

# Reações entre caolim, vírus da influenza suína e inibidor de clara de ovo da hemoaglutinação de vírus

por

**Frank Lanni\*** e **Yvonne Thery Lanni**

da Secção de Vírus do Instituto Oswaldo Cruz

O inibidor da hemoaglutinação do vírus da influenza foi caracterizado como um ou mais membros do grupo da ovomucina (ovomucóide) das mucoproteínas da clara do ovo (1-4). A verificação recente de que o inibidor é retido pelos papéis de filtro comuns (5) sugeriu um estudo com um agente adsorvente particular. Experiências preliminares mostraram que o caolim e a terra de diatomáceas têm uma atividade considerável e grosseiramente comparável de fixação do inibidor, enquanto que o hidróxido de alumínio e o carbonato de cálcio, por unidade de peso, eram muito menos eficazes. Dada sua manipulação mais simples, foi o caolim escolhido para um estudo detalhado. As experiências aqui referidas foram levadas a efeito primeiramente para verificar as reações que poderiam ter interesse imediato.

*Material e métodos* — A clara de ovo (EW) era obtida de ovos frescos de galinha. O inibidor semipurificado era preparado da camada branca espessa por precipitação por ácidos (1). Uma suspensão-estoque de caolim (Kaolin, Washed Powder (American Standard), Lot n.º 72 845, J.T. Baker Chemical Co.), contendo 400 mg por ml, era preparada em tampão de fosfato e diluída à medida das necessidades. O caolim era primeiramente bem lavado com o tampão, para remover uma impureza termoestável e ácido-resistente que causava turvação durante a análise do nitrogênio. O vírus da influenza dos porcos (Shope's strain 15) era a mesma amostra adaptada ao ovo, que fôra usada em investigações anteriores. Ovos embrionados de 11 dias eram inoculados por via alantóide e os líquidos alantóides eram recolhidos após 40 horas a 35°C.

As misturas rotineiras eram feitas pela rápida adição de 2.0 ml de suspensão de caolim a 2.0 ml de solução do inibidor em um tubo de Pyrex de 13mm (O.D.) x 100 mm, fazendo-se uma correção com tampão de fosfato para o volume do caolim disperso, na proporção de 0.4 ml por g. As misturas eram imediatamente agitadas à mão e,

---

\* Bolsista do Instituto Oswaldo Cruz.

após 10 minutos, os sedimentos eram novamente re-suspensos com um bastão. Depois de 2 horas, as misturas eram centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 r.p.m. (1.900 x g); o líquido sobrenadante era clareado de novo por centrifugação, como anteriormente. A prática geralmente aconselhável de agitar constantemente as misturas durante a incubação foi abandonada porque a agitação necessária para manter os sedimentos bem suspensos determinava a precipitação da proteína (cf. 1).

A atividade inibidora foi titulada pelo método de diluição do inibidor (1,6) em relação a doses hemoaglutinantes (HD) de vírus de influenza suína não purificado (53°C, 30 minutos). Antes do aquecimento, a preparação de vírus era tratada com igual volume de uma solução a 5.7% de citrato de sódio (7). A atividade hemoaglutinante foi titulada pelo método de HIRST (8). Todas as leituras foram feitas com um fotômetro\* que diferia do descrito por HIRST e PICKELS (9), principalmente pelo uso de luz vermelha quase paralela; as "densidades óticas" das suspensões de hemátias assim resultavam preponderantemente da dispersão da luz incidente. Os títulos de inibição foram padronizados em relação a uma solução conservada de clara de ovo (6). O fator purificante de uma preparação é a relação entre sua atividade específica (título/nitrogênio) e da solução padrão. O nitrogênio era dosado por nesslerização direta (10). O tampão de fosfato (0.06 M fosfato, pH 7.2-7.3, contendo 0.02% de mertiolato de Lilly) foi usado como transportador e dissolvente para os reagentes, antes de fazer a mistura. Foi usada para as titulações solução salina tamponada (0.81% NaCl, 0.005 M fosfato, pH 7.2-7.3):

*Experiências. Observações gerais.* Quando o inibidor semipurificado e o caolim finamente suspenso são misturados em concentrações convenientes, o caolim floclula e deposita rapidamente. Com atividade inibitória equivalente, a clara de ovo pura também produz floclulação, mas o fenômeno é menos pronunciado e os flóculos são mais facilmente redispersos. Com suspensões convenientemente diluídas de caolim (1-5 mg por ml) a floclulação pode ser produzida por quantidades tão pequenas quanto 0.05  $\gamma$  de inibidor N semipurificado, embora a reação seja retardada. A pesquisa no líquido que sobrenada demonstra que a floclulação do caolim é acompanhada de um decréscimo da atividade de floclulação do caolim, bem como da atividade inibitória e do nitrogênio das preparações do inibidor (veja abaixo).

Se se observar uma série de misturas, feitas em volume constante com caolim constante e com inibidor ou concentração de clara de ovo variáveis após a sedimentação da massa principal de caolim floclulado, verificar-se-á que a turvação do líquido que sobrenada passa por um mínimo. A inibição da floclulação por excesso de inibidor, que esse resultado sugere, é confirmada pelo fato de que, na experiência inversa, feita com

---

\* Agradecemos ao Sr. IGOR V. GORTINSKY o auxílio que nos prestou na construção do aparelho.

inibidor constante e caolim em concentração variável, a turvação residual passa por um máximo na região de baixa concentração de caolim.

