

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

VACUNA ELABORADA A PARTIR DE UNA CEPA APATOGENA
DE CAMPO DE Erysipelothrix rhusiopathiae, EN MEXICO.

T E S I S

Que Para Obtener el Título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a

LUIS BOJORQUEZ NARVAEZ

México, D. F.

1978



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS 1978

LAD _____

AGE M. 63

FECHA _____

PROC. _____



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA.

VACUNA ELABORADA A PARTIR DE UNA CEPA APATOGENA
DE CAMPO DE Erysipelothrix rhusiopathiae, EN MEXICO.

LUIS BOJORQUEZ NARVAEZ
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO.

1978

Jurado asignado
originalmente según el
tema

PRESIDENTE : Prof.Oscar Amor Dodero

VOCAL: Prof.Magdalena Acosta Segura

SECRETARIO: Prof.Ma.Dolores Lastra A.

1er. SUPLENTE: Prof.Elda Peniche Quintana

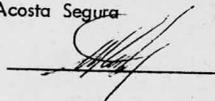
2do. SUPLENTE: Prof.Librado Ortiz Ortiz

Sitio donde se desarrollo el Tema: Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias-SARH

Nombre completo y firma del sustentate: Luis Bojórquez Narváez



Nombre completo y firma del asesor del tema: Prof.Magdalena Acosta Segura



Nombre completo y firma del supervisor técnico: MVZ. Raúl Vargas García

Dedico esta tesis a mis padres :

MARIA NARVAEZ F.

JUSTINO BOJORQUEZ H.

A mis primos :

MARCELO ESPINOZA R.

ROGELIO ESPINOZA R.

Y a :

M. V. Z. FRANCISCO SUAREZ G.

M. V. Z. ROBERTO CERVANTES O.

M. V. Z. RAUL VARGAS G.

I N D I C E

	Página
INTRODUCCION	1
CAPITULO I. - GENERALIDADES	
CARACTERISTICA DE <u>E. rhusiopathiae</u>	4
PATOGENIA	7
ESTUDIOS SOBRE LA COMPOSICION ANTIGENICA DE <u>E. rhusiopathiae</u> .	
VACUNAS DE EMPLEO ACTUAL	12
CAPITULO II. - MATERIAL Y METODOS	
MATERIAL	18
METODOS	21
CAPITULO III. - RESULTADOS	28
CAPITULO IV. - DISCUSION	35
CAPITULO V. - RESUMEN Y CONCLUSIONES	36
CAPITULO VI. - BIBLIOGRAFIA	39

INTRODUCCION

La erisipela es una enfermedad infecto-contagiosa producida por la bacteria Erysipelothrix rhusiopathiae, que afecta a: cerdos, borregos, caballos, vacas, cabras, pavos, pollos, peces y humanos. Esta infección en el cerdo es conocida con otros nombres, tales como : "Fiebre roja ", -- "Enfermedad de la piel de diamante" y "Piel r6mbica", mientras que en el hombre, es algunas veces llamada Erisipela de Rosembach. (4, 7, 17, 18, 23, 29).

Esta enfermedad es de especial importancia para la industria porc6cola, por retraso en el crecimiento; por decomiso en rastros y mataderos; de 1971 a 1976, hubo un total de 1596 cerdos decomisados por presentar erisipela en el Rastro de Ferrerfa y por las muertes que ocasionen.

En algunos pa6ses de Europa, as6 como en los Estados Unidos de Norteam6rica la erisipela existe en forma enzo6tica (17). En M6xico esta enfermedad ha sido descrita cl6nicamente desde hace mucho tiempo, pero no fue sino hasta 1966, cuando se aislo el agente etiol6gico por primera vez (8).

A esta enfermedad no se le habfa dado mucha importancia en nuestro pa6s, pero en Mayo de 1970 se presentaron varias epizootias en : Irapuato, -- Guadalajara, Edo. de M6xico y Distrito Federal (17). Por otro lado el -- Instituto Mexicano del Seguro Social reporta 2676 casos notificados de --

Erisipela en humanos, en un periodo de 1973 a 1977, incrementándose -- en los últimos tres años. Los lugares donde hubo más incidencia, son -- los siguientes : Valle de México, Veracruz, Nuevo León, Tamaulipas y -- Puebla (13).

El control de esta enfermedad comprende fundamentalmente la prevención con vacunas dado que a poco costo y muy bajo riesgo, se obtienen resulta-- dos confiables y demostrativos; como lo muestra la disminución en la in-- cidencia de erisipela porcina en los Estados Unidos de Norteamérica y -- otros países, que han realizado una inmunización sistemática de hatos -- susceptibles.

La comprobación de la potencia de los productos inmunizantes es conse-- cuentemente, una de las áreas fundamentales a cubrir dentro de una ac-- ción integral para el control del problema.

