62, 2, (2) (1971): 283-292.
50. *Mohler, W. M.*: Observations on complement fixation with de stilled water spleen antigen in equine infectious anemia. "*J.A.V.M.A.*", 8S. (1936): 624-627.
51. *Mohlmon, H.*: Ansteckende blutarmat der pferde. *Hundbuch der virus infectionen bei Tieren-3*, (1968): 627-719'.
52. *Monteverde, J. J.* Enfermedades anemizantes de los equinos. Anemia Infecciosa y Piroplasmosis. "*Acad. Nac Agr. v Vet. Bs. As.*", 26, 1 (1972) .
53. *Monteverde, J. J. y Garbers, G. V.*: Septicemias colibacilares y anemia infecciosa equina. *Primeras Jornadas Argentinas de Microbiología, Bs. Aires.* (Nov. 1968).
54. *Monteverde, J. J.; Garbers, G. V. y Morón, B. L.* Anemia infecciosa equina. Su descubrimiento en la República Argentina. *Reunión Científica (Die. 28, 1964). Cátedra de Microbiología. Fac. Agr. y Vet. Univ. Bs. Aires.*
55. *Monteverde, J. J., Moran B. L. y Garbers, G. V.*: Anemia Infecciosa equina. *Comunicación Previa.* "*Rev. Med. Vet. Bs. As.*", 45, 6 (1964): 377-383.
56. *Moore, R. W.*: Equine infectious anemia - recent research findings. *Proceedings of first international conference on equine infectious diseases.* (July, 1966): 42-57.
57. *Moore, R, W.*: The immunologic properties associated with equine infectious anemia: Recent findings. "*J. Amer. Vet. Med. Ass.*", 155. (1969): 331-335.

58. Moore, R. W. et al.: Growth of the equine infectious anemia virus in a continuous passage horse leukocyte culture. "Am. J. Vet. Res.", 31, 9 (1970): 1575.
59. Moore, R. W. et al.: Equine Infectious Anemia. IV. Nature of the precipitinogen found in horses with EIA. "The Southwestern Vet.", 19, 3 (1966): 217-220.
60. Moore, R. W.; Katada, M. and Redmond, H. E.: A method for the continuous culture of peripheral horse leukocytes. "Am. J. Vet. Res.", 31, (1970): 463-468.
61. Moore, R. W.; Livingston, C. W.; Jr. and Redmond, H. E.: Equine-infectious anemia. I. Preparation and preliminary investigations of a precipitinogen for equine infectious anemia (EIA). "Southwest Vet.", 19, (1966): 187-191.
62. Moore, R. W.; Livingston, C. W.; Jr. and Redmond, H. T.: Nature of the precipitinogen found in horses with EIA. "Southwest Vet.", 19, (1966): 217-220.
63. Moore, R. W.; Redmond, H. E. and Lewis, D. H.: Equine infectious anemia. A diagnostic problem. "Proc. U.S. Livestock San. A.", 70, Oct., (1966): 255-260.
64. Moreman, D. and Smith, H. A.: A review of equine infectious anemia. "The Southeastern Vet.", 19, (3): 183-186.
65. Myeres, W. L. et al.: Equine infectious anemia: Reports of progress in research. "J. Am. Vet. Med. Assoc.", 155 (2) (1969): 352-354.
66. Nakajima, H.: Immunodiffusion studies in equine infectious anemia and their evaluation for diagnosis. Troisième Conf. Int. Maladies du Cheval. Paris, Juillet 1972.
67. Nakajima, H.; Kono, Y. and Ushimi, C.: Demonstration of viral specific antibody in serum from the horse with equine infectious anemia by immunodiffusion. 70th Meeting of Japanese Society of Veterinary Science. Sept. 18-20. (1970).
68. Nakajima, H.; Norcross, N. L. and Coggins, L.: Demonstration of antigenic identity between purified equine infectious anemia virus and an antigen extracted from infected horse spleen. "Infect. Immunity", 6, 3 (1972): 416-417.
69. Nakajima, H.; Tajima, M.; Tanaka, S. and Ushimi, C.: Physicochemical studies of equine infectious anemia virus. III. Purification and electron microscopic observation of the virus. "Arch. Ges. Virusforsch.", 28, (1969): 348-360.
70. Nakajima, H.; Tanaka, S. and Ushimi, C.: Fractionation of equine infectious anemia virus by diethylaminoethyl cellulose chromatography and sucrose density gradient centrifugation. "Nat. Inst. Anim. Health Quart.", 8, (1968).
71. Nakajima, H.; Tanaka, S. and Ushimi, C.: Physicochemical studies of equine infectious anemia virus II. Sensitivity of the virus to trypsin. "Arch. Ges. Virusforsch.", 26, (1969): 395-397.
72. Nakajima, H.; Tanaka, S. and Ushimi, C.: Physicochemical studies of equine infectious anemia virus. IV. Determination of the nucleic acid type in the virus. "Arch. Ges. Virusforsch.", 31, (1970): 273-280.
73. Nakajima, H.; Ushimi, C. and Obara, J.: Physicochemical studies on equine infectious anemia virus. "Nat. Inst. Anim. Health Quart.", Tokio, 7, (1967): 21-27.
74. Nakajima, H. and Obara, J.: Ether susceptibility of equine infectious anemia. "Nat. Inst. Anim. Health Quart.", 4, (1964): 129-134.
75. Norcross, N. L. and Coggins, L.: Characterization of an equine infectious anemia antigen extracted from infected horse spleen tissue. "Infection and Immunity", 4, (4) (1971): 528-531.
76. Outchertony, O.: Diffusion in gel. Methods for immunological analysis. "Progress Allergy", 6, (1962): 30-154.

