

Universidade Federal de Minas Gerais

Conselho de Pós-Graduação

Escola de Veterinária



AVALIAÇÃO DE BACTERINAS E VACINA VIVA AVIRULENTA DE
ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE ATRAVÉS DO TESTE DE
POTÊNCIA EM CAMUNDONGOS

Karin Birgit Bottger

Beio Horizonte

Minas Gerais

1981

Karin Birgit Boettger



AVALIAÇÃO DE BACTERINAS E VACINA VIVA AVIRULENTA DE
ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE ATRAVÉS DO TESTE DE
POTENCIA EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada à Escola de
Veterinária da Universidade
Federal de Minas Gerais, co
mo requisito parcial para ob
tenção do grau de Mestre em
Medicina Veterinária.

Área : Medicina Veterinária
Preventiva

Belo Horizonte

Minas Gerais

1981



MV-00007117-5

FICHA CATALOGRÁFICA

Boettger, Karin Birgit, 1949-

B673a Avaliação de bacterinas e vacina viva avirulenta de Erysipelothrix rhusiopathiae através do teste de potencia em camundongos. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1981.
50 p. ilustr.

Tese, Mestre em Medicina Veterinária

1. Vacina - Erysipelothrix rhusiopathiae. 2. Bacterinas - Erysipelothrix rhusiopathiae. 3. Teste de potência - Camundongos . I. Título.

CDD - 615 372

Tese aprovada em : 31/07/1981

Ronaldo Reis

Prof. RONALDO REIS
- Orientador -

Jose Divino Lima

Prof. JOSÉ DIVINO LIMA

Romulo Cerqueira Leite

Prof. ROMULO CERQUEIRA LEITE

À memória de
José Antonio Morales Smith

Este trabalho foi realizado em Belo Horizonte - Minas Gerais, com suporte financeiro e material das seguintes instituições :

- Conselho Nacional de Pesquisas ;
- Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária Preventiva (FEP - MVP) ;
- FUNTEC ;
- Laboratório Hertape S.A.;
- Setor de Biotério do Ministério da Agricultura .

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela educação e formação intelectuais.

Ao professor Ronaldo Reis, pela orientação segura, exemplo como profissional e convívio agradável nestes longos anos.

Aos meus amigos e colegas Romulo Cerqueira Leite e José Divino Lima, pelo apoio, estímulo e, principalmente, pela enorme amizade.

As funcionárias Marília da Conceição Nogueira e Olívia Moreira, pela incansável ajuda na realização deste trabalho.

Ao Ministério da Agricultura, na pessoa do Dr. Antonio Gomes da Silva, pelo fornecimento de camundongos.

Aos professores, colegas do curso de pós-graduação funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas e à FUNTEC, pelas bolsas de estudo concedidas.

Aos meus colegas do ICB - UFMG, pelo apoio moral.

RESUMO

Doze amostras de *E. rhusiopathiae*, isoladas no Estado de Minas Gerais e seis de referência foram estudadas segundo o crescimento em quatro meios de cultura. O meio que proporcionou maior crescimento da maioria das amostras continha 3,7 % de infusão de cérebro e coração, 0,1 % de Tween 80, 0,5 % de extrato de levedura, 0,0004 % de triptofano e 10 % de soro equino, incubado a 37 °C por 24 horas e concentrado com 0,18 % de carboxi-metil-celulose.

Foram produzidas 16 bacterinas com as amostras AV, BC, BM, CB, CN5486, IB, LR, LV, NF4, OP, PA, PM, PT, RE, SE-9 e S-192, inoculadas em quatro meios de cultura. Utilizou-se duas amostras de referência : uma (EVA), para produção de vacina viva avirulenta e outra (WB) utilizada para desafio.

Através de testes de potência em camundongos, observou-se maior proteção com a vacina viva avirulenta e bacterinas produzidas no meio descrito acima. A vacina viva avirulenta foi capaz de proteger 100 % dos animais desafiados com amostra virulenta, enquanto que as bacterinas não forneceram resultados satisfatórios (10 protegeram menos que 50 % e uma protegeu 56,2 % dos camundongos desafiados).

Duas vacinas comerciais e uma de referência, utilizadas para comparação, também forneceram resultados satisfatórios. A vacina de referência protegeu 81,2 e 68,7 % dos camundongos desafiados. Das vacinas comerciais, uma protegeu 81,2 e 93,7 % e a outra, 68,7 % dos camundongos desafiados.

SUMÁRIO

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	05
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

A erisipela suína, também conhecida como ruiva, é doença infecto-contagiosa causada pelo Erysipelothrix rhusiopathiae, um bacilo curto, reto ou ligeiramente curvo, GRAM positivo, imóvel e sem esporos, isolado por PASTEUR & THUILLIER em 1892. Sobrevive por longos períodos em carne em decomposição e na água, sendo resistente a processos de conservação tais como salga e defumação. É considerado por muitos como sendo saprófita, com capacidade de viver e de se multiplicar em solos alcalinos quentes e ricos em humus (GALLOWAY, 1974). Acomete suínos de todas as idades, apresentando-se sob forma septicêmica aguda, evidenciada por lesões cardíacas; sob forma de poliartrite, afetando geralmente articulações dos membros e sob forma cutânea ou de urticária, geralmente encontrada em associação com lesões internas, evidenciada pelo aparecimento de manchas vermelhas, encontradas principalmente no abdomen e que podem evoluir para necrose e feridas de extensões variáveis (BRUNER & GILLESPIE, 1961). O E. rhusiopathiae tem sido isolado de cordeiros e bezerros com poliartrites, de patos e perus com infecções septicêmicas agudas, de camundongos selvagens e de laboratório, de amígdalas e membranas mucosas de suínos aparentemente normais, de tecidos de animais e plantas em decomposição, da superfície corporal de peixes de água doce e salgada e de lesões supurativas no erisipeloide do homem (BRUNER & GILLES

PIE, 1961).

A erisipela suína é doença de distribuição universal, sendo reconhecida como causa de sérias perdas em suínos na Europa, Ásia e América do Norte (SHUMAN, 1965). Estima-se em 33 milhões de doses a produção de bacterina por 22 laboratórios dos Estados Unidos em 1970, no valor de dois milhões de dólares (OSE, 1972).

No Brasil, a literatura a respeito é muito escassa. O primeiro isolamento do E. rhusiopathiae foi feito por MELLO & SOUZA (1931) em material de um suíno importado dos Estados Unidos. Em 1956, CROCCO detalha lesões cutâneas e de válvulas cardíacas em achados na rotina de inspeção de carnes, sendo confirmada a presença de E. rhusiopathiae neste material por ALBUQUERQUE (1956). Em 1958, DIAS & SILVA apresentaram um método de diferenciação entre Listeria monocytogenes e E. rhusiopathiae através do trifeniltetrazólio, aos microscópios óptico e eletrônico. CASTRO et alii (1963) isolaram duas amostras de E. rhusiopathiae de 175 amígdalas de suínos aparentemente normais, provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo e abatidos em matadouro no Estado de São Paulo. TROISE et alii (1963) fizeram observações sobre a ruiva dos porcos no sentido de alertar para a possibilidade de infecção inaparente em suínos do Estado de São Paulo. CASTRO et alii (1970 e 1972) isolaram 73 amostras de E. rhusiopathiae de amígdalas de suínos aparentemente normais e 29 da superfície corporal de peixes e as tipificaram, encontrando, além dos tipos sorológicos já descritos, três novos tipos, pela técnica de imunodifusão, propondo para estes as denominações I, J e K. Além disto, estudaram as amostras quanto às características bioquímicas, sorológicas, provas de patogenicidade para animais de laboratório e sensibilidade a drogas. CARVALHO et alii (1976), REIS et alii (1976) e FREITAS et alii (1976) comunicaram surtos da doença nos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, durante o XV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. REIS et alii (1977)

identificaram dez surtos de erisipela suína no Estado de Minas Gerais, ocorrendo as formas septicêmica e de poliartrite e elaboraram bacterinas autóctones experimentais, utilizadas com sucesso no controle da doença. ARAÚJO (1979) preparou um antígeno aglutinante a partir de amostra padrão de E. rhusiopathiae, utilizando-o em levantamento sorológico preliminar efetuado em amostras de soros de suínos não vacinados no Estado de Minas Gerais. SILVA (1980) testou uma vacina bivalente viva contra a peste suína clássica (amostra chinesa) e erisipela suína (amostra avirulenta) em leitões, verificando que a imunidade contra erisipela aos 21, 56 e 89 dias após a vacinação foi de 80%, 50% e 50%, respectivamente.

Analisando o que foi exposto, verifica-se no Brasil um número crescente de casos de erisipela suína nos últimos cinco anos e maior preocupação em estudos no assunto. Não existem levantamentos estatísticos que demonstrem a importância da doença em nosso meio, mas REIS et alii (1977) estimaram prejuízos de mais de um milhão de cruzeiros num período de dois anos, no Estado de Minas Gerais.

A vacinação tem sido adotada mundialmente como medida profilática da erisipela suína. Existem cinco produtos imunizantes diferentes utilizados na profilaxia da doença: vacina viva avirulenta injetável, vacina viva avirulenta oral, vacina viva modificada injetável, bacterina e antisoro.

Nos Estados Unidos utilizam-se os cinco produtos, verificando-se que no ano de 1973, 18 laboratórios produziram bacterinas num total de 262 séries e um total de 36 milhões de doses (BAIREY & VOGEL, 1973). Na Europa também são utilizados os cinco tipos de imunização contra a erisipela suína (MANNINGER, 1951; FLÜCKIGER, 1952 e DEMNITZ, 1952). Vacinas avirulentas são utilizadas na Polônia, Rumania, União Soviética e República Democrática Alemã e vacinas formolizadas são também utilizadas na União Soviética (FECHNER, 1966).