*Efeito do modo de preparo das misturas e do tempo em que se deixa processar a reação.* — Um estudo da influência do modo de preparação e subsequente tratamento das misturas caolim-inibidor, antes da centrifugação, deu os seguintes resultados: a) quando as misturas são preparadas pela lenta adição de um reagente ao outro, maiores quantidades de inibidor e de nitrogênio são removidas se fôr adicionado caolim ao inibidor; b) êste efeito de ordem é grandemente reduzido se as misturas forem feitas rapidamente; c) a velocidade de adição é relativamente pouco importante se o caolim fôr o reativo adicionado; d) um estado de equilíbrio aparente, no que se refere tanto à atividade como ao nitrogênio, pode ser atingido dentro de 1 hora se as misturas forem preparadas rapidamente e deixadas em repouso. Contudo, se o inibidor fôr adicionado lentamente ao caolim, pode ocorrer durante a incubação ulterior uma diminuição significativa do nitrogênio mas não da atividade. A técnica rotineiramente adotada para a presente investigação é, em grande parte, baseada nessas verificações.

*Reação do caolim com a clara de ovo bruta.* Preparavam-se pelo método usual misturas de volumes iguais de suspensões de caolim, variando de 50 a 400 mg por ml e clara de ovo espessa diluída, com título de inibição de 20.400, teor em nitrogênio de 3.20 mg por ml e  $\text{pH} = 7.4$ . Os resultados de análises no líquido sobrenadante são assinalados no gráfico da figura 1, em que se pode observar que uma gôta precipitante em atividade inibitória com concentração crescente de caolim é acompanhada de uma lenta diminuição em nitrogênio.

Supondo que a adsorção do inibidor é reversível e que as misturas alcançaram equilíbrio antes da centrifugação, os dados de atividade da figura 1 podem ser ajustados pela simples equação de adsorção:

$$C = \frac{k_2}{k_1} \cdot \frac{B}{SK - B} \quad (\text{I})$$

em que  $C$  e  $B$  são as concentrações de equilíbrio de inibidor livre e fixado, respectivamente, expressas em porcentagem do total presente;  $K$  é a concentração do caolim em mg por ml da mistura em reação;  $S$  é a capacidade máxima de fixação do inibidor para 1 mg de caolim (em saturação); e  $k_1$  e  $k_2$  são as intensidades constantes de adsorção e dessorção, respectivamente, do inibidor. A equação I, com os valores 1.32% e 3.0% dados aos parâmetros  $S$  e  $k_2/k_1$  (a concentração de inibidor livre em equilíbrio com caolim meio saturado), respectivamente, foi assinalada no gráfico da figura 1 e, como se vê, se ajusta bastante com os dados experimentais. Contudo, a equação não parece ser sempre válida; por exemplo, os resultados obtidos com misturas preparadas com relações constantes, mas variando a concentração absoluta, exigem uma diminuição de  $k_1$  e  $k_2$  ou um aumento de  $S$ , à medida que

a concentração diminui, porquanto uma quantidade maior do que a prevista de inibidor está fixada. Parece provável que êsse efeito seja devido à diminuição da velocidade de floculação do caolim à medida que baixa a concentração da mistura em reação.

*Reação de caolim com inibidor semipurificado.* Experiências semelhantes foram levadas a efeito com 2 preparações de inibidor semipurificado, M37-PEI e M37-PEII, com os fatores de purificação 42 e 65, respectivamente. As preparações eram diluídas até os títulos de inibição 20.200 e 19.700 e teor de nitrogênio de 119 e 76  $\gamma$  por ml, respectivamente, antes de se fazer a mistura com caolim. Os resultados, assinalados na figura 2, mostram que o nitrogênio foi retirado mais rapidamente que a atividade inibidora, ao contrário do resultado obtido com a clara de ovo bruta. De modo que assim se realizara uma purificação pelo menos duas vezes maior com cada preparação. Os traçados da figura 3, relativos ao fator de purificação do líquido sobrenadante em relação quer à atividade quer ao nitrogênio residuais, sugerem um fator limitante similar de purificação de 135-140 para cada preparação\*. Os dados relativos à atividade, como os que dizem respeito ao nitrogênio, da figura 2, podem ser ajustados só de modo aproximado pela solução da equação I, como se pode deduzir da forma das curvas das experiências. Essa propriedade dos dados é atribuída a uma aproximação menor do equilíbrio das misturas da figura 2, em comparação com as da figura 1, o que resulta de uma floculação mais pronunciada do caolim pelo inibidor semipurificado.

## QUADRO I

TÍTULOS DE INIBIÇÃO DE EXTRATOS SUCESSIVOS DE SEDIMENTO CAOLIM-INIBIDOR

LÍQUIDO	SEDIMENTO EXTRAÍDO A	
	0°C	24°C
Inibidor em natureza.....	10,100	10,100
Líquido sobrenadante.....	7,760	7,710
Extrato 1.....	275	232
» 2.....	161	110
» 3.....	95	51
» 4.....	60	46

\* Os dados relativos a valores de nitrogênio extremamente baixos e em cuja determinação, por isso mesmo, não se podia confiar, foram omitidos da figura 3.

Pela experiência que se segue foi conseguida a prova da reversibilidade da reação caolim-inibidor.

Misturas em duplicata, preparadas pela adição de 2.0 ml de suspensão de caolim, a 25 mg por ml, a 4.0 ml de preparação M37-PEI, diluída até o título de inibição de 15.200, eram agitadas repetidamente durante 30 minutos à temperatura ambiente (24°C.) e centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 r.p.m. O volume de cada porção era de cerca de 0.09 ml. De cada vez, uma porção era extraída repetidamente à temperatura ambiente, com 6.0 ml de tampão de fosfato, durante 30 minutos. A outra porção era extraída de modo semelhante, mas a temperatura próxima de 0°C. Como se vê no Quadro I, 23-24% da atividade inicial era adsorvida pelo caolim e mais ou menos 20% do inibidor adsorvido era recuperado nos extratos, a recuperação sendo um pouco maior a 0°C. que a 24°C. A quantidade de inibidor recuperada era pelo menos 5 vezes a que se poderia esperar obter no espaço livre da porção inicial. Além disso, a atividade de extratos sucessivos caía por um fator de 1-2 antes que de 60 ou mais, como se poderia esperar de um simples mecanismo de lavagem.