77. *Pearson, J. E.; Becvar, C. S. and Mott, L. O.*: Evaluation of the immunodiffusion test for the diagnosis of equine infectious anemia. "Proc. 74th Ann. Mtg. U.S. Anim. Health Ass.", (1970): 260-267.
78. *Russell, L. H., Jr.; Livingston, C. W., Jr. and Moore, R. W.*: Equine infectious anemia. III. Comparison of alterations in serum proteins to results of the precipitin test. "Southwest. Vet.", 19, (1966): 207-216.
79. *Russell, L. H., Jr.; Livingston, C. W., Jr.; Moore, R. W. and Beasley, J. N.* Equine infectious anemia. II. Evaluation of a precipitin test. "Southwest. Vet.", 19, (1966): 192-206.
80. *Saurino, V. R.; Waddell, G. H.; Flynn, J. G. and Teigland, N. B.*: Immunodiagnostic relations of three clinical types of equine infectious anemia. "J. A.V.M.A.", 149, (1966): 1416-1422.
81. *Saxer, V. E. and Fuentes, R.*: Nuere aspekt der Serologie bei infectiosen der einhufer (AIE). "Schweiz. Arch. Tierheilk.", 102, (1960): 232-254.
82. *Stein, C. D. and Mott, L. O.*: Equine Infectious in the United States with Special Reference to the Recent Outbreak in New England. "Proc. U.S. Livestock San. An." 51, (1947).
83. *Stein, C. D.; Mott, L. C. and Gales, D. W.*: Some observations on carriers of equine infectious anemia. "J.A.V.M.A.", 126, (1955): 277-287.
84. *Squire, R. A.*: Equine Infectious Anemia: A model immunoproliferative disease. Blood, 32, (1968): 157-169.
85. *Toma, B. et Goret, P.*-, L'anémie infectieuse des équidés. "Pratique Vet. equine", 4, 4 (1972): 149-156.
86. *Toma, B.; Luka Iskander, G. E. and Goret, P.*: Recherches sur l'anémie infectieuse des équidés. IV. Etude du virus obtenu en culture de leucocytes de cheval. "Rev. Méd. Vet.", Tome CXLVI (Juin 1970).
87. *Toma, B.; Luka Iskander, G. E. et Goret, P.*: Sérodiagnostic de l'anémie infectieuse des équidés par précipitation en gélose. I. Mise au point de la technique. "Bull. Ac. Vet.", 44, (1971): 403-413.
88. *Toma, B.; Luka Iskander, G. E. et Goret, P.*: Sérodiagnostic de l'anémie infectieuse des équidés par précipitation en gélose. II. Premiers résultats d'une enquête épidémiologique en France. "Bull. Ac. Vet.", 44, (1971): 415-426.
89. *Ulbrich, F.*. Untersuchungen über die von Altara, Serra und Guarini modifizierte Komplementbindungsreaktion zur diagnose der infectiosen anämie der einhufer. "Zentralbl. Vt. med.", 5, (1948): 245-264.
90. *Ushimi, C., Nakajima, H. and Tanaka, S.* Demonstrative of equine infectious anemia viral antigen by immunofluorescence. "Nat. Inst. Anim. Health Quart", 10, (1970): 90-91.
91. *Yamamoto, H. and Kono, S.*: Pathological studies on bone marrow in equine infectious anemia. I. Macroscopical findings on whole longitudinal sections. "Nat. Inst. Anim. Health Quart.", Tokyo, 7, (1967): 40-53.