Considerando o crescente problema da doença no Brasil, a existência de animais portadores sãos, a existência

ainda de criações de suínos em condições precárias de manejo, o que facilitaria o aparecimento da doença por qualquer fator "stress" e a possibilidade de aparecimento de erisipela em bezerros nas criações em promiscuidade com suínos, tornam-se necessários estudos no sentido de produção de vacinas de uso comercial para a profilaxia da doença.

O presente trabalho visa avaliar a capacidade imunogenica de bacterinas produzidas com amostras autóctones de E. rhusiopathiae isoladas no Estado de Minas Gerais, através do teste de potência em camundongos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

MELLO & SOUZA (1931) isolaram o *E. rhusiopathiae* de material colhido de um porco importado dos Estados Unidos que morreu durante a viagem e que apresentava lesões nas válvulas cardíacas. O germe foi identificado através de provas culturais e bioquímicas e de inoculação experimental em animais, verificando ser ele altamente virulento para camundongo, pombo, coelho e pardal. Os autores conseguiram imunizar pombos inoculando culturas do germe isolado misturado com soro anti-erisipela proveniente da Europa.

DEEM (1936), procurando um meio ideal para preparação de antígeno para testes de hemoaglutinação, encontrou que a adição de triptofano e extrato seco de levedura ao caldo de carne aceleravam o crescimento de bactérias com um mínimo de floculação.

TRAUB (1949) foi o primeiro que produziu bacterina adsorvida em hidróxido de alumínio e morta pelo formol, a partir de culturas em meio líquido com bom desenvolvimento e cuja turvação foi controlada pelo colorímetro de Lange. Utilizou amostras tidas por ele como antigenicamente boas, verificando por testes de precipitação que as amostras eram de tres tipos sorológicos diferentes, identificados como A, B e N. Encontrou que apenas, mas nem todas, as do grupo B são próprias para produção de vacinas. Estas formam antígenos solúveis no líquido sobrenadante, importante fator imunogenico.

Empregou em suínos aquelas vacinas que protegeram camundongos de quatro a cinco semanas de idade após inoculação única por via subcutânea de 0,2 ml da vacina diluída a 1:64 e 1:256. Um volume de 0,2 ml desta vacina foi capaz de proteger contra 1000 doses letais.

STEFFEN (1951) encontrou que o maior número de organismos atenuados pode ser produzido por cultura de 24 horas em caldo de carne de cavalo adicionado de 1 % de peptona e 0,1 % de glicose, em pH 7,6. Inoculando camundongos, ele verificou que a dose letal mínima era de quatro organismos virulentos. Camundongos que receberam 100 organismos atenuados, por via subcutânea, adquiriram imunidade de curta duração em duas semanas.

GLEDHILL (1952) preparou bacterinas e verificou proteção de 50 % dos camundongos frente a 1000 doses letais. Verificou que duas de 11 amostras forneceram vacinas altamente potentes e ainda, que a presença de soro no meio aumenta a potência das vacinas.

KATITCH (1952) estudou duas amostras de E. rhusiopathiae, cultivando-as segundo métodos descritos por MUROMCEV (1948) e TRAUB (1949). O método de MUROMCEV determinou que a amostra fosse cultivada por seis dias a 34-35 °C, adicionada de 0,3-0,4 % de formol e incubada em estufa por 48 horas. Pelo método de TRAUB, a amostra, de propriedades antigênicas marcadas era cultivada em caldo e adsorvida em solução de alúmen de potássio. O precipitado era centrifugado e o novo precipitado era diluído com caldo de cultura de 48 horas e adicionado de 0,4 % de formol. Estas duas vacinas foram inoculadas em camundongos na dose de 0,2 ml com vacina não diluída e diluída a 1/4. Os animais foram desafiados 20 dias após com 100 doses mínimas letais. Todos os camundongos inoculados com a vacina preparada segundo a técnica de MUROMCEV morreram; nos camundongos inoculados com vacina segundo TRAUB houve proteção de 19 em 20 vacinados com vacina não diluída e de quatro em 20 vacinados com vacina diluída a 1/4.

SHUMAN (1954) conduziu testes em camundongos com

duas séries de bacterinas de dois laboratórios, inoculando 0,2 ml de bacterina concentrada e em diluições seriadas de 1:2 até 1:64, usando dez camundongos por diluição. Todos os camundongos foram desafiados tres semanas após, com cultura não diluída e cultura diluída a 10^{-3} (200 DL50), via subcutanea, na dose de 0,1 ml. Camundongos desafiados com cultura não diluída tiveram 100 % de proteção nos grupos vacinados com bacterina diluída de 1:2 a 1:16. Houve 70 % de sobreviventes no grupo 1:32 e 50 % no grupo 1:64. Os camundongos desafiados com cultura diluída apresentaram 100% de proteção nas diluições 1:8 e 1:32 e 90 % na diluição 1:64 de uma das bacterinas e 100 % de proteção nas diluições 1:2 e 1:4; 90 % nas diluições 1:8 e 1:16; 66,6 % na diluição 1:32 e 30 % na diluição final de 1:64 da outra bacterina.

GRAY & NORDEN (1955) desenvolveram uma vacina com amostra avirulenta de E. rhusiopathiae. Esta amostra é inteiramente avirulenta para camundongos, cobaios, pombos, porcos, perus e homem. Pode ser usada com ou sem administração simultanea de soro suíno anti-erisipela. Um dos testes da vacina foi feito em camundongos inoculados por via subcutanea com quantidades variáveis de cultura, variando de 0,05 a 0,5 ml e todos os animais permaneceram sãos. A intervalos de 14 a 30 dias, os animais vacinados e os controles foram desafiados por via subcutanea com 0,1 ml de cultura virulenta de erisipela capaz de matar camundongos em 72 a 96 horas. Todos os animais vacinados sobreviveram e todos os controles morreram.

ALBUQUERQUE (1956) relata sobre o primeiro isolamento de E. rhusiopathiae feito no Estado do Rio Grande do Sul, a partir de material suíno colhido em matadouro. O germe foi submetido a provas culturais e bioquímicas; a inoculação pelas vias subcutanea, intramuscular e intraperitoneal em camundongos, por via intramuscular em pombos e intramuscular e subcutanea em cobaios. Foi possível reisolar o germe de camundongos e de pombos inoculados por todas as vias, mas não de cobaios.

MARTINEZ (1958) comparou 20 bacterinas e sete vacinas vivas avirulentas utilizadas no mercado espanhol quanto ao índice de proteção em camundongos, determinado com base na diluição que protege 50 % dos camundongos vacinados, de acordo com o método de REED & MUENCH (1938). Os animais foram desafiados com 1000 doses letais de cultura de E. rhusiopathiae. Como não dispunha de bacterina de referência, utilizou inoculação de soro de referência contra erisipela, com cultura virulenta, em diluições seriadas múltiplas de tres. Avaliou seus resultados de acordo com normas do Bureau of Animal Industry dos Estados Unidos (1953) e calculou para cada tipo de vacina estudada o número de doses letais com o título da diluição obtida. Verificou que nem todas as amostras se prestam para produção de bacterinas ou vacinas vivas avirulentas e que as vacinas avirulentas vivas eram mais eficazes do que as bacterinas.

ANDO et alii (1959) conseguiram acelerar o crescimento bacteriano adicionando Tween 80 aos meios de cultura.

WOOD(1959) vacinou suínos e camundongos com "pool" de bacterinas de referência produzidas com amostras de E. rhusiopathiae de sorotipo 2 e os desafiou com amostras patogênicas de sorotipos 1, 2, 4, 9, 10 e 11, na dose de $2,55 \times 10^5$ organismos, em camundongos e de $6,28 \times 10^4$ em suínos. Os camundongos foram imunes a quatro das amostras, as de sorotipos 1, 2, 4 e 11 e apenas 13 de 30 camundongos foram imunes à amostra de sorotipo 9 e sete de 30 à amostra de sorotipo 10. Todos os porcos foram imunes às amostras de sorotipos 1, 2, 4 e 11, dois de seis porcos foram imunes à amostra de sorotipo 9 e nenhum foi imune à amostra de sorotipo 10. Numa segunda etapa do experimento, suínos e camundongos foram vacinados com bacterinas feitas com as amostras de sorotipos 1, 2, 4, 9, 10 e 11, utilizadas na primeira etapa como desafio e os desafiaram com as mesmas amostras de sorotipos 1, 2, 4, 9, 10 e 11. Observou que a bacterina feita com a amostra desafio de sorotipo 10 induziu imunidade específica em suínos, mas não em camundongos. Bacterinas feitas com outras a-

mostras desafio induziram pouca ou nenhuma imunidade em suínos ou camundongos. O autor menciona que, apesar da imunidade adquirida poder ser quantitativa, as diferenças na suscetibilidade de animais inoculados podem ser devidas a variações antigenicas qualitativas entre bacterinas e amostras de safio, ou mesmo entre as próprias amostras desafio.

BECKER (1960) obteve o melhor desenvolvimento da atividade imunogenica das bactérias com adição de soro de cavalo aos meios de cultura.

KRAUSS et alii (1960) testaram duas vacinas avirulentas em camundongos e porcos e observaram que uma delas é altamente imunogenica para as duas espécies e a outra apenas para camundongos.

ZUFFA et alii (1960) testaram a capacidade imunogenica de tres amostras avirulentas de E. rhusiopathiae, incluindo a amostra de referênciã EVA e obtiveram imunidade satisfatória em camundongos, apesar de uma delas não proteger 10 a 20 % dos vacinados.

TRUSZCZYNSKI (1961) inoculou quatro amostras de E. rhusiopathiae mortas por formol, após concentraçãõ a 1/3 do volume original, em 20 camundongos, por via subcutanea. Após 14 dias, os animais foram desafiados com cinco a 10 DL50. Os camundongos desafiados morreram todos, exceto os de uma das amostras, onde 25 % dos animais foram protegidos. Em outra etapa do experimento, utilizou duas amostras vivas avirulentas de E. rhusiopathiae, diluindo-as de 10^{-2} a 10^{-7} e inoculou cada diluição em grupos de oito camundongos, por via subcutanea, na dose de 0,25 ml. Após 14 dias, os animais foram desafiados. De uma das amostras, todos os vacinados com cultura não diluída morreram, indicando que mesmo 61,8 milhões de organismos não foram suficientes para imunizar camundongos contra infecção com 0,2 ml de cultura diluída a 1:20. Com a outra amostra, verificou-se que 111 organismos foram suficientes para imunizar camundongos contra a mesma dose de safio.

HOCHSTEIN-MINTZEL (1965) produziu bacterina formo-

lizada e adsorvida em hidróxido de alumínio, a partir de cultura no seguinte meio : água peptonada com 5 % de extrato de fígado e 10 % de soro equino, ao qual adicionou 20 % de hidróxido de alumínio e 0,3 % de formol. Esta vacina foi titulada em camundongos usando 10^6 DL50, nas doses de 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125 e 0,00625 ml, verificando 85 % de sobreviventes vacinados com a dose de 0,1 ml. Imunizou camundongos no dia do nascimento e com dois dias de idade, com 0,05 ml da vacina não diluída e camundongos com quatro, seis, oito, dez e 12 dias de idade, com 0,1 ml da mesma vacina. Os animais foram desafiados com 0,2 ml de diluição 10^4 (10^4 DL50) após 28 e 59 dias, via intraperitoneal. Todos os controles não imunizados morreram e dentre os controles adultos imunizados houve proteção de 85 %. Valores semelhantes foram obtidos por animais imunizados ao 80 dia de vida; animais imunizados com quatro e seis dias de idade tiveram proteção de 70 e 66 %, respectivamente. Os vacinados neo-natais e com dois dias de idade tiveram proteção de 16 e 32 %, respectivamente.

FECHNER (1966) descreveu o preparo de bacterinas contra erisipela, utilizando amostras tipo B, selecionadas quanto a seu conteúdo antigenico e seu comportamento nos testes de hemoaglutinação e precipitação, mantidas liofilizadas. As amostras foram cultivadas em caldo de carne de cavalo, com 10 % de soro equino e 0,5 a 2 % de peptona, incubados a 37 ou 38,5 °C por 48 horas, acrescidas de 10 a 18 % de hidróxido de alumínio e mortas com 0,3 % de formalina. As vacinas foram deixadas em repouso por cinco a sete dias e a seguir, decantadas a 3/4 ou 4/5 de seu volume total.

WHITE & VERWEY (1970) prepararam um meio para produção de antígeno a partir de amostra avirulenta de E. rhusiopathiae, contendo água destilada a 70 °C, 10 g de peptona, 8 g de fosfato de sódio dibásico, 1 g de fosfato de potássio monobásico, 1 g de citrato de sódio, 0,2 g de sulfato de magnésio, 0,3 g de ácido tioglicólico, 8 g de extrato seco de levedura, 1 g de bile pó, 2 % de dextrose e 7,3 % de soro equino. Este meio foi incubado a 37 °C por 48 horas.

Após agitação com barra magnética e centrifugação, o líquido sobrenadante foi utilizado como antígeno com a finalidade de se verificar a presença de antígeno solúvel. Após adição de hidróxido de alumínio em tampão fosfato, fez inoculações em camundongos, obtendo os seguintes resultados : a inoculação de cultura inteira não diluída protegeu todos os camundongos vacinados ; inoculações de célula: proteção de todos os camundongos ; de líquido sobrenadante: seis em sete camundongos e de líquido sobrenadante filtrado : todos os camundongos.

CASTRO et alii (1972) estudaram 102 amostras de E. rhusiopathiae isoladas de amígdalas de suínos aparentemente normais (73 amostras) e da superfície corporal de peixes (29 amostras), quanto a características bioquímicas e culturais, tipificação, através de teste de imunodifusão, provas de patogenicidade em camundongos (via intraperitoneal e por escarificação) e pombos (via intramuscular) e sensibilidade a drogas. Além dos tipos sorológicos já existentes, os autores propuseram as denominações I, J e K para tres novos tipos encontrados. Os animais inoculados apresentaram sintomas característicos da doença e dos mortos isolou-se o germe.

OSE (1972) testou várias bacterinas comerciais através do teste de potência em suínos segundo as normas recomendadas pelo UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), tendo escolhido este teste por considerá-lo um meio efetivo para testar bacterinas contra erisipela, apesar da dificuldade encontrada para obter suínos comprovadamente suscetíveis para teste. Ele preferiu utilizar este teste ao alternativo em camundongos, por serem os suínos a quem se destinam as bacterinas.

BAIKEY (1972) e BAIKEY & VOGEL (1973) testaram 13 séries diferentes de bacterinas produzidas por sete laboratórios diferentes e as submeteram a testes de proteção em suínos e camundongos, de acordo com as normas do USDA. Todas as bacterinas produziram proteção satisfatória em suínos, mas em camundongos apenas sete das 13 séries foram satisfatórias.

havendo portanto, uma correlação de 53,8 % entre os dois testes. Os autores acreditam que a diferença de correlação no teste de potência em camundongos causa dúvidas sobre o significado do teste para avaliação de bacterinas de erisipela. Entretanto, devido à dificuldade e aos custos em se obter suínos suscetíveis à doença, continuaram o trabalho no sentido de desenvolverem um teste satisfatório para camundongos. Prepararam nova bacterina de referência, que foi avaliada em camundongos e suínos, incluíram a diluição 1:10 e testaram-na juntamente com quatro séries de bacterinas comerciais e conseguiram obter correlação entre os testes. Entretanto, esta nova técnica precisa ser retestada para avaliação de sua significância.

CARVALHO et alii (1976) identificaram um surto de erisipela suína no Estado de Minas Gerais, acometendo animais de diferentes faixas etárias, com predominância de adultos, observando mortalidade de 7,5 % e caráter agudo da doença. A identificação do agente etiológico foi feita através de características morfológicas, tintoriais, de motilidade, de provas bioquímicas e patogenicidade para animais de laboratório.

REIS et alii (1977) identificaram a erisipela suína em dez focos ocorridos em nove municípios do Estado de Minas Gerais e verificaram que em um foco a doença se apresentou sob forma de poliartrite em animais de três a seis meses de idade e nos demais houve septicemia aguda em matrizes e animais de reprodução. As amostras foram submetidas a provas culturais e bioquímicas, a testes de patogenicidade em camundongos e suínos e à identificação com anticorpos marcados (fluorescentes). Foram produzidas bacterinas autóctones concentradas e adsorvidas em hidróxido de alumínio, testadas segundo as exigências do USDA (1973) e aplicadas em animais aparentemente saudáveis, por via subcutânea, sendo três rebanhos com aplicação única e seis com duas aplicações intervaladas de duas a quatro semanas, proporcionando resultados satisfatórios no controle da doença.



SILVA (1980) preparou uma vacina bivalente contra erisipela suína e peste suína clássica, utilizando um meio de cultura para produção de vacina com amostra avirulenta de E. rhusiopathiae contendo 3,7 % de infusão de cérebro e coração, 0,5 % de extrato de levedura dessecado, 0,1 % de Tween 80, 0,0004 % de triptofano e 10 % de soro equino, em pH 7,6. A cultura foi incubada de 12 a 18 horas a 37 °C e concentrada com carboxi-metil-celulose (CMC) na concentração de 0,18%. Esta cultura continha $1,2 \times 10^{12}$ germes / ml e, após associação desta vacina com o vírus da peste suína e liofilização, o número de E. rhusiopathiae por ml caiu para $2,5 \times 10^9$. Os testes de potência desta vacina foram realizados em leitões, observando que a imunidade contra erisipela aos 21, 56 e 89 dias após vacinação foi de 80%, 50% e 50%, respectivamente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento das amostras

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 18 amostras de E. rhusiopathiae, sendo 12 isoladas no Estado de Minas Gerais e seis de referência.

As amostras autóctones foram todas isoladas de focos de doença ocorridos em 11 municípios do Estado de Minas Gerais, identificadas como : Alvinópolis (AV), Barbacena (BC), Campo Belo (CB), Governador Valadares (BM e LR), Igarapé (LV), Itabirito (IB), Ouro Preto (OP), Parã de Minas (PM), Patos de Minas (PT), Pedra do Anta (PA) e Rio Espera (RE). Estas amostras foram gentilmente cedidas por REIS et alii (1977), inclusive as amostras IB e LV, que foram isoladas posteriormente.

Dos 12 focos observou-se que em dez (AV, BC, BM, CB, IB, LR, OP, PA, PM e RE) a doença se apresentou sob forma septicêmica aguda, afetando animais de terminação e de reprodução. Constatou-se em alguns focos variações de 1 a 30 % na morbidade (AV: 15%; BC:10%; BM:6%; LR:5%; OP:10% ; PA: 1%; PM:25% e RE: 30%) e de 0,4 a 50 % na mortalidade (AV: 9%; BC: 4%; BM: 4%; CB: 0,4%; IB: 50 %; LR: 4 %; OP: 3 %; PA: 0,6 %; PM: 2,5% e RE: 15%). A letalidade foi de 100 % em animais não medicados com antibióticos.

Destes focos, a criação LR foi desativada por ini

ciativa do proprietário, em virtude do diagnóstico da doença.

No foco IB houve suspeita concomitante de peste suína africana, confirmada no laboratório do Ministério da Agricultura (MA). Entretanto, como nesta criação foi feita medicação com antibióticos (Penicilina-estreptomicina) e se verificou recuperação dos animais doentes medicados logo após o aparecimento dos sinais clínicos, nova remessa de material (soro e vísceras) foi feita ao laboratório, com resultado negativo para peste suína africana.

