

Maria Lúcia Cavaliéri de Araújo

SOROAGLUTINAÇÃO EM ERISPELA SUÍNA-
produção do antígeno e levantamento
sorológico no Estado de
Minas Gerais

Tese apresentada à Escola de Ve-
terinária da Universidade Fede-
ral de Minas Gerais, como requi-
sito parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Medicina Vete-
rinária. Área: Medicina Veteri-
nária Preventiva.

Belo Horizonte

Minas Gerais

1979

Araújo, Maria Lúcia Cavalieri de, 1949-
A663s Soroaglutinação em erisipela suína; produção
de antígeno e levantamento sorológico no Esta-
do de Minas Gerais. Belo Horizonte, Escola de
Veterinária da UFMG, 1979.
42p. ilust.

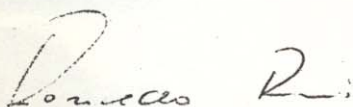
Bibliografia

Tese, Mestre em Medicina Veterinária.

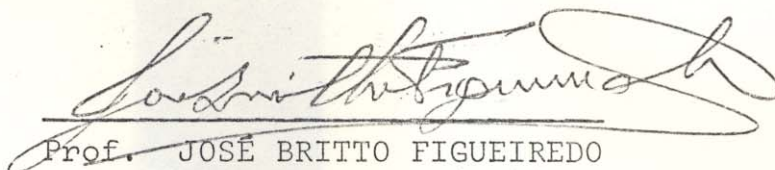
1. Imunologia - Erisipela - Suíno. 2. Antíge_
no. 3. Soro-aglutinação. I. Título.

CDD - 636.408 969 42

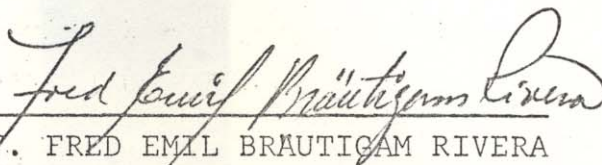
Aprovada em: 12/12/1979



Prof. RONALDO REIS
Orientador



Prof. JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO



Prof. FRED EMIL BRAUTIGAM RIVERA

Ao meu esposo, Marcos, a
meus pais, Otávio e Vanil
e ao Tio Miro.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ronaldo Reis, pela orientação.

Aos professores José Brito Figueiredo e Fred Emil Brautigan Rivera pelas sugestões e revisão desta tese.

Ao Dr. Fernando Cruz Laender e a EMATER-MG, pelo fornecimento dos soros analisados neste trabalho.

Ao amigo e colega Israel José da Silva pela inestimável colaboração na montagem e desenvolvimento dos experimentos.

Aos amigos e colegas Karin B. Bottger e José Ailton da Silva pela cooperação.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" "Campus" de Jaboticabal, pela oportunidade de cursar o pós-graduação.

À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, pela receptividade.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao PICD da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal pela bolsa de estudos concedida.

Aos professores, colegas e funcionários do curso de pós-graduação e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para esta formação.

BIOGRAFIA DO AUTOR

MARIA LÚCIA CAVALIERI DE ARAÚJO, filha de Otávio Cavalieri e de Vanil Lopes Cavalieri, nasceu na cidade de Santos, estado de São Paulo, aos 24 dias do mês de março de 1949.

Obteve o diploma de Médico Veterinário em julho de 1973 pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ingressando na mesma ocasião, como médica veterinária na empresa particular, elaboração de produtos biológicos, onde permaneceu até 1975.

Em 1975 ingressou como Auxiliar de Ensino, no Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP.

Em 1977 iniciou o curso de Mestrado na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, na área de Medicina Veterinária Preventiva.

RESUMO

Preparou-se um antígeno aglutinante, para evidenciar anticorpos contra erisipela suína a partir de uma amostra de *Erysipelothrix rhusiopathiae* NF₄, cultivada em caldo de carne, enriquecido com peptona (2%), bile em pó (0,05%) e soro equino (10%).

Este antígeno foi avaliado frente a soros de animais protegidos com vacina viva ou inativada contra Erisipela suína e inoculados com cepa viva patogênica, por via oral e intradérmica.

O antígeno preconizado foi utilizado em levantamento sorológico preliminar efetuado em 494 amostras de soros de suínos (matrizes não vacinadas) do Estado de Minas Gerais, mostrando os seguintes títulos aglutinantes: reagentes a 1:1 = 56; a 1:5 = 86; a 1:10 = 87; a 1:20 = 107; a 1:40 = 92; a 1:80 = 54; a 1:160 = 06 e não reagentes igual a 06.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
4. RESULTADOS	19
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÕES	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

A erisipela suína, doença infectocontagiosa produzida pelo *Erysipelothrix rhusiopathiae*, apresenta distribuição universal, sendo considerada de grande importância econômica na Europa, Ásia e América do Norte (SHUMAN, 1965).

No Brasil parece que a doença não tem sido bem estudada, evidenciada pela escassa bibliografia a respeito.

REIS et alii (1977) estimaram, num período de dois anos, um prejuízo relativo à doença equivalente a mais de um milhão de cruzeiros, somente no Estado de Minas Gerais.

A infecção natural dos suínos e provavelmente de outros animais se produz correntemente por via digestiva. O solo, alimentos e bebidas se contaminam facilmente através das fezes e urina de animais enfermos.

A doença apresenta-se sob forma aguda e crônica, sendo a primeira caracterizada por aparição brusca, elevação da temperatura e alta mortalidade. Na região ventral do corpo dos

animais infectados podem aparecer áreas hemorrágicas que acompanham a evolução da enfermidade.

A forma crônica se caracteriza por endocardite e artrites. Apesar da baixa mortalidade da erisipela em sua forma crônica, os animais doentes apresentam desenvolvimento retardado e parecem ser disseminadores constantes da infecção (KARLSON, 1970).

O diagnóstico só pode ser feito com certeza baseado em testes bacteriológicos e ou sorológicos.

O diagnóstico sorológico foi introduzido por SCHOENING et alii (1935), e consistia em uma prova de aglutinação rápida em placa. O resultado da prova era comprovado com achados clínicos e ou bacteriológicos. Os autores caracterizaram a prova para uso no campo e diagnóstico a nível de rebanho.

A partir desta data, vários trabalhos têm sido realizados na tentativa de se estabelecer um teste seguro e prático que possa oferecer suporte a diagnósticos clínicos.

Ainda SCHOENING & CREECH (1933) introduzem novas técnicas no preparo de um antígeno para testes de soroaglutinação, seguido por DEEM (1936), KARLSON & MCNUTT (1939), RICE et alii (1952a) e outros pesquisadores que chamam a atenção para este tipo de teste, afirmando ser ele de grande valia em termos de diagnóstico de rebanho.