*Técnica de Ouchterlony**Figura A.*

—Preparación de las capas de agar en caja de Petri para hacer los receptáculos donde se introducirán los reactivos: antígeno, anticuerpos específicos para control y sueros en prueba (1, 2, 3 y 4).

Figura B.

—Diámetro de los receptáculos y distancia entre ellos.

Figura C.

—*Sin reacción*-, receptáculo con antígeno equino (AgEq) frente a receptáculo con anticuerpo no específico (AcX).
 —*Reacción específica*: receptáculo con antígeno equino frente a receptáculo con anticuerpo específico (Ac. Eq); a determinada distancia, banda de precipitación.
 —*Reacción no específica*: receptáculo con antígeno equino frente a receptáculo con un reactivo no específico (Ac. V.); 2 bandas de precipitación, ubicación diferente respecto a las de antígeno y anticuerpo homólogo.

Figura D.

—Parte superior. Distribución de receptáculos en una caja de Petri de 10 cm de diámetro.
 —Parte inferior. Ejemplo donde en el receptáculo central se coloca el antígeno (Ag. Eq), los receptáculos I y II (Ac. Eq.) contienen el anticuerpo específico sirviendo para control y los restantes receptáculos sirven para introducir reactivos a ser probados (sueros: cerdo, vaca, conejo y perro). Se producirá reacción solamente entre el antígeno y su correspondiente anticuerpo.

*Curso de la enfermedad y datos seriológicos.**Figura E.*

—Equino con sintomatología clínica de AIE (curso agudo).
 Temperatura, hemutocrito y hemoglobina (según J. A. Pearson).

Figura F.

—Equino con sintomatología clínica de AIE (curso subagudo).
 Temperatura, hematocrito y hemoglobina (según J. A. Pearson).

Figura G

—Equino con sintomatología clínica (curso crónico) de AIE.
Temperatura, hematocrito y hemoglobina (según J. A. Pearson).

Figura H

—Infección experimental de un equino con virus AIE. Producción y valoración de anticuerpos específicos (según B. Toma y col.) .

Figura I

—Inoculación experimental de un equino con virus AIE. Aparición de anticuerpo específico 21 días después y hasta su muerte aplicando el procedimiento de Coggins-Nercross (según Toma y col.).

*Interpretación de resultados**Figura N^o 1.*

Sueros controles I y II: reacción precipitante 1 sola banda visible. S: sueros equinos en prueba; 1, 3 y 4: Negativos; 2: Positivo.

Figura A^o 2.

Sueros controles I y II: reacción precipitante 1 sola banda visible. S: 5, 6, 7 y 8: Negativos. La banda que aparece en 7 no coincide con la del control II y se cruza con la de éste? por lo que debe considerarse inespecífica.

Figura N^o 3.

Sueros controles I y II: reacción precipitante 1 sola banda visible. S: 9, 10, 11 y 12: Negativos. Las 2 bandas visibles que se observan en el S: 10 no son específicas.

Figura TV^o 4.

Sueros controles I y II: reacción precipitante 2 bandas visibles. S: 14 y 17 precipitación dudosa; se aconseja repetir. Banda ancha en 17 algo difusa, no se aprecia bien la coincidencia con el control I; en 14 dudosa coincidencia de bandas con el control I. S: 15 y S: 16: Negativos.

Figura N^o 5.

Sueros controles I y II: reacción precipitante 1 banda visible. S: 18, 19, 20 y 21: Negativos; sin embargo se trata de casos experimentalmente infectados con virus AIE de 14, 28, 43 y 31 días de evolución en los que los anticuerpos específicos aún no han aparecido como para dar origen a pruebas precipitantes positivas.

Figura N^o 6.

Sueros controles I y II reacción precipitante 2 bandas específicas visible? (Banda C cercana al suero control; Banda G cercana al antígeno). S: 22 y 24: Casos positivos. S: 23 y 25: Negativos.

Figura N° 7.