No foco LV a doença se apresentou também de forma septicêmica aguda, afetando, porém, animais de dois meses de idade. Neste rebanho houve também suspeita de peste suína africana, confirmada posteriormente no laboratório do MA, o que levou à depopulação total do rebanho.

No foco PT, a forma de apresentação da doença foi de poliartrite, afetando animais de três a seis meses de idade, havendo também histórico de aborto, observando-se 12 % de morbidade e 4 % de mortalidade.

Em todos os focos em que se observou a forma septicêmica aguda, colheu-se asepticamente fragmentos de baço e sangue por punção cardíaca e na forma de poliartrite colheu-se asepticamente exsudato sinovial. Este material foi semeado em caldo infusão de cérebro e coração (caldo 3C)* e caldo simples, em placas de agar sangue, Teague(EMB)* e agar infusão de cérebro e coração (agar 3C)*.

Os meios semeados foram incubados a 37 °C por 48 horas, examinando-se esfregaços de colônias corados pelo método de GRAM.

Foram feitos cortes de quatro μ m de espessura de amígdala, baço, cérebro e linfonódios em micrótomo de congelamento e corados por anticorpos marcados com isotiocianato de fluoresceína para peste suína clássica e erisipela.

As culturas obtidas foram submetidas às seguintes provas bioquímicas: reações de VM e VP; produção de nitratos, H₂S, indol e catalase; fermentação da glicose, galactose,

* Difco Laboratories - Detroit - Michigan - USA

lactose e levulose; acidez em leite tornassolado; motilidade e presença de esporos. Também foram submetidas a testes de patogenicidade em camundongos e suínos suscetíveis, feitos segundo a técnica de FORTNER & DINTER (1944) e de identificação por anticorpos fluorescentes, através de conjugados preparados com imunesoro contra amostra N de E. rhusiopathiae, recebido do " International Laboratory for Biological Standards" (ILBS), Weybridge, Inglaterra.

As seis amostras de referência (CN5486, EVA, NF4, S-192, SE-9 e WB) foram recebidas sob forma liofilizada, sendo a CN5486 do Wellcome Research Laboratories, Inglaterra, quatro do ILBS (NF4, S-192, SE-9 e WB) e uma do " Laboratório Norden " dos Estados Unidos (EVA). Estas amostras foram todas do tipo B. A amostra EVA é apatogênica para camundongos e foi utilizada como amostra vacinal viva. As amostras NF4 e S-192 são provenientes de material de suínos dos Estados Unidos e a amostra SE-9 é amostra vacinal originária da Alemanha.

As amostras isoladas, logo após a identificação, foram liofilizadas e mantidas a -20°C.

Todas as amostras liofilizadas de E. rhusiopathiae foram resuspensas em caldo simples, semeadas em tubos com caldo PPL0, incubadas a 37 °C por 24 horas e inoculadas em dois camundongos (exceto EVA) por via intraperitoneas, na dose de 0,5 ml, para sua ativação.

Os camundongos morreram, entre 48 e 72 horas, após apresentarem conjuntivite intensa, inapetência, incoordenação motora e prostração. Destes, colheu-se assepticamente sangue por punção cardíaca e semeou-se imediatamente placas de agar 3C. Estas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e examinadas ao microscópio estereoscópico para verificação do crescimento de colônias lisas, caracterizadas por tamanho pequeno, transparente, de contorno nítido e sem pigmentação. As colônias lisas típicas foram selecionadas e utilizadas na inoculação de tubos com caldo 3C e soro equino, que constituiu o inóculo do meio de produção.

Este procedimento foi seguido para cada partida de vacina produzida.

3.2. Meios de produção

Para a produção de bacterinas foram avaliados quatro meios de cultura líquidos no aspecto de crescimento e tempo de incubação. Prepararam-se vacinas de cada amostra estudada.

Os quatro meios de cultura, identificados por números, tinham a seguinte composição:

Meio I

caldo de carne de cavalo	1000 ml
peptona	10 g

O caldo de carne foi preparado por cozimento de carne de cavalo fresca e desprovida de gordura. Após adição de peptona, o meio foi autoclavado. Adicionou-se 10 % de soro equino esterilizado por filtração.

Meio II

caldo de carne de cavalo	1000 ml
Tween 80	1 ml

O caldo de carne de cavalo foi preparado como para o meio I. Após adição de Tween 80, o meio foi autoclavado. Adicionou-se 10 % de soro equino filtrado.

Meio III

extrato de carne	3 g
peptona	20 g
bile p \bar{o}	500 mg
Tween 80	1 ml
solução de triptofano*	20 ml
extrato de levedura	5 g

* 20 mg de triptofano em 100 ml de água destilada

lactose	2,5 g
gelatina	2,5 g
fosfato de sódio dibásico anidro	8,0 g
fosfato de potássio monobásico anidro ..	1,0 g
citrato de sódio	1,0 g
sulfato de magnésio	0,2 g
água destilada a 70 °C	1000 ml

Acertou-se o pH em 7,8 e o meio foi fervido por 10 minutos e a seguir autoclavado a 120 °C por 30 minutos. Adicionou-se 10 % de soro equino filtrado.

Meio IV

infusão de cérebro e coração (3C)	37 g
Tween 30	1 ml
água deionizada	900 ml

Acertou-se o pH em 8,0 e o meio foi autoclavado. À parte, preparou-se os outros componentes como se segue:

extrato de levedura	5 g
triptofano	4 mg
soro equino	100 ml
água deionizada	100 ml

Estes componentes foram esterilizados por filtração e adicionados ao restante do meio autoclavado.

3.2.1. Culturas em meio I

Das culturas das amostras AV, BC, BM, LR, OP, PA, PM, PT, RE, SE-9 e WB, colheu-se uma colônia típica de E. rhusiopathiae, que foi semeada em tubos com caldo 3C e incubada a 37 °C por 24 horas.

Dos tubos que apresentaram crescimento de E. rhusiopathiae, avaliado pela coloração de GRAM e imunofluorescência direta, semeou-se novos tubos com caldo 3C e incubou-se os mesmos a 37 °C por 24 horas.

Balões contendo 100 ml do meio I foram inoculados com 10 % de cultura de 24 horas e incubados a 37 °C por 32 horas. Após isto, preparou-se diluições de uma amostra de cada balão de 10^{-1} a 10^{-7} em salina tamponada (pH 7,2), para contagem. Semeou-se duas placas com agar 3C por diluição, com 0,1 ml das diluições de 10^{-7} a 10^{-5} de cada amostra. Após incubação a 37 °C por 48 horas, procedeu-se à contagem das placas.

3.2.2. Culturas em meio II

Seguiu-se o mesmo procedimento utilizado para as culturas em meio I, com as diferenças relacionadas a seguir.

Utilizou-se apenas as amostras AV, BC, OP, PA, S-192 e SE-9. Inoculou-se 15 ml de cada amostra em 150 ml de meio II que foi incubado a 37 °C por 48 horas, em estufa de agitação ("Controlled environment incubator shaker").

Colheu-se uma amostra de cada balão após 24 e 48 horas de incubação e efetuou-se diluições de 10^{-1} a 10^{-6} para contagem, semeando-se 0,1 ml das diluições de 10^{-6} a 10^{-4} em duas placas com agar 3C por diluição, acrescidas de 10 % de soro equino esterilizado por filtração.

3.2.3. Culturas em meio III

Preparou-se duas partidas de culturas a partir de 13 amostras (AV, BC, BM, CN5486, NF4, OP, PA, PM, PT, RE, S-192, SE-9 e WB), em meio III, seguindo basicamente o mesmo procedimento descrito no item 3.2.1. Uma partida foi preparada em volume de 150 ml e a outra em 200 ml.

3.2.4. Culturas em meio IV

Fez-se também duas partidas de culturas em meio IV e seguiu-se o mesmo procedimento descrito para o meio I, utilizando as amostras AV, BC, BM, CN5486, EVA, IB, LR, NF4, OP, PA, PM, PT, RE, S-192, SE-9 e WB.

Após 24 horas de incubação a 37 °C, adicionou-se 38 ml de uma solução de Carboxi-metil-celulose sódica (CMC) a 1,8 % e deixou-se a 4°C por sete dias, para sedimentação. A seguir, decantou-se o sobrenadante e procedeu-se a preparação das diluições até 10^{-10} para contagem.

Para a preparação da segunda partida de vacinas repetiu-se o procedimento anteriormente descrito, exceto com a amostra S-192, que foi eliminada por apresentar colônias rugosas.

3.3. Vacinas

3.3.1. Vacina preparada com culturas em meio I

Aos balões inoculados com as amostras AV, BC, BM, LR, OP, PA, PM, PT, RE, SE-9 e WB adicionou-se 18 % de hidróxido de alumínio (pH 7,6) e deixou-se os mesmos em repouso a 4 °C por sete dias.

Retirou-se de cada balão cerca de 80 ml do líquido sobrenadante, acrescentou-se 0,3 % de formalina ao sedimento e colocou-se os mesmos a 37 °C por 12 horas, para melhor atuação da formalina.

Colheu-se em seguida cinco ml de cada amostra de vacina para os testes de inocuidade e esterilidade.

3.3.2. Vacinas preparadas com culturas em meio II

Aos balões inoculados com as amostras AV, BC, OP, PA, S-192 e SE-9, adicionou-se 0,3 % de formalina e colocou-se os mesmos a 37 °C por quatro horas em estufa de agitação

Em seguida, adicionou-se a cada balão 20 % de hidróxido de alumínio (pH 7,6). Os balões foram colocados a 37 °C por uma hora, sob agitação constante e, em seguida, foram deixados em repouso a 4 °C por sete dias.

Retirou-se de cada balão 160 ml do líquido sobrenadante, colheu-se cinco ml do sedimento e efetuou-se os testes de inocuidade e esterilidade.

3.3.3. Vacinas preparadas com culturas em meio III

3.3.3.1. Primeira partida

Aos balões inoculados com as amostras AV, BM, CN - 5486, OP, PA, PT e SE-9 adicionou-se 20 % de hidróxido de alumínio (pH 7,6) e deixou-se os mesmos em repouso a 4 °C por sete dias.

Em seguida, retirou-se cerca de 100 ml do líquido sobrenadante de cada balão e ao depósito adicionou-se 0,3 % de formol p.a., colocou-se a 37 °C por quatro horas e deixou-se em repouso a 4 °C por sete dias.

Retirou-se novamente mais 50 ml de cada balão e colheu-se do sedimento cinco ml para os testes de esterilidade e inocuidade.

3.3.3.2. Segunda partida

Aos balões inoculados com as amostras AV, BC, BM, CN5486, LR, NF4, OP, PA, PM, PT, RE, S-192 e SE-9 adicionou-se 0,2 % de formol p.a. e deixou-se os mesmos por cinco horas em temperatura ambiente, para melhor atuação do formol.

Os balões com as amostras EVA e WB não foram inativados, já que a primeira era a amostra vacinal viva e WB a usada como amostra desafio.

Em seguida, adicionou-se a cada balão (exceto WB) 30 % de hidróxido de alumínio (pH 8,0), deixando os mesmos sob agitação lenta com barra magnética por cerca de 30 minutos, com a finalidade de melhor adsorção do hidróxido de alumínio. A seguir, deixou-se em repouso a 4°C por sete dias.

Retirou-se cerca de 185 ml do líquido sobrenadante de cada vacina e colheu-se dos sedimentos dois ml para os testes de esterilidade das vacinas.

3.3.4. Vacinas preparadas com culturas em meio IV

3.3.4.1. Primeira partida

Aos sedimentos dos balões inoculados com as amostras AV, BC, BM, CN5486, IB, LR, NF4, OP, PA; PM, PT, RE, S-192 e SE-9 adicionou-se 0,2 % de formol p.a. e deixou-se os balões em temperatura ambiente por cinco horas.

Ao sobrenadante, adicionou-se 20 % de hidróxido de alumínio (pH 8,0), colocando-se cada amostra sob agitação lenta com barra magnética por uma hora, para facilitar a adsorção do hidróxido de alumínio e deixou-se em repouso a 4 °C por sete dias.

Decantou-se novamente o sobrenadante e do sedimento de hidróxido de alumínio adicionou-se ao sedimento inicial formolizado quantidade correspondente a 30 % de seu volume.

Da vacina assim obtida colheu-se dois ml de cada amostra para os testes de esterilidade.

Os balões com as amostras EVA e WB não foram inativados.

3.3.4.2. Segunda partida.

Repetiu-se o procedimento descrito no item 3.3.4.1.

3.3.5. Vacina de referência

Para comparação, utilizou-se uma vacina de referência, recebida do " Central Veterinary Laboratory", Weybridge Inglaterra, sob forma liofilizada.

A ampola de vacina de referência foi resuspensa em oito ml de água destilada. Tomou-se quatro ml desta vacina resuspensa e adicionou-se 20 ml de salina tamponada (pH 7,2). Esta diluição correspondia à vacina não diluída e continha 10 unidades internacionais em cada 0,5 ml.

3.3.6. Vacinas comerciais

Também para comparação, utilizou-se duas vacinas comerciais (1 e 2)*, formolizadas e adsorvidas em hidróxido de alumínio.

3.4. Testes de esterilidade das vacinas

Foram realizados com todas as vacinas e consistiu em se semear 0,2 ml de cada amostra de vacina nos seguintes meios de cultura: caldo 3C, caldo PPL0, tioglicolato de sódio, Tarozzi, agar 3C e agar Sabouraud.

Todos os meios foram incubados a 37 °C por 48 horas e observados para crescimento de bactérias e fungos.

A vacina foi considerada estéril se não havia nenhum crescimento nos meios de cultura acima mencionados.

3.5. Testes de inocuidade das vacinas

Foram realizados com todas as vacinas preparadas com os meios I, II, III e IV e consistiu em inocular cada amostra de vacina pronta em oito camundongos, por via intraperitoneal, na dose de 0,5 ml.

Os animais foram observados durante sete dias para aparecimento de sintomas característicos da doença em camundongos, isto é, conjuntivite intensa, incoordenação motora, inapetência e prostração.

3.6. Desafio

Para se efetuar o desafio dos animais vacinados,

*1 - Laboratório Salsbury, USA

2 - Ruivac - Laboratório Hertape SA, Belo Horizonte

preparou-se culturas de E. rhusiopathiae, amostra Weybridge, juntamente com as culturas a serem utilizadas para produções de vacinas, com cada meio de cultura utilizado, exceto o meio II.

Com o meio I preparou-se dois tipos de cultura para desafio. Uma foi feita com a amostra WB, já mencionada no item 3.2.1.. A outra foi preparada com um "pool" das amostras AV, BM e PA, através do mesmo procedimento descrito no item 3.2.1.

As amostras WB preparadas com os meios III e IV, reservadas para desafio, foram mencionadas nos itens 3.2.3.1, 3.2.3.2. e 3.2.4.2..

De todas as culturas que foram reservadas para serem usadas para desafio colheu-se pequenas amostras e fez-se diluições de 10^{-1} a 10^{-6} em salina tamponada (pH7,2). Cada diluição foi inoculada em cinco camundongos por via intraperitoneal na dose de 0,5 ml.

Os camundongos foram observados por sete dias e registrado o número de mortos.

O título da amostra foi calculado pelo método de REED & MUENCH (1938).

Todos os camundongos vacinados foram desafiados, com 100 DL50 das amostras para desafio 20 dias após a vacinação.

3.7. Animais utilizados

A ativação das amostras de E. rhusiopathiae, os testes de inocuidade, as titulações e as vacinações foram realizados com camundongos suíços albinos, desmamados, com peso corporal variando entre 18 e 30 g.

3.8. Teste de potência em camundongos

Cada amostra de vacina foi inoculada em 16 camundongos por via subcutânea, na dose de 0,5 ml.

A vacina de referência e/ou as vacinas comerciais também foram inoculadas seguindo-se o mesmo esquema.

Para cada esquema de vacinação foi incluído um grupo controle de 16 camundongos não vacinados.

3.8.1. Com vacinas preparadas com o meio I

Todas as vacinas foram diluídas em salina tamponada (pH 7,2) a 1:30 e 1:90.

Numa primeira etapa não se incluiu a vacinação com vacina de referência. Os animais foram desafiados 20 dias após a data de vacinação com "pool" de AV, BM e PA, cujo título foi de $10^{-2,5}$ DL50 / 0,5 ml.

Numa segunda etapa, utilizou-se apenas as amostras AV, PA, RE e SE-9 e incluiu-se no esquema de vacinação a vacina não diluída e diluída a 1:30 e 1:90. Incluiu-se a vacina de referência, no mesmo esquema de diluições.

3.8.2. Com vacinas preparadas com o meio III

Foram preparadas duas vacinas com o meio III. A primeira, preparada conforme descrito nos itens 3.2.3. e 3.3.3.1., foi utilizada sob forma não diluída e na diluição 1:30, incluindo-se nesta vacinação as vacinas comerciais, sendo o desafio realizado 20 dias após a data de vacinação com a amostra WB de título $10^{-3,375}$ DL50 / 0,5 ml.

A segunda, preparada como descrito nos itens 3.2.3. e 3.3.3.2., foi utilizada apenas sob forma não diluída, incluindo-se as vacinas de referência e comercial I neste esquema de vacinação, sendo o desafio realizado 20 dias após a data de vacinação com a amostra WB de título de $10^{-2,37}$ DL50 / 0,5 ml.

3.8.3. Com vacinas preparadas com o meio IV

A vacina preparada como descrito nos itens 3.2.4.e

3.3.4.2. foi utilizada apenas sob forma não diluída, incluindo-se a vacina de referência, sendo o desafio realizado 20 dias após a data de vacinação com amostra WB de título $10^{-5,166}$ DL50 / 0,5 ml.

Os testes de esterilidade, inocuidade e potência em camundongos foram realizados de acordo com as exigências do UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (1974), que serão detalhadas a seguir.

Para os testes de esterilidade, inocula-se a vacina teste em meios apropriados para crescimento de bactérias e fungos, incuba-se os mesmos a 37 °C e verifica-se a total ausência de crescimento de organismos, em se tratando de bacterinas, ou o crescimento de colônias típicas de E. rhusiopathiae, confirmado por coloração pelo GRAM, no caso de vacinas de culturas vivas.

Para os testes de inocuidade, inocula-se uma dose de, no mínimo, 0,2 ml da vacina teste, por via intraperitoneal, em oito camundongos ou três leitões saudáveis e observa-se os mesmos para sintomas específicos da erisipela.

Para os testes de potência em camundongos deve-se utilizar para comparação uma bacterina padrão, aceita para tal finalidade por Órgãos Veterinários e procede-se como se segue:

- 1- efetua-se a diluição inicial a 1:2, em salina fisiológica, tanto da vacina teste quanto da padrão e elaboram-se três diluições sucessivas múltiplas, de três, de ambas.
- 2- Inocula-se cada diluição em, pelo menos, 16 camundongos, com peso corporal entre 16 e 20 g, por via subcutânea, na dose de 0,5 ml.
- 3- Desafia-se cada camundongo por via subcutânea 14 a 21 dias após a vacinação com cultura de E. rhusiopathiae, na dose de 0,5 ml contendo pelo menos 100 DL50 e conta-se os sobreviventes por um período de 10 dias.
- 4- Para o teste de validade da vacina teste, observa-se o seguinte :

- a) pelo menos duas diluições da padrao e duas da vaci na teste devem proteger mais de 0 % e menos de 100 % dos camundongos inoculados. A diluição mais baixa da padrão deve proteger mais de 50 % e a diluição mais alta menos de 50 % ;
 - b) subtrai-se o número de camundongos sobreviventes , de cada uma das tres diluições da vacina teste, do número de sobreviventes das diluições corresponden tes da vacina padrão;
 - c) a diferença da diluição média deve ser ajustada a zero por adição de número adequado, usando-se si - nal positivo ou negativo. Este número deve ser adi cionado às diferenças das diluições mais baixa e mais alta;
 - d) consulta-se a tabela relativa e verifica-se os re- sultados obtidos comparando-os com valores idênti- cos existentes na tabela. Caso haja identidade, o teste é válido e a potência da vacina teste pode ser comparada à da padrão.
- 5- Obtem-se o total de sobreviventes da vacina teste e o da vacina padrão . Se o total de sobreviventes da vacina pa- drão excede o da vacina teste por um número maior do que seis, a vacina teste não é satisfatória.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento das Amostras

Nas culturas em agar 3C, obtidas a partir de polpa de baço, sangue e exsudato sinovial, colhidos de animais nos focos IB e LV, observou-se crescimento de colônias pequenas, transparentes, de superfície lisa, contornos nítidos e sem pigmentação.

Nas culturas do mesmo material em agar sangue, observou-se crescimento de colônias lisas, pequenas e com zona de hemólise alfa.

Ao exame de esfregaços corados pelo método de GRAM observou-se a presença de bacilos GRAM positivos, retos ou ligeiramente curvos, isolados ou em cadeias curtas.

Nos cortes de amígdalas, baço, cérebro e linfonódios e nos esfregaços de culturas, corados por anticorpos fluorescentes, observou-se a presença de organismos de cor verde-brilhante, idênticos aos observados em lâminas controladas feitas com material positivo e esfregaços de culturas de referência.

Os resultados das provas bioquímicas foram os seguintes: as amostras foram negativas às reações de VM e VP, não produziram nitratos, catalase e indol, produziram H₂S, acidificaram ligeiramente o leite tornassolado e fermentaram glicose, galactose e levulose sem produção de gás. Mostraram



-se imóveis e não esporulados.

Os camundongos inoculados com cada uma das amostras apresentaram conjuntivite intensa, incoordenação motora e inapetência e morreram dentro de 48 horas. Culturas em agar 3C de sangue cardíaco destes animais revelaram crescimento de colônias idênticas às obtidas com material de suínos.

Camundongos inoculados com as amostras liofilizadas autóctones e de referência apresentaram os mesmos sintomas descritos acima, observando-se que os inoculados com amostras AV e PT morreram em cerca de 36 horas e os inoculados com amostra EVA não apresentaram sintomas da doença.

Suínos suscetíveis inoculados por via intradérmica com culturas recém isoladas apresentaram, quatro dias após, eritema intenso no local da inoculação, hiperemia e hipertermia.

4.2. Contagens bacterianas, titulações e testes de potência

Os resultados da contagem bacteriana das várias amostras nos quatro meios de cultura incubados a 37 °C por 24 e 48 horas são apresentados nas Tabelas I a VII.

Os resultados das titulações das amostras utilizadas para desafio, calculadas pelo método de REED & MUENCH (1938), são apresentados na Tabela VIII.

Os resultados dos testes de potência em camundongos das diversas partidas de vacinas preparadas com as amostras de E. rhusiopathiae em três diferentes meios de cultura são apresentados nas Tabelas I, II, IV, V e VII.

TABELA I - Número de bactérias / ml do meio I, após 24 horas de incubação e resultados do teste de potência em camundongos, segundo as amostras de *E. rhusiopathiae* e as diluições das vacinas preparadas no mesmo meio.

Amostra	Número de bactérias $\times 10^6$	Diluições da vacina	
		1:30	1:90
AV	5250	0/15	1/16
BC	2950	0/15	1/15
BM	350	0/13	0/15
LR	450	0/14	0/14
OP	1650	0/14	0/15
PM	800	1/15	0/15
PT	-	1/14	0/15
PA	3700	0/15	2/16
RE	950	0/15	1/15
SE-9	100	1/14	0/15
WB	6250	0/14	1/13
Não vacinado	-	0/16	0/16

Numerador: número de sobreviventes

Denominador: número de desafiados

TABELA II - Número de bactérias / ml do meio I, após 24 horas de incubação e resultados do teste de potência em camundongos, segundo as amostras de E. rhusiopathiae e as diluições das vacinas preparadas no mesmo meio.

Amostra	Número de bactérias $\times 10^6$	Diluições da vacina		
		N D	1:30	1:90
AV	5250	0/16	0/16	0/16
PA	3700	0/16	0/16	0/16
RE	950	0/16	0/16	0/16
SE-9	100	1/14	0/15	0/13
Vac. Referência	-	13/16	1/16	1/16
Não Vacinado	-	0/16	0/16	0/16

Numerador : número de sobreviventes

Denominador: número de desafiados

ND : Não diluída.

TABELA III - Número de bactérias / ml no meio II, após 24 e 48 horas de incubação, segundo as amostras de E. rhusiopathiae.

Amostra	Número de bactérias x 10 ⁵	
	24 h inc.	48 h inc.
AV	-	17100
BC	100	6650
OP	12950	13950
PA	3950	2050
S-192	2	150
SE-9	1050	7250

TABELA IV - Número de bactérias / ml do meio III, após 24 e 48 horas de incubação e resultados do teste de potência em camundongos, segundo as amostras de E. rhusiopathiae e as diluições das vacinas preparadas no mesmo meio.

Amostra	Número de bactérias x 10 ⁶		Diluições da vacina	
	24 h inc.	48 h inc.	N D	1:30
AV	3000	1000	0/13	0/13
BC	1500	1000	-	-
BM	2500	500	0/16	0/16
CN5486	1000	310	0/16	0/16
NF4	684	500	-	-
OP	100	300	0/10	0/11
PM	500	500	-	-
PT	513	50	0/16	0/16
PA	1250	300	0/13	0/12
RE	950	500	-	-
S-192	1200	29	-	-
SE-9	50	450	1/12	0/14
Vac.Comercial 1	-	-	13/16	1/16
Vac.Comercial 2	-	-	11/16	0/15
Não Vacinado	-	-	0/16	0/16

Numerador: número de sobreviventes

Denominador: número de desafiados

ND : não diluída

TABELA V - Número de bactérias / ml do meio III, após 24 e 48 horas de incubação e resultados do teste de potência em camundongos, segundo as amostras de E. rhusiopathiae e as vacinas não diluídas preparadas no mesmo meio.

Amostra	Número de bactérias x 10 ⁶		Vacina não diluída
	24 h inc.	48 h inc.	
AV	6000	100	0/16
BC	900	300	1/16
BM	450	2150	1/16
CN5486	1180	100	0/16
EVA	500	-	8/16
LR	4000	2160	0/16
NF4	100	100	0/16
OP	1000	30	0/16
PM	300	3000	0/16
PT	200	300	0/16
PA	300	14000	0/16
RE	6000	1200	0/16
S-192	1000	10	1/16
SE-9	3000	300	3/16
WB	1000	410	-
Vacina de Referência	-	-	11/16
Vacina Comercial 1	-	-	15/16
Não Vacinado	-	-	0/16

EVA : Incubada por apenas 24 horas

Numerador : Número de sobreviventes

Denominador : Número de desafiados

TABELA VI - Número de bactérias / ml no meio IV, após 24 horas de incubação e concentração com CMC, segundo as amostras de E. rhusiopathiae.

Amostra	Número de bactérias x 10 ⁶
AV	8000
BC	2000
BM	28000
CN5486	1000
EVA	3000
IB	6000
LR	110000
NF4	16000
OP	15000
PM	30000
PT	6000
PA	17000
RE	4000
S-192	170
SE-G	10000

TABELA VII - Número de bactérias / ml do meio IV, após 24 horas de incubação e concentração com CMC e resultados do teste de potência em camundongos, segundo as amostras de E. rhusiopathiae e as vacinas não diluídas preparadas no mesmo meio.

Amostra	Número de bactérias x 10 ⁶	Vacina não diluída
AV	5000	6/16
BC	5000	4/16
BM	3000	1/06
CN5486	3000	3/16
EVA	300	16/16
IB	3000	1/16
LR	1200	7/16
NF4	1120	8/16
OP	270	6/16
PM	3000	9/16
PT	4000	1/10
PA	160	3/16
RE	770	5/16
SE-9	2500	5/16
WB	20	-
Vacina de Referência	-	16/16
Não vacinado	-	0/16

Numerador ; número de sobreviventes

Denominador: número de desafiados.



TABELA VIII - Títulos das amostras usadas para desafio, calculados pelo metodo de REED & MUENCH (1938).

Amostra	Meio de cultura	Título DL50/0,5ml
"pool" de AV, BM e PA	I	$10^{-2,5}$
WB	I	$10^{-3,63}$
WB	III	$10^{-3,375}$
WB	III	$10^{-2,37}$
WB	IV	$10^{-5,166}$

5. DISCUSSÃO

5.1. Isolamento das amostras IB e LV

No foco LV observou-se forma septicêmica aguda em animais de dois meses de idade, diferindo de outros focos onde esta forma foi observada em animais de terminação e de reprodução. Como neste foco foi diagnosticada peste suína africana pelo laboratório do M.A., é possível que a erisipela tenha se tornado evidente após infecção com o vírus da peste suína africana, o que teria acarretado queda de resistência dos animais e conseqüente multiplicação de *E. rhusiopathiae*, provavelmente presente nas amígdalas de animais sãos.

No foco IB observou-se o mais alto índice de mortalidade, devido a diagnóstico inicial incorreto de peste suína africana, não se adotando de imediato medidas específicas de controle. Entretanto, após medicação com antibióticos (penicilina-estrepomicina) e verificação de total recuperação dos animais medicados logo após o aparecimento dos sintomas, novas remessas de órgãos e de soro foram feitas ao laboratório do M.A., com resultado negativo para peste suína africana, vindo confirmar as suspeitas de erisipela suína. É possível que este rebanho seja altamente suscetível, à semelhança de observações feitas por REIS et alii (1977).