Considerando a falta de estudos desta natureza em nosso meio, este trabalho objetivou a produção e avaliação de antígeno para testes de soroaglutinação rápida em placa, bem como a utilização deste antígeno em levantamento sorológico preliminar em alguns rebanhos suínos do Estado de Minas Gerais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

SCHOENING et alii (1933) relataram a necessidade de se reconhecer a erisipela suína em rebanho onde observações clínicas fossem confirmadas por exames laboratoriais. Diante disso, elaboraram estudo com a finalidade de implantar técnicas sorológicas que pudessem ser aplicadas no diagnóstico da doença. Como primeiro passo, desenvolveram um teste de aglutinação com sangue total, para campo, e um teste em tubo, para laboratório. Encontraram dificuldades quanto ao preparo de lotes uniformes de antígeno e quando esses eram satisfatórios, permaneciam inalterados por 2 a 4 semanas, quando começavam a apresentar tendência a auto-aglutinação. Recomendaram para elaboração do antígeno o uso de colônias lisas por produzirem pouco ou nenhum agrupamento e um satisfatório grau de especificidade, sendo suficientemente estável. Os autores acreditam que o teste é mais indicado para determinar a doença no rebanho do que para diagnósticos individuais.

SCHOENING et alii (1935) descreveram a elaboração de um antígeno a partir de uma única amostra de *E. rhusiopathiae*, em meio líquido, após incubação por 36-48 horas e centrifugação. Em seguida, lavou-se o sedimento em solução salina contendo 1% de formalina, centrifugou-se e ressuspendeu-se em uma pequena quantidade da mesma solução. Tal suspensão foi agitada durante meia hora filtrada em algodão e estandarizada para tubo nº 1 do nefelômetro de Mac Farland.

DEEM (1936) relatou duas dificuldades na produção de antígeno para uso em testes de aglutinação:

- a - crescimento do microrganismo em quantidades suficientes e
- b - preparo de um antígeno estável que se mantenha em suspensão e não apresente floculação espontânea. Não conseguiu um antígeno satisfatório a partir de colônias tipo rugosas com crescimento dos organismos em cadeias. Demonstrou ainda que a adição de triptofano e fermento seco ao caldo de carne acelera grandemente o crescimento, com um mínimo de floculação espontânea. O meio de cultura assim preparado após ter sido semeado com o microrganismo, foi incubado durante 48 horas, e a seguir centrifugado durante 1 hora a 2000 rpm, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspense em álcool a 95% por 18 a 24 horas, o que parecia diminuir a floculação. Após nova centrifugação por 1 hora a 2000 rpm e des

carte do sobrenadante, o sedimento era ressuspensado em solução salina 0,9%, contendo 0,5% de fenol, agitado por 1 hora e centrifugado, sendo finalmente padronizado para densidade do tubo 1 do nefelômetro de McFarland, após o que estava pronto para uso. A prova consistia em colocar 1 ml de antígeno em tubos, adicionando-se quantidades apropriadas de soro e incubando por 24 horas a 37°C. Os antígenos controles e soro negativo mostraram pequena ou nenhuma sedimentação, enquanto que soros imunes apresentaram aglutinação completa na diluição 1:2000.

KARLSON & MCNUTT (1939) descreveram, para um teste de aglutinação microscópica, a técnica de preparo do antígeno, onde recomenda, para produção, colônias lisas de *E. rhusiopathiae* cultivadas em caldo de carne magra mais a adição de peptonas, triptona e cloreto de sódio.

RICE et alii (1952a), descreveram o preparo de um antígeno elaborado a partir de cultura de *E. rhusiopathiae* cultivada por 48 horas a 37°C, em caldo de carne contendo 2% de soro de suíno. Após incubação e centrifugação, o sedimento era ressuspensado em solução salina a 0,85% a um oitavo do volume original. Esse era novamente centrifugado e o sedimento ressuspensado, a um décimo do volume original, em água destilada contendo 0,05% de mertiolate. A suspensão concentrada era estocada em refrigerador por 3 dias e testada quanto a viabilidade por plaqueamento em agar sangue. As suspensões concentradas eram agitadas o bastante para homogeneização. Antes do uso, cada

suspensão era diluída em água destilada, levando a uma densidade ligeiramente maior que a do tubo nº 2 do nefelômetro de Mc Farland. A técnica da prova consistia na mistura em partes iguais de soro de coelhos imunizados com suspensões de *E. rhusiopathiae*, as quais foram, em seguida, submetidas a agitação mecânica e incubação a 42°C, durante 4 horas, em banho maria e posteriormente a 37°C, em estufa, durante uma noite. Como controle usaram soro de coelho normal.

RICE et alii (1952b) estudando, através da prova de aglutinação, amostras de soros de suínos normais e com artrites, verificaram que nenhum dos soros normais apresentou títulos acima de 1:100, mas considerável proporção apresentou títulos de 1:20 a 1:80, enquanto que os soros de suínos com artrite apresentaram títulos de 1:1600 ou mais. Os autores chamam a atenção para o caso de reações negativas ou fracas, dizendo que elas devem ser interpretadas com cuidado, pois amostras colhidas nos primeiros estágios da infecção podem ter pouca atividade aglutinante. Também relatam, como dificuldade na interpretação do teste, a tendência de muitos soros normais apresentarem uma aglutinação não específica para *E. rhusiopathiae* em baixas diluições.

FREEMAN et alii (1964), usando a técnica de soroaglu tinação para determinar níveis de anticorpos no soro, relataram a estreita relação entre a frequência e severidade de respostas patológicas e a magnitude de respostas imunológicas. Para prepa ro do antígeno, usaram uma amostra de *E. rhusiopathiae* isolada de um caso de septicemia fatal, cultivada em caldo cérebro-coração em pH 4, acrescido de 5-10% de soro equíno. As bactérias foram

obtidas por centrifugação da cultura em caldo de 24 horas, sendo em seguida lavadas de 1 a 3 vezes e ressuspensas em solução de NaCl 0,85%, a um volume igual a 1/10 do volume original. Foi usado o calor (60°C por 60 minutos) ou o fenol a 0,5% para matar as bactérias .