Sueros controles I y II reacción precipitante 1 banda visible. S: 26: caso positivo, bandas coincidentes.
 S: 28 y 29: Casos negativos.
 S: 27 se obtendrán reacciones específicas (exceso de anticuerpo).

Figura N° 8.

Controles I y II: presencia de 1 banda precipitante específica. S: 30, 31 y 32: casos negativos. En S: 31 se observa una banda precipitante inespecífica que se cruza con el suero control II.
 S: 33 corresponde a un caso de AIE. Se produce una coincidencia con la banda del control I solamente en el extremo de contacto. Se trata de una banda incompleta debida a que el suero 33 contiene poco anticuerpo específico. En la repetición la prueba se hace positiva franca.

Figura N° 9.

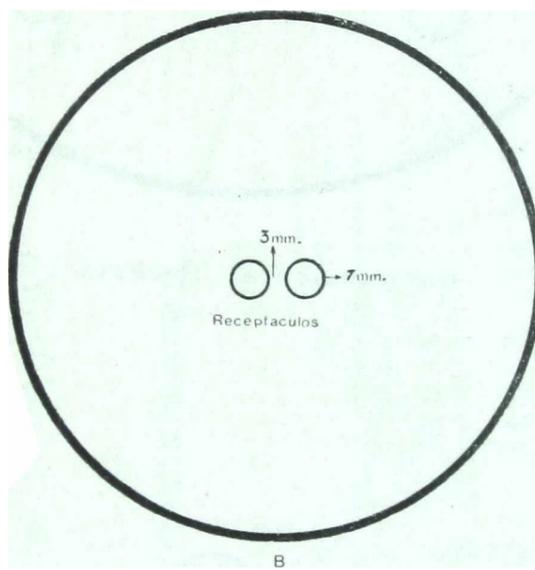
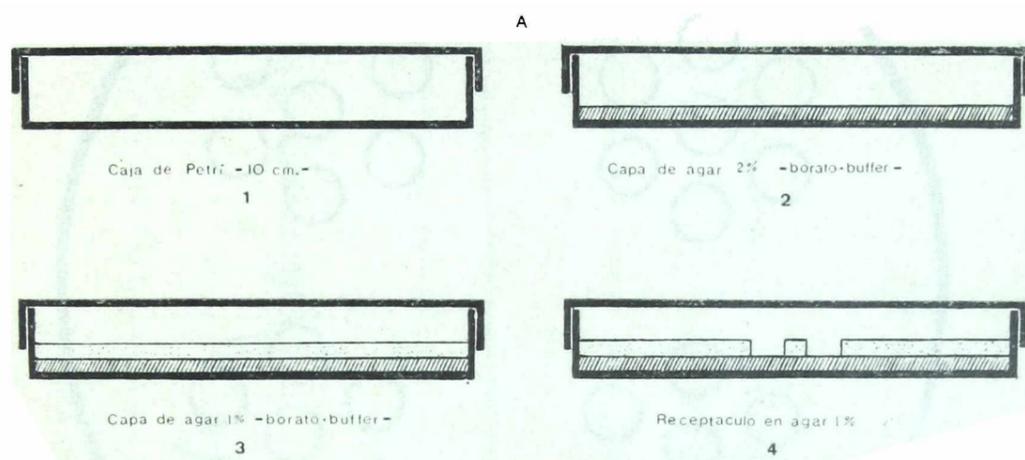
Controles I y II reacción precipitante con 2 bandas visibles.
 S: 41 y 42: casos negativos.
 S: 43 y 44: casos positivos; reacción solamente con la banda cercana al antígeno.

Figura N° 10.

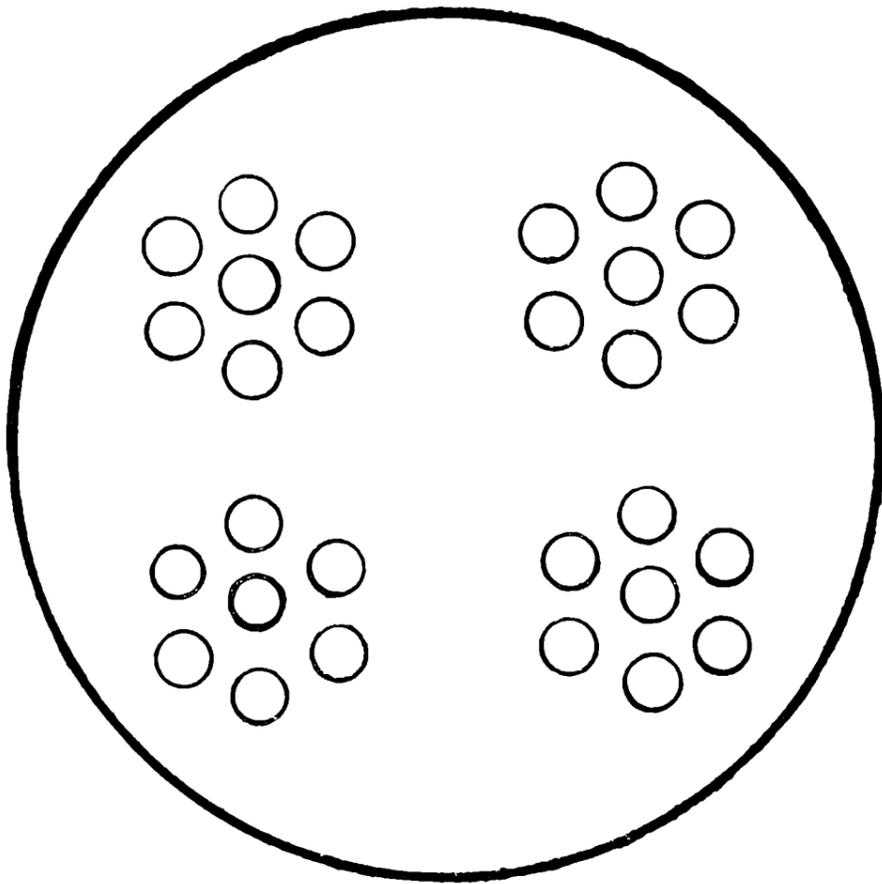
Controles I y II, reacción precipitante 1 banda visible.
 S 53, 54, 55 y 56: suero correspondiente a un caso de infección experimental (EB. Zai) probado: puro, 1:2, 1:4 y 1:8.
 En 53 y 54 (exceso de anticuerpo específico) en 55 y 56 el mismo suero produce una franca precipitación específica en coincidencia con las bandas precipitantes de los controles.

Se agradece la colaboración de los Profesores Ing. Agr. C. Bellon y M. Piscitelli de la Facultad de Agronomía de Buenos Aires y también al Dr. L. H. Román, Ayudante en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires por su intervención en la preparación de las figuras. -

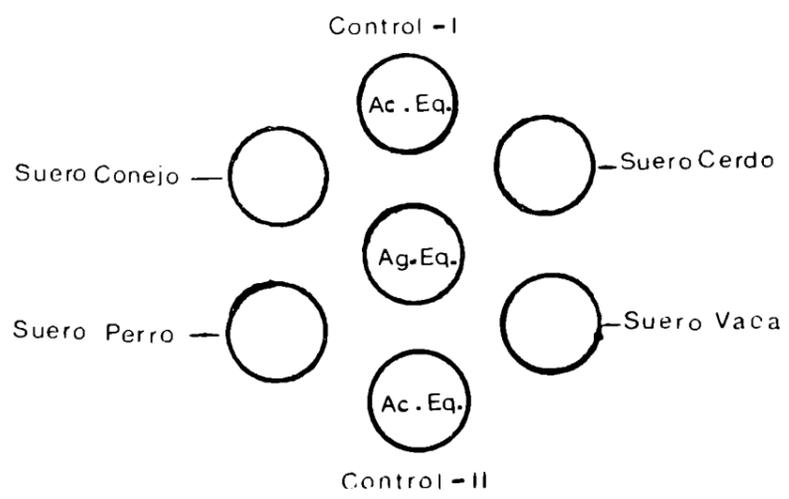
TECNICA DE OUCHTERLONY



D



Distribución de Receptáculos



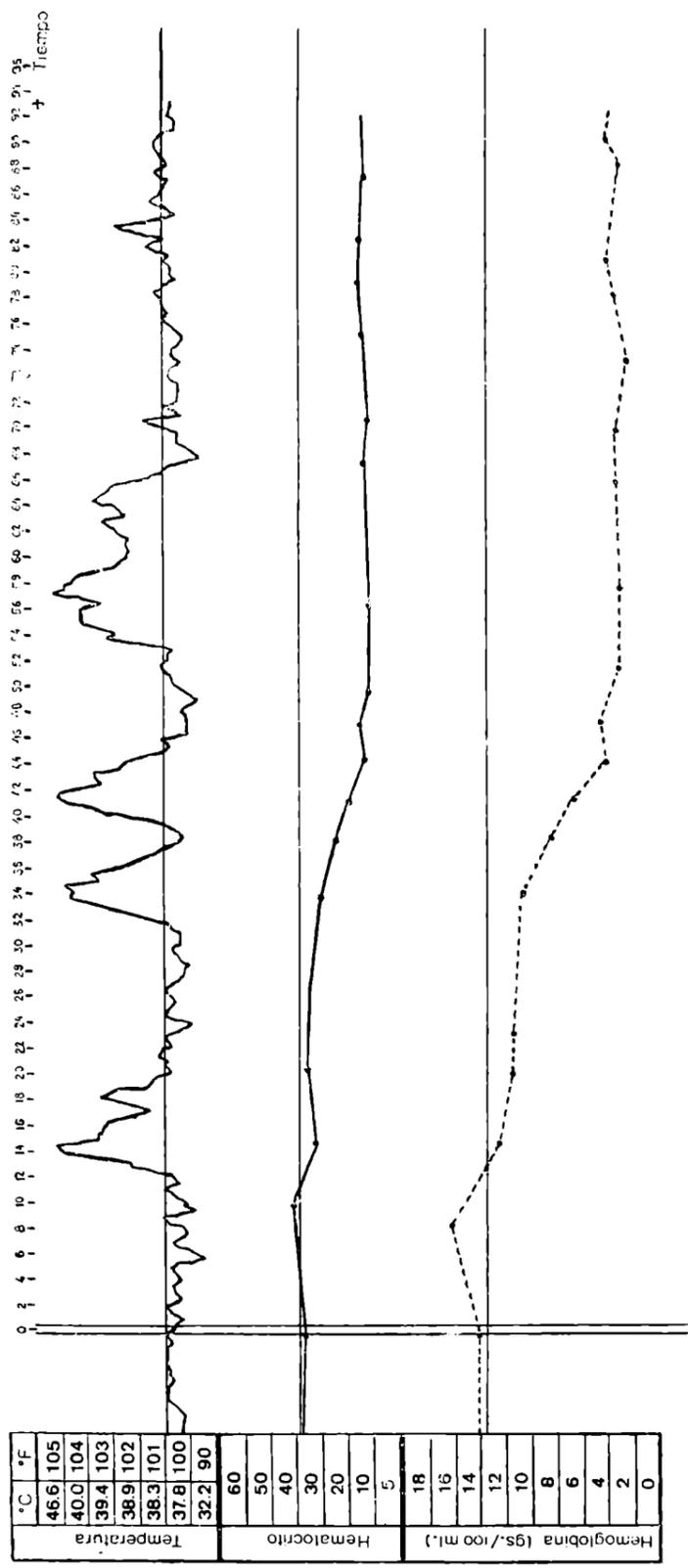


Fig. E

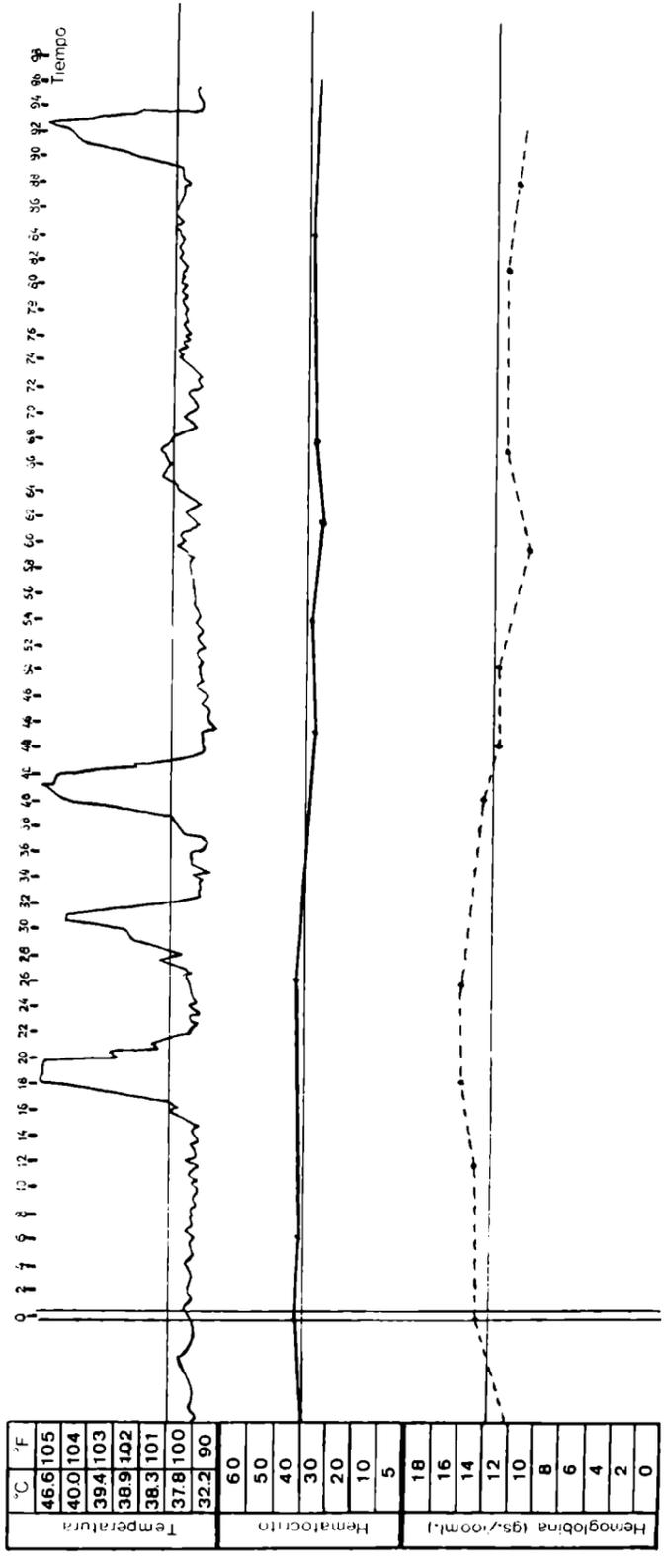


Fig. F