En el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (INIP), de 1972 a -- 1975, se probó la potencia de los productos inmunizantes comerciales -- contra erisipela porcina, que se distribuyen en México observándose una potencia muy variable en ellos (5, 33 y 34); así mismo, se realizaron es-- tudios antigénicos de 20 cepas de E. rhusiopathiae aisladas de casos de -- campo en México, encontrándose un esquema antigénico complejo; lo cual explica los resultados obtenidos en las pruebas de potencia que se practi-- caron a los inmunizantes comerciales (20 y 35).

En este trabajo se reporta la elaboración de una vacuna experimental, --
utilizando una cepa avirulenta de Erysipelothrix rhusiopathiae, aislada a --
partir de la tonsila de un cerdo asintomático en el Edo. de Hidalgo, la --
cual cruzó serológicamente con el 77% de 17 cepas aisladas en nuestro -
país. Con esto esperamos ayudar en parte en la solución de los proble--
mas originados por la erisipela porcina.

CAPITULO I

CARACTERISTICAS DE E. rhusiopathiae.

La bacteria Erysipelothrix rhusiopathiae fue clasificada en el género -- Erysipelothrix, en la octava edición del Bergey (4). Se le considera principalmente parásito de mamíferos, aves y peces (4 y 7); se ha aislado de: cerdos, palomas, borregos, vacas, patos, peces, pavos, ratones y el -- hombre (7).

Koch la describió por primera vez en 1878, y le dió el nombre de "Bacilo de la Septicemia del Ratón ". En 1882, Pasteur y Thullier lo aislaron del cerdo, y a partir de esta cepa prepararon la primera vacuna que se -- conoce (29).

Es posible que en 1882 Loeffler haya observado este mismo bacilo aislado de un cerdo que murió de erisipela (7, 29).

Las células de E. rhusiopathiae, son bacilos cortos, delgados, rectos o curvos, de 0.2 a 0.6 micras por 0.5 a 2.5 micras de largo. Se encuentran aisladas, en parejas o grupos de cadenas que tienden a formar filamentos largos. Son inmóviles, no forman esporas, ni tienen cápsula. Son Gram positivas, pero se decoloran fácilmente cuando proceden de cultivos viejos (4, 7, 18 y 29).

Choening y Col. en 1938, describieron tres tipos de colonias: lisa(S), -- rugosa (R) e intermedia (R-S). Las colonias típicamente lisas son circu-

lares, con superficie convexa; en estas colonias los microorganismos - aparecen pequeños, rectos o ligeramente curvos, con polos redondeados, arreglados simplemente, en pequeños paquetes o en cadenas cortas. En la forma rugosa las colonias típicas son circulares, pero irregulares, - con bordes rizados y superficie rugosa. En estas colonias los microorganismos forman filamentos de 60 micras o más, algunos de los cuales se rompen para formar cadenas de bacilos. Las colonias intermedias presentan algunas de las características de las colonias rugosas y lisas, asumiendo una gran variedad de formas. Sin embargo, la morfología varía - en algunas de sus dimensiones conforme al medio en el cual los microorganismos crecen (7 y 29).

Generalmente la forma rugosa se presenta en cultivos viejos, pero puede pasar a lisa por pases en ratón (29).

La bacteria es aerobia, pero puede crecer en una atmósfera de 5 - 10% - de dióxido de carbono. La temperatura óptima para su desarrollo es de - 37°C, aunque puede crecer en un rango de 15 a 44°C, a un pH de 7.6, - - siendo este último su óptimo de crecimiento (7, 18, 29).

Este microorganismo crece escasamente en medios de cultivo ordinarios. La adición al medio de suero de caballo, favorece la rapidez y abundancia del crecimiento, además de la antigenicidad (4, 9, 17, 18 y 42).

El Tween 80 favorece el desarrollo de E. rhusiopathiae, se obtienen re - -

sultados similares con los siguientes componentes: riboflavina, ácido -- oleíco y tiamina. (14, 7, 17, 18 y 19).

Se ha observado que la glucosa en concentraciones elevadas tiene una acción inhibitoria sobre esta bacteria (29).

El azida de sodio (NaN_3) y el cristal violeta son sustancias que se usan para la elaboración de medios selectivos de Erysipelothrix, dada la resistencia que muestra esta bacteria hacia estos compuestos y el conocimiento que se tiene de que estos inhiben el desarrollo de bacterias Gram negativas y Gram positivas (12 y 22).

Además de los compuestos anteriores E. rhusiopathiae, es resistente a -- concentraciones de 1:2000 de telurito de potasio (29), de antibióticos como la kanamicina, neomicina y vancomicina (42).