A reação caolim com o inibidor tratado com o vírus. O tratamento do inibidor da clara de ovo com o vírus ativos não aquecidos de influenza é acompanhado de alterações progressivas nas propriedades inibitórias (11, 12), viscosidade (13) e constante de sedimentação (14) do inibidor, bem como de formação de produtos dializáveis de cisão (2). Esses efeitos são atribuídos a uma atividade de tipo enzimático do vírus, a qual se perde, sem que haja perda das atividades de hemoaglutinação e de combinação com o inibidor, quando o vírus é levemente aquecido, como acontece quando o vírus é preparado para uso nas titulações de inibição.

O efeito do vírus sobre a afinidade do inibidor para o caolim foi estudado tanto com o inibidor parcialmente tratado, em termos de ati-

#### QUADRO II

EFEITO DA INATIVAÇÃO PARCIAL PELO VÍRUS DA INFLUENZA SUÍNA SOBRE A ADSORÇÃO DO INIBIDOR (M37-PEII) PELO CAOLIM

TRATAMENTO PELO VIRUS, HORAS	ATIVIDADE DO SOBRENADANTE, POR CENTO, À CONCENTRAÇÃO FINAL DE CAOLIM, mg POR ml		
	0	20	80
0.....	100	37	4.7
1.....	100+	33	3.5
3.....	100+	32	3.2

\* Valor estabelecido arbitrariamente, como ponto de referência.

vidade, como com inibidor exaustivamente tratado, em termos de nitrogênio. Um volume (3.7 ml) de vírus de influenza suína em líquido alantóide (previamente dializado, durante uma noite, no frigorífico, com 200 vezes seu volume de solução salina tamponada, para reduzir o nitrogênio total de 90-95%) era misturado à temperatura ambiente com 4 vezes seu volume de M37-PEII, diluído a 57  $\gamma$  N por ml. Uma parte alíquota, como testemunha, era aquecida imediatamente durante 2 minutos à 100°C. para destruir o vírus, e outras eram de modo semelhante aquecidas após 1 hora e 3 horas. Partes alíquotas de cada mistura diluída eram então tratadas pelo método usual, com volume igual de tampão de fosfato contendo 0 mg, 40 mg ou 160 mg por ml. A uma dada concentração de caolim, a turvação dos sobrenadantes, antes da centrifugação, diminuía à medida que o tratamento com o vírus se prolongava. Titulações de inibição dos líquidos que sobrenadavam à centrifugação davam as curvas de inibição representadas na figura 4. De acôrdo com as verificações anteriores (11, 12), a forma da curva de inibição mudava radicalmente como resultado do tratamento do inibidor pelo vírus. Tratamento subsequente com caolim produzia um desvio da curva para a esquerda, significando adsorção do inibidor, sem alteração pronunciada de forma. Estimativas da atividade residual, feitas gráficamente por comparação com o contrôlo apropriado e apresentadas no Quadro II, sugerem que o tratamento com o vírus pode ter causado um ligeiro aumento na proporção do inibidor capaz de ser removido por uma dada quantidade de caolim. As ligeiras modificações de forma da curva, vistas na figura 4C, exigiriam estudo detalhado para maiores comentários.

Em uma experiência separada, o inibidor foi quase completamente destruído pelo tratamento com vírus dializado durante 20 horas, à temperatura ambiente. Partes alíquotas da mistura, após aquecimento durante 2 minutos a 100°C, eram tratadas com quantidades variáveis de caolim, os líquidos que sobrenadavam sendo analisados em relação ao nitrogênio. Uma testemunha, consistindo em mistura de vírus inibidor aquecida imediatamente após a preparação, foi tratada de modo semelhante. O Quadro III mostra que um ligeiro aumento da quantidade de nitrogênio adsorvida por uma dada quantidade de caolim ocorreu após um tratamento prolongado de inibidor pelo vírus.

*Reação de caolim com vírus aquecido ou não aquecido.* A atividade de fixação de vírus apresentada pelo caolim foi estudada em preparação para as experiências descritas na seção seguinte. Uma porção de uma mistura de vírus da influenza suína em líquido alantóide foi diluída em volume igual de tampão de fosfato, uma outra em volume igual de solução a 5.7% de citrato de sódio, e uma terceira em volume igual de tampão de fosfato após diálise preliminar com solução salina tampão. (Com o vírus da influenza suína não purificado, a diálise ou o tratamento pelo citrato são processos alternativos, empregados conjuntamente com o aquecimento, para tornar o vírus suscetível de emprêgo nas titulações de inibição (7). Partes alíquotas de amostras,

## QUADRO III

EFEITO DO TRATAMENTO PROLONGADO DO INIBIDOR PELO VIRUS DA INFLUENZA SUÍNA, \* SÔBRE A ADSORÇÃO DO NITROGÊNIO TOTAL PELO CAOLIM

TRATAMENTO COM VIRUS, HORAS	NITROGÊNIO SOBRENADANTE, $\gamma$ POR ml, NA CONCENTRAÇÃO FINAL DE CAOLIM, mg POR ml			
	0	25	50	100
0.....	49.2 $\pm$ 0.9 $\bar{U}$	16.0 $\pm$ 0.6	11.8 $\pm$ 0.1	7.8 $\pm$ 0.7
20.....	48.5 $\pm$ 0.8	14.2 $\pm$ 0.9	10.7 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.2

\* Um volume de vírus dializado, a 30 $\gamma$  por ml, era misturado com 5 vezes seu volume de M37-PEII, a 114 $\gamma$  N por ml.