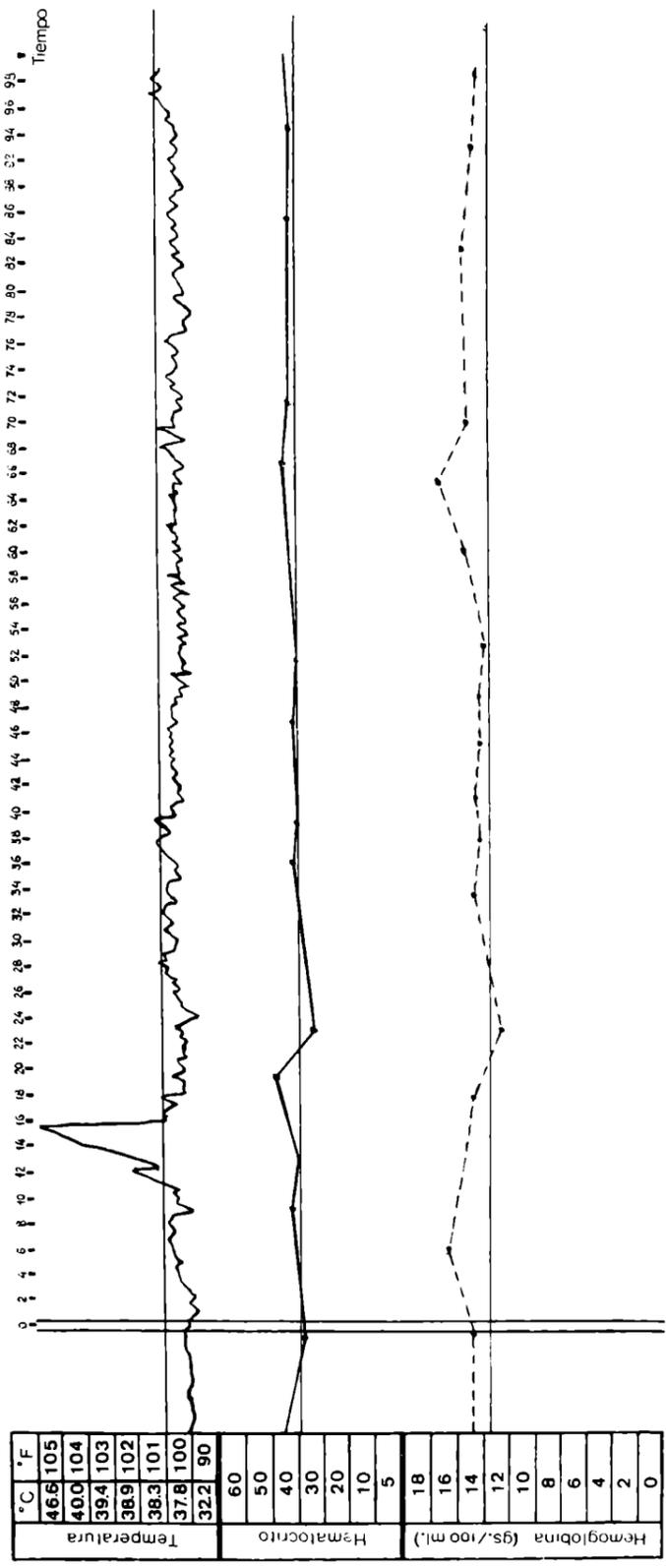


Fig. G

^ Anticuerpos

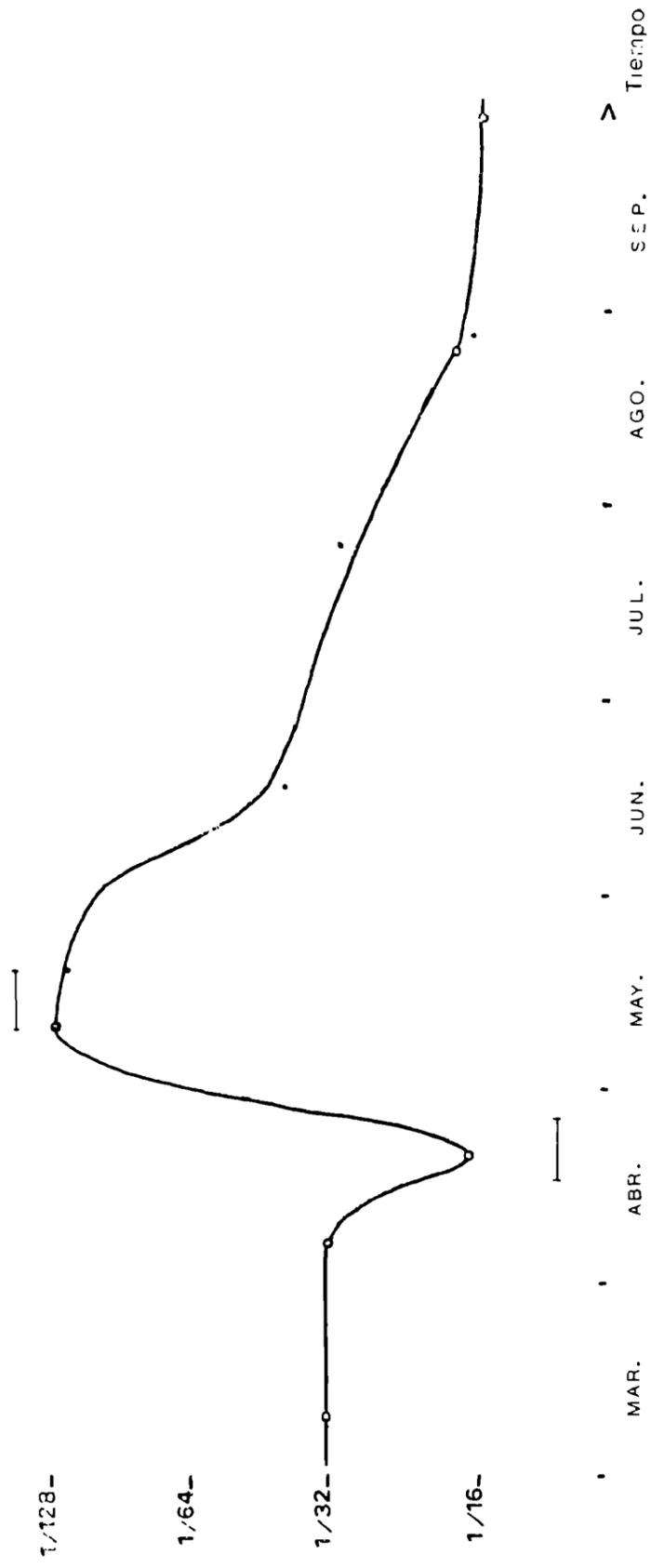


Fig. H