Este microorganismo produce fácilmente ácido de: glucosa, maltosa y lactosa y más lentamente de galactosa, manosa y arabinosa. Produce ácido-sulfhídrico de medios con acetato de plomo. No forma indol, ni decolora el azul de metileno, da reacciones negativas para las pruebas de Voges - Proskawer y rojo de metilo. (4 y 29), Sin embargo, se debe hacer notar con respecto a los carbohidratos, que su utilización es un fenómeno variable, que puede ser atribuido a una descripción incompleta de las condiciones, como son medio base, concentración de azúcares e indicador (25 y - 39).

PATOGENIA

La principal vía de entrada de este microorganismo es la mucosa oral, - aunque también es importante la piel irritada o a través de heridas, como aquellas que son producidas por castración o marcaje de los animales (3, 7, 10, 24).

La invasión del torrente sanguíneo se presenta en todos los animales infectados. El subsecuente desarrollo de una septicemia aguda o una bacteremia con localización en órganos y articulaciones, depende de factores - no determinados. Aún cuando la virulencia de una cepa en particular es - importante ésto solo depende de recientes pases en cerdos (3). Tomando en consideración lo anterior, la enfermedad puede dividirse en las siguientes formas:

- a) Aguda o septicémica
- b) Crónica con endocarditis y artritis
- c) Subclónica (9, 19, 26 y 27)

a) La forma Aguda, suele confundirse con otras enfermedades septicémi cas, principalmente con cólera porcino y salmonelosis aguda (11 y 17). - Las principales características de esta forma de la enfermedad son: temperatura elevada de 42-43°C; conjuntivitis, con abundante secreción mucoide; indiferencia; pérdida del apetito; respiración acelerada y presencia de numerosas áreas púrpuras, en forma de rombos; además de falta de - coordinación de las piernas traseras (17, 18 y 27). En estos animales se presenta una leucocitosis seguida por una leucopenia, lo cual se puede uti- lizar para diferenciar la erisipela del cólera porcino (6, 17). Si la fiebre

baja en pocas horas, el animal se recupera, pero si la temperatura permanece alta por 36-48 hrs. la muerte es inminente (3, 18 y 27).

b) La forma Crónica, de la Erisipela porcina se caracteriza por una en docarditis vegetativa de las válvulas cardíacas particularmente de la mitral. Esta puede ir acompañada también de artritis, en la que se inflaman las articulaciones de las extremidades posteriores, dando al cerdo una marcha característica. La erisipela crónica no es mortal frecuentemente, pero los animales afectados no engordan rápidamente (3, 17, 18, 26 y 27).

c) La forma Subclínica, pasa desapercibida y solo se detecta por el aislamiento de E. rhusiopathiae de las amígdalas del cerdo (9,19).

ESTUDIOS SOBRE LA COMPOSICION ANTIGENICA DE E. rhusiopathiae

Los trabajos de Watts, Atkinson (1945) y Dedie (1949), demostraron que las cepas de E. rhusiopathiae pueden dividirse en dos grupos, de acuerdo a su estructura antigénica: serotipo A y serotipo B.

Estos antígenos específicos de serotipos son solubles en ácidos y pueden ser puestos de manifiesto por reacciones de precipitación, aglutinación y fijación de complemento, empleando sueros homólogos. Existe además el serotipo N, que se deriva del A o el B, previa pérdida de los antígenos solubles en ácidos (2 y 9). La literatura que habla acerca del serotipo N no menciona si se trata de un antígeno enmascarado por los serotipos A o B.

Las cepas de serotipo A, cambian a serotipo N después de 50 pases en ratón, pero vuelven a su serotipo original después de 7 pases en palomas. Resultados similares se han reportado con cepas de serotipos B, en donde después de 10 a 50 pases en medio de cultivo o 25 a 27 pases en ratón se observa el cambio, aún cuando se ha visto que los pases en ratón son reversibles. No se ha observado ningún cambio de serotipo dando pases en cerdo. (9 y 28).

La mayor parte de los serotipos B poseen una buena capacidad inmunizante contra E. rhusiopathiae A y B (29, 28 y 37).

En este serotipo cuando se cultiva la bacteria en medio de caldo sin suero de caballo también se encuentra un antígeno que produce aglutinación de glóbulos rojos de aves (9, 20 y 28).

Truszczyński, trabajando con cepas de serotipos A y B logró poner de manifiesto seis fracciones antigénicas a partir de extractos ácidos. Cuatro aparecieron en ambos serotipos y dos únicamente en el serotipo B. Ninguna de estas fracciones confirió protección en ratones ni absorbió anticuerpos de suero polivalente contra erisipela (30 y 31).

Por prueba de inmunodifusión él demostró que los antígenos tipo-específico se encuentran en mayor cantidad en extractos ácidos y los de especie en cultivos líquidos.

Comparando el serotipo B con una cepa avirulenta, encontró zonas de pre

cipitación idénticas (32).

Además, observó que el serotipo B contiene más antígenos que el serotipo A (32).