Os resultados das provas culturais e bioquímicas feitas com culturas de IB e LV são semelhantes aos obtidos

por MELLO & SOUZA (1931), ALBUQUERQUE (1956), CASTRO et alii (1963 e 1972), FREITAS et alii (1976) e REIS et alii (1976 e 1977).

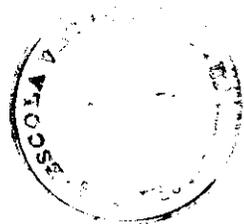
Os camundongos inoculados com as duas amostras apresentaram sintomas clínicos semelhantes aos descritos por CASTRO et alii (1972) e REIS et alii (1977) e morreram dentro de 48 horas.

Suínos inoculados por via intradérmica apresentaram sintomas semelhantes aos descritos por REIS et alii (1977).

Das amostras de E. rhusiopathiae liofilizadas e inoculadas em camundongos observou-se que AV e PT são mais patogênicas, pois causaram morte destes em tempo bem menor do que as outras (36 horas).

5.2. Meios de cultura

A escolha de um meio de cultura apropriado para obtenção de um antígeno de boas qualidades imunogênicas e maior crescimento de germes é fundamental (MUROMCEV, 1948). Isto nos motivou a testar alguns meios de cultura descritos na literatura, introduzindo-se porém algumas modificações. FECHNER (1966) relata um meio de cultura cuja fórmula corresponde ao meio I, no qual se empregou peptona a 1%. TRUSZCZYNSKI (1961) cultivou quatro amostras de E. rhusiopathiae em meio contendo caldo de carne de cavalo com 10% de soro equino e obteve cerca de 444×10^6 germes por ml, o que foi superado por várias amostras utilizadas neste trabalho. ANDO et alii (1959) recomendam a adição de Tween 80 aos meios de cultura, com finalidade de acelerar o crescimento bacteriano, o que serviu de suporte para os meios II, III e IV. Entretanto, substituindo a peptona do meio I pelo Tween 80 no meio II observou-se que houve crescimento bem menor neste meio. DEEM (1936) propôs a adição de triptofano e extrato seco de levedura aos meios de cultura para estimular o crescimento bacteriano com um mínimo de floculação, fato que levou ao uso destes elementos nos meios III e IV, com bons resultados, sendo



que o meio III se assemelha em sua composição ao meio utilizado por WHITE & VERWEY (1970), para produção de antígeno de E. rhusiopathiae. Comparando os resultados obtidos e apesar do meio III ser um meio muito mais rico, não se observou muita diferença entre o crescimento das amostras nos meios I e III. O meio IV foi utilizado com a mesma composição indicada por SILVA (1980), não se conseguindo, porém, obter o mesmo número de germes verificado por ele ($1,2 \times 10^{12}$), apesar de se observar melhor crescimento das amostras neste meio. Entretanto, houve variações nos períodos de incubação, que foram de 12 a 18 horas no trabalho de SILVA (1980) e de 24 horas no presente trabalho, fato este que poderia causar esta diferença, já que se observou, pelos resultados das contagens realizadas nos meios II e III que, de um modo geral, houve diminuição do número de germes com o aumento do período de incubação com a maioria das amostras, motivo que nos levou a incubar as culturas em meio IV por apenas 24 horas. CASTRO et alii (1972) também incubaram suas amostras por 24 horas e STEFFEN (1951) encontrou o maior número de organismos atenuados em cultura de 24 horas em caldo de carne de cavalo com 1 % de peptona e 0,1 % de glicose. Entretanto, TRAUB (1949), ao preparar sua primeira vacina formolizada, incubou culturas por 48 horas. Este tempo também foi utilizado por TRUSZCZYNSKI (1961), com resultados menores que os obtidos neste trabalho. Apesar das divergências, acredita-se que o melhor período de incubação é de 24 horas, pois após este tempo observa-se queda acentuada do pH dos meios incubados para 6,5, verificado nos meios II e III incubados por mais de 24 horas, quando foi encontrado por diversos autores inclusive STEFFEN (1951) e SILVA (1980) que o pH que promove ótimo crescimento de E. rhusiopathiae é de 7,6.

Das amostras utilizadas neste trabalho, obteve-se o melhor crescimento na maioria dos meios de cultura com a amostra AV e o menor com a amostra S-192, mostrando a tendência de certos tipos de E. rhusiopathiae de apresentarem melhor crescimento em qualquer meio de cultura, desde que enri

As outras vacinações foram realizadas apenas com vacina não diluída, com os mesmos resultados, exceto para as vacinas de referência e comercial I e para a vacina avirulenta viva EVA, que protegeu metade dos camundongos vacinados quando produzida em meio III e todos os animais quando produzida em meio IV.

A vacinação realizada com bacterinas produzidas em meio IV forneceu relativa proteção aos camundongos, apesar dos resultados não se enquadrarem na avaliação proposta pelo USDA para bacterinas de boa qualidade.

O USDA (1974) considera válido para bacterinas e vacinas avirulentas vivos testes de potência em camundongos e suínos, mas as opiniões são divergentes quanto à validade do teste em camundongos. Os resultados obtidos no presente trabalho, apesar de se tentar vários meios de cultura diferentes, no sentido de se obter bacterinas mais eficientes, não foram satisfatórios. Resultados pouco satisfatórios também foram obtidos por BAIREY (1972) e BAIREY & VOGEL (1973), que testaram 13 bacterinas em suínos e camundongos e verificaram serem todas elas satisfatórias para suínos e apenas sete o foram para camundongos, o que proporciona um índice de correlação de 53,8 %. Eles acreditam que o teste em camundongos poderia desqualificar bacterinas que poderiam conferir imunidade em suínos. OSE (1972) considera o teste de potência em suínos muito mais efetivo que o realizado em camundongos, visto o produto final destinar-se a suínos. MARTINEZ (1958), avaliando bacterinas e vacinas vivas avirulentas, verificou que nem todas as amostras utilizadas para sua produção induziram imunidade, mas que as avirulentas foram mais eficazes que as bacterinas. Em 1954, SHUMAN realizou testes de potência em camundongos com duas séries de bacterinas, utilizando porém, 200 DL50 como desafio e obteve resultado decrescente de proteção com o aumento da diluição da vacina.

Outros autores realizaram testes de bacterinas em camundongo, mas seguindo esquemas diferentes que os do USDA (1974), com resultados satisfatórios (TRAUB, 1949; KATITCH, 1952; HOCHSTEIN-MINTZEL, 1965), ou com resultados insatisfa-

tórios (TRUSZCZYNSKI, 1961; WOOD, 1959 ; GLEDHILL , 1952) . TRAUB (1949) considera que as amostras capazes de produzir boas vacinas são as do grupo B, que formam antígenos solúveis no líquido sobrenadante, fato constatado por WHITL & VERWEY (1970), que conseguiram proteção de 100 % de camundongos vacinados com líquido sobrenadante filtrado de cultura a virulenta de E. rhusiopathiae. Estes resultados nos levaram a adicionar o hidróxido de alumínio ao líquido sobrenadante de culturas produzidas em meio IV, com finalidade de promover adsorção de antígeno solúvel possivelmente presente no mesmo, antes de se adicionar o hidróxido de alumínio ao sedimento inicial de cultura. É possível que os resultados melhores obtidos com os testes de potência de bacterinas produzidas em meio IV se devam à presença destes antígenos solúveis no líquido sobrenadante, o que não se obteve com outras bacterinas, onde o líquido sobrenadante foi desprezado.

Um dos problemas, talvez, ocorridos neste trabalho foi o de não se ter efetuado antes da produção de vacinas, testes com finalidade de se conhecer os sorotipos das amostras autóctones, já que, segundo FECHNER (1966) são as amostras de E. rhusiopathiae do tipo B e que se prestam para produção de bacterinas.

Os resultados obtidos com a vacina viva avirulenta foram satisfatórios, fato confirmando os achados de GRAY & NORDEN (1955). Outros autores trabalharam com amostras avirulentas, obtendo resultados satisfatórios com aplicação das vacinas em camundongos (KRAUSS et alii, 1960; ZUFFA et alii 1960).

As bacterinas produzidas com amostras de referência, todas do tipo B, tampouco forneceram resultado satisfatórios no teste de potência em camundongos, exceto a amostra SE=9, que mostrou alguma proteção quando preparada em meios III e IV e as amostras NF4 e CH5486, inoculadas em meio IV. É possível que estas amostras de referência não se enquadrem nos requisitos de TRAUB (1949) e FECHNER (1966) para amostras boas produtoras de bacterinas.

6. CONCLUSÕES

1. Existem variações nos diversos meios de cultura inoculados com as amostras de E. rhusiopathiae. Verificou-se maior crescimento da maioria das amostras no meio IV, incubado a 37 °C por 24 horas e concentrado com CMC na concentração final de 0,18 %.

2. Para produção de bacterinas autoctones utilizadas em testes de potência em camundongos é necessário tipificar as amostras de E. rhusiopathiae por testes de hemoaglutinação ou precipitação, com finalidade de se utilizarem apenas as amostras do tipo B, melhores produtoras de bacterinas.

3. Os testes de potência de bacterinas e vacinas vivas avirulentas contra erisipela devem ser conduzidos em suínos e não em camundongos, nos quais resultaram insatisfatórios para as bacterinas, apesar de resultarem satisfatórios para a vacina viva avirulenta, uma vez que estes produtos se destinam à imunização de suínos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE, J.S. Isolamento e identificação do Erysipelothrix rhusiopathiae, em casos de erisipela suína no Rio Grande do Sul. Arq. Inst. Pesq. Vet. Desiderio Finamor, Porto Alegre, 2:57-9, 1956.
2. ANDO, K.; MORIYA, Y.; KUWAHARA, S. Studies on the effect of Tween 80 on the growth of Erysipelothrix insidiosa. JPN. J. Microbiol., Tokyo, 3(1): 85-93, 1959 apud SHUMAN, R.D. Swine erysipelas. In: --- DUNNE, H.W. Diseases of swine. Ames, The Iowa State University Press, 1965, p. 409 - 52.
3. ARAUJO, M.L.C. Soroaglutinação em erisipela suína - produção de antígeno e levantamento sorológico no Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da U.F.M.G., 1979. 42 p. (Tese, Mestre em Medicina Veterinária).
4. BAIREY, M.H. Comments on evaluation of erysipelas vaccine. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 160(4): 607-8, 1972.
5. BAIREY, M.H.; VOGEL, J.H. Erysipelas immunizing product review. Proc. Ann. Meet., U.S. Anim. Hlth. Assoc., 77 : 340-4, 1973.
6. BASSET, J. Rouget du porc. Quelques précisions concernant les "vues nouvelles" sur cette maladie. Bull. Acad. Vet. Fr., Paris, 23:103-8, 1950.

7. BECKER, M. Monatsh. Veterinaer. Med., Jena, 15, 1960 apud FECHNER, J. Vacunación contra el mal rojo. In: --- Vacunas y vacunación de los animales domésticos. Zaragoza, Acribia, 1966. p. 51-76.
8. BRUNER, D.W.; GILLESPIE, J.H. The genus Erysipelothrix. In: --- Hagan's infectious diseases of domestic animals 6. ed. Ithaca, Cornell University Press, 1961, p.331-43.
9. 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 Gerais. I. Observações anatomopatológicas. II. Isolamento de Erysipelothrix insidiosa. In : CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA, 15., Rio de Janeiro, 1976. p.87.
10. CASTRO, A.F.P.; SANTA ROSA, C.A.; TROISE, C.; GISSONI, R. H. Isolamento de Erysipelothrix rhusiopathiae de suínos aparentemente normais abatidos em matadouro. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 30: 115-7, 1963.
11. CASTRO, A.F.P.; TRABULSI, L.R.; CAMPEDELLI FILHO, O. ; TROISE, C. Isolations of three new serotypes of Erysipelothrix rhusiopathiae. Rev. Microbiol., São Paulo, 1 (2): 95-6, 1970.
12. CASTRO, A.F.P.; TRABULSI, L.R.; CAMPEDELLI FILHO, O. ; TROISE, C. Characteristics of strains of E. rhusiopathiae isolated in Brazil. Rev. Microbiol., São Paulo, 3(1):11-24, 1972.
13. CROCCO, A. Primeiros casos de "erisipela" em suínos autóctones no Brasil. Arq. Inst. Pesq. Vet. Desiderio Fijamor, Porto Alegre, 2:70-6, 1956.
14. 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, 42(2): 197-8, 1936.
15. DEMNITZ, . Le rouget du porc et les différentes méthodes de vaccination. Bull. Off. Int. Epiz., Paris, 38: 184-95, 1952.

16. DIAS, V.M.; SILVA, N.P.M. Diferenciação entre Listeria monocytogenes e Erysipelothrix rhusiopathiae com o cloreto de trifeniltetrazólio. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 56(2): 477-83, 1958.
17. FECHNER, J. Vacunación contra el mal rojo. In: --- Vacunas y vacunación de los animales domésticos. Zaragoza, Acribia, 1966. p. 51-76.
18. FLUCKIGER, G. Le rouget du porc et les différentes méthodes de vaccination préventive. Bull. Off. Int. Epiz., Paris, 38:162-7, 1952.
19. FORTNER, J.; DINTER, Z., 1944 apud BASSET, J. Rouget du porc. Quelques précisions concernant les "vues nouvelles" sur cette maladie. Bull. Acad. Vet. Fr., Paris, 23: 103-8, 1950.
20. 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 anatomopatológicas. II. Isolamento de Erysipelothrix insidiosa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA, 15., Rio de Janeiro, 1976. p. 90.
21. GALLOWAY, J.H. Swine erysipelas. In: --- Farm Animal Health and Disease Control. Philadelphia, Lea & Febiger 1974. p.119-26.
22. GLEDHILL, A.W. The immunizing antigens of E. rhusiopathiae. The role of the L-antigen. J. Gen. Microbiol., London, 7:179-91, 1952 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 23 (8): 2194, 1953.
23. GRAY, C.W.; NORDEN, C. J. Erysipelas vaccine avirulent (EVA) - A new agent for erysipelas control. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 127(945):506-10. 1955.
24. HOCHSTEIN-MINTZEL, V. Die aktive Immunisierung infantiler Mäuse gegen E. rhusiopathiae. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., Hamburg, 78: 191-3, 1965.
25. KATITCH, V. Examen de la valeur immunigène des vaccins contre le rouget du porc d'après MUROMCEV et TRAUB. Off. Int. Epiz., Paris, 37(1-2): 49-55, 1952.

26. KRAUSS, S.; JANOWSKI, H.; MIERZEJEWSKA, M. Variability of avirulent E. rhusiopathiae strains. II. Strains AV- R9 and ST55. Roczn. Nauk. rol. Warsaw, 69:413-31, 1960 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 31(6): 1695, 1961.
27. MANNINGER, R. Über eine Methode der aktiven Immunisierung gegen Schweinerotlauf. Acta Vet. Acad. Sci. Hung., Budapest, 1(1):5-22, 1951.
28. MARTINEZ, M.G. Estructura antigênica del Erysipelothrix rhusiopathiae. I. Investigaciones comparativas de las vacunas adsorvidas y vivas contr el mal rojo. Rev. Patronato Biol. Anim., Madrid, 9:5-31, 1958.
29. MELLO, R.; SOUZA, M.A. O bacillo da ruiva dos porcos: sua constatação no Brasil. Rev. Zoot. Vet., Rio de Janeiro, 17(1): 41-7, 1931.
30. MUROMCEV, S.N. Poluzidkie. Vakcini, p.23, 1948 apud KATITCH, V. Examen de la valeur immunigère des vaccins contre le rouget du porc d'après MUROMCEV et TRAUB . Off. Int. Epiz., Paris, 37(1-2): 49-55, 1952.
31. OSE, E.E. Evaluation on erysipelas vaccines. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 160(4):603-6, 1972.
32. PASTEUR & THUILLIER, 1892 apud FERREIRA, A.J. Doenças de incidencia exclusiva nos suínos - Mal rubro. In:--- Doenças infectocontagiosas dos animais domésticos. Lisboa, Fundação Calouste-Gulbenkian, 1965, p.396-408.
33. REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg., Baltimore, 27(3) : 493-7, 1938.
34. REIS, R.; RESENDE, M.; NASCIMENTO, E.F. Doenças de suínos em Minas Gerais. II. Ocorrência de erisipela suína . In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA, 15., Rio de Janeiro, 1976, p.91-2.
35. REIS, R.; RESENDE, M.; NASCIMENTO, E.F. Doenças do suíno no Estado de Minas Gerais. III. Ocorrência e controle da erisipela. Arg. Esc. Vet. U.F.M.G., Belo Horizonte , 29(2): 203-10, 1977.

36. SHUMAN, R.D. Experimental evaluation of swine erysipelas adsorbate bacterin. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 124:362-7, 1954.
37. SHUMAN, R.D. Swine erysipelas. In: DUNNE, H.W. Diseases of swine. Ames, The Iowa State University Press, 1965 . p. 409-52.
38. SILVA, I.J. Avaliação de uma vacina experimental bivalente viva contra peste suína clássica e erisipela suína . Belo Horizonte, Escola de Veterinária da U.F.M.G., 1980. 56 p. (Tese, Mestre em Medicina Veterinária).
39. STEFFEN, J. Biology and antigenic properties of the attenuated swine erysipelas vaccine described by Staub. Pol. Arch. Weter., Warsaw, 1:345-82, 1951 apud Vet. Bull. , Farnham Royal, 23(10): 2761, 1953.
40. TRAUB, E. Immunisation contre le rouget du porc par les vaccins adsorbés concentrés. Bull. Off. Int. Epiz., Paris, 32:22-35, 1949.
41. TROISE, C.; GISSONI, R.H.; SANTA ROSA, C. A.; CASTRO, A. F.P. Observações sobre a "ruiva" dos porcos . O Biólogo , São Paulo, 29(9): 179-83, 1963.
42. TRUSZCZYNSKI, M. The antigenic structure of virulent and avirulent strains of Erysipelothrix rhusiopathiae . I. Immunobiologic properties. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 22:836-8, 1961.
43. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. ANIMAL PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE FEDERAL REGISTER, 38(nº 180) Hyattsville, Maryland 20783, USA 1973 apud REIS, R.; RESENDE, M.; NASCIMENTO, E.F. Doenças do suíno no Estado de Minas Gerais. III. Ocorrência e controle da erisipela. Arq. Esc. Vet. U.F.M.G., Belo Horizonte, 29(2): 203-10, 1977.
44. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE, CFR Amendment 74-67, 39 F 16853 (5/10/74).

45. WHITE, R.R.; VERWEY, W.F. Isolation and characterization of a protective antigen-containing particle from culture supernatant fluids of Erysipelothrix rhusiopathiae. Infect. and Immun., Washington, 1(4): 380-6, 1970.
46. WOOD, R.L. Specificity in response of vaccinated swine and mice to challenge exposure with strains of Erysipelothrix rhusiopathiae of various serotypes. Amer. J. Vet. Res., Schaumburg, 40(6):795-801, 1959.
47. ZUFFA, A.; NOVAK, Z.; RAJTAR, V. Comparative evaluation of live avirulent and killed adsorbed swine erysipelas vaccines. Vet. Cas. (Kosice), Bratislava, 9:447-61 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 31(4):1006, 1961.