§ Erro médio,  $\gamma$  N por ml, de análises em triplicata.

## QUADRO IV

ADSORÇÃO PELO CAOLIM DE VIRUS DE INFLUENZA SUÍNA, AQUECIDO E NÃO AQUECIDO

VÍRUS		VÍRUS SOBRENADANTE, HD POR ml, À CONCENTRAÇÃO FINAL DE CAOLIM, mg POR ml			
Tratamento prévio	Tratamento ulterior	0	0.4	1.2	3.6
Tampão	Nenhum	9.8	9.7	8.0	4.3
»	30 min, 53°C	10.2	9.1	3.3	0.9
Citrato	Nenhum	10.4	9.6	7.5	3.7
»	30 min, 53°C	10.8	9.7	4.2	0.6
Diálise	Nenhum	10.0	9.2	6.8	0.7
»	30 min, 53°C	10.4	8.5	2.3	0.5

aquecidas (30 minutos, a 53°C.) ou não aquecidas, eram tratadas com várias quantidades de caolim, e os líquidos que sobrenadavam eram titulados sob o ponto de vista da atividade de hemoaglutinação. Como mostra o Quadro IV, as próprias amostras não aquecidas mostravam pequenas diferenças, como as amostras aquecidas. Contudo, quantidades significativamente maiores de vírus aquecido do que de vírus não aquecido foram adsorvidas a concentrações maiores de caolim.

*Reação do complexo caolim-inibidor com o vírus.* O complexo lavado caolim-inibidor, da experiência do Quadro I (a amostra examinada foi retirada a 24°C.) foi dispersado em tampão de fosfato de

modo que as suspensões contivessem cerca de 2.5 e 5.0 mg de caolim por ml. Duas partes alíquotas (1.0 ml) de cada suspensão eram misturadas com vírus não aquecido de influenza suína (2.0 ml) a 0°-1°C. em banho-maria refrigerado, a baixa temperatura, sendo utilizada para reduzir ao mínimo a atividade destruidora do vírus. Depois de 1 hora, durante a qual os sedimentos eram repetidas vezes re-suspensos, uma mistura de cada espécie era levada à temperatura ambiente, agitada repetidamente durante uma hora e centrifugada (10 minutos, 3.000 r.p.m.). A segunda mistura foi centrifugada no frigorífico; o líquido que sobrenadava foi deixado em repouso à temperatura ambiente e o sedimento foi misturado, em volume igual ao original de tampão à temperatura ambiente, agitado durante 1 hora e centrifugado. Testemunhas preparadas com caolim não tratado passaram pelo mesmo processo. As titulações da atividade de hemoaglutinação dos líquidos que sobrenadam forneceram os resultados registrados no Quadro V, que mostram que o caolim tratado pelo inibidor é capaz de fixar o vírus excedente não fixado pelo caolim livre e que uma grande parte do vírus fixado pode ser recuperado. Experiências semelhantes foram realizadas com vírus aquecido, mas os dados não são apresentados porquanto sua interpretação se torna ambígua pela contínua libertação de inibidor pelo caolim tratado com este último (Quadro I). A quantidade de inibidor assim liberada, embora pequena em proporção ao

## QUADRO V

ADSORÇÃO DE VÍRUS DA INFLUENZA SUÍNA PELO COMPLEXO INIBIDOR-CAOLIM, A 0°C SEGUIDA PELA DESSORÇÃO A 24°C

TRATAMENTO DO VIRUS	VÍRUS TOTAL LIVRE, HD, APÓS		
	(A) 1 hora a 0°C	(B) 1 hora a 0.C + 1 hora a 24°C	(C) Porção (A) extraída 1 hora a 24°C
Tampão.....		56.0	
Complexo, 5.0 mg+.....	25.9	39.3	16.1
Complexo, 2.5 mg+.....	38.4	48.0	9.2
Caolim, 5.0 mg.....	47.7	45.3	1.8Ú

\* Refere-se ao conteúdo em caolim, estimativa provavelmente correta na aproximação de 20%.

§ Essa quantidade de vírus poderia razoavelmente se ter originado do líquido livre em ou ao redor da porção. Porções obtidas com caolim tratado ou não com inibidor têm muito aproximadamente o mesmo volume quando preparadas de modo semelhante.



total fixado, é suficiente para neutralizar a atividade hemoaglutinante de uma grande parte do vírus aquecido que pode ser convenientemente empregada.

*Discussão.* Dos dados das figuras 1 e 2, resulta que as proteínas da clara de ovo podem ser classificadas em três grupos, conforme a afinidade que apresentam para o caolim em solução tampão de fosfato 0.06 M, de pH = 7.2-7.3. Um grupo, compreendendo 80-90% da proteína total, tem afinidade consideravelmente menor que o inibidor; um segundo grupo inclui o inibidor; o terceiro grupo tem maior afinidade que este. Embora não se tenha ainda estabelecido um método baseado nessa diferenciação para a purificação direta do inibidor a partir da clara de ovo, conseguiu-se um grau apreciavelmente maior de purificação de preparações semipurificadas, obtidas pela precipitação pelos ácidos (1), por meio da adsorção preferencial de material biologicamente inativo pelo caolim. O fator padrão de purificação foi assim elevado a cerca de 130, e um possível limite de 135-140 foi sugerido para as condições das experiências (Figura 3). De acordo com a concepção (3) de que as preparações semipurificadas com fator de purificação de cerca de 60 consistem em misturas de mucoproteínas ativas e inativas, um fator de 130 poderia ser atingido somente pela remoção preferencial da mucoproteína inerte. O valor 130 e o limite 135-140 podem ser comparados com o valor 190 obtido para o componente rapidamente móvel isolado electroforéticamente de preparações semipurificadas e com o valor 123 obtido para uma mistura mal definida desse componente com um segundo componente de mobilidade intermediária, que se presume também ter atividade (4).

Estudos sobre a ação do vírus da influenza suína sobre o inibidor levam a admitir (fig. 4, Quadros II e III) que o vírus possa aumentar a reatividade do inibidor com caolim. Desde que o volume molecular do inibidor parece ser reduzido pelo vírus (2, 14), esse aumento de reatividade pode refletir somente uma capacidade ligeiramente maior do inibidor alterado para penetrar no flóculo caolim-inibidor e não necessariamente uma alteração nas forças de adsorção. As dificuldades encontradas para levar a equilíbrio os sistemas caolim-inibidor, desencorajaram estudos aprofundados desses fenômenos. Apesar disso, um resultado útil emergiu, na verificação (fig. 4) de que a forma da curva de inibição, radicalmente alterada pela ação do vírus sobre o inibidor, não é grandemente afetada pelo tratamento subsequente do inibidor com o caolim. Essa observação concorda com a explicação das alterações produzidas pelo vírus na forma da curva, em termos do modo de alteração do inibidor (11,12).

A recuperação do inibidor ativo a partir do caolim tratado pelo inibidor (Quadro I) e a demonstração de que o complexo inibidor-caolim é capaz de fixar o vírus da influenza (Quadro V), ambas indicam que o inibidor não é inativo quando adsorvido pelo caolim. Essa verificação, juntamente com a dessorção observada (elução específica?) do vírus ativo do complexo (Quadro V) leva a acreditar na utilidade pro-

vável dos sistemas, contendo inibidor adsorvido, para estudos de importância tanto prática quanto teórica, tanto mais quanto as hemátias de aves e mamíferos, que têm receptores naturais para vírus, já foram utilizadas (15). Contudo, o sistema inibidor caolim não pode ser imediatamente proposto para tais estudos, por causa da contínua dessorção de traços do inibidor (Quadro I) e também por causa da atividade de combinação do caolim para vírus tanto tratados como não tratados (Quadro IV).

*Sumário.* O caolim adsorve a atividade inibitória mais rapidamente que o nitrogênio total da clara de ovo bruta e menos rapidamente que o nitrogênio total das preparações semipurificadas de inibidor. A adsorção do inibidor é reversível. O tratamento de preparações semipurificadas pelo vírus ativo da influenza suína causa um ligeiro aumento da adsorção da atividade e do nitrogênio total. O vírus ativo combina-se no frigorífico com o caolim que adsorveu o inibidor e pode ser em grande parte recuperado à temperatura ambiente. Uma quantidade menor de vírus é fixada pelo caolim não tratado. O aquecimento do vírus durante 30 minutos a 53°C aumenta sua adsorção pelo caolim\* .

#### LITERATURA (References)

1. LANNI, F., SHARP, D.G., ECKERT, E.A., DILLON, E.S., BEARD, D., and BEARD, J.W., *J. Biol. Chem.*, 1949, v179, 1275.
2. GOTTSCHALK, A., and LIND, P.E., *Nature*, 1949, v164, 232.
3. LANNI, F., SHARP, D.G., CSÁKY, T.Z., and BEARD, J. W., *Arch. Biochem.*, 1950, v28, 313.
4. SHARP, D.G., LANNI, F., LANNI, Y.T., CSÁKY, T.Z., and BEARD, J.W., *Arch. Biochem.*, 1951, v30, 251.
5. CSÁKY, T.Z., LANNI, F., and BEARD, J.W., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1950, v75, 105.
6. LANNI, F., LANNI, Y.T., and BEARD, J.W., *J. Immunol.*, 1950, v65, 269.
7. LANNI, Y.T., LANNI, F., and BEARD, D., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1950, v73, 229.
8. HIRST, G.K., *J. Exp. Med.*, 1942, v75, 49.
9. HIRST, G.K., and PICKELS, E.G., *J. Immunol.*, 1942, v45, 273.
10. LANNI, F., DILLON, M.L., and BEARD, J.W., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1950, v74, 4.

11. LANNI, F., LANNI, Y.T., and BEARD, J.W., *J. Immunol.*, 1951, v66, 169.
12. LANNI, Y.T., LANNI, F., and BEARD, J.W., *J. Immunol.*, 1951, v66, 213.
13. ECKERT, E.A., LANNI, F., BEARD, D., and BEARD, J.W., *Science*, 1949, v109, 463.
14. SHARP, D.G., LANNI, F., LANNI, Y.T., and BEARD, J. W., *Arch. Biochem.* 1951, v30, 453.
15. BRIODY, B.A., *Bact. Rev.*, 1950, v14, 65.

---

\* Os autores agradecem aos membros do corpo de pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz que os ajudaram ou aconselharam.

---

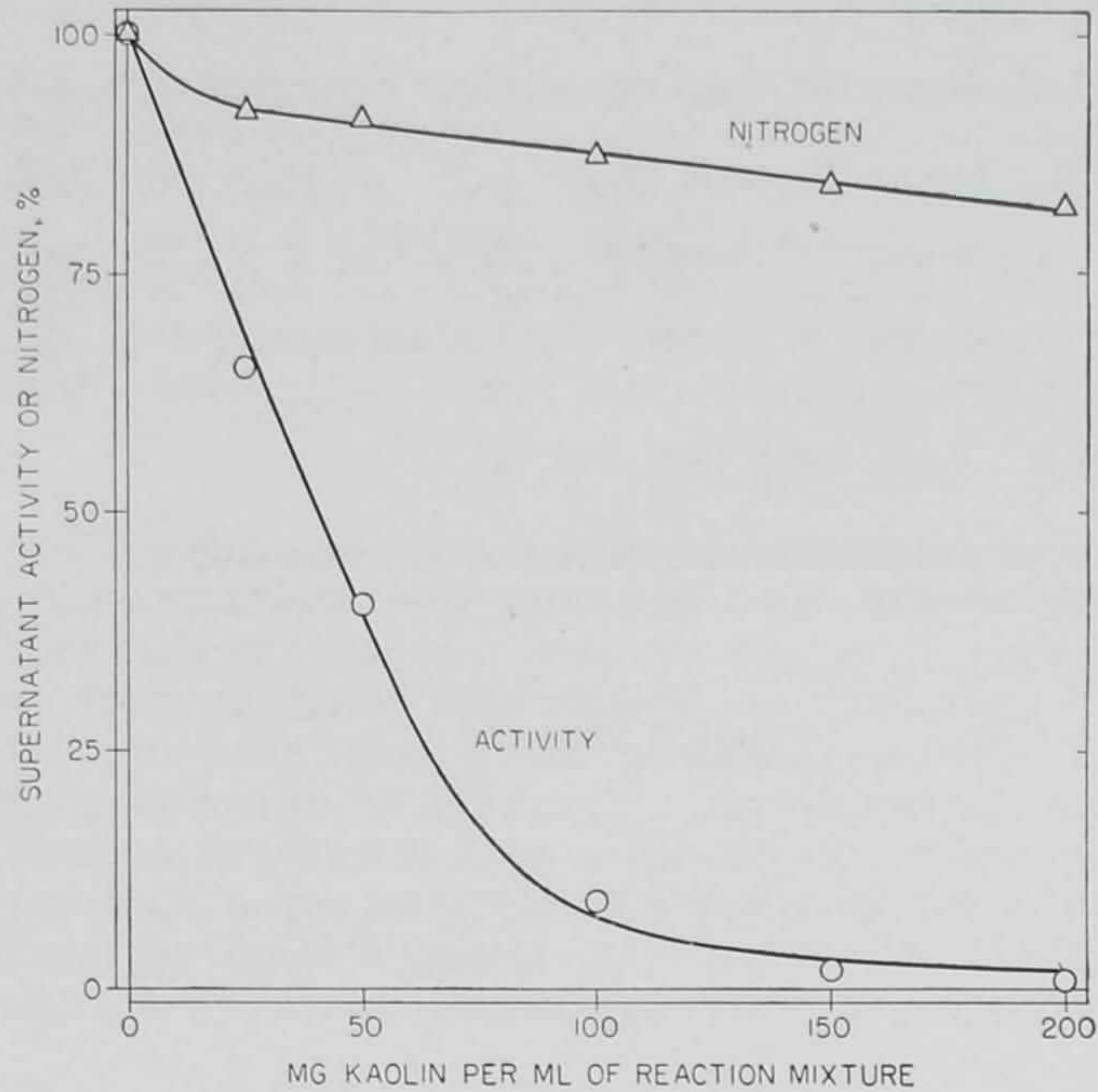


Fig. 1 — Reação de clara de ovo espessa, bruta, com caolim. Os dados relativos à atividade foram ajustados pela equação de adsorção:

$$C = \frac{1.32 K - B}{3.0 B} \quad (\text{veja o texto}).$$

Fig. 1 — Reaction of crude, thick egg-white kaolin. The activity data have been fitted by the adsorption equation

$$C = \frac{3.0 B}{1.32 K - B} \quad (\text{see text}).$$

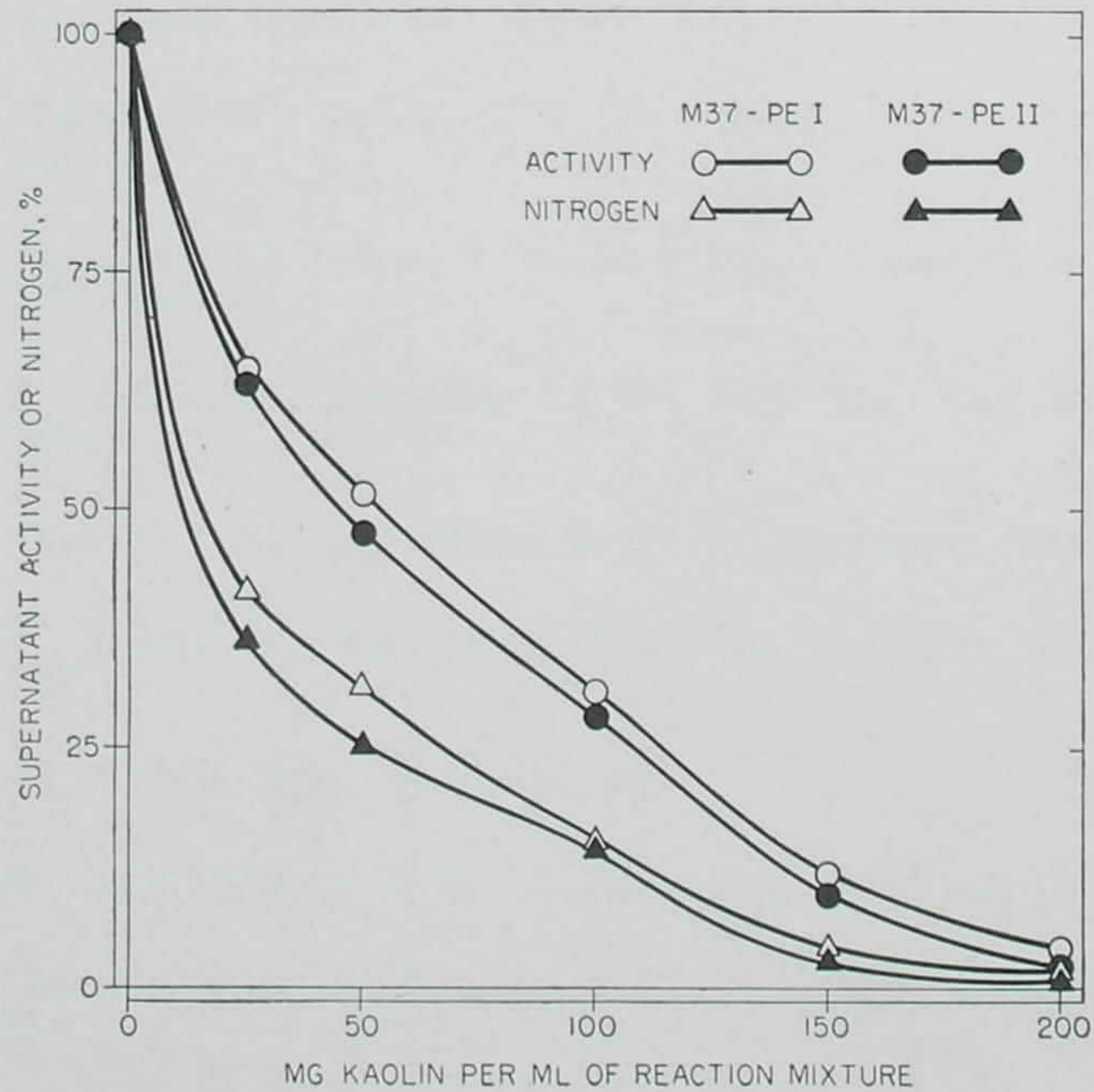


Fig. 2 — Reação de duas preparações de inibidor semipurificado com caolim.

Fig. 2 — Reaction of 2 semipurified inhibitor preparations with kaolin.

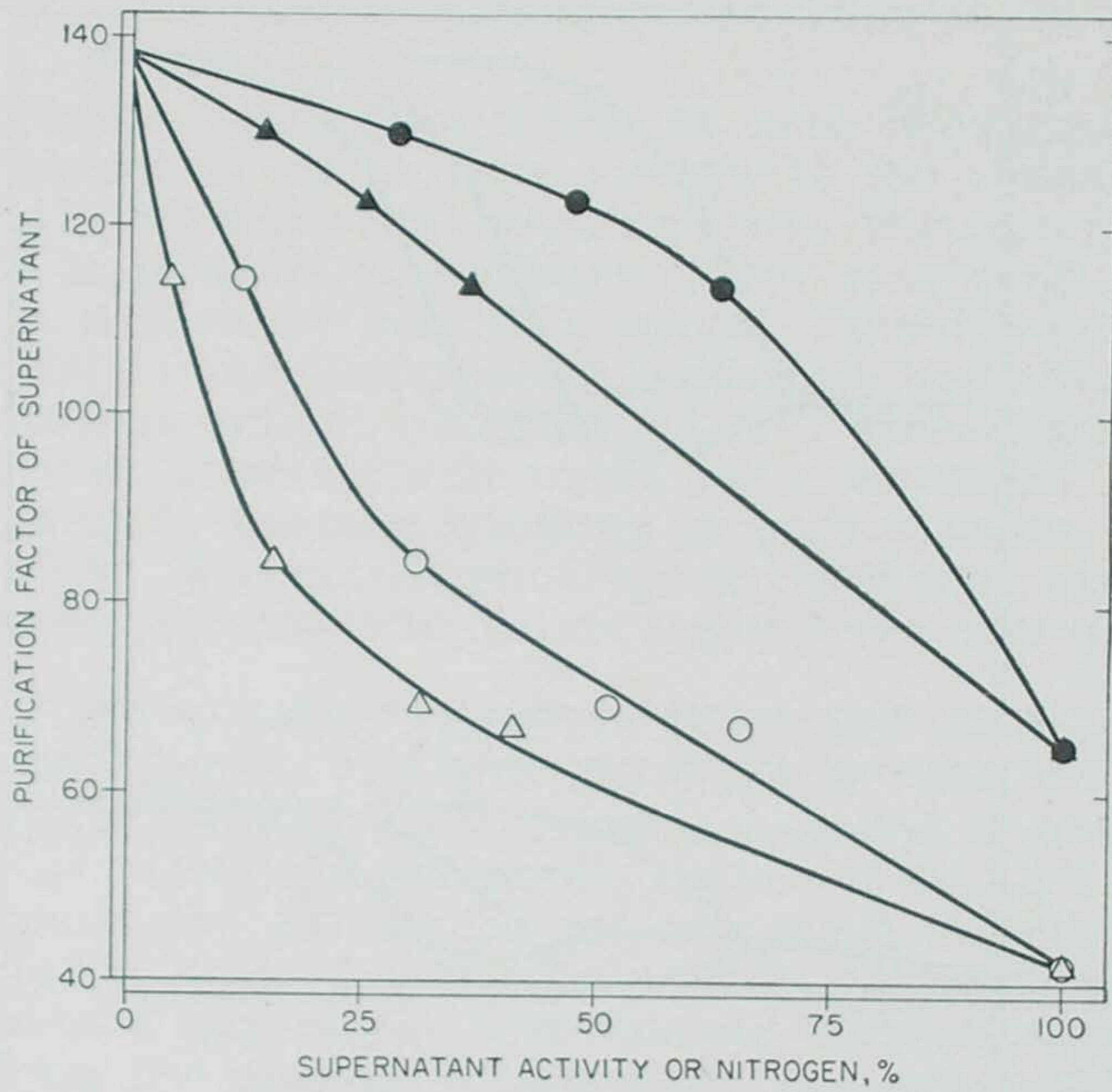


Fig. 3 — Fator de purificação dos sobrenadantes da figura 2, em função da atividade do sobrenadante (círculos) e do nitrogênio (triângulos). M37-PEI, sinais claros; M37-PEII, sinais escuros.

Fig. 3 — Purification factor of the supernatants of Fig. 2 as a function of supernatant activity (circles) or nitrogen (triangles). M37-PEI, open symbols; M37-PEII, solid symbols.

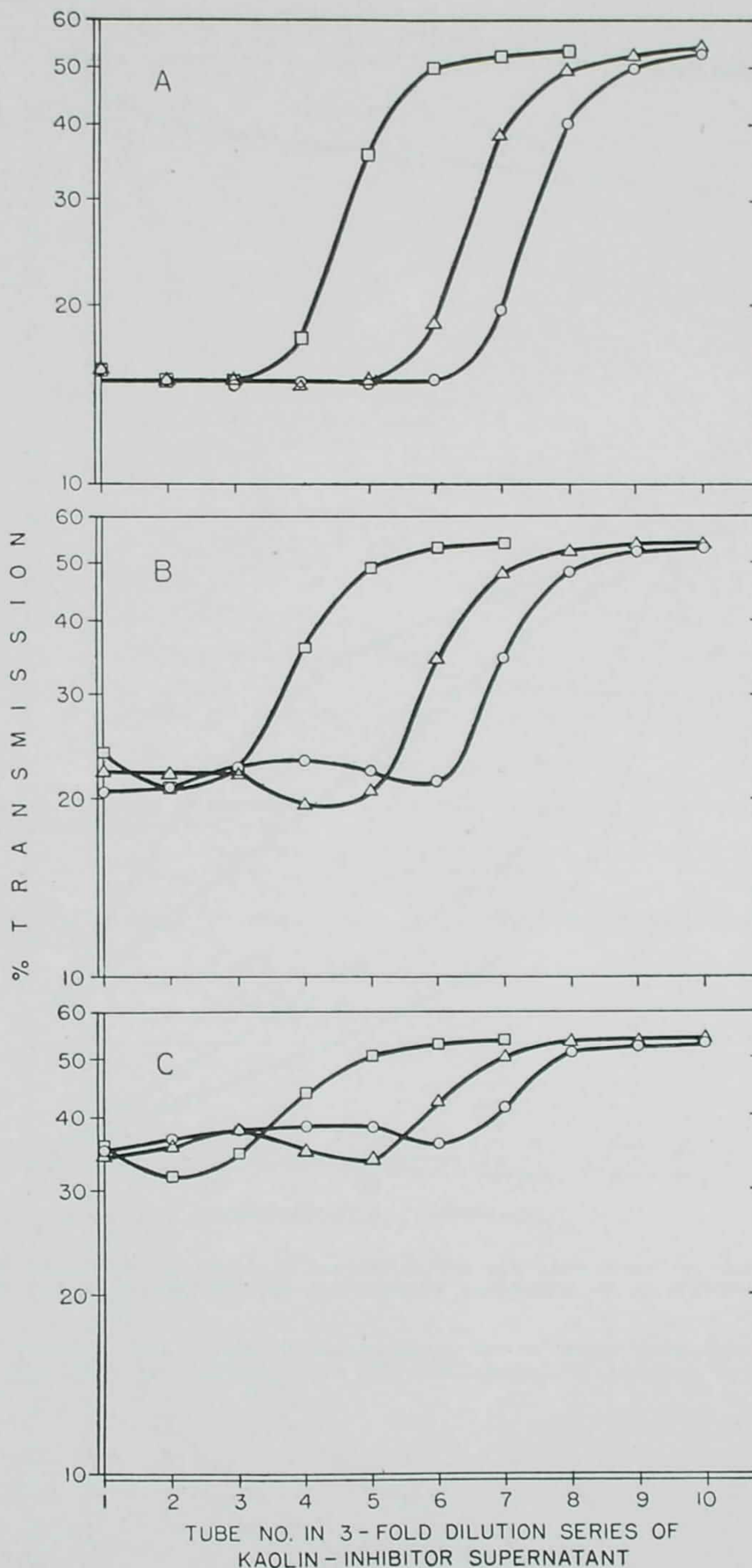


Fig. 4 — Curvas de hemoaglutinação-inibição dos sobrenadantes, de misturas de caolim com inibidor (M37-PEII) que forma tratadas com o vírus ativo da influenza suína, por 0 (A), 1 (B), ou 3 (C) horas. A concentração final de caolim, mg por ml, era 0 (círculos), 20 (triângulos) ou 80 (quadrados). A transmissão ótica é mostrada para diluições progressivas de cada sobrenadante em provas de inibição com vírus aquecido e RBC de galinha. A transmissão de 15% é a de uma suspensão a 1% de RBC e significa inibição completa. A transmissão de 55% é o valor obtido na ausência de inibidor.

Fig. 4 — Hemagglutination-inhibition curves of supernatants from mixtures of kaolin with inhibitor (M37-PEII) which had been treated with active swine influenza virus for 0 (A), 1 (B), or 3 (C) hours. The final kaolin concentration, mg per ml, was 0 (circles), 20 (triangles), or 80 (squares). The optical transmission is shown for progressive dilutions of each supernatant in inhibition tests with heated virus and chicken RBC. Transmission 15% is that of a 1% RBC suspension and means complete inhibition suspension and means complete inhibition. Transmission 55% is the value obtained in the absence of inhibitor.