Por otro lado White y Kalf, separaron cinco fracciones antigénicas, utilizando columnas de intercambio aniónico, a partir de extractos neutros de células pertenecientes a serotipos B.

Ellos clasificaron a estas fracciones de acuerdo a las características siguientes:

Antígeno	suero ^a				Proteínas totales - mg.
	Homólogo	Heterólogo	Isólogo	Termo lábil ^b	
A	+	-	+	-	5.18
B	+	-	-	-	2.48
C	+	+	+	+	9.83
D	+	+	+	+	3.08
E	+	-	-	+	

a) basados en los serotipos de la bacteria

b) serológicamente inactivo después de cuatro minutos a 100°C

El antígeno A, es idéntico al antígeno tipo-específico, presente en extractos ácidos de una misma cepa, preparado por el método que utilizó Atkinson (2).

Ambos antígenos presentan la siguiente composición química:

Componente	Antígeno A	Extracto ácido
Nitrógeno total	8 -11%	8%
Fósforo total	No detectable	No detectable
Carbohidrato total	4.0 -4.3%	4.0%
Sustancias ^b reductoras	0.4%	0.4%
Hexosamina ^c	1-2%	1-2%
Lípidos totales	30%	

% en peso seco de antígeno

- a) Expresado como glucosa
- b) Exclusivamente hexosamina
- c) Expresado como glucosamina.

Es interesante notar que los antígenos A de cepas serotipo B, contienen ácido diamino-pimélico, mientras que las de serotipo A contienen lisina.

En cuanto a su composición de aminoácidos y azúcares, el antígeno A -- contiene lo siguiente: ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, serina, - arginina, alanina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, glucosamina, glucosa, manosa y ácido murámico. Esto parece indicar que el antígeno- A, está compuesto de polímeros de glucosamina y ácidos murámicos, -- unidos por componentes peptídicos, de donde se deduce que este antígeno se deriva de la pared celular (15, 16 y 38).

El antígeno B, tiene una composición química parecida al A, con diferencia que el B no tiene glucosamina ni fenilalanina, en vez de éstos se ha encontrado prolina, la cual no aparece en el antígeno A (15, 16 y 38).

El antígeno C es de tipo genérico, común en todas las cepas (14, 15, 16 y 38). Puede ser que haya un antígeno de E. rhusiopathiae que induzca en el huésped la producción de anticuerpos protectores, que se encuentra en el sobrenadante de cultivos líquidos, con suero equino. Este antígeno no parece ser un fragmento de pared-celular ni de membrana celular -- (40). Este antígeno es capaz de absorber virtualmente toda la actividad protectora pasiva de suero inmune preparado en conejos inmunizados con cultivo total. Está compuesto de proteínas, lípidos y pequeñas cantidades de carbohidratos. Su actividad protectora desaparece completamente después de que se trata con tripsina y en un 75% cuando se usa muramidasa. Estas propiedades sugieren que el antígeno es un complejo lípido-glicopéptido, con propiedades atribuibles a lipoproteínas (41).

Finalmente este antígeno es capaz de conferir protección contra cepas de serotipo A y B, lo que significa que se encuentra en ambos serotipos (40 y 41).

VACUNAS DE EMPLEO ACTUAL

Antes de que se introdujeran las vacunas y bacterias*, las pérdidas por -

* Bacterina: En el lenguaje veterinario, inmunógeno constituido por bacterias inactivadas. Y vacuna al producto constituido por microorganismos atenuados.

erisipela, en muchas zonas eran tan elevadas que los criadores de cerdos no contaban con ninguna seguridad. Las pérdidas disminuyeron considerablemente después de que Pasteur (1882) y G. Lorenz (1893), elaboraron un método de prevención que posteriormente fue aplicado metódicamente. Asimismo, la terapéutica sérica con el método propuesto por G. Lorenz redujo de manera efectiva las pérdidas por erisipela (3, 9 y 18).

Métodos de Inmunización

- a) Inoculación simultánea de Lorenz
- b) Inmunógenos constituidos por bacterias inactivadas (Bacterinas).
- c) Con cultivos vivos atenuados.

INMUNIZACION SIMULTANEA DE LORENZ. Este método se fundamenta en la combinación de la inmunización activa con la pasiva; el procedimiento fue propuesto por Gustavo Lorenz, que lo desarrolló entre los años de 1891 a 1893. Este autor pudo comprobar la efectividad inmunizante del método inoculando ratones con cultivos virulentos y aplicándoles simultáneamente unas gotas de suero anti-erisipela. Lorenz preparó este suero mediante un esquema de inmunización, primero en conejos, más tarde en cerdos y finalmente en caballos. En sus experiencias previas, observó que la protección conferida por el suero era suficiente, pero sólo de corta duración y para lograr una defensa más prