

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

AVALIAÇÃO DE UMA VACINA EXPERIMENTAL BIVALENTE VIVA CONTRA
PESTE SUÍNA CLÁSSICA E ERISPELA SUÍNA

Israel José da Silva

Belo Horizonte
Minas Gerais
1980

Israel José da Silva

AVALIAÇÃO DE UMA VACINA EXPERIMENTAL BIVALENTE VIVA CONTRA
PESTE SUÍNA CLÁSSICA E ERISÍPELA SUÍNA

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Belo Horizonte
Minas Gerais
1980

FICHA CATALOGRÁFICA

S586a Silva, Israel José da, 1951-
Avaliação de uma vacina experimental bivalente viva, contra peste suína clássica e erisipela suína. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1980.
viii +56 p. ilust.

Bibliografia

Tese, Mestre em Medicina Veterinária

1. Vacina - Suínos. 2. Peste Suína. 3. Erisipela. I. Título.

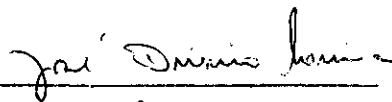
CDD - 636 408 944 7

Tese aprovada em: 04/07/1980

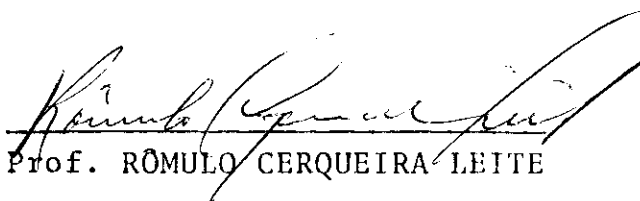


Prof. RONALDO REIS

- Orientador -



Prof. JOSÉ DIVINO LIMA



Prof. RÔMULO CERQUEIRA LEITE

Aos meus pais,
pelo exemplo e estímulo;
à minha esposa,
pelo apoio e compreensão.

Este trabalho foi realizado em Belo Horizonte-MG, com o suporte financeiro e material das seguintes Instituições:

- Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG);
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA);
- Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária Preventiva (FEP-MVP);
- Laboratório Hertape S.A. - Belo Horizonte;
- Associação Mineira de Criadores de Coelhos (AMICCO);
- Ministério da Agricultura (M.A.).

AGRADECIMENTOS

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, pela oportunidade concedida.

Ao Prof. Ronaldo Reis, da Escola de Veterinária da UFMG, pelo apoio e orientação.

Ao Dr. Alberto Marcatti Neto e ao Técnico Agrícola Pedro Patrício de Resende, pela colaboração em montagem do experimento, na Fazenda Experimental da EPAMIG - Felixlândia-MG.

Ao Dr. Vicente de Paula Macedo Gontijo, da EPAMIG, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

Ao Ministério da Agricultura, nas pessoas dos Drs. José Xavier Monteiro e Gil Naves Guimarães, pela cessão das instalações para o desafio dos animais.

Às Dras. Maria Augusta Macário Rocha e Mauri Lúcia Rocha Araújo, do Ministério da Agricultura, pelas sugestões na elaboração deste trabalho.

Aos Professores, colegas do curso de pós-graduação e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pelo convívio agradável.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, pela bolsa de estudos fornecida.

À bibliotecária Eunice de Faria Lopes, pela re-

visão bibliográfica.

À Marlene Antonieta Ribeiro Gomide e Geraldo Magela Carozzi de Miranda, da EPAMIG, pela revisão linguística.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Uma vacina bivalente viva contra peste suína clássica (vírus amostra chinesa) e erisipela suína (amostra avirulenta) foi testada na forma experimental em 30 leitões de 71 a 95 dias de idade e em 11 matrizes de 28 a 57 dias de gestação (cinco no terço inicial e seis no terço médio). Não houve registro de efeitos colaterais que pudessem ter sido causados pela vacina.

A imunidade contra peste suína nos desafios aos 28, 66 e 96 dias após a vacinação foi de 100%, enquanto que contra erisipela, a imunidade aos 21, 56 e 89 dias após a vacinação foi de 80%, 50% e 50%, respectivamente. Usou-se dois animais controles para cada época de desafios, em ambas as doenças, e todos eles foram susceptíveis.

Doses de cem a mil vezes menores, que a dose usada nos desafios para erisipela, foram suficientes para produzir doença em animais não vacinados.

Nas gestantes não houve diferenças quanto ao número de leitões natimortos, fetos mumificados e período médio de gestação, quando comparadas as 11 fêmeas gestantes-controles. Não houve também diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos, em relação ao tamanho e peso da leitegada ao nascimento.

SUMÁRIO

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

Na exploração da suinocultura, as medidas profiláticas constituem, às vezes, ponto de estrangulamento ou limitações no custo de produção. Por outro lado, a exploração em confinamento facilita a disseminação de doenças.

Sob o aspecto sanitário devemos destacar aquelas medidas profiláticas baseadas nas vacinações contra doenças transmissíveis, que frequentemente ocorrem endêmica ou epidemicamente. As vacinações maciças e regulares, além de eficientes e práticas, são as medidas econômicas mais recomendáveis na prevenção das doenças transmissíveis dos suínos. Dentre estas destacamos a erisipela suína (E.S.) e a peste suína clássica (P.S.C.), doenças da maior importância em patologia suína, tanto no Brasil como na maioria dos países que se dedicam à suinocultura.

A P.S.C. está disseminada em todo o mundo, embora as perdas causadas por ela sejam maiores nas áreas com alta concentração de suínos. A incidência da infecção tem sido também alta nas Américas Central e do Sul, Europa, China, Japão, África e Austrália. O vírus da P.S.C. causa ainda mais mortes em suínos, do que qualquer outro organismo infeccioso (DUNNE, 1975).

A E.S. é também de distribuição mundial e sérias

perdas econômicas são registradas na Europa, Ásia e Américas (WOOD & SHUMAN, 1975). Normalmente, as perdas causadas por erisipela são devidas a artrites, abortos e mortes. É alta a taxa de *Erisipelothrix rhusiopathiae* nos suínos condenados por artrites (ROUSELL, 1958; GRABELL et alii, 1962).

O aborto pode ocorrer, quando a forma aguda da doença acomete porcas gestantes (AAMDAL, 1970; KIMENIS & SZÉKI, 1971; SAUNDERS, 1967).

No Brasil não existem dados estatísticos levantados que possam demonstrar a importância nacional destas duas doenças. Sabe-se, por exemplo, através de pesquisas regionais, da importância da *E. rhusiopathiae* como causa de morbidade e/ou mortalidade em suínos (MELO & SOUZA, 1931; CARVALHO et alii, 1976; FREITAS et alii, 1976; REIS et alii, 1976; REIS et alii, 1977).

A profilaxia destas duas doenças, através de vacinas, tem sido mundialmente adotada como rotina. Vacinas polivalentes mostram ser viáveis em vários países, no combate a diversas doenças como a peste suína, erisipela e doença de Aujeszky (SIMEONOV et alii, 1974; NEDELICIV et alii, 1977), ou contra peste suína, erisipela e colibacterioses (TERESZCZUK et alii, 1975). Sendo possíveis associações até de quatro vacinas (PETROV & BUT'YANOV, 1974).

A vacina bivalente viva contra erisipela e peste suína, já foi testada (FENG et alii, 1963 e ISOPESCU et alii, 1966) com bons resultados.

O objetivo deste trabalho é a avaliação da eficiência e inocuidade, em leitões e porcas gestantes, de uma vacina viva bivalente contra E.S. e P.S.C., que poderá ser muito útil na prevenção destas duas doenças, pelas seguintes razões:

- a) redução do stress dos animais;
- b) simplificação do manejo;
- c) possibilidade de redução dos custos;
- d) aplicação em campanhas de controle da E.S. e P.S.C.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Vacina avirulenta para erisipela

A imunização contra erisipela nos suínos é um fato que remonta de quase um século. Parece que a primeira vacina foi preparada por PASTEUR (1883) com uma cultura viva atenuada, por passagens seriadas em coelhos. A vacina era dada em duas doses, sendo a segunda menos atenuada que a primeira.

O emprego de uma vacina viva avirulenta para erisipela em animais de laboratório e em suínos, mostrou ser esta viável em suínos de todas as idades (STAUB, 1940).

FORTNER & DINTER (1944) mostraram que a imunidade contra erisipela suína pode ser testada pelo método percutâneo. Ele consiste em aplicar 0,5 ml de cultura de amostra patogênica em cada escarificação. São inoculadas três amostras diferentes, incubadas por 18 horas em caldo soro, e uma quarta escarificação é usada como controle. As lesões de pele e reações gerais são registradas e as temperaturas tomadas diariamente, por três dias após a infecção.

JIRINA (1946) concluiu que a erisipela suína não é rara em leitões. Em 1945, 52 casos foram identificados em leitões de duas a 12 semanas pelo autor. Foi notado também que matrizes vacinadas contra a doença em todos os es-

tágios da gestação, mesmo a poucas horas do parto, não tinham o potencial reprodutivo prejudicado.

POKORNÝ (1946) demonstrou que a vacinação de suínos com cultura viva de *E. rhusiopathiae* proporcionou imunidade num período de oito meses, em suínos de seis a 12 semanas, pesando de 12 a 30 kg. A dose utilizada foi de 0,5 ml de cultura seguida por 1 ml, duas semanas mais tarde. Não houve reações locais ou gerais. O autor sugere que tal vacinação em leitões é segura e pode ser usada amplamente. Também confirma a observação, de outros autores, que suínos menores do que três meses são difíceis de se infectarem com erisipelas.

VALÉE (1946) utilizou quatro lotes, de três suínos cada, vacinados com 1, 2, 3 e 5 ml de vacina viva atenuada em triplaflavina e cloridrato de 3,6 - diaminocridina. Os animais resistiram a um desafio de 5 ml de cultura virulenta viva subcutânea, sendo que os controles manifestaram quadro clínico da doença com hipertermia. A vacina deu boa imunidade, inclusive com a dose de 1 ml. O autor sugere que a vacinação, em dose única, deve ser usada onde a vida econômica do animal é curta.

SANDSTEDT & SWAHN (1947) observaram que desde a introdução na Suécia, em 1943, do uso da vacina avirulenta contra erisipela suína, 200.000 suínos foram vacinados até 1947, com bons resultados. Num trabalho com 25.000 leitões, de mesma idade e vacinados com uma única dose, foram observadas 35 mortes. Os autores concluem que, mesmo se estas mortes fossem atribuídas à erisipela suína, os resultados foram satisfatórios, pois a maioria dos casos ocorreu somente após quatro a cinco meses da vacinação.

GOCHENOUR & YOTTER (1952) observaram que culturas de *E. rhusiopathiae*, para vacina na forma líquida, são relativamente instáveis como produtos biológicos, perdendo a viabilidade de potência num curto período de tempo após a produção. Em estudos onde vacinas preparadas foram desseca-

das após congelação, notou-se que neste estado elas conservavam sua viabilidade original e virulência por um mínimo de dois anos e, posteriormente, permaneciam estáveis em sua forma reconstituída, pelo menos sete dias, quando mantidas a 4,4°C.

KOBUSIEWICZ (1952), usando vacina viva avirulenta cultivada em caldo de carne de cavalo, com 1% de soro ou glicose e pH = 7,6, obteve uma proteção de três meses em suínos vacinados com 2 ml de cultura, contendo 4×10^8 bactérias. Quando estocada em refrigeração, a cultura perdeu 50% das bactérias viáveis em 15 dias. Entretanto, o uso desta vacina foi feito na Polônia de 1948 a 1951, em 5,8 milhões de suínos, obtendo-se bons resultados.

ANDO & NAKAMURA (1958) observaram que a taxa de sobrevivência de *E. rhusiopathiae*, estocada em refrigerador por seis meses, é de pelo menos 50% após ter sido liofilizada. Frascos com 1 ml de cultura da amostra Koganei, adaptada em acriflavina após liofilização, continham de 2×10^9 a 5×10^9 bactérias. O período de incubação utilizado foi de 20 horas em meio contendo 3% de peptona, 0,1% de tween 80, 5% de leite em pó e 10% de extrato de levedura.

KURAMASU et alii (1959), estudando a liofilização de uma cultura de erisipela atenuada em acriflavina, mantida no processo durante 18 horas e, tendo como estabilizador 50% de leite desnatado, observaram que a cultura manteve sua qualidade efetiva durante 12 meses, quando estocada em refrigeração e, por dois meses, quando mantida à temperatura de 22 a 25°C. A segurança da vacina liofilizada em suínos foi testada em campo com 511 animais, dos quais apenas 13 (2,5%) apresentaram transitória redução de apetite e excreção de fezes moles.