SIKES (1965) descreveu o preparo de um antígeno a partir de colônias lisas, caracterizando tais colônias como pequenas, redondas, brilhantes e com a borda inteira como sendo ideais para essa técnica. Os microrganismos ocorrem, como pequenos bastões, singularmente ou em pequenas cadeias de 2 ou 3. Esses microrganismos eram estocados em meio semi-sólido enriquecido com 10% de soro equino e cultivados em caldo triptose com 10% de soro caprino; eram incubados por 24 horas a 35°C, sendo o sedimento suspenso em salina fisiológica acrescida de 1% de formalina. Essa suspensão era centrifugada por 1 hora a 3300 rpm e se necessário, logo após novamente ressuspensa em pequena quantidade de salina formolada. A seguir, era submetida a agitação por 30 minutos, filtrada em algodão, sendo a densidade ajustada para o nº 2 do nefelômetro McFarland. Os soros, a serem testados, eram diluídos a 1:10, em solução salina fisiológica estéril e pipetados para os tubos nas quantidades de 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,02 e 0,01 ml sendo 1,0 ml de antígeno adicionado em cada um. Salina fisiológica era usada como controle. Os tubos eram incubados a 37,5°C por 30 minutos e a seguir, centrifugados por 4 minutos a 1.800 rpm. A leitura era feita através de uma fonte de luz.

SIKES & TUMLIN (1967) introduziram modificação no preparo do antígeno descrito anteriormente por Sikes (1965).

Adicionaram à suspensão de antígeno, como estabilizador e preservador, o timol na concentração de 0,0015% em solução fisiológica. O antígeno mostrou bons resultados em várias diluições do soro até a 6ª semana, havendo alguma perda de potência na 7ª semana. Os resultados do teste indicaram ser ele prático, seguro e vantajoso para diagnóstico sorológico em erisipela suína.

SCHAAF & KRAMER (1968) estabeleceram um antígeno que podia ser estocado por vários meses e usado no teste de aglutinação em tubo para detectar artrite por erisipela, podendo também controlar as propriedades profiláticas e terapêuticas do soro imune. O meio de cultura usado foi caldo alcalino de fígado (fígado fresco, caldo de carne com 1% de peptona e 0,5% de NaCl, pH 7,6) esterilizado por 30 minutos em autoclave, sendo adicionadas 2 gotas de NaOH a 4% (pH 8,0). A seguir, os tubos foram incubados por uma noite a 37°C. Quando o líquido estava completamente claro e pronto para uso, foram inoculadas colônias de *E. rhusiopathiae* variação necessariamente lisa e incubados por uma noite. Logo após, os tubos contendo a cultura, foram analisados quanto à turvação e bom crescimento. O sobrenadante foi decantado e juntado a ele uma gota de formalina a 4% por mililitro. Após 24 horas de incubação a 37°C, o antígeno podia ser guardado em refrigerador 4°C por 12 meses. Antes do uso o antígeno era ajustado para tubo nº 2 do nefelômetro McFarland. A técnica da prova obedeceu o seguinte critério: a cada 0,1 ml de soro a testar foi adicionado 0,9 ml de solução salina, contendo 0,04% de gelatina. A partir do 1º tubo, 0,5 ml foi pipetado em sucessão para uma série de 6 tubos. A cada um desses tubos foi adicionado 0,5 ml de antígeno. A seguir os tubos foram agitados e

incubados por uma noite. O autor aponta a tendência de formas agregadas do *E. rhusiopathiae*, principalmente quando cultivado em meio contendo soro. É considerado como importante, o cultivo em caldo de fígado, para tornar uma elaboração prática, com multiplicação rápida das bactérias e sem tendência à formação de grupos.

NIELSEN (1969) chamou a atenção para a necessidade de se implantar um teste para diagnosticar a erisipela crônica num rebanho, teste esse que fosse seguro e econômico. São descritas as várias dificuldades na técnica de preparo de um antígeno para o teste, como a tendência de várias amostras do agente causal da erisipela aglutinarem espontaneamente, baixa conservação de antígeno e interpretação do baixo grau de reação. Preconizou emprego de antibióticos em meio para crescimento do *E. rhusiopathiae*, recomendando o caldo carne de cavalo, acrescido de 1% de peptona e 0,5% de NaCl, P.A., pH 7.8. O meio foi aquecido por 15 minutos tamponado com fosfato esterilizado por autoclavagem. Apresentou, como resultado, a eliminação de contaminantes.

BOHM (1974a) estabeleceu requisitos na avaliação do teste de soroaglutinação para erisipela, apontando a necessidade de se estabelecer o limite entre títulos inespecíficos (condicionados por aglutininas normais) e específicos (que ocorrem após um confronto com antígeno de erisipela). Demonstrou o autor que suínos provenientes de isolamentos (gnotobióticos) apresentaram títulos até 1:5; suínos SPF (Specific Pathogen Free = livre de agentes patogênicos) apresentaram títulos até 1:40, o que o levou a declarar que títulos até 1:80 situavam-se ainda ao nível de títulos inespecíficos. Títulos mais altos são considerados específicos com uma possibilidade de erro $1\% > p > 0,1\%$,

significando que em grande número de exames, um título mais alto, como 1:160, na aglutinação pode não ser causa de uma infecção pelo agente causal da erisipela, na proporção de um máximo de 9 vezes em 1000 animais examinados. Entretanto observou também que se pode encontrar anticorpos produzidos pelo *Erysipelothrix* a nível de títulos inespecíficos.

BOHM (1974b) aperfeiçoou a técnica de aglutinação, na tentativa de apontar soluções quanto ao problema de aglutinação espontânea das amostras utilizadas na produção de antígeno, bem como a baixa produção e conservação do antígeno. Para tanto utilizou a amostra NF₄E1², cultivada em caldo de carne de porco acrescido de 3% de peptona, 1% de glicose e 1% de fenol liquefeito (pH 7,6). A adição posterior de 5% de soro bovino aumentou consideravelmente a produção de antígeno. A cultura foi incubada por 20 - 24 horas a 37°C, sendo em seguida adicionado 0,3% de formalina que agiu por 24 horas a 22 ou 37°C. A seguir, o antígeno foi centrifugado por 20 minutos a 2000 g e decantado cerca de 1/3 do sobrenadante. O restante do material foi colocado em temperatura de geladeira por um período mínimo de 14 dias antes do uso. Após este período, testes foram realizados frente a soro comprovadamente positivo (soro de suínos com erisipela crônica, soro hiperimune de cavalo, suíno ou coelho), negativo (soro de suíno gnotobiótico ou SPF, soro de rato ou coelho). O antígeno pronto para o uso foi mantido a -20°C durante longo período. Após degelá-lo a + 4°C ele só foi utilizável por no máximo 8 semanas. O autor realizou a aglutinação em placas sintéticas. A leitura ocorria sobre um fundo preto, não brilhante. O título indicava a diluição, na qual todo o antígeno estava sedimentado no centro do orifício, sob forma de depósito homogêneo, sem margem estrelada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparo do Antígeno

Foi usada, para uma elaboração do antígeno, uma amostra de referência NF₄ de *Erisipelothrix rhusiopathiae* (swine, U.S.A.), repicando-a para tubos contendo caldo 3c* acrescido de 10% de soro equino filtrado (filtro Seitz). Após 24 horas, tendo sido observado crescimento, visualizado pela turvação do meio e nos esfregaços em lâminas coradas pelo método de Gram, procedeu-se à inoculação de 0,5 ml, por via intraperitoneal, em camundongos suíços albinos, desmamados.

Os camundongos foram observados a partir de 24 horas, quando começaram a apresentar mudança de comportamento, desde incordenação motora até a morte, que na maioria dos casos ocorreu entre 48 e 72 horas. Esses camundongos foram necropsiados e o sangue colhido assepticamente, através de punção cardíaca, com agulha e seringa tipo tuberculina. A seguir, o sangue foi plaqueado em agar 3c** e levado à estufa a 37°C por 24 ho

* Caldo 3C - BRAIN HEART INFUSION-DIFCO LABORATORIES DETROIT, MICHIGAN USA.

** Agar 3c - BRAIN HEART INFUSION AGAR GIBCO DIAGNOSTICS, Madison, Wisconsin 53713 USA.

ras. Transcorrido esse período, foi observado crescimento característico do *Erysipelothrix rhusiopathiae*, que consistia no aparecimento de colônias transparentes, brilhantes, pouco agrupadas. Na placa foram selecionadas, através de observação em lupa, colônias pequenas de aspecto brilhante, apresentando bordos regulares, sem pigmentação, que eram isoladas como colônias lisas e semeadas em placas de agar 3c. Essas foram levadas para estufa a 37°C durante 24 horas. Após este tempo, as placas foram reanalisadas, quanto à morfologia das colônias e, ainda, foram colhidas amostras para esfregaços, corados pelo GRAM, onde se consideraria somente a presença de bastonetes GRAM positivos, isolados ou em cadeias curtas, característico de colônias lisas do *E. rhusiopathiae*. Após essas operações as colônias foram repicadas e usadas como inóculo.

O meio líquido usado para preparo do inóculo e o meio de produção tinham a seguinte composição:

Extrato de carne	0,3 g
Peptona	2 g
Bile em pó	50 mg
Água destilada	100 ml
Soro equino filtrado	10 ml

Feita a adição, os balões foram incubados 24 horas a 37°C. Em seguida, colheu-se assepticamente uma amostra de 1 ml, de cada balão da emulsão bacteriana formando um "pool". A partir desse "pool" foram feitas diluições sucessivas a partir de 10^{-1} a 10^{-10} a saber:

0,9 ml de salina tamponada estéril pH 7,2 em cada tubo de hemólise. No primeiro tubo colocou-se assepticamente,

0,1 ml do "pool" descrito, homogeneizando-se 5 vezes por pipetagem, deslocando-se 0,1 ml da mistura de um tubo ao outro e assim sucessivamente. Utilizou-se apenas diluições a partir de 10^{-6} .

Tomou-se o tubo com a diluição 10^{-10} , colocando-se assepticamente 0,1 ml da mistura no centro de uma placa de Petri contendo agar 3c. A mesma operação foi repetida nas demais diluições até 10^{-6} . Em seguida espalhou-se a mistura com alça de Drigalski flambada e resfriada em uma placa de agar 3c estéril. A alça não foi flambada de uma diluição a outra. As placas assim preparadas foram colocadas na estufa a 37°C por 30 minutos em posição normal, sendo invertidas a seguir deixadas por 24 horas.

Após este tempo as placas foram observadas e as colônias contadas para determinação do número de bactérias por ml de suspensão.

Paralelamente à contagem de bactérias por ml foi feito teste de pureza do antígeno em agar 3c. A seguir, foi adicionada aos balões formalina na quantidade de 0,3%, que agiu durante 24 horas a 37°C. Transcorrido esse tempo, foram tomadas amostras de antígeno para teste de inocuidade em placas de agar 3c incubadas a 37°C durante 24 horas. Não havendo nenhum crescimento, o antígeno foi centrifugado a 2.000 G durante 20 minutos. Terminada essa operação, 2/3 do sobrenadante foi descartado e substituído por salina tamponada estéril pH 7,2, sendo submetido a nova centrifugação pelo mesmo tempo e rpm, processo este repetido 3 vezes.

Após as três centrifugações, lavando as células do antígeno, este foi conservado em salina tamponada estéril pH

7,2, em volume igual a 1/3 do inicial e distribuído em pequenas quantidades, em frascos estéreis tipo penicilina, devidamente rotulados e tampados, sendo conservados a 4°C durante 14 dias, quando foram feitos os testes definitivos. Os testes finais com o antígeno consistiram em colocá-lo frente a soros comprovadamente positivos (soro imune de referência -Weybridge Inglaterra), negativos (soro de coelho normal) e a solução salina para verificação da auto-aglutinação. O antígeno assim preparado e testado foi usado a seguir ou guardado em temperatura de geladeira.

3.2. Soros

Inicialmente, foi realizado um experimento para que se pudesse ter dados relativos ao comportamento do antígeno frente a soros de suínos, submetidos à inoculação experimental e a imunização.

3.2.1. Soros de animais inoculados experimentalmente.

Foram utilizados soros provenientes de suínos e inoculados experimentalmente com o *Erysipelothrix rhusiopathiae* amostra Itabirito (isolado de animais acometidos de um surto da doença no município de Itabirito, M.G.) com características de alta patogenicidade.

Para inoculação os animais foram divididos em 2 grupos. No primeiro grupo os animais foram inoculados por via oral na dose de 10 ml. No segundo grupo os animais foram inoculados via intradérmica, por escarificação no costado direito, de sedimento da cultura pura acima descrita. (TAB.I).

7,2, em volume igual a 1/3 do inicial e distribuído em pequenas quantidades, em frascos estéreis tipo penicilina, devidamente rotulados e tampados, sendo conservados a 4°C durante 14 dias, quando foram feitos os testes definitivos. Os testes finais com o antígeno consistiram em colocá-lo frente a soros comprovadamente positivos (soro imune de referência -Weybridge Inglaterra), negativos (soro de coelho normal) e à solução salina para verificação da auto-aglutinação. O antígeno assim preparado e testado foi usado a seguir ou guardado em temperatura de geladeira.

3.2. Soros

Inicialmente, foi realizado um experimento para que se pudesse ter dados relativos ao comportamento do antígeno frente a soros de suínos, submetidos à inoculação experimental e a imunização.

3.2.1. Soros de animais inoculados experimentalmente.

Foram utilizados soros provenientes de suínos e inoculados experimentalmente com o *Erysipelothrix rhusiopathiae* amostra Itabirito (isolado de animais acometidos de um surto da doença no município de Itabirito, M.G.) com características de alta patogenicidade.