ZUFFA et alii (1960) compararam as propriedades imunizantes das amostras Eva, AV/R9 e WR2 de *E. rhusiopathiae* em camundongos e suínos. Todas elas produziram imunidade satisfatória em camundongos, mas a WR2 matou entre 10 e 20 %

destes animais. Os suínos foram imunizados por doses subcutâneas de 2, de 3 ou de 5 ml ou por aplicação de 0,2 ml de cultura incubada por 18 horas, em áreas escarificadas da pele. A amostra WR2 foi única em produzir uma reação local média, em pequena proporção de animais escarificados. Mas seu poder protetor foi superior ao das outras amostras, sendo sua proteção comparada à das vacinas comerciais formolizadas.

ROSSI (1961), testando 55 suínos vacinados com 3 ml de cultura avirulenta (amostra Eva) de *E. rhusiopathiae* por via subcutânea, observou que apenas 24 (43,8%) deles foram resistentes aos desafios de 18, 24 ou 53 dias mais tarde.

EWALD (1962) demonstrou, em camundongos, que as formas dissociadas da *E. rhusiopathiae* são avirulentas e não imunogênicas. E que sua presença na imunogenicidade de vacinas avirulentas é discutida.

NOVÁK et alii (1963) descreveram que 42 suínos desmamados, selecionados ao acaso de 180 vacinados com dose única da amostra WR2 de erisipela, foram imunes em grandes proporções para um desafio sete meses e meio mais tarde. A vacina em geral foi bem tolerada.

OSE et alii (1963), testando uma vacina oral avirulenta contra erisipela, utilizaram dois procedimentos nos desafios, o percutâneo e o intramuscular. No percutâneo usaram cinco amostras de culturas liofilizadas em escarificações no costado do animal. No desafio intramuscular foi usado 1 ml de cultura com 24 horas de incubação. O título da cultura variava entre 1×10^9 e 3×10^9 células por ml. A temperatura de cada porco foi registrada diariamente, um a dois dias antes e durante seis dias após o inóculo, acrescentada das observações de lesões e peles. Foram considerados susceptíveis suínos que, pelo método percutâneo, tiveram temperatura acima de $40,55^\circ\text{C}$ por um ou mais dias e lesões de pele localizadas. No caso do desafio intramuscular (I.M.), a temperatura corporal maior que $41,1^\circ\text{C}$ e lesões generalizadas, ou morte, indicavam susceptibilidade.

LAWSON et alii (1966), num trabalho de vacinação

contra erisipela, através da via oral, procederam da seguinte forma nos desafios: na fase preliminar usou-se uma amostra de erisipela por via I.M. e a nível de campo usou-se o desafio intradérmico (I.D.). O desafio via I.M. consistiu de uma injeção de 1 ml de cultura reconstituída contendo aproximadamente 1,1 bilhão de organismos. Animais susceptíveis mostraram temperaturas muito altas e presença de lesões em forma de losangos no corpo, sendo ou não fatais. O desafio I.D. consistiu da inoculação de cinco amostras de *E. insidiosa*, via I.D., no costado do animal. O lado do animal era depilado e dividido em cinco áreas de igual tamanho e, em cada área era injetado 0,1 ml de cada cultura, contendo aproximadamente 100 doses de teste de pele. A dose de teste de pele é considerada a menor quantidade de *E. insidiosa* que causa típica reação no local da injeção. Este método tenta mostrar os diversos graus de imunidade, assim interpretados:

- a) lesões típicas no local da injeção, seguidas por generalização ou doença - animal susceptível;
- b) lesões no local da injeção apenas - animal parcialmente imune;
- c) ausência de sintomas, ou lesões locais - animal completamente imune.

Os animais tidos como imunes ou parcialmente imunes são registrados como imunes.

BODEN (1967) mostrou que a reconstituição de vacinas vivas com água destilada ou salina comum são frequentemente inadequadas. Estudando o efeito de diluentes para *E. rhusiopathiae* e *Brucella abortus* B 19, observou que o diluente é de importância fundamental para que a vacina reconstituída permaneça viável um mínimo de 8 horas em condições de campo. Com isto, para *E. rhusiopathiae* o caldo simples parece preencher os requisitos, pois preserva o estado osmótico destes organismos. É importante também uma estabilização destes microorganismos antes da liofilização.

SAUNDERS (1967) notou que não parece ter a *E.*

rhusiopathiae afinidades para o feto ou placenta como ocorre na *B. abortus*, sendo que o aborto, causado pela primeira, parece ser devido ao efeito sistêmico da bactéria sobre a matriz gestante.

KEMENES & SZÉKI (1971) observaram que em nove abortos ocorridos num rebanho de suínos, no prazo de duas semanas, as evidências sorológicas mostravam serem estes relacionados à infecção com *E. rhusiopathiae*. No entanto, *E. rhusiopathiae* não foram demonstráveis nos fetos abortados, após um período temporário da doença. Mas quatro fetos abortados, por uma porca aparentemente sadia no 98º dia de gestação, continham grande quantidade de *E. rhusiopathiae* em seus rins.

EUA (1975) mostra que o desafio para erisipela suína deve causar bacteremia, hipertermia e sintomas da doença, incluindo mas não limitando apenas a sintomas da doença na forma aguda, com hiperemia de abdômen, orelhas e morte súbita; anorexia e coma com ou sem lesões de pele; apatia e/ou lesões articulares; e qualquer combinação destes sintomas e lesões durante sete dias. E que, no mínimo, 75% dos controles deverão apresentar temperaturas \geq a 40,9°C por 48 horas ou \geq a 41,7°C por 16 horas no mínimo, sendo que serão também susceptíveis os animais sacrificados, dos quais se isolem a *E. insidiosa* no sangue, baço ou outros órgãos. Para a demonstração da imunidade após o desafio (feito aos 14 ou 21 dias da vacinação), os suínos vacinados deverão permanecer livres de lesões ou sintomas da erisipela por sete dias e a temperatura corporal não deverá exceder a 40,3°C, por um período superior a 24 horas.

2.2. Vacina viva modificada (lapinizada) para peste suína clássica

YORK (1961) considera os seguintes fatores para uma vacina ideal:

- a) a vacina deve produzir resposta imune em 90% ou mais dos suínos vacinados;
- b) a imunidade tem que exceder a 12 meses após a vacinação e o período negativo para produção de imunidade deve ser de quatro a sete dias e, não deve ocorrer nem mesmo infecção de baixo grau nos suínos quando desafiados.

Quanto à segurança, a vacina deverá ser inócua sem uso de soro-imune, não desenvolver a condição de portadores sãos, não transmitir doença a animais susceptíveis e não mostrar evidência de doença após 12 passagens em suínos sem uso de soro-imune.

Num ensaio com 1097 porcos, utilizando vacina com vírus amostra chinesa, sem adição simultânea de soro imune, BOGNÁR & MESZÁROS (1962) revelaram que de 31 suínos mantidos juntos por 12 a 34 dias com outros vacinados com amostra chinesa, 30 não resistiram ao desafio com vírus, concluindo que a excreção do vírus da amostra chinesa é baixa. E os mesmos autores, em 1963, revelaram também que o uso de 10 de 20 e 30 ml de soro hiperimune, usado simultaneamente com a vacina, não interferiu com a presença de imunidade por 31 a 158 dias.

COGGINS (1964) mostrou que leitões de porcas vacinadas contra peste suína clássica com vírus lapinizado (produzidos em cultura de tecidos), após mamarem o colostro tinham o título de anticorpos igual ao da mãe. E estes, quando satisfatórios, persistiam por 12 a 14 semanas nos leitões.

BRAN et alii (1966) afirmaram que o vírus da amostra chinesa, apesar de presente na urina de animais imunizados, não induziu imunidade a animais em contato com os vacinados. Durante 12 passagens em suínos, o vírus reteve sua capacidade de multiplicação sem retornar à virulência e diminuir sua capacidade protetora. Os vírus presentes na urina de suínos, após 12 passagens, só eram recuperados quando passados em coelhos, nos quais demonstravam alto grau de adaptabilidade.

PASSOS et alii (1968), usando a amostra chinesa no Brasil, demonstraram que seu alto poder antigênico protegeu de 95 a 100% dos animais vacinados, desafiados 15 dias após. A vacina foi usada em todas as idades, inclusive em matrizes no terço inicial da gestação, mostrando-se completamente inócua.

BEKAERT & LEUNEN (1969) observaram que a vacina viva modificada, amostra chinesa, não teve efeito nocivo em gestantes e reprodutores. E as leitegadas foram normais, independentemente do estágio em que a matriz foi vacinada.

FLORENT et alii (1969), usando a imunodepressão para comprovar a virulência residual de amostras lapinizadas, observaram que apenas a amostra chinesa foi inteiramente incapaz de causar mortes ou quadros patológicos de peste suína nos leitões imunodeprimidos.

MIHAITA et alii (1969) observaram que após a viremia, a recuperação do vírus lapinizado, amostra chinesa, não é possível por passagens diretas entre suínos, mas somente em coelhos. E após 120 dias da vacinação, o vírus lapinizado ainda é isolado dos suínos.

AYNAUD et alii (1973) mostraram que a imunidade passiva colostrar pode neutralizar parcial ou totalmente o vírus da vacina. Portanto, leitões filhos de porcas vacinadas não devem ser imunizados antes dos dois meses de idade.

JAEGER & BARTH (1973) mostraram que o teste de hipertermia em coelhos, para vacina lapinizada amostra chinesa, é digno de confiança e pode ser comparado com o teste de eficiência da vacina em suínos. Normalmente, os coelhos tornam-se hipertérmicos com uma injeção endovenosa de 1/10 da dose usada em suínos. Uma boa vacina deve produzir um aumento de pelo menos 1,5°C. As vantagens deste teste consistem no seu baixo custo e na rapidez dos resultados.

A vacina contra peste suína clássica, amostra chinesa, é uma vacina de vírus vivo modificado, com boa capacidade imunogênica e absolutamente inócua. Trata-se de um

vírus vivo lapinizado, que teve um alto número de passagens em coelhos (480 a 490), de procedência ignorada, sabendo-se apenas que foi uma amostra enviada a pesquisadores da Europa Oriental por cientistas da República Popular da China (LÓPEZ, 1973).

BARTH & JAEGER (1974), em um ensaio com o vírus amostra chinesa, observaram que coelhos na fase de hipertermia contêm os mais altos títulos do vírus nos linfonodos intestinais, seguidos pelo baço, eritrócitos e plasma, sendo que no fígado contêm um título muito baixo.

DINGELDEIN et alii (1974), usando uma vacina, amostra chinesa "Suiferin C" num rebanho de reprodução, observaram que quadros patológicos que poderiam ser vestígios da vacinação, foram ausentes. O exame para antígenos de peste suína nos órgãos de leitões natimortos ou lactentes que morriam pela técnica do anticorpo fluorescente e teste de Ouchterlony, foram negativos em 54 animais. E que material de 28 leitões no teste de hipertermia em coelhos também foram negativos. Abortos não apareceram. Apenas um argumento é válido contra a vacinação: é que os animais se tornam sorologicamente positivos.

PRECAUSTA et alii (1974) testaram a vacina amostra chinesa CL*, sem soro imune, em porcas gestantes e em leitões de sete e 60 dias. A vacina não causou problemas na gestação nem nos leitões. Entretanto, leitões, filhos de porcas vacinadas com amostra chinesa CL, só eliminam anticorpos maternos após 60 dias. Logo, a vacinação de leitões nestes casos só deverá se efetuar aos 90 dias e nos leitões de porcas não vacinadas no sétimo dia após o nascimento.

LÝRA (1979), comparando as vacinas contra peste suína clássica, dos tipos cristal violeta (inativada) e a-

* Chinoise Lyon

mostra chinesa (viva), observou que na gestação a vacina amostra chinesa mostrou evidentes vantagens quanto à presença de fetos mumificados, apatogenicidade mediante imunodepressão e duração da imunidade passiva colostrar nos leitões, quando comparada com a vacina cristal violeta.

BRASIL (1979) publica normas para controle e emprego da vacina contra peste suína clássica, podendo ser usadas vacinas inativadas tipo cristal violeta e vacina modificada (lapinizada), amostra chinesa, previamente testadas, partida por partida. A prova de esterilidade é realizada em ágar simples, caldo simples e Tarozzi; a prova de inocuidade é feita em cobaias e a de eficiência em suínos. O desafio dos suínos é realizado entre 21 a 28 dias após a vacinação com 2 ml de vírus da peste suína clássica de capacidade infecciosa comprovada. Quanto à vacina lapinizada, deve ser titulada por hipertermia em coelho, sendo a DI 50% calculada pelo método de REED MUENCH ou SPERMANN KARBER, aceitando-se o título mínimo de $10^{2,5}$ por dose vacinal de 2 ml.

2.3. Associação de vacinas

O uso de uma amostra de vírus de peste suína lapinizado e uma amostra de *E. insidiosa* atenuada, em estabilizador constituído por solução de leite em pó com 1% de sucrose, após liofilização e diluição com 1,2% de hidróxido de alumínio $Al(OH)_3$ em gel, proporcionou uma imunidade de 100% para ambas as doenças, ao fim de sete meses. A potência da vacina foi mantida por seis meses à temperatura de 8 a 35°C (FENG et alii, 1963).

ISOPESCU et alii (1966), usando a amostra chinesa como vacina viva contra peste suína clássica e a amostra WR₂ como vacina viva contra erisipela suína, inoculada simultaneamente em 163 suínos de dois a seis meses, teve como resultado que todos os suínos foram satisfatoriamente protegidos contra o desafio de peste suína clássica, enquanto apenas

77,4% foram totalmente protegidos contra erisipela até aos 90 dias da vacinação. Os 22,6% restantes tiveram ligeiras reações de pele no local do desafio. Os controles foram 100% susceptíveis para ambas as infecções.

BUT'YANOV (1967), inoculando uma amostra de erisipela de baixa virulência via I.M., simultaneamente com uma amostra lapinizada de peste suína clássica em suínos de 2,5 a quatro meses, observou que foi necessário repetir a dose para erisipela via subcutânea 20 a 21 dias após, para que se estabelecesse uma imunidade adequada para erisipela. A proteção para ambas as doenças persistiram por seis meses.

KONOPATKIN (1969), trabalhando com suínos de três a quatro meses, vacinados por via subcutânea com vacina contra peste suína (amostra chinesa), vacina contra erisipela (amostra WR₂) e com a mistura das duas, observou que suínos vacinados com a vacina dupla retinham o título de aglutinação contra erisipela por um período maior do que os vacinados com a vacina simples. A vacina contra erisipela induziu leucocitose e leucopenia em animais imunizados. Enquanto que contra a peste suína, nenhum efeito foi observado nos animais. Os suínos vacinados com a vacina dupla foram imunes por seis meses para infecção experimental dos agentes, juntos ou separados. A potencialização das vacinas foi confirmada, em 170.000 animais no campo.

MACIAK (1969), fazendo uso de uma vacina viva (vírus lapinizado) de peste suína clássica, associada à vacina ou infecção por erisipela, em suínos e coelhos, observou que o vírus não tem qualquer efeito na infecção por erisipela em ambos os animais, à exceção da sua longa permanência na corrente sanguínea do coelho. Portanto, os resultados favorecem o uso de inoculações combinadas de erisipela e vírus de peste suína clássica.

PETROV & BUT'YANOV (1974), através de uma série de experimentos, confirmaram que é viável imunizar suínos com combinações de duas, três ou quatro vacinas contra peste suí-

na, pasteurelose, doença de Aujeszky, leptospirose, carbúnculo hemático e erisipela suína.

TERESZCZUC et alii (1975), utilizando três grupos de animais vacinados contra peste suína clássica, erisipela e o terceiro contra peste suína clássica, erisipela e colibacilose, observaram que o estado imunitário dos animais, medido através de sorologia ou desafios, demonstrou ser a vacinação simultânea contra as três doenças, pelo menos, de mesmo padrão de proteção ao das vacinas monovalentes usadas,

KOVALENKO et alii (1976), usando uma vacina bivalente contra erisipela e peste suína clássica (vírus lapinizado) em um grupo de suínos mantidos por 10 dias sucessivos à temperaturas de 30 a 32°C, durante oito horas por dia, e num grupo da mesma faixa etária, mantidos à temperaturas de 14 a 18°C, observaram que:

- a) sintomas de erisipela foram presentes em quatro de cada cinco suínos expostos à temperaturas de 30 a 32°C, quando desafiados a três e 18 semanas após a vacinação;
- b) suínos mantidos à temperaturas de 14 a 18°C resistiram aos desafios de erisipela de três e 18 semanas;
- c) ambos os grupos resistiram ao desafio de peste suína clássica nas duas épocas.

BURTSEV et alii (1977) estimaram as reduções do número de *E. rhusiopathiae*, quando estas são associadas a vacinas de peste suína clássica e/ou vacina para doença de Aujeszky. Os autores observaram que a diluição do vírus de peste suína em cem vezes, causou uma redução de mil vezes no número de *E. rhusiopathiae* em duas horas após a associação das vacinas. E investigando sobre as doses mínimas para leitões nas três vacinas associadas notaram que, por aerosol, a dose mínima imunizante para erisipela foi aumentada quatro a seis vezes e cem vezes por via I.M. Para peste suína, a imunidade demorou a aparecer e foi de curta duração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Vacina contra erisipela - amostra avirulenta

Como meio de cultura foi utilizada a infusão de cérebro e coração* a 3,7%, enriquecida com 0,5% de extrato de levedura dessecado**, 0,1% de tween 80**, 0,0004% de triptofano***, 10% de soro equino e pH = 7,6. Após inoculada com a amostra de *E. rhusiopathiae* avirulenta a cultura foi incubada de 12 a 18 horas a 37°C e concentrada com carboxi-metil-celulose (cmc)**** na concentração de 0,18%.

3.2. Vacina contra peste suína - amostra chinesa

Foi utilizada a técnica para produção de vírus lapinizado semelhante à de LOPEZ (1973). Os coelhos receberam inoculação endovenosa de 1 ml da suspensão de baço a 10% (com o vírus amostra chinesa) reconstituído em caldo triptose fos-

* Difco Laboratories - Detroit
** BBL - Cockeysville
*** dl Tryptophan - Waukegan
**** Uddeholm - Sweden

fatado*. Após temperatura superior a 41,0°C, os coelhos eram sangrados e seus baços retirados assepticamente, sendo depois triturados e homogeneizados. O "pool" de sangue e baços dos coelhos eram congelados a -40°C para lise de hemácias e liberação das partículas víricas.

3.3. Associação das culturas

Para cada dose da vacina bivalente foram associados, em partes iguais, cultura de *E. rhusiopathiae*, amostra avirulenta, pool de sangue e baço de coelhos com hipertermia pela amostra chinesa e um estabilizador de liofilização à base de solução de glicocola a 5% (6 partes) e solução de leite em pó a 10% (4 partes) sendo o pH = 7,6.

Antes da associação, foi feita a contagem apenas da *E. rhusiopathiae* em ágar cérebro coração, já que o material para peste suína foi coletado de coelhos com temperaturas superiores a 41°C. Após liofilizada, a vacina foi guardada em refrigeração (4-8°C).

3.4. Testes de controle da vacina

Um pool de quatro frascos da partida foi submetido aos seguintes testes:

- a) teste de pureza semeados em ágar e caldo cérebro-coração, meio de tioglicolato e meio de Tarozzi;
- b) teste de inocuidade através de inoculação de 0,5 ml de vacina reconstituída, via intraperitoneal em 20 camundongos desmamados, sendo os animais observados por 14 dias.

3.5. Titulação

Após a liofilização, a vacina foi reconstituída (pool de quatro frascos) em caldo simples com pH = 7,6 para

contagem de *E. rhusipathiae*. Foram feitas até a diluição de 10^{-10} e plaqueou-se 0,1 ml em placas de ágar cérebro-coração e em seguida incubou-se por 36 horas à temperatura de 37°C .

Um pool de quatro frascos foi utilizado para titulação do vírus através da DI 50%. A diluição foi feita em solução salina tamponada com pH 7,6. Foram usadas as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , com quatro coelhos por diluição. A dose inoculada foi de 1 ml/coelho via endovenosa, sendo considerado para cálculo do título, o acréscimo de 1°C ou mais. A DI 50% foi calculada pelo método de REED & MUENCH (1938).

3.6. Desafio para erisipela

A amostra para desafio foi cultivada a partir de uma amostra isolada em um foco da doença no município de Itabirito-MG, com capacidade de provocar doença em animais susceptíveis num período de 60 horas ou menos.

O meio de cultura empregado para cultivo da amostra desafio foi idêntico ao da vacina.

Foram testados dois métodos de desafios: o primeiro foi semelhante ao de FORTNER & DINTER (1944), só que as escarificações foram aplicadas com apenas um tipo de amostra, na dose de $1,5 \times 10^{12}$ bactérias. Este método foi usado previamente, mas apresentou inconvenientes; o segundo método, que consistia na diluição da cultura, onde a dose de $1,2 \times 10^9$ bactérias/3 ml era aplicado via intramuscular/animal, foi empregado no nosso trabalho.

A cultura desafio, titulada pela DL 50% (método de REED & MUENCH, 1938), em camundongos desmamados, deu um título correspondente a $10^{8,37}/0,5$ ml em 120 horas de observação. E a titulação da patogenicidade da amostra desafio em suínos mostrou ser ela capaz de produzir doença, em animais susceptíveis, na dose de $2,4 \times 10^6$ bactérias/3 ml (TAB. III).

Após o desafio, todos os animais eram observados quanto a sinais clínicos (inapetência, prostração e hipertermia), durante um período de seis dias, onde seu grau de pro-

teção era classificado de acordo com a TAB. I. Sendo que para efeito de proteção contra a doença, todo animal imune (I) ou parcialmente imune (PI) era dado como protegido.

Para efeito de controle da doença, os animais com hipertermia superior a 12 horas, ou outra característica de susceptibilidade ao desafio, eram medicados com penicilina (G-procaína, G-potássica e G-benzatina)* na dose de 20.000 a 27.000 UI/kg de peso vivo, até a ausência de sinais clínicos da doença (+ 3 doses).

3.7. Desafio para peste suína

Foi utilizada a amostra de vírus dos testes oficiais de vacina do Ministério da Agricultura, gentilmente fornecida pelo Laboratório Satélite de Curitiba (Castro-PR). O desafio foi feito através da aplicação intramuscular de 2 ml de sangue virulento glicerinado em todos os suínos. Após o desafio, os animais eram observados quanto a sinais clínicos (inapetência, prostração, hipertermia) e morte, sendo então classificados no grau de proteção de acordo com a TAB. II. O controle de temperatura dos animais era feito diariamente, por um período mínimo de sete dias. Os animais eram observados por mais sete dias e depois eliminados.

3.8. Época e ordem dos desafios

Os animais vacinados e os controles foram desafiados aos 21, 56 e 89 dias para erisipela e aos 28, 66 e 96 dias para peste suína. Como procedimento desafiava-se primeiro para erisipela e após o período de observação todos os animais,

* Hertabiótico - Laboratório Hertape S.A., Belo Horizonte

com sintomas ou não, eram medicados com penicilina na dose de 20.000 a 27.000 UI/kg de peso vivo. O desafio contra peste suína clássica só se iniciava após a normalização clínica dos animais.

3.9. Animais do experimento

3.9.1. Leitões desmamados

Foram vacinados 30 leitões das raças Large White (LW) e Landrace (L), com idade de 71 a 95 dias e com pesos entre 15 e 26 kg. Para cada desafio foram usados 10 leitões vacinados e dois controles. Tanto os animais vacinados como os controles eram submetidos aos dois agentes consecutivamente, por cada época de desafio.

Os animais antes e durante a fase experimental recebiam o mesmo manejo sanitário e zootécnico. A vacina foi aplicada por via I.M. na dose de 2 ml por animal.

3.9.2. Matrizes gestantes

Utilizaram-se 22 fêmeas pluríparas das raças Large White (LW) e Landrace (L). Onze porcas foram vacinadas, entre 28 a 57 dias de gestação (cinco no terço inicial e seis no terço médio), enquanto as restantes serviram como testemunhas para a inocuidade da vacina. O rebanho era livre de brucelose, leptospirose e peste suína africana. A avaliação do estudo foi feita através de:

- a) número de leitões nascidos vivos;
- b) peso da leitegada ao nascer;
- c) fetos mumificados;
- d) natimortos;
- e) leitões com tremores congênitos;
- f) mal formações embrionárias;
- g) número de abortos.

Estes dados foram comparados nos dois grupos de porcas.

3.9.3. Origem dos animais

Os animais, utilizados neste trabalho, originaram-se da Fazenda Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), município de Felixlândia - MG, situada na região Alto São Francisco, tendo as seguintes características meteorológicas no período do trabalho (média de 30 anos):

- temperatura média - 23,7°C
- umidade relativa do ar - 78,8%
- precipitação pluviométrica total - 1164,9 mm

3.10. Análise estatística

Os resultados foram estudados por análise de variância simples, para comparação dos índices produtivos entre matrizes gestantes vacinadas e não vacinadas.

Os dados referentes à duração de imunidade da vacina foram analisados por regressão linear simples, segundo SNEDECOR & COHRAN (1967).

4. RESULTADOS

4.1. Títulos da vacina

O título médio para a cultura de *E. rhusiopathiae*, antes da associação e liofilização, foi de $1,2 \times 10^{12}$ erisipelas por ml de cultura.

Após associação com sangue e baços de coelhos e liofilizada, a amostra de *E. rhusiopathiae* atenuada apresentou um título médio de $2,5 \times 10^9$ erisipelas por ml de cultura.

Para peste suína, o vírus amostra chinesa, após titulação em coelhos da vacina já liofilizada, segundo a técnica de LÓPEZ (1973), deu um título na DI 50% de $10^{3,0}$ /ml, pelo método de REED & MUENCH (1938) (TAB. IV).

4.2. Testes de pureza

A vacina, após liofilização, foi considerada inócua, depois da injeção intraperitoneal em 20 camundongos desmamados na dose de 0,5 ml por animal. Os animais permaneceram normais após um período de 14 dias de observação, não ocorrendo nenhum efeito indesejável que pudesse ter sido atribuído à vacina.

4.3. Teste de esterilidade

A vacina utilizada neste estudo não revelou contaminação nas provas a que foi submetida.

4.4. Patogenicidade das amostras usadas no desafio

Os resultados, segundo a titulação da patogenicidade da amostra de Itabirito-MG, feita na TAB. III, mostram que doses cem a mil vezes menores que as usadas nos desafios da vacina de erisipela seriam suficientes para produzirem a doença em animais susceptíveis.

Para peste suína foi usada a dose desafio dos testes oficiais, dispensando portanto, qualquer estudo sobre a patogenicidade, concentração e forma de desafio.

4.5. Teste de inocuidade da vacina em porcas gestantes

O grupo de porcas vacinadas apresentou o total de 8,93% de alterações, sendo 4,46% de leitões natimortos, 1,78% de fetos mumificados e 2,68% de leitões eliminados por debilidade, enquanto que no grupo controle ocorreram 9,52% de alterações divididas em 4,76% de natimortos, 0,95% de mumificados e 3,81% de leitões eliminados por debilidade. A média de peso dos leitões nascidos vivos foi de 1,34 kg nas porcas vacinadas e 1,30 kg nas porcas controles. Nas TAB. V e VI são apresentados os parâmetros observados parcialmente e no total, das matrizes vacinadas e controles, com os percentuais de cada alteração por tratamento. Não houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre matrizes vacinadas e matrizes controles, no que diz respeito a tamanho e peso da leitegada ao nascer (TAB. V e VI). Não foi observada a presença de leitões com tremores ou malformações congênitas.

Abortos não aconteceram em nenhum dos grupos. Uma porca do grupo controle (LW 454) - (TAB. V), foi retirada do

teste por produzir só um leitão.

Não houve diferença na duração do período de gestação. As vacinadas tiveram a média de 114,6 dias, para 114,2 dias das não vacinadas (TAB. V).

4.6. Eficiência da imunidade nos leitões vacinados

Observaram-se os seguintes resultados nos animais desafiados para erisipela suína: todos os suínos utilizados como controles nos desafios aos 21, 56 e 89 dias adoeceram com a dose de $1,2 \times 10^9$ erisipelas até 60 horas após o desafio (TAB. VII, VIII e IX). Já os animais vacinados foram classificados em graus de imunidade de acordo com a TAB. I. Os graus de proteção obtidos foram de 80%, 50% e 50% aos 21, 56 e 89 dias, respectivamente (TAB. VII, VIII e IX) e (GRAF. 1).

Para cada lote de 10 suínos desafiados, havia dois animais controles, dos quais se reisolou a amostra de *E. rhusiopathiae* inoculada, durante a hipertermia, através de hemocultura.

Houve uma tendência linear de redução na imunidade dos leitões, à medida em que aumentou o período entre a vacinação e o desafio. Foi estimada a seguinte equação de regressão: $\bar{Y} = 84,6 - 0,4454 X$ ($r^2 = 0,73$), que representa o efeito do referido período de tempo sobre a percentagem de leitões imunes após o desafio (GRAF. 1).

Os seguintes resultados foram obtidos nos desafios para peste suína, com a amostra de vírus do Laboratório Satéelite de Curitiba (Castro-Pr). Todos os suínos testemunhas usados nos desafios de 28, 66 e 96 dias morreram de peste suína típica, até um período máximo de 15 dias (TAB. X, XI e XII).

Os animais apresentaram febre alta, inapetência, incoordenação motora e morte. À necrópsia, revelaram manchas hemorrágicas na pele, hemorragias puntiformes (petéquias) nos rins, estômago, bexiga e linfonodos de praticamente toda a

cadeia linfática. Com menor frequência, houve presença de infartes hemorrágicos do baço e linfonodos. Amostras de material de todas as épocas de desafios foram positivas para os testes de imunofluorescência realizados.

O comportamento da imunidade para peste suína foi classificado sob o critério da TAB. II, que julgou como 100% imunizados todos os animais desafiados nos períodos de 28, 66 e 96 dias após a vacinação (TAB. X, XI e XII).

TABELA I - Critério para interpretação dos desafios de crise-pela suína

Temperatura retal (°C)	Condições gerais			Duração da Hipertermia	Classificação do grau de imunidade
	Apetite	Lesões	Prostração		
38 -40,5	Normal	Ausentes	Ausente	Ausente	Imune
40,6-41,1	Normal	Ausentes	Ausente	até 12 h	Parcialmente imune
> 41,1	Normal	Ausentes	Ausente	+ de 12h	Susceptível
> 41,1	Normal	Presentes	Ausente	+ de 12h	Susceptível
> 41,1	Anormal	Ausentes	Ausente ou Presente	+ de 12h	Susceptível
> 41,1	Normal ou Anormal	Ausentes	Presente	+ de 12h	Susceptível

TABELA II - Critério para interpretação dos desafios de peste suína clássica

Temperatura retal (°C)	Condições gerais		Duração da Hipertermia	Classificação do grau de imunidade
	Apetite	Prostração		
38 -40,5	Normal	Ausente	Ausente	Imune
38 -40,5	Anormal	Presente	Ausente	Susceptível
Acima de 40,5	Normal ou Anormal	Presente ou Ausente	+ de 24 h	Susceptível
Acima de 40,5	Normal	Ausente	até 24 h	Parcialmente imune

TABELA III - Titulação da patogenicidade da *E. rhusiopathiae* (amostra Itabirito-MG), em suínos não vacinados

Animal	Idade ao desafio (dias)	Sexo	Dose (bact./ml)	Temperaturas em °C, após a inoculação dos animais via intramuscular (em horas)											
				Inicial	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144
LW 71	92	M	$1,2 \times 10^{10}$	39,3	40,1	39,9	42,2*	38,7	39,0	39,0	38,3	38,4	38,6	38,5	38,6
LW 118	84	M	$1,2 \times 10^{10}$	58,8	39,6	39,7	42,4*	38,6	39,4	39,2	38,8	39,0	39,0	38,8	38,9
LW 102	86	M	$1,2 \times 10^9$	39,3	40,0	40,7	42,5*	38,9	39,1	39,4	38,6	38,7	38,8	38,6	38,7
LW 103	86	M	$1,2 \times 10^9$	39,8	40,2	39,3	40,3	42,3*	39,5	39,0	38,7	39,2	39,0	38,9	38,6
LW 292	129	M	$1,2 \times 10^8$	39,4	39,8	42,0	42,1*	38,6	38,9	39,0	38,8	41,5*	39,0	39,0	38,8
LW 311	127	F	$1,2 \times 10^8$	40,0	39,7	40,1	40,6	42,3*	39,2	39,4	38,9	39,5	40,5	40,0	39,1
LW 366	157	M	$2,4 \times 10^7$	39,4	39,8	39,3	42,1*	39,0	39,4	38,6	39,4	38,6	38,9	38,9	39,5
LW 510	160	F	$2,4 \times 10^7$	39,0	39,3	40,0	42,5*	39,1	39,4	39,0	39,5	40,5	39,3	39,2	39,5
LW 508	160	F	$2,4 \times 10^6$	39,3	39,5	39,0	39,2	38,5	39,3	39,2	39,3	38,6	39,1	40,0	39,1
LW 557	157	M	$2,4 \times 10^6$	39,3	39,0	39,5	41,9*	39,4	39,2	38,5	39,0	38,8	39,1	38,9	40,5

* Medicação com Hertabíótico - Laboratório Hertape S/A - Belo Horizonte (20.000 a 27.000 UI/kg peso vivo)

TABELA IV - Titulação do vírus de peste suína clássica, amostra chinesa, em coelhos adultos

Caiola nº	Diluição	Peso (kg)	Temperatura dos animais após inoculação do vírus via endovenosa (em horas)														(°C)*
			Inicial	24	36	48	54	60	66	72	78	90	102	114			
01	10 ⁻¹	2,65	39,5	39,4	39,4	40,3	41,0	41,4	41,3	41,1	39,7	39,3	39,1	39,1	1,9		
02	10 ⁻¹	2,50	39,6	39,5	39,7	41,0	41,0	40,7	39,8	39,8	39,7	39,3	40,6	39,7	1,4		
03	10 ⁻¹	1,97	39,6	39,4	39,7	39,5	39,8	40,2	40,6	40,8	40,0	39,2	39,3	39,4	1,2		
04	10 ⁻¹	1,65	39,8	39,9	39,9	40,5	41,0	40,9	40,7	40,4	39,9	39,5	40,0	40,3	1,2		
05	10 ⁻²	1,80	39,4	39,5	39,4	39,7	40,0	40,5	40,7	40,7	39,9	39,5	39,6	39,2	1,3		
06	10 ⁻²	1,89	39,5	39,6	39,7	40,0	40,3	40,9	41,4	41,4	40,3	39,7	39,7	40,2	1,9		
07	10 ⁻²	2,58	39,6	39,5	39,8	40,0	40,7	41,3	41,9	41,9	41,3	39,4	39,6	39,7	2,5		
08	10 ⁻²	2,06	39,5	39,5	39,8	39,7	39,9	39,7	40,1	40,2	40,6	40,4	39,8	39,2	1,1		
09	10 ⁻³	2,32	39,7	39,6	39,5	39,8	40,1	39,4	39,6	40,0	41,2	41,3	41,5	39,5	1,6		
10	10 ⁻³	2,33	39,6	39,6	39,5	39,7	39,9	39,6	40,5	40,6	41,6	41,5	40,2	39,2	2,0		
11	10 ⁻³	2,07	39,5	39,6	39,7	39,5	39,8	39,6	39,4	39,2	39,6	39,4	39,5	40,3	0,8		
12	10 ⁻³	1,76	39,6	39,5	39,5	39,5	39,8	39,4	39,4	39,6	40,1	39,6	40,0	39,5	0,5		

* Obtido entre temperatura inicial e hipertermia, resultando um título na DI 50% = 10^{3,0}/ml

TABELA V - Dados referentes à produtividade da matriz vacinada na gestação, comparada à da matriz gestante controle (não vacinada)

Porças Raça e Número	Leitões por parto		Leitões nascidos vivos por leitegada		Peso dos leitões nascidos vivos		Duração da gestação (dias)		Vacinação (dias de gestação)		Ordem do parto	
	Vaci- nadas	Con- troles	Vaci- nadas	Con- troles	Vaci- nadas	Con- troles	Vaci- nadas	Con- troles	Vaci- nadas	Con- troles	Vaci- nadas	Con- troles
LW 682 LW 1484	12	10	11	10	10,9	12,7	114	118	57		4º	3º
LW 240 LW 254	6	12	6	12	8,6	20,8	116	115	49		10º	2º
LW 130 LW 565	16	12	14	12	16,8	12,9	116	113	48		3º	2º
LW 518 LW 338	13	9	11	9	16,7	11,7	114	113	47		2º	2º
LW 519 LW 632	9	4	9	4	14,5	5,7	114	116	45		2º	2º
LW 534 LW 650	9	6	9	6	10,9	9,3	115	113	38		2º	2º
LW 631 LW 497	13	13	13	13	13,6	11,7	114	110	37		2º	2º
LW 459 LW 454*	12	X	10	X	16,9	X	114	X	37		8º	X
LW 578 LW 476	4	13	4	10	6	13,1	114	113	36		2º	2º
LW 1458 LW 1523	8	9	8	9	9,4	13,4	116	115	28		3º	8º
L 497 L 499	9	15	9	12	16,3	18,0	114	116	44		8º	3º
Totais	112	105	105	99	140,6	128,7	-	-	-		-	-
X̄	10,18	10,50	9,54	9,90	12,78	12,87	114,64	114,20	42,36			

* Matriz retirada do experimento

TABELA VI - Frequência de anormalidades em leitegadas de porcas gestantes vacinadas e de porcas gestantes controles (não vacinadas)

Tratamento	Quantidade de porcas	Total de leitões por parto	Total de leitões nascidos vivos	Total de leitões natimortos	Total de leitões mumificados	Total de leitões eliminados por debilidade	Total de leitões de anormalidades
Porcas vacinadas	11	112	105	5(4,46%)	2(1,78%)	3(2,68%)	10(8,93%)
Porcas controles	10	105	99	5(4,76%)	1(0,95%)	4(3,81%)	10(9,52%)

TABELA VII - Controle térmico diário dos animais desafiados com $1,2 \times 10^9$ *E. rhusiopathiae*¹ aos 21 dias após a vacinação

Animal	Idade vaci-nação (dias)	Peso a vaci-nação (kg)	Sexo	Tratamento	Temperaturas em °C, após inoculação da erisipela (em horas)										Interpretação			
					Inicial	24	36	48	60	72	84	96	108	120		132	144	
LW 269	76	23,0	M	Vac.	39,5	39,9	39,4	39,4	39,5	39,2	39,2	39,4	39,6	39,2	39,5	39,9	39,5	I
LW 267	76	22,0	M	Vac.	39,5	39,5	39,2	39,1	39,2	39,2	39,2	39,4	39,7	39,0	39,1	39,0	39,2	I
LW 263	76	16,0	M	Vac.	39,5	39,8	39,0	40,3	39,5	39,3	39,5	39,5	39,8	39,5	39,1	39,7	39,3	I
LW 307	71	22,0	F	Vac.	39,0	40,1	38,9	39,6	40,5	40,0	39,7	40,1	39,2	38,9	39,4	39,2	39,2	I
LW 268	76	25,0	M	Vac.	39,2	40,0	41,0	41,4	42,0*	39,1	38,4	38,9	38,6	38,8	38,7	38,7	38,8	S
LW 264	76	24,5	M	Vac.	39,0	40,5	39,3	39,8	42,1	41,6	41,5*	39,8	38,7	38,7	38,9	38,9	38,9	S
LW 265	76	20,0	M	Vac.	38,8	39,7	40,2	39,5	39,9	39,9	39,5	39,7	39,4	39,1	39,4	39,3	39,3	I
LW 164	95	26,0	F	Vac.	39,0	40,1	38,8	39,5	39,2	39,3	38,8	39,4	38,9	38,6	39,0	39,1	39,1	I
LW 248	78	26,0	M	Vac.	38,9	40,0	38,7	39,3	40,5	41,1	41,0	40,5	39,6	38,8	39,0	39,0	39,0	PI
LW 238	78	25,0	M	Vac.	39,2	39,5	38,8	39,3	39,6	39,2	39,0	39,5	38,9	38,4	38,6	38,7	38,7	I
LW 102	65	16,0	M	Contr.	39,3	40,0	40,7	42,5*	38,9	39,1	39,4	38,6	38,7	36,8	36,8	38,7	38,7	S
LW 105	65	15,0	M	Contr.	39,8	40,2	39,3	40,3	42,3*	39,5	39,0	38,7	39,2	39,0	38,9	38,9	38,6	S

I = Imune S = Susceptível

PI = Parcialmente Imune

I = Amostra de Itabirito-MG

* Medicação com Hertsabíótico - Laboratório Hertape S/A - Belo Horizonte-MG (20.000 a 27.000 UI/kg peso vivo)

TABELA VIII - Controle térmico diário dos animais desafiados com $1,2 \times 10^9$ *E. rhusiopathiae*¹ aos 56 dias após a vacinação

Animal	Idade à vacinação (dias)	Peso à vacinação (kg)	Sexo	Tratamento	Temperaturas em °C, após inoculação da erisipela (em horas)											Interpretação	
					Inicial	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132		144
LW 272	76	23,5	F	Vac.	39,1	39,4	41,9	41,7*	38,8	39,0	38,9	38,7	39,4	39,5	39,5	39,4	S
LW 287	75	18,5	F	Vac.	39,0	39,3	39,9	39,2	41,0	41,1	40,5	40,6	39,8	39,5	38,8	39,0	PI
LW 290	75	21,0	M	Vac.	39,2	39,5	38,8	39,5	40,8	40,7	39,6	39,3	39,1	39,0	39,0	39,3	PI
LW 246	78	20,5	M	Vac.	39,3	39,5	39,9	41,7	morto	S
LW 168	95	24,5	M	Vac.	38,9	39,4	41,9	41,5*	38,6	38,5	38,3	38,7	41,0	38,8	38,4	38,6	S
LW 271	76	25,0	F	Vac.	39,4	39,9	39,3	39,9	40,3	41,2	40,0	40,5	39,1	39,3	38,6	38,8	PI
LW 266	75	26,0	M	Vac.	38,9	39,8	41,4	41,9*	38,3	38,7	38,6	39,1	41,5	38,8	38,6	38,7	S
LW 296	75	21,5	F	Vac.	38,8	39,3	39,1	39,0	41,4	41,6*	38,8	39,0	39,0	39,0	39,4	39,2	S
LW 278	75	15,0	M	Vac.	39,7	40,6	39,6	39,5	39,4	40,1	40,0	39,6	39,7	39,5	39,6	39,7	I
LW 270	76	20,0	M	Vac.	39,0	39,3	39,4	39,7	39,0	39,2	40,8	40,2	40,2	39,7	39,0	38,8	PI
LW 301	71	13,0	M	Contr.	39,8	40,1	39,2	41,4	41,7*	39,3	39,1	39,2	39,4	39,6	39,1	39,1	S
LW 312	71	11,0	F	Contr.	39,5	42,1	42,0*	40,2	38,8	39,2	41,3	40,5	39,6	39,3	39,6	39,7	S

I = Imune

S = Susceptível

PI = Parcialmente Imune

I = Amostra de Itabirico-MG

* Medicação com Hertabático - Laboratório Hertape S/A - Belo Horizonte-MG (20.000 a 27.000 UI/kg peso vivo)

TABELA IX - Controle térmico diário dos animais desafiados com $1,2 \times 10^9$ *E. rhusiopathiae*¹ aos 89 dias após a vacinação

Animal	Idade a vacinação (dias)	Peso a vacinação (kg)	Sexo	Tratamento	Temperaturas em °C, após inoculação da erisipela (em horas)										Interpretação		
					Inicial	24	36	48	60	72	84	96	108	120		132	144
LW 289	73	17,0	M	Vac.	39,0	39,6	38,7	39,3	38,8	39,4	38,7	39,1	38,7	39,3	38,6	39,3	I
LW 306	71	17,5	F	Vac.	38,7	39,8	38,9	41,5*	38,9	39,1	39,2	39,1	38,8	38,7	38,3	39,2	S
LW 298	75	17,5	F	Vac.	38,9	38,3	38,5	39,0	38,9	40,4	41,1	39,7	38,4	38,3	38,5	38,8	PI
LW 302	71	14,8	M	Vac.	38,8	39,1	41,7	41,8*	38,5	38,8	38,5	38,8	38,5	38,7	38,5	38,8	S
LW 273	76	16,5	F	Vac.	38,6	39,5	38,4	39,1	38,9	39,7	40,2	39,9	39,4	38,9	38,4	38,5	I
LW 257	76	18,0	F	Vac.	38,9	39,9	39,1	41,2	41,6*	40,3	38,5	39,0	38,7	39,1	39,1	39,4	S
LW 255	76	17,0	M	Vac.	38,7	40,0	41,7	41,1	38,4	39,1	38,5	38,8	39,7	39,5	39,0	39,2	PI
LW 288	75	15,0	F	Vac.	38,8	39,1	38,9	38,8	39,0	39,2	39,2	38,9	39,3	39,2	39,3	39,2	I
LW 285	75	15,0	F	Vac.	39,0	38,7	39,5	42,0*	38,8	39,3	38,8	39,9	38,8	39,0	38,7	39,4	S
LW 279	75	17,5	M	Vac.	38,7	39,4	38,4	40,2	41,8*	40,3	38,1	38,8	38,8	39,0	38,7	39,3	S
LW 283	75	10,0	M	Contr.	39,3	39,2	39,7	41,6*	41,4*	39,6	38,4	39,1	38,1	38,4	38,4	39,0	S
LW 305	71	12,0	F	Contr.	38,8	39,2	39,3	41,9*	39,1	39,3	38,8	38,9	38,8	38,7	38,7	38,5	S

I = Imune

S = Susceptível

PI = Parcialmente Imune

I = Amostra de Itabirito-MG

* Medicação com Hetrabiótico - Laboratório Hertape S/A - Belo Horizonte

(20.000 a 27.000 UI/kg de peso vivo)

TABELA X - Controle térmico diário dos animais desafiados contra peste suína clássica aos 28 dias após a vacinação

Animal	Idade vaci-nação (dias)	Peso vaci-nação (kg)	Sexo	Tratamento	Temperaturas em °C, após inoculação do vírus via intramuscular (em horas)											Interpretação
					Inicial	24	48	72	96	120	144	168	216			
LW 269	76	23,0	M	Vac.	38,9	38,4	39,0	38,8	38,7	39,2	39,1	39,0	NA	I		
LW 267	76	22,0	M	Vac.	39,0	39,0	39,3	39,1	38,9	39,0	38,9	39,2	NA	I		
LW 263	76	16,0	M	Vac.	39,1	39,0	38,8	38,8	39,8	39,2	39,4	39,3	NA	I		
LW 307	71	22,0	F	Vac.	39,0	38,6	39,0	38,5	39,2	38,7	38,8	38,5	NA	I		
LW 268	76	23,0	M	Vac.	38,7	38,5	38,8	38,6	38,6	38,5	38,9	38,7	NA	I		
LW 264	76	24,5	M	Vac.	38,5	38,1	38,8	38,8	39,0	38,9	39,4	38,8	NA	I		
LW 265	76	20,0	M	Vac.	38,6	38,8	38,8	38,9	39,0	38,8	38,7	38,8	NA	I		
LW 164	95	26,0	F	Vac.	38,4	38,2	38,7	38,8	38,8	38,8	38,8	38,5	NA	I		
LW 248	78	26,0	M	Vac.	38,6	38,2	38,4	38,4	38,7	38,4	38,7	38,6	NA	I		
LW 258	78	23,0	M	Vac.	38,9	38,8	38,8	38,9	39,0	39,4	38,7	38,7	NA	I		
LW 71	71	15,0	M	Contr.	38,0	38,7	39,5	41,4	40,7	40,9	41,1	morte	S			
LW 118	63	11,0	M	Contr.	38,4	38,5	41,3	40,3	39,9	41,8	41,4	41,1	morte	S		

I = Imune

NA = Nenhuma Alteração

2 = Vírus do Laboratório Satélite de Curitiba (Castro-PR)

S = Suscetível

TABELA XI - Controle térmico diário dos animais desafiados contra peste suína clássica² aos 66 dias após vacinação

Animal	Idade à vacinação (dias)	Peso à vacinação (kg)	Sexo	Tratamento	Temperaturas em °C, após inoculação do vírus via intramuscular (em horas)												Interpretação	
					Inicial	24	48	72	96	120	144	168	216	264	312	360		
LW 272	76	23,5	F	Vac.	39,0	39,0	38,6	38,7	38,8	38,8	38,7	39,2	38,7	38,8	38,8	38,8	NA	I
LW 287	75	18,5	F	Vac.	38,8	38,8	38,9	38,7	39,1	39,0	38,9	38,7	38,7	39,3	39,0	39,0	NA	I
LW 290	75	21,0	M	Vac.	39,5	39,2	38,5	39,0	39,6	38,9	39,2	38,6	38,7	38,5	38,6	38,6	NA	I
LW 246*	78	20,5	M	Vac.	-
LW 168	95	24,5	M	Vac.	39,0	39,2	38,5	38,9	39,2	38,8	38,8	39,0	38,8	39,0	38,9	38,9	NA	I
LW 271	76	25,0	F	Vac.	39,0	38,7	38,8	39,0	38,8	39,0	39,0	39,1	39,0	38,8	38,8	38,8	NA	I
LW 266	76	26,0	M	Vac.	38,5	38,3	38,5	38,8	38,6	39,0	38,5	39,3	38,4	38,5	38,5	38,5	NA	I
LW 296	75	21,5	F	Vac.	38,7	38,8	38,8	39,2	39,3	39,0	39,0	38,9	38,5	38,5	38,9	38,9	NA	I
LW 278	75	12,0	M	Vac.	39,5	39,5	39,5	39,3	39,3	40,0	39,2	40,0	39,5	39,1	39,0	39,0	NA	I
LW 270	76	20,0	M	Vac.	38,7	38,8	38,9	38,7	38,6	38,8	39,1	38,9	38,5	38,4	38,6	38,6	NA	I
LW 292	75	11,0	M	Contr.	38,9	40,2	40,1	41,4	40,8	41,2	41,9	41,1	41,1	41,1	41,0	41,0	morte	S
LW 312	71	11,5	F	Contr.	39,6	40,8	41,2	41,0	39,6	39,1	40,8	42,0	41,0	41,0	41,0	41,2	morte	S

I = Imune

S = Susceptível

NA = Nenhuma Alteração

2 = Vírus do Laboratório Satélite de Curitiba (Castro-PR)

* Morreu no desafio para erisipela suína

TABELA XII - Controle térmico diário dos animais desafiados contra peste suína clássica² aos 96 dias após a vacinação

Animal	Idade à vacinação (dias)	Peso à vacinação (kg)	Sexo	Tratamento	Temperaturas em °C, após inoculação do vírus via intramuscular (em horas)											Interpretação
					Inicial	24	48	72	96	120	144	168	216	264		
LW 289	73	17,0	M	Vac.	39,0	39,2	39,3	39,0	39,2	38,9	39,4	39,1	38,8	38,9	I	
LW 306	71	17,5	F	Vac.	38,7	39,0	38,8	38,8	39,0	39,3	38,8	39,1	38,5	38,6	I	
LW 298	73	17,5	F	Vac.	38,8	38,8	39,0	38,7	38,7	38,6	38,8	38,8	38,6	38,4	I	
LW 302	71	14,0	M	Vac.	38,5	39,2	39,3	38,8	38,4	38,8	38,9	39,0	38,6	39,0	I	
LW 273	76	16,5	F	Vac.	38,7	39,5	39,7	39,0	39,6	39,0	38,7	39,2	38,7	38,8	I	
LW 257	76	18,0	F	Vac.	38,5	38,7	39,0	38,7	40,5	39,6	38,9	39,0	38,4	38,7	I	
LW 255	76	17,0	M	Vac.	39,0	39,1	39,2	39,0	39,9	40,9	39,2	39,0	39,2	39,0	PI	
LW 268	75	15,0	F	Vac.	38,6	38,8	39,5	39,5	40,8	39,5	39,6	39,4	39,0	38,7	PI	
LW 285	75	15,0	F	Vac.	38,2	39,1	39,4	39,5	40,0	41,0	39,8	38,9	39,6	39,0	PI	
LW 279	75	17,5	M	Vac.	38,7	38,7	39,2	38,8	39,0	39,6	39,4	39,3	38,9	39,0	I	
LW 283	75	10,0	M	Contr.	39,0	40,2	41,2	41,4	41,0	40,7	41,0	41,2	41,0	morte	S	
LW 508	71	13,5	F	Contr.	39,4	40,9	41,1	40,8	40,1	40,9	41,8	41,4	morte	-	S	

I = Imune

PI = Parcialmente Imune

S = Susceptível

² = Vírus do Laboratório Satélite de Curitiba (Castro-PR)

TABELA XIII - Análise de variância para peso da leitegada ao nascer

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	1	0,04	0,04	-NS ^a
Resíduo	19	304,68	16,03	
Total	20	304,72		

a = Não significativo ao nível de 5%

TABELA XIV - Análise de variância para número de leitões nascidos (\sqrt{n})

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	1	0,0056	0,0056	-NS ^a
Resíduo	19	6,2686	0,3299	
Total	20	6,2742		

a = Não significativo ao nível de 5%

TABELA XV - Análise de variância para comportamento da imunidade da vacina de erisipela suína

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Regressão linear	1	458,73	458,73	3,247 ^a
Indep. regressão	1	141,27	141,27	
Total	2	600,00		

a = Não significativo ao nível de 5%

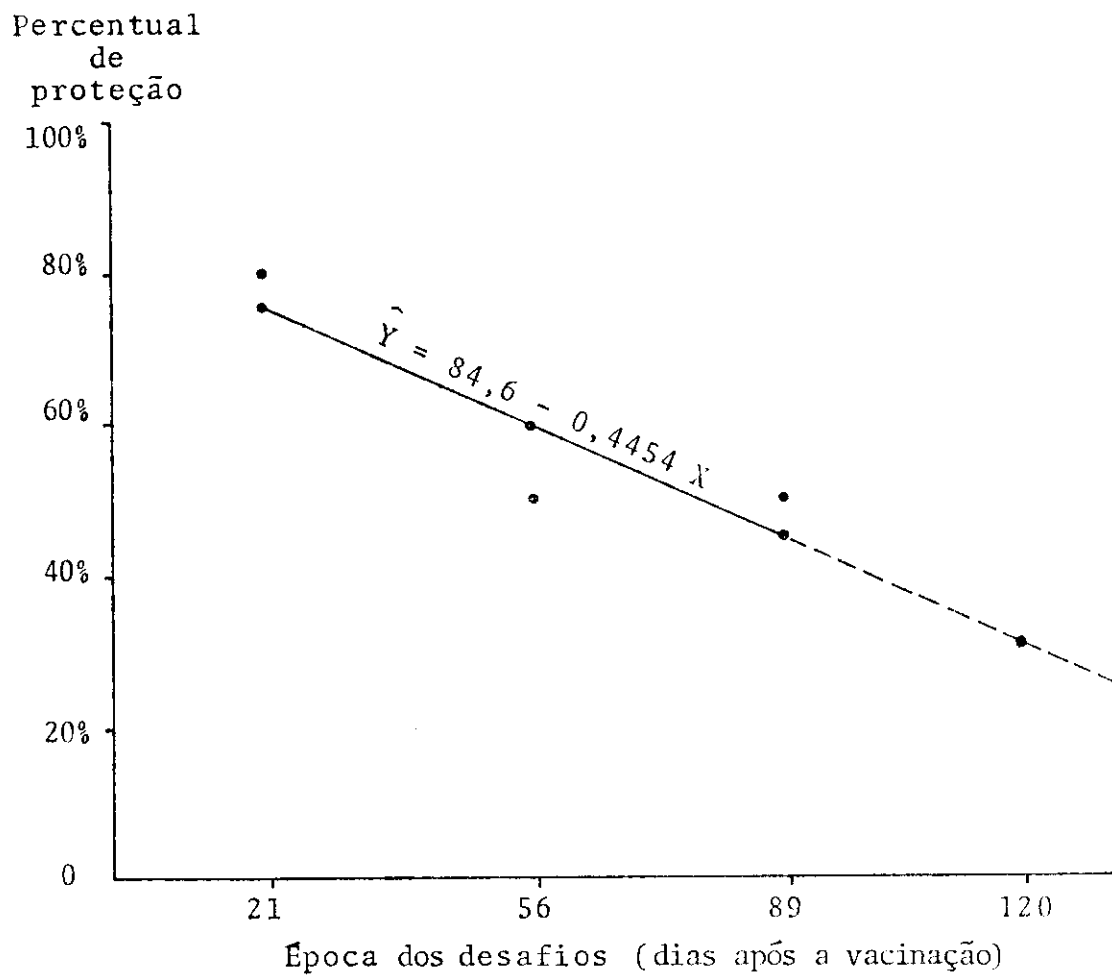


GRÁFICO 1 - Tendência linear da imunidade para *E. rhusiopathiae* no intervalo entre vacinação e épocas de desafios

5. DISCUSSÃO

5.1. Vacina lapinizada contra peste suína

Segundo a classificação de YORK (1961) é que se escolheu a amostra chinesa como de eleição para o nosso trabalho, pois, segundo BOGNÁR & MESZÁROS (1962), a amostra chinesa usada sem adição de soro imune dá excelentes resultados, afirmando também, em 1963, que suínos não vacinados mantidos juntos a suínos vacinados com a amostra chinesa, continuam susceptíveis à doença, mostrando que a excreção do vírus vacinal é baixa, sendo ainda de ótima capacidade imunogênica, estável e absolutamente inócua (BRAN et alii, 1966; LYRA, 1979; PASSOS et alii, 1968; MIHAITA et alii, 1969 e FLORENT et alii, 1969). Mesmo apesar de três animais manifestarem aumento de temperatura no desafio para peste suína aos 96 dias e serem julgados como parcialmente imunes (TAB. XII), não podemos indicar com isto uma proteção deficiente da vacina, já que o comportamento clínico dos animais continuaram normais nos dias seguintes e mesmo no dia da hipertermia o apetite e as condições gerais continuaram ótimas.

O teste de hipertermia em coelhos para vacina lapinizada amostra chinesa é digno de confiança e pode ser comparado com o teste de eficiência da vacina em suínos, segundo JAEGER & BARTH (1973). Coelhos com hipertermia, pelo vírus amostra chinesa, contêm os mais altos títulos nos lin-

fonodos intestinais, seguidos pelo baço e sangue, sendo que o fígado contém os mais baixos títulos (BARTH & JAGGER, 1974). Tentativas no uso da vacina, apenas com "pool" de sangue desfibrinado, não deu título satisfatório em coelhos após associação com cultura de *E. rhusiopathiae*. Entretanto, o uso de um "pool" de sangue desfibrinado e baços de três coelhos hipertérmicos foram suficientes para se obter um título da DI 50% = $10^{3,0}$ /ml em coelhos pelo método de REED & MUENCH (1938), após liofilização com a cultura de erisipela, sendo este título superior ao preconizado (BRASIL, 1979).

O vírus da peste suína clássica associado à vacina ou infecção por erisipela, quando inoculado em suínos e coelhos, não dão qualquer efeito adverso em ambos os animais, à exceção da permanência do vírus por longo tempo na corrente sanguínea do coelho (MACIAK, 1969). Entretanto, para titularmos o vírus da vacina, após liofilização, fizemos um teste de inoculação em coelhos da cultura de *E. rhusiopathiae* empregada na vacina, sem observarmos qualquer alteração nestes animais.

5.2. Vacina avirulenta contra erisipela

A vacinação contra *E. rhusiopathiae*, usando uma cultura viva avirulenta, é entre nós um fato novo, principalmente quando esta cultura é associada a outro tipo de agente vivo. A primeira vacina de erisipela, com cultura viva atenuada, remonta quase um século e foi preparada por PASTEUR, em 1883. Vacinas deste tipo têm sido usadas por STAUB (1940) e desde 1943 em condições de campo na Suécia por SANDSTEDT & SWAHN (1947), dando ótimos resultados. Logo, devido a estes achados resolvemos empregar a cultura avirulenta em nosso estudo.

O uso de culturas de *E. rhusiopathiae*, para vacinas na forma líquida, é impróprio, devido ao fato delas se tornarem instáveis e terem sua potência reduzida em curto

espaço de tempo (GOCHENOUR & YOTTER, 1952). Além destes aspectos, a liofilização no nosso caso fazia-se mais necessária, devido à associação com outro agente vivo, o que iria influenciar diretamente, na redução do período de estabilidade da vacina.

A reconstituição de vacinas com água destilada ou salina comum é frequentemente inadequada, já que o diluente exerce importância fundamental, para que a reconstituição líquida permaneça viável um mínimo de 8 horas em condições de campo (BODEN, 1967). Para erisipela o caldo simples preenche os requisitos, já que este preserva o estado osmótico da bactéria. Somando-se a isto, observamos que o diluente não mostrou também qualquer efeito ao vírus lapinizado amostra chinesa, razão pela qual este foi usado na reconstituição da vacina.

EWALD (1962) demonstrou em camundongos que a presença de formas dissociadas de *E. rhusiopathiae* em vacinas avirulentas são discutidas. Em função disto, o período de incubação das culturas para produção de vacinas, no nosso estudo, sempre foram iguais ou inferiores a 18 horas. Porque a presença de formas dissociadas aumentavam acentuadamente após este período.

Frascos com 1 ml de cultura de *E. rhusiopathiae* amostra Koganei adaptada em acriflavina, após liofilização, continham de 2×10^9 a 5×10^9 bactérias (ANDO & NAKAMURA, 1958). E KOBUSIEWICZ (1952), usando uma vacina avirulenta de erisipela, obteve três meses de proteção em suínos vacinados com 2 ml de cultura contendo 4×10^8 bactérias por dose. Esta vacina foi usada na Polônia, por três anos, em 5,8 milhões de suínos, com bons resultados.

Na preparação da vacina bivalente, observamos que nas contagens feitas através de diluições em placas, o número de *E. rhusiopathiae* por ml de cultura era de $1,2 \times 10^{12}$. Sendo que este número, após a associação com o vírus amostra chinesa e liofilização, caiu para a faixa de $2,5 \times$

10^9 erisipelas por ml, ou seja, uma concentração quase mil vezes menor, embora ainda satisfatória, comparando com 4×10^8 /dose usado por KOBUSIEWICZ (1952).

Um ml de cultura da amostra desafio de erisipela reconstituída, com aproximadamente $1,1 \times 10^9$ organismos, causa num animal susceptível temperatura muito alta, presença de lesões em forma de losangos, podendo estas serem ou não fatais (LAWSON et alii, 1966). Em nosso experimento, a dose de agressão em todos os desafios com a amostra isolada, no município de Itabirito-MG, foi de $1,2 \times 10^9$ por 3 ml de diluente, ou seja, a mesma dose utilizada na vacinação e que correspondia de cem a mil vezes a dose capaz de causar doença em um animal susceptível (TAB. III).

Os desafios para erisipela e peste suína foram via I.M. Desafios para erisipela, por escarificação, como os descritos por FORTNER & DINTER (1944), em nosso caso apresentavam inconvenientes como:

- a) após o inóculo os animais deitavam-se no chão e prejudicavam a precisão da dosagem;
- b) não haviam baias suficientes para manter cada animal individualmente, portanto, os companheiros de baia lambiam as escarificações diluindo a dose de agressão.

Inoculando 1×10^9 a 3×10^9 erisipelas por ml, como desafio via intramuscular em suínos vacinados, OSE et alii (1963), usaram o seguinte critério para observação dos animais:

- a) a temperatura era registrada um a dois dias antes do inóculo e seis dias após o mesmo;
- b) animais que tivessem temperatura corporal maior que $41,1^\circ\text{C}$, lesões generalizadas ou morte eram classificados como susceptíveis.

No nosso caso a temperatura acima de $41,1^\circ\text{C}$ deveria ser mantida por mais de 12 horas, ou então somada à

presença de qualquer outro sintoma, para se julgar um animal susceptível. Temperaturas de até 41,1°C, com ausência de qualquer outro sinal clínico, foi atribuído a uma reação parcial ao desafio, sendo o animal considerado imune (TAB. I).

Os animais de números LW 271 (TAB. VIII) e LW 255 (TAB. IX) foram considerados imunes, devido ao fato que o pique térmico acima de 41,1°C veio sem qualquer outra manifestação clínica e a normalização da temperatura foi bastante rápida, o que coloca-os em desacordo com a condição de susceptíveis. Entretanto, salienta-se que pelo EUA (1975), apenas os animais de números LW 248 (TAB. VII) e LW 287 (TAB. VIII) dos classificados como parcialmente imunes (PI) seriam classificados como susceptíveis, pois são os únicos a apresentarem temperaturas maiores do que 40,3°C, por um período acima de 24 horas.

Quanto à patogenicidade da amostra desafio usada notamos que, apesar dos animais controles não serem observados por sete dias como prevê o EUA (1975), de todos eles se isolou a amostra desafio (do sangue) durante o período de hipertermia, que em nenhum caso foi inferior a 41,6°C (TAB. VII, VIII e IX), acrescida ainda de sinais clínicos como prostração, anorexia e hiperemia cutânea.

5.3. Associação de vacinas

Associações de vacinas mostram ser viáveis em diversas circunstâncias (PETROV & BUT'YANOV, 1974; TERESZCZUK et alii, 1975).

O comportamento da associação de vacinas no estudo não deu problemas no que se refere ao grau de imunidade para peste suína clássica (TAB. II, X, XI e XII). Entretanto, o comportamento da amostra avirulenta de erisipela evidenciou uma atividade imunogênica discutível. Seria interessante ressaltar que a existência de apenas três pontos para a estimação da equação de regressão para a imunidade da

vacina de erisipela nos leitões, pode ter contribuído para a não existência de significância para o coeficiente de regressão linear (TAB. XV) bem como para estimar a duração da imunidade em 190 dias (GRAF. 1). ROSSI (1961) mostra que de 55 suínos vacinados com a amostra de erisipela avirulenta EVA, apenas 24 (43,8%) deles foram resistentes aos desafios 18, 24 e 53 dias mais tarde. ZUFFA et alii (1960), comparando o potencial imunizante das amostras EVA, AV/R9 e WR2 de erisipela, observaram que o poder imunizante da WR2 foi superior, podendo ser comparado ao das vacinas comerciais formolizadas. Entretanto, foi a única a produzir reação local média em pequena proporção de animais. O nível de imunidade atingido no nosso caso pode ter sido superior ao de ROSSI (1961), talvez devido ao sinergismo da associação com o vírus lapinizado, mostrado por KONOPATKIN (1969), ou outros fatores como ausência de formas dissociadas, maior título etc. No entanto, o uso de uma amostra como a WR2 poderia ter melhorado ainda mais nossos achados, já que esta é uma das amostras avirulentas de erisipela de melhor poder imunogênico (ZUFFA et alii, 1960; NOVÁK et alii, 1963; KONOPATKIN, 1969; ISOPESCU et alii, 1966).

KOVALENKO et alii (1976), usando uma vacina bivalente para erisipela e peste suína (vírus lapinizado) em um grupo de suínos mantidos por 10 dias sucessivos à temperaturas de 30 a 32°C, durante 8 horas por dia, e um grupo da mesma faixa etária, mantido à temperaturas de 14 a 18°C, observaram que os sintomas de erisipela foram presentes em suínos mantidos em altas temperaturas, quando mais tarde eram desafiados. Com isto notamos que, o índice de proteção conferido pela vacina de erisipela, no nosso caso, pode ter sofrido uma queda, devido ao fato da temperatura média local, nos dias de vacinação, estar na faixa dos 27°C.

Vacinação em dose única para erisipela suína, só deve ser usada onde a vida econômica do animal é curta (VALÉE, 1946). Portanto, uma alternativa para o nosso trabalho po-

deria ser a aplicação de um reforço para erisipela 20 dias mais tarde. Pois, segundo BUT'YANOV (1967), uma dose de reforço para erisipela numa vacina bivalente, contra erisipela e peste suína clássica, pode manter a atividade imunogênica da vacina por seis meses.

5.4. Época de vacinação

A imunidade passiva colostrar, no caso da vacina contra peste suína amostra chinesa, persiste até dois meses e a imunização antes desta época pode neutralizar parcial ou totalmente o vírus da vacina (COGGINS, 1964; AYNAUD et alii, 1973 e PRECAUSTA et alii, 1974).

Leitões com idade inferior a três meses parecem ter sua susceptibilidade para *E. rhusiopathiae* diminuída (POKORNÝ, 1946). Embora o mesmo não seja falado por JIRINA (1946).

O uso da nossa vacina, em leitões com idade igual ou maior que 71 dias, aproxima-se do preconizado em estudos feitos pelos autores acima mencionados, visando assim uma época ótima de vacinação de leitões contra as duas doenças.

5.5. Estabilidade da vacina

Apesar da vacina ser mantida por um prazo de 40 dias em refrigeração (4 a 8°C), seu poder protetor não parece ter sido prejudicado, já que KURAMASU et alii (1959) mantiveram a qualidade efetiva de uma cultura de *E. rhusiopathiae* atenuada por 12 meses, quando estocada em refrigeração após liofilização. E títulos de DI 50% (em coelhos) oscilando de $10^{3,2}$ a $10^{3,5}$ /dose vacinal foram encontrados por IÓPEZ (1973), mesmo quando o vírus amostra chinesa era mantido por 12 meses em refrigeração.

Vacinas bivalentes vivas para erisipela e peste suína podem manter sua potência por até seis meses à tempe-

raturas de 8 a 35°C, dependendo apenas do meio para liofilização e conservação (FENG et alii, 1963).

A liofilização da cultura de erisipela avirulenta com o vírus amostra chinesa evidenciou uma queda no número de *E. rhusiopathiae*. Esta queda, no nosso caso, pode ser atribuída à deficiência do estabilizador ou à simples associação com o vírus, como demonstrada por BURTSEV et alii (1977).

5.6. Inocuidade na gestação

Abortos podem ocorrer em porcas, quando a erisipela age sobre elas na forma de infecção (SAUNDERS, 1967 e KEMENES & SZÉKI, 1971). Entretanto, fêmeas vacinadas contra erisipela em todos os estágios da gestação, não tiveram seu potencial reprodutivo alterado (JIRINA, 1946).

BEKAERT & LEUNEN (1969) observaram que a vacina viva amostra chinesa não tem efeito nocivo em porcas gestantes e varrões, sendo as leitegadas normais, independente do estágio em que a matriz é vacinada, confirmando os estudos de PASSOS et alii (1968). Nossos achados coincidem com o dos autores acima citados, no tocante à vacinação de porcas gestantes. Os percentuais de natimortos, fetos mumificados e eliminados por debilidade foram semelhantes nos dois tratamentos (TAB. V e VI). Apesar de não ter sido feitos exames de imunofluorescência nos leitões natimortos, a patogenicidade residual parecia ausente, pois não se registrou nenhum caso de malformação congênita ou leitões com tremores, uma vez que a vacinação foi realizada na primeira metade da gestação. Isto confirma o trabalho de DINGELDEIN et alii (1974) que mostra a ausência de quadros patológicos, nos leitões de porcas vacinadas com a amostra chinesa, atribuídos à vacina. E ele mostra que os exames de imunofluorescência nos leitões natimortos ou que morriam foram negativos em 54 animais examinados.

A análise do tamanho e peso da leitegada ao nascer pelo teste "F" não mostrou diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% (TAB. XIII e XIV). O período médio da gestação foi de 114,6 dias nas vacinadas, contra 114,2 dias nas controles.

A matriz do grupo controle LW 454 (TAB. V) foi retirada do teste por ter produzido apenas um leitão e este, por sua vez, influenciaria muito na análise estatística do grupo.

6. CONCLUSÕES

1) A técnica usada para o preparo da vacina foi satisfatória quanto aos títulos do vírus e da bactéria, após o processo de liofilização, apesar da queda na concentração de erisipelas.

2) Não se registrou nos animais vacinados qualquer alteração que pudesse ser atribuída a efeitos colaterais da vacina.

3) A imunidade obtida pelo vírus lapinizado a amostra chinesa não pareceu alterada pela associação com a amostra de erisipela avirulenta.

4) As culturas de *E. rhusiopathiae*, utilizadas para associação com o vírus de peste suína, devem estar na fase logarítmica de crescimento.

5) No caso de animais com grande susceptibilidade para erisipela, como os do teste, desafios menores que os utilizados dariam melhores índices de proteção aos animais. Mostrando assim que, a nível de campo, a proteção conferida provavelmente seria maior e mais duradoura.

6) A vacina revelou-se completamente inócua, quando aplicada em porcas gestantes no período de 28 a 57 dias

de gestação. A presença de leitões natimortos e fetos mumificados foram semelhantes nos grupos vacinados e controles. Não houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre matrizes vacinadas e matrizes controles, no que diz respeito ao número de leitões nascidos vivos e peso da leitegada ao nascer.

7) O uso do mesmo animal para o desafio de erisipela e peste suína clássica, consecutivamente, mostra que não há interferência na imunidade da peste suína, quando os animais são desafiados previamente contra erisipela.

8) O curto período de imunidade proporcionado pela amostra de *E. rhusiopathiae* avirulenta, neste trabalho, limita o uso da vacina apenas aos leitões destinados ao abate, já que estes têm curto ciclo de vida e não necessitam revacinações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AAMDAL, J. Abortion in sows. Acta Vet. Scand., Copenhagen, 11(3):390-3, 1970.
2. ANDO, K. & NAKAMURA, H. Supplementary studies on swine erysipelas living vaccines. II. Experiments lyophilization of the vaccine. Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth., Tokyo, 34:1-10, 1958 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 29(6):1681, 1959.
3. AYNAUD, J.M.; GORTHIÉ, G.; LUDE, H. Influence de l'immunité passive transmise par le colostrum sur l'évolution de la peste porcine classique chez le porcelet. Ann. Rech. Vet., Paris, 4(3):359-69, 1973.
4. BARTH, R. & JAEGER, O. Determination of the virus content of the blood and organs of rabbits infected with lapinized swine fever virus. Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr., Hamburg, 87(2):31-2, 1974 (abstract).
5. BEKAERT, H. & LEUNEN, J. Le vaccine vivant atténué contre la peste porcine "souche chinoise". Bull. Off. Int. Epizoot., Paris, 72:705-15, 1969.
6. BODEN, W. Selection of suspending fluids for freeze dried *Brucella abortus* B-19 and *Erysipelothrix insidiosa* vaccines. Monatsh. Veterinaermed., Jena, 22:382-7, 1967 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 38(5):2083, 1968.

7. BOGNÁR, K. & MÉSZÁROS, J. Immunogenicity of lapinized swine fever viruses. I. Chinese strain. Állatgyóg. Oltóanyag. Int. Evkönyv. 1952-1962, Hungary: 123-30, 1962 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 33(6), 1983, 1963.
8. BOGNÁR, K. & MÉSZÁROS, J. Chinese strain of lapinized swine fever virus. Magy Állatorv. Lapja, Budapest (18) :69-74, 1963 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 33(10) : 3528, 1963.
9. BRAN, L.; MIHAITA, S.; POPA, M.; TOTORCEA, N.; ALBU, T. Sur la stabilité de quelques caractères biologiques de la souche C du virus lapinisé de la Peste porcine. Bull. Off. Int. Epizoot., Paris, 66(1):681-93, 1966.
10. BRASIL, Leis, Decretos etc. Portaria Ministerial de nº 190 21 dez. 1978. Normas para produção, controle e emprego de vacina contra a Peste Suína Clássica. Diário Oficial, Brasília, 22 jan. 1979. p.1052-55.
11. BURTSEV, V.I.; IZOTOVA, N.A.; KUSHNIR, A.T.; BONDARENKO, I.M. Interactions between vaccines used for simultaneous immunization of swine (against erysipelas, swine fever and Aujeszky's disease). Veterinariya, Moscow, (1): 51-4, 1977 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 47(8):4466, 1977.
12. BUT'YANOV, D.D. Efficacy of combined immunization against swine fever and erysipelas. Vestsi. Akad. Navuk. Bssr., URSS, 2:114-7, 1967 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 38(5):1871, 1968.
13. CARVALHO, E.C.Q.; CARNEIRO, G.M.; FREITAS, M.A.Q.; PIRES, A.R.; MENEZES, M.B.; MAGALHÃES, H. Ruiva dos porcos no norte de Minas. I- Observações anatomo-patológicas. II- Isolamento da *E. insidiosa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 15º, Rio de Janeiro, 1976. p. 87.
14. COGGINS, L. Effect of colostral antibody on active hog cholera immunization. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 25(106):613-7, 1964.

15. DINGELDEIN, W.; BECKER, W.; FORSTER, V.; MANZ, D.; MARKS, M.; TIEFENBACH, B.; WACHENDORFER, G. The use of hog cholera live vaccine "Suiferin C" in breeding stock swine herd. In: INTERNATIONAL CONGRESS. INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 3., Lyon, 1974. HC-17 p.1-9.
16. DUNNE, H.W. Hog Cholera. In: _____ & LEMAN, A.D. eds. Disease of Swine. 4.ed. Ames, The Iowa University Press, 1975. p.189-255.
17. EUA, Leis, Decretos etc. Code of Federal Regulations. Washington, D.C., U.S. Government Printing Office, 1975. pt., § 113.104e.
18. EWALD, F.W. Dissociation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* III. Virulence of dissociated bacilli. Mh. Tierheilk., Germany, 14 260-7, 1962 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 33(3):749, 1963.
19. FENG, C.C.; CHENG, C.T.; WANG, M.C. Studies on a mixed bivalent lyophilized vaccine for active immunization against swine erysipelas and swine fever. Acta Vet. Zootech. Sin., China, 6:173-80, 1963 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 34(6):2055, 1964.
20. FLORENT, A.; THOMAS, J.; LEUNEN, J. Contrôle des vaccines vivants contre la Peste Porcine. Intérêt de l'immuno-dépression pour la mise en evidence de la virulence. Bull. Off. Int. Epizoot., Paris, 72(1):665-9, 1969.
21. FORTNER, J. & DINTER, Z. Z. Infektionskr. Haustiere, Germany, 60:157, 1944 apud ZUFFA, A.; ZAK, O.; POLAK, L. Combined vaccination against infectious disease of pigs. II- Simultaneous vaccination against Aujeszky's disease and swine erysipelas with live vaccines. Bull. Off. Int. Epizoot., Paris, 67:577-95, 1967.
22. FREITAS, M.A.Q.; TORTELLY, R.; CARVALHO, E.C.; CRUZ, J.B.; MENEZES, M.B. Ruiva dos porcos no Estado do Rio de Janeiro. I- Observações anátomo-patológicas. II- Isolamento da *E. insidiosa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 15º, Rio de Janeiro, 1976. p.90.

23. GOCHENOUR, R.B. & YOTTER, E.S. The stability of *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine (desiccated). Vet. Med., Bonner Springs, 47(1):27 e 30, 1952 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 22:925, 1952.
24. GRABELL, I.; HANSEN, H.J.; OLSON, S.E.; ORSTADIUS, K.; THAL, E. Discospondylitis and arthrits in swine erysipelas. Acta Vet. Scand., Copenhagen, 3(1):33-50, 1962.
25. ISOPESCU, I.; MIHĂITĂ, S.; TIGĂERU, N.; JITARU, N.; DUMITRESCUMÎNDRAS, T.; ALEXANDRU, N. On the possibility of simultaneous immunization of pigs with erysipelas and lapinized swine fever vaccines. Lucr. Inst. Cercet. Vet. Bioprep. Pasteur, Bucharest, 5:101-12, 1966.
26. JAEGER, O. & BARTH, R. Efficacy testing of a swine fever vaccine, suiferin C by hypertermia test in rabbits. Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr., Hamburg, 86(19):371-4, 1973, (abstract).
27. JIRINA, K. Active immunization of piglets against swine erysipelas. Cas. Cesk. Vet., Czechoslovakia, 1:266, 1946 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 17:2462, 1947.
28. KEMENES, F. & SZÉKI, A. Contribution to diagnosis of infectious swine abortion. Zentralbl. Veterinaermed. ReiheB, Hamburg, 18(2):170-6, 1971.
29. KOBUZIEWICZ, T. L'immunization contre le rouget du porc avec le vaccin unique selon Staub. Bull. Off. Int. Epizoot., Paris, 38:150-61, 1952.
30. KONOPATKIN, A.A. Plasma-cell reaction and immunological criteria during single or combined vaccination against swine fever and erysipelas. Dokl. Vses. Akad. Sel-Khoz. Nauk., U.R.S.S., 5:36-7, 1969 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 39(11):4625, 1969.
31. KOVALENKO, Y.A.R.; FESENKO, I.D.; BONDARENKO, V.Z. Strength and duration of post vaccinal immunity (to swine fever and erysipelas) in pigs kept at a high environmental temperature. Dokl. Vses. Akad. S. KH.

- Nauk., U R S S , 2:36-9, 1976 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 46(7):3972, 1976.
32. KURAMASU, S.; TAKAMATSU, Y.; ZAIZEN, K. Studies on freeze-drying of swine Erysipelas live vaccine. NIBS Bull. Biol. Res., Tokyo, 4:77-91, 1959.
33. LAWSON, K.F.; PEPEVNAK, F.; WALKER, V.C.R.; CRAWLEY, J. F. Vaccination of swine with erysipelas (live culture-modified) by the oral route. Can. Vet. J., Ottawa , 7:13-7, 1966.
34. LYRA, T.M.P. Peste suína clássica: Estudo comparativo da vacina inativada (cristal violeta) e viva (amostra chinesa), Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1979. 82p. (Tese, Mestre em Medicina Veterinária).
35. LÓPEZ, L.G.P. Vacuna lapinizada contra la peste porcina classica "cepa china". In: CONGRESSO PANAMERICANO DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA, 7, Bogota, 1973. p.1-12.
36. MACIAK, T. The effect of "Rovac" Lapinized swine fever virus on animals infected or immunized with swine erysipelas bacteria. Arch. Exp. Veterinaermed., Stuttgart, 23:201-26, 1969 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 39(11):4626, 1969.
37. MELO, T. & SOUZA, M.A. O bacilo da Ruiva dos porcos ; sua constatação no Brasil. Rev. Zoot. Vet., Rio de Janeiro, 17(1):41-7, 1931.
38. MIHAITA, S.; TORTOCEA, N.; POPA, M.; ALBU, T. Recherches sur la persistance du virus suipestique lapinisé "C" dans l'organisme des porcs vaccines. Bull. Off. Int. Epizoot., Paris, 72(1):885-97, 1969.
39. NEDELICIV, D.; I.SUHACI, C.; VIOR, C.; POPA, M.; DRĂGHICI, D.; SEVCIUC, P.; POTECEA, E.; BĂRNAURE, G H.; STĂNUICĂ, D.; DUMITRESCU, T. Research upon the feasibility of associated vaccination in pigs against the Aujeszky's disease, hog-cholera and swine erysipelas. Lucr. Inst.

- Cercet. Vet. Bioprep. Pasteur, Bucharest, 13:29-41, 1977.
40. NOVÁK, Z.; ZUFFA, A.; ZAMĚČNIK, A. Duration of immunity after single inoculation of live avirulent swine erysipelas vaccine. Vet. Med., Prague, 8:173-6, 1963 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 33(11):3811, 1963.
41. OSE, E.E.; BARNES, L.E.; BERKMAN, R.N. Experimental evaluation of an avirulent oral erysipelas vaccine. J. Am. Vet. Med. Ass., Schaumburg, 143(10):1084-9, 1963.
42. PASSOS, J.J.; TOZZINE, F.; BOGADO, S.C. Experiência de vacinação de suínos com vírus vivo modificado cepa chinesa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 11º & CONGRESSO FLUMINENSE DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1, Niterói, 1968. Anais. Niterói, 1968. v.1, p.218-26.
43. PASTEUR, L. & THUILLIER, M.L. La vaccination du rouget des porcs à l'aide du virus mortel atténué de cette maladie. Comp. rend. Acad. Sci., Paris, 97:1163, 1883 apud LAWSON, K.F.; WALKER, V.C.R.; CRAWLEY, J.F. Modified swine Erysipelas vaccine. Can. J. Comp. Med., Ottawa, 22(5):164-74, 1958.
44. PETROV, V.F. & BUT'YANOV, D.D. A single vaccination to protect pigs against several infections. Veterinaryia, Moscow, 11:66-8, 1974 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 45(5):2614, 1975.
45. POKORNÝ, V. Active immunization of piglets against swine erysipelas. Cas. Cesk. Vet., Czechoslovakia, 1:109-15, 1946 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 19:638, 1949.
46. PRECAUSTA, P.; BRUN, A.; KATO, F. Classical swine fever vaccine prepared with the chinese strain CL. I- Safety tests. II- Potency tests. In: INTERNATIONAL CONGRESS. INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 3, Lyon, 1974. p.12-4.
47. REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty cent end points. Am. J. Hyg., Baltimore, 27(3):493-7, 1938.

48. REIS, R.; RESENDE, M.; NASCIMENTO, E.F. Doenças do suíno em Minas Gerais. II- Ocorrência de erisipela suína. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 15º, Rio de Janeiro, 1976. p.91.
49. REIS, R.; RESENDE, M.; NASCIMENTO, E.F. Doenças do suíno em Minas Gerais. III- Ocorrência e controle da erisipela suína. Arq. Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 29(2):203-10, 1977.
50. ROSSI, L. Immunizing property of an avirulent strain of swine erysipelas bacillus. Vet. Cas., Kosice, 10:122-7, 1961 apud Vet. Bull., Farnhan Royal, 31(8) : 2428, 1961.
51. ROWSELL, H.C. *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in joints from market hogs in Canada. J. Am. Vet. Med. Ass., Schaumburg, 132(2):369-73, 1958.
52. SANDSTEDT, H. & SWAHN, O. Inoculation of piglets with avirulent erysipelas vaccine. Skand. Vet. Tidskr., Sweden, 37:85-94, 1947 apud Vet. Bull., Farnhan Royal, 20 : 1969, 1950
53. SAUNDERS, C.N. Abortions, stillbirths and congenital abnormalities. Vet. Rec., London, 80(25):XV-XVI, 1967.
54. SIMEONOV, S.; MERMERSKI, K.; STOEVI, I.; PETROV, P.; VASILEV, V.; IOTOV, M.; DIMITROV, K. Preparation of lyophilized trivalent, live vaccine against swine fever, Aujeszky's disease and erysipelas in pigs. Nauchn. Tr. Nauchno-Issled. Inst. Immunoprofilaktiki Bolezni Svinei, Vratsa, 3:11-8, 1974 apud Vet. Bull., Farnhan Royal, 48(4): 2237, 1978.
55. SNEDECOR, G.W. & COHRAN, W.G. Statistical Methods. 6ed. Ames, The Iowa State University Press, 1967, 593p.
56. STAUB, A. Nouvelle formule de vaccination contre le rouget du porc. Bull. Acad. Vet. Fr., Paris, 13:103-4, 1940.
57. TERESZCZUC, S.; WASIŃSKA, B.; WASIŃKI, K. Examination on the simultaneous vaccination of pigs against hog-cholera,

- swine erysipelas and colibacteriosis. Med. Vet., Warsaw, 31(3):131-4, 1975.
58. VALÉE, M. Sur la vaccination active du porc contre le rouget. Bull. Acad. Vet. Fr., Paris, 19(6):187-9, 1946.
59. WOOD, R.L. & SHUMAN, R.D. Swine erysipelas. In: DUNNE, H.W. & LEMAN, A.D. eds. Disease of swine. 4.ed. Ames, The Iowa University Press, 1975. p 565-620.
60. YORK, C.J. Modified hog-cholera viruses. In: SYMPOSIUM ON HOG CHOLERA, University of Minnesota, 1961. Proceedings. p.149-52 apud DUNNE, H.W. Hog cholera (European Swine Fever). Adv. Vet. Sci. Comp. Med., New York, 17:315-59, 1973.
61. ZUFFA, A.; NOVÁK, Z.; RAJTAR, V. Comparative evaluation of live avirulent and killed adsorbed swine erysipelas vaccines. Vet. Cas., Kosice, 9:447-61, 1960 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 31(4):1006, 1961.