Para inoculação os animais foram divididos em 2 grupos. No primeiro grupo os animais foram inoculados por via oral na dose de 10 ml. No segundo grupo os animais foram inoculados via intradérmica, por escarificação no costado direito, de sedimento da cultura pura acima descrita. (TAB.I).

3.2.2. Soros de animais imunizados.

Foram utilizados soros de animais imunizados com vacina viva, dose 5 ml, via subcutânea da amostra avirulenta; e também soros de animais imunizados com vacina morta, dose 5 ml, via subcutânea da amostra CN 5486 (TAB.I).

As amostras foram colhidas antes e após o início do experimento, a cada 15 dias, durante 2 meses.

3.2.3. Soros de animais de campo.

Posteriormente foram analisadas amostras de soros de suínos, provenientes de diferentes regiões geoeconômicas do Estado de Minas Gerais assistidas pela EMATER-MG.

Foram colhidas 494 amostras de soro de porcas, não vacinadas contra erisipela, divididas proporcionalmente entre 8 regiões assistidas pela EMATER-MG.

Dentro de cada região, os estabelecimentos bem como os animais doadores, foram escolhidos ao acaso levando-se em conta apenas o requisito: matrizes não vacinadas. Estas distribuições encontram-se na TAB. II.

O sangue dos animais foi obtido através de incisão na orelha, sendo depositado a seguir em frasco estéril, tipo penicilina, para obtenção do soro.

Os soros foram separados, identificados e acondicionados em gelo, sendo transportados ao laboratório onde foram imediatamente processados ou estocados a (-20°C) até o momento do uso.

3.3. Técnica da prova de soroaglutinação.

Os soros a serem testados foram diluídos em uma

série de 7 tubos de hemólise, obedecendo ao esquema: 0,8 ml de salina tamponada pH 7,2 estéril para o primeiro tubo da série e 0,5 ml nos restantes. No 1º tubo foi colocado 0,2 ml do soro a testar e após homogenização foi transferido para o tubo seguinte 0,5 ml da mistura, sendo o processo repetido até o final da série. Desta maneira o soro apresentava-se diluído de 1:5 até 1:320.

Os testes foram elaborados em placas de Huddleson onde foi colocado com auxílio de contagotas graduado (tipo brucelose = 0,03 ml por gota) uma gota do soro em diferentes diluições e uma gota de antígeno, sendo a mistura homogeneizada nos moldes da soroaglutinação pela brucelose.

A leitura foi feita em até 10 minutos, através de uma fonte de luz. O título foi dado levando-se em conta a última bem marcada aglutinação do soro. Como controle foi usada salina tamponada pH 7,2 para verificação de auto-aglutinação.

TABELA I - Dados relativos a animais e tratamentos utilizados para obtenção de soro de suínos para uso em prova de soroaglutinação em Erisipela Suína, em rebanhos do Estado de Minas Gerais, 1979.

Tratamento	Raça	Sexo	Nascimento	Idade inicial em dias
<u>A. Vacinados</u>				
A ₁ . Vacina viva	LW 1118	M	31/01/79	86
Amostra AVIR.				
Dose 5 ml	LW 1121	F	31/01/79	82
Sub. cutânea	H 1196	M	16/01/79	97
Data 25/4/79	D 1213	M	22/01/79	91
A ₂ . Vacina morta	LW 1058	M	16/01/79	97
Amostra CN				
5486	H 1202	F	16/01/79	97
Dose 5 ml	D 1211	M	16/01/79	97
Sub. cutânea				
Data 25/4/79	D 1215	F	22/01/79	91
<u>B. Experimentalmente inoculados.</u>				
B ₁ . Via intradérmica (escarificação)	LW 1117	M	31/01/79	84
Amostra Itabirito				
(escarificação)	LW 1057	M	16/01/79	99
Amostra Itabirito	H 1199	M	16/01/79	99
Data 27/4/79	D 1217	F	22/01/79	93
B ₂ . Via oral	LW 1120	F	31/01/79	84
Amostra Itabirito				
rito	H 1201	F	16/01/79	99
Dose 10 ml	D 1218	F	22/01/79	93
Data 27/4/79	D 1212	F	22/01/79	93

TABELA II - Número de propriedades e suínos não vacinados sorteados para exame de hemossoroaglutinação para Erisi pela segundo as regiões geoeconômicas do Estado de Minas Gerais, 1979.

Regiões	Nº de Produtores		Matrizes	
	Existentes	Sorteados	Existentes	Sorteados
I	138	18	5845	73
II	458	40	12798	156
III	150	20	6545	81
IV	25	05	1686	20
V	123	10	3283	40
VI	133	16	5350	66
VII	35	03	1075	14
VIII	85	11	3675	44
TOTAL	1147	123	40257	494

4. RESULTADOS

O antígeno preparado a partir de colônias lisas, obtidas através de passagens em camundongos, cultivadas conforme descrito em material e métodos, apresentou na contagem de bactérias por mililitro da suspensão os seguintes resultados:

Diluição	Nº de bactérias/ml
10^{-6}	Incontável
10^{-7}	Incontável
10^{-8}	> 301
10^{-9}	275
10^{-10}	44

O antígeno preparado frente a soro hiperimune de referência (Weibridge-Inglaterra) apresentou título de 1:1280. Nenhum título foi encontrado frente a soros de coelhos normais (utilizados como negativo) e não houve auto-aglutinação frente a solução salina.

A conservação adotada do antígeno em meio líquido

foi a 4°C sendo estocado reproduzindo os mesmos resultados, durante 6 meses.

O antígeno preconizado mostra, frente a soros provenientes de suínos vacinados (TAB. III e IV), que os títulos pós-vacinais situam-se entre os limites 1:1 a 1:80.

Os maiores aumentos de títulos pós-vacinais foram no lote em que foi usada a vacina viva. Estes títulos permaneceram até o final das observações, ou seja 60 dias (TAB. III).

Todos os animais utilizados apresentaram antes da vacinação ou da inoculação, títulos aglutinantes iguais ou inferiores a 1:10 (TAB. IV).

Nas análises sorológicas posteriores não observamos aumentos significativos de títulos aglutinantes (TAB. V e VI). Os animais inoculados quer por via oral, quer por via intradérmica, apresentaram após 24 h, uma elevação da temperatura (atingindo 42°C).

Frente aos resultados obtidos na análise dos soros provenientes das várias regiões do Estado de Minas Gerais, que estão mencionados nas TAB. VII a XIV, podemos notar que de 494 soros examinados, 488 apresentaram títulos assim distribuídos: 1:1 = 56; 1:5 = 86; 1:10 = 87; 1:20 = 107; 1:40 = 92; 1:80 = 54; 1:160 = 06. TAB. XV.

Dos 494 soros analisados 16 não apresentaram nenhuma reação. TAB. XV.

TABELA III - Resultados obtidos no teste de soroaglutinação para Erisipela Suína em diferentes amostras de soros de suínos, protegidos com vacina viva, Minas Gerais, 1979.

COLHEITA	Nº de animais	DILUIÇÕES									
		1/1	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320		
1. Antes da vacinação	04	1	2	1	0	0	0	0	0	0	
2. 15 dias após a vacinação	04	0	0	0	1	2	1	0	0	0	
3. 30 dias após a vacinação	04	0	0	0	1	3	0	0	0	0	
4. 45 dias após a vacinação	04	0	0	1	1	2	0	0	0	0	
5. 60 dias após a vacinação	04	0	0	1	2	1	0	0	0	0	

TABELA IV - Resultados obtidos no teste de soroaglutinação para Erisipela Suína com diferentes amostras de soros de suínos protegidos com vacina inativada, Minas Gerais, 1979.

COLHEITA	Nº de animais	DILUIÇÕES							
		1/1	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
1. Antes da vacinação	04	2	1	1	0	0	0	0	0
2. 15 dias após a vacinação	04	0	1	1	2	0	0	0	0
3. 30 dias após a vacinação	04	0	0	1	1	2	0	0	0
4. 45 dias após a vacinação	04	0	0	2	1	1	0	0	0
5. 60 dias após a vacinação	04	0	0	2	2	0	0	0	0

TABELA V - Resultados obtidos no exame de soroaglutinação para Erisipela Suína com diferentes amostras de soro de suínos inoculados experimentalmente com a amostra patogênica *Itabirito* por via intradérmica, Minas Gerais, 1979.

COLHEITA	Nº de animais	DILUIÇÕES									
		1/1	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320		
1. Antes da inoculação	04	0	3	1	0	0	0	0	0	0	
2. 15 dias após a inoculação	04	1	0	2	0	0	1	0	0	0	
3. 30 dias após a inoculação	04	1	0	2	0	0	1	0	0	0	
4. 45 dias após a inoculação	04	1	0	2	0	0	1	0	0	0	
5. 60 dias após a inoculação	04	1	1	1	0	0	1	0	0	0	

TABELA VI - Resultados obtidos no exame de soroaglutinação para Erisipela suína com diferentes amostras de soros de suínos inoculados experimentalmente com amostra patogênica *Itabirito* por via oral, Minas Gerais, 1979.

COLHEITA	Nº de animais	DILUIÇÕES									
		1/1	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320		
1. Antes da inoculação	04	2	1	1	0	0	0	0	0	0	
2. 15 dias após a inoculação	04	2	1	1	0	0	0	0	0	0	
3. 30 dias após a inoculação	04	2	1	1	0	0	0	0	0	0	
4. 45 dias após a inoculação	04	2	1	1	0	0	0	0	0	0	
5. 60 dias após a inoculação	04	2	0	2	0	0	0	0	0	0	

TABELA VII - Resultados obtidos no teste de soroglutinação para Erisipela Suína na Região I, Minas Gerais, 1979.

MUNICÍPIOS	Nº DE SOROS EXAMINADOS	DILUIÇÕES						
		1/1	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
BARBACENA	04	1	1	2	0	0	0	0
CORDISBURGO	04	0	0	0	0	3	1	0
IBIRITE	13	0	1	4	1	3	4	0
ITAÚNA	08	1	0	5	1	1	0	0
LAGOA SANTA	04	1	1	1	1	0	0	0
MARIANA	04	1	1	2	0	0	0	0
OLIVEIRA	08*	0	1	2	2	2	0	0
OURO PRETO	04	1	0	1	0	2	0	0
PARÁ DE MINAS	08	0	2	2	1	1	2	0
PARAOPEBA	04	0	0	0	2	1	1	0
SETE LAGOAS	08	1	0	0	2	3	2	0
TIRADENTES	04*	2	0	1	0	0	0	0
T O T A L	73	8	7	20	10	16	10	0

* Um soro não reagente

TABELA VIII - Resultados obtidos no teste de soroaglutinação para Erisipela Suína, na Região II, Minas Gerais, 1979.

MUNICÍPIOS	Nº DE SOROS EXAMINADOS	DILUIÇÕES						
		1/1	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
MURIAÉ	12	1	2	4	3	1	1	0
EUGENÓPOLIS	04	0	2	2	0	0	0	0
CARANGOLA*	16	2	2	3	3	3	3	0
TOMBOS	16	0	0	0	4	9	3	0
LEOPOLDINA	16	0	3	4	5	2	2	0
PIRANHA	04	0	0	1	2	1	0	0
RIO POMBA	04	0	2	1	1	0	0	0
S.J. NEPONUCENO	08	0	2	2	4	0	0	0
PEQUERI	04	0	2	1	1	0	0	0
MARIPÁ DE MIN.	04	0	1	1	2	0	0	0
JUIZ DE FORA	08	0	3	3	1	1	0	0
RAUL SOARES	04	0	0	0	2	2	0	0
S. PEDROS DOS FERROS	04	0	0	1	1	2	0	0
PONTE NOVA	08	0	0	2	4	2	0	0
RIO CASCA	08	0	0	1	2	2	2	1
URUCÂNIA	08	0	0	2	5	1	0	0
TEIXEIRAS	12	0	0	5	3	4	0	0
DOM SILVÉRIO	04	0	3	1	0	0	0	0
ALVINÓPOLIS	04	0	4	0	0	0	0	0
VISCONDE DO RIO BRANCO	08	0	1	5	2	0	0	0
T O T A L	156	3	27	39	45	30	11	01

* Uma das amostras com material insuficiente para diluições maiores que 1:1

TABELA IX - Resultados obtidos no teste de soroaglutinação para Erisipela Suína na Região III, Minas Gerais, 1979.

MUNICÍPIOS	Nº DE SOROS EXAMINADOS	DILUIÇÕES						
		1/1	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
ALFENAS	07	1	1	2	2	1	0	0
ANDRADAS	08	2	2	1	2	1	0	0
BOTELHOS	04	0	0	1	2	1	0	0
CANDEIAS	05	1	3	0	1	0	0	0
LAVRAS	04	0	1	0	2	1	0	0
MACHADO	04	0	0	1	1	1	1	0
MONTE SANTO DE MINAS	04	0	1	1	0	2	0	0
NEPOMUCENO	04	0	2	0	0	1	1	0
PASSOS	08	0	1	0	1	1	4	1
POCINHOS DO RIO VERDE	04	0	4	0	0	0	0	0
POÇOS DE CALDA	08	2	1	1	1	1	2	0
SANTA RITA DE CALDAS	04	1	3	0	0	0	0	0
SANTA RITA DO SAPUCAÍ	08	2	2	1	2	1	0	0
SANTO ANTONIO DO AMPARO	04	1	2	1	0	0	0	0
SÃO SEBASTIÃO DO PARAÍSO	04	3	1	0	0	0	0	0
SERRANIA	01	0	0	1	0	0	0	0
T O T A L	81	13	24	10	14	11	08	01

TABELA X - Resultados obtidos no teste de soroaglutinação para Erisipela Suína na Região IV, Minas Gerais, 1979.

MUNICÍPIOS	Nº DE SOROS EXAMINADOS	DILUIÇÕES						
		1/1	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
MONTE ALEGRE DE MINAS	04	0	1	1	1	1	1	0
UBERLÂNDIA	16	0	1	1	1	8	5	0
TOTAL	20	0	2	2	2	9	5	0

TABELA XI - Resultados obtidos no teste de soroaglutinação para Erisipela Suína na Região V, Minas Gerais, 1979.

MUNICÍPIOS	Nº DE SOROS EXAMINADOS	DILUIÇÕES						
		1/1	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
GUIMARANIA	04	1	1	0	1	0	1	0
LAGOA FORMOSA	12*	2	2	2	3	2	0	0
PATOS DE MINAS	20	3	4	1	7	3	2	0
SERRA DO SALI TRE	04	1	1	1	0	0	0	1
TOTAL	40	07	08	04	11	05	03	01

* Um soro não reagente

TABELA XII - Resultados obtidos no teste de soroaglutinação para Erisipela Suína na Região VI, Minas Gerais, 1979.

MUNICÍPIOS	Nº DE SOROS EXAMINADOS	DILUIÇÕES						
		1/1	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
BOCAIÚVA	08	2	1	1	2	2	0	0
CORAÇÃO DE JESUS	08	3	3	0	1	1	0	0
FRANCISCO SÃ	14*	6	1	3	2	0	0	0
MIRABELA	04	0	0	1	1	2	0	0
MONTES CLAROS	20	5	4	0	6	2	2	1
UNAI	12	0	1	0	4	4	3	0
TOTAL	66	16	10	05	16	11	05	01

* Dois soros não reagentes

TABELA XIII - Resultados obtidos no teste de soroaglutinação para Erisipela Suína na Região VII, Minas Gerais, 1979.

MUNICÍPIOS	Nº DE SOROS EXAMINADOS	DILUIÇÕES					
		1/1	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80
ARAGUAÍ	09	2	0	0	1	3	3
PEDRA AZUL	05	0	1	0	3	1	0
T O T A L	14	02	01	0	04	04	03

TABELA XIV - Resultados obtidos no teste de soroaglutinação para Erisipela Suína, na Região VIII, Minas Gerais, 1979.

MUNICÍPIOS	Nº DE SOROS EXAMINADOS	DILUIÇÕES						
		1/1	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
AÇUCENA	05	0	0	1	0	0	2	2
AIMORÉS	12	1	4	1	3	1	2	0
BOM JESUS DO GALHO	04	1	2	1	0	0	0	0
CARATINGA	04	3	0	1	0	0	0	0
CORREGO NOVO	04	0	0	1	0	1	2	0
PESCADOR	10*	0	0	1	1	3	4	0
RESPLENDOR	05	2	1	0	1	1	0	0
T O T A L	44	7	7	6	5	6	10	02

* Um soro não reagente.

TABELA XV - Resultados obtidos no teste de soroaglutinação para Erisipela Suína, nas diferentes regiões do Estado de Minas Gerais, assistidas pela Emater, M.G. 1979.

REGIÕES	Nº DE SOROS EXAMINADOS	DILUIÇÕES						
		1/1	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
I	73**	08	07	20	10	16	10	0
II	156	03	27	40	45	30	10	01
III	81	13	24	10	14	11	08	01
IV	20	00	02	02	02	09	05	0
V	40*	07	08	04	11	05	03	01
VI	66**	16	10	05	16	11	05	01
VII	14	02	01	00	04	04	03	0
VIII	44*	07	07	06	05	06	10	02
TOTAL	494	56	86	87	107	92	54	06
Percentagem (%)		11,34	17,40	17,61	21,65	18,62	11,0	1,21

* Um soro não reagente.

** Dois soros não reagentes.

Percentagem (%) de não reagentes - 1,21%.

5. DISCUSSÃO

Um dos pontos da mais alta importância no preparo do antígeno para o teste de soroaglutinação para erisipela suína, revelado pela literatura, seria o uso de colônias lisas do *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Assim como SCHOENING et alii (1932), precursores do emprego da soroaglutinação em erisipela suína e de acordo ainda com os trabalhos de DEEM (1936); KARLSON & MCNUTT (1939); SIKES (1965) e SCHAAF & KRAMER (1968), foi observado no presente trabalho que colônias lisas do microrganismo causador da erisipela suína apresentando-se à coloração de Gram isolados ou em curtas cadeias, produziam antígeno sem floculação espontânea e estabilidade desejada.

O meio de cultura base para cultivo foi o caldo de carne, acrescido de 2% de peptona, variando apenas nas quantidades usadas por KARLSON & MCNUTT (1939) (1%); SCHAAF & KRAMER (1968) (1%); NIELSEN (1969) (1%) e BÖHM (1974 b) (3%).

Ao contrário de DEEM (1936), não se obteve bons resultados com a adição de triptofano e levedura ao meio de cultura, que realmente aumentou o crescimento bacteriano, mas que talvez tenha sido causa de posterior floculação espontânea do antígeno.

À semelhança dos trabalhos de RICE et alii (1952a); FREEMAN et alii (1964); SIKES (1965) e BOHM (1974b), foi obtido excelentes resultados para crescimento bacteriano após a adição de soro equino ao meio de cultura. Tal crescimento no número de bactérias parece não ter interferido em possíveis tendências e formas agregadas do *E. rhusiopathiae*, como descrito por SCHAAF & KRAMER (1968).

Como BOHM (1974b), foi usada a formalina a 0,3% agindo por 24 horas a 37°C, que resultou em morte das bactérias como resultado desejado.

A técnica de conservação do antígeno concorda em certos itens com BOHM (1974b), principalmente quanto à conservação do antígeno em geladeira 14 dias antes do uso. Entretanto, não foi conseguido bons resultados em relação ao congelamento do antígeno pronto para uso, devido à formação de grumos durante as provas posteriores. A opção foi feita em relação à refrigeração (4°C) quando o antígeno manteve-se inalterável durante pelo menos 6 meses, à semelhança do trabalho de SCHAAF & KRAMER (1968).

Na primeira fase do experimento, quando foram testados soros provenientes de animais vacinados, foi observado que títulos por vacinas não atingiam níveis altos, o que concorda com trabalhos de BOHM (1974a), quanto à não interferência em níveis de títulos específicos (determinado como sendo acima de

1:80). Na mesma fase, quando analisados soros provenientes de suínos inoculados experimentalmente quer por via intradérmica quer por via oral, não foram obtidos títulos elevados na prova, o que parece ser explicável, pois os animais, 24 horas após a inoculação, desenvolveram pico febril extremamente elevado (em torno de 42°C) quando se administrou o antibiótico penicilina na dose de 1.200.000 UI mascarando assim a resposta imunológica.

Deve-se observar que os animais escolhidos para esta fase do experimento foram animais jovens provenientes de criação controlada com uma parte do rebanho vacinado contra erisipela e com condições higiênico-sanitárias satisfatórias. Os títulos destes animais antes do início do experimento variaram de 1:1 a 1:10, títulos estes que podem ser considerados baixos em relação aos títulos encontrados nas análises dos 494 soros provenientes das várias regiões do Estado de Minas Gerais, cuja maioria (51,21%) apresentou títulos entre 1:20 a 1:40. Em vista disso, os animais da primeira fase do experimento (a serem vacinados e inoculados), poderiam ser considerados bastante susceptíveis à enfermidade, o que os fez manifestar frente à inoculação experimental, um caráter extremamente agudo da doença levando-nos a praticar medicação imediata no sentido de evitar a perda do animal.

Poder-se-ia considerar também a quantidade do inóculo, que para animais nestas condições talvez tenha sido demasiado.

Assim como RICE et alii (1952d) e BÖHM (1974a), foi encontrado nos exames de soros provenientes de suínos aparentemente normais, considerável proporção de títulos situados en

tre os limites 1:20 a 1:80. Esse fato é explicado pelos mesmos autores como aglutinação não específica em baixas diluições ou colheita de amostras no primeiro estágio da infecção.

Nesta fase do experimento, quando foram analisadas 494 amostras de soros, a porcentagem de títulos maiores que 1:80 foi acima do erro estabelecido por BÖHM (1974a), quando se examina grande número de soros, o que poderia deixar representar a frequência de títulos específicos, entretanto existem algumas diferenças quanto à técnica da prova, uma vez que esta foi adaptada às nossas condições.

6. CONCLUSÕES

1 - Um antígeno para teste de soroaglutinação em placa, preparado a partir de uma amostra de *Erysipelothrix rhusiopathiae* segundo as condições preconizadas neste trabalho, mostrou:

- não ser auto-aglutinante;
- ser confiável frente a soros positivos e negativos;
- ser estável a uma temperatura de 4°C por um período de pelo menos 6 meses.

2 - A distribuição de títulos para erisipela suína em Minas Gerais na amostra analisada frente ao antígeno preparado mostrou:

- que a maioria dos animais (98,8%) apresentou títulos aglutinantes, nas diferentes diluições;
- os títulos mais frequentes situam-se entre os limites 1:20 a 1:40;

- títulos determinados por vacinação não ultrapassaram o limite de 1:80;
- títulos maiores que 1:80 foram encontrados em 1,2% dos animais.

3 - Outros trabalhos deverão ser realizados especialmente quanto a associação da sorologia a achados sorológicos o que estabeleceria definitivamente o emprego amplo do teste de soroaglutinação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BÖHM, K.H. Diagnostic evaluation of serologically demonstrable antibodies in chronic erysipelas of pigs. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., Hanover 81(5): 104-108, 1974a.
2. BÖHM, K.H. Serological methods in erysipelas and reproducibility of serological results. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., Hanover, 81(6): 138-141, 1974b.
3. DEEM, A.W. Notes on the preparation and use of an antigen for the agglutination test in swine erysipelas. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 89: 197-198, 1936.
4. FREEMAN, M.J.; SEGRE, D.; BERMAN, D.T. Hipersensitivity in Erysipelas arthritis of swine. I. Hipersensitization of swine with viable and nonviable *Erysipelothrix*. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 25(1):135-144, 1964.

5. KARLSON, A.G. & MCNUTT, S.H. A microscopic agglutination test for the diagnoses of swine erysipelas. J. Infect. Dis., Chicago, 64: 49-51, 1939.
6. KARLSON, A.G. Gênero *Erysipelothrix*. In: MERCHANT, I.A. & PACKER, R.A. Bacteriologia e Virologia Veterinárias. Zaragoza, ACRIBIA, 1970. p. 478-486.
7. NIELSEN, N.C. The use of a seletive medium in the growter-agglutination test for chronic *Erysipelothrix insidiosa* infection in swine. Acta Vet. Scand., Copenhagen, 10: 127-136, 1969.
8. REIS, R.; RESENDE, M.; NASCIMENTO, E.F. Diseases of swine in Minas Gerais State: III. Occurence and control of the Erysipelas. Arq. Esc. Vet. U.F.M.G., Belo Horizonte, 29 (2): 203-210, 1977.
9. RICE, C.E.; CONNELL, R.; BYRNE, J.L.; MOYNIHAN, I.W. & FRANK, J.F. Studies of swine erysipelas. III. Antigenic characteristics of strains of *E. rhusiopathiae* isolated in different areas in Canada. Can. J. Comp. Med. & Vet. Sci., Gardenvale, 16: 195-204, 1952a.
10. RICE, C.E.; CONNELL, R.; BYRNE, J.L. & BOULANGER, P. Studies of swine erysipelas. IV. Serological diagnostics in swine. Can. J. Comp. Med. & Vet. Sci., Gardenvale, 16: 209-215, 1952b.
11. SCHAAF, A. VANDER & KRAMER-ZEEVW, A. A stable antigen for the tube agglutination test in chronic swine erysipelas. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 29: 205-207, 1968.

12. SCHOENING, H.W.; CREECH, G.T.; GREY, C.G. A laboratory tube test and a whole blood rapid agglutination test for the diagnosis of swine erysipelas. No. Amer. Vet., 13 (12): 19- 25, 1932 apud SCHOENING, H.W. & CREECH, G. T. Swine Erysipelas - with particular reference to serological diagnosis. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 88: 310-316, 1935.
13. SCHOENING, H.W. & CREECH, G.T. An agglutination test for swine erysipelas. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 82: 503-508, 1933.
14. SHUMAN, R.D. Erisipela porcina. In: DUNNE, H.W. Enfermedades del cerdo. México, UTHEA, 1965. p. 441-488.
15. SIKES, D. Some biochemic properties of a smooth colony of *E. insidiosa* used for antigen production in the tube test. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 26: 636-640, 1965.
16. SIKES, D. & TUNLIN, T.J. Further studies on the *Erysipelothrix insidiosa* tube agglutination test. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 28: 1177-1181, 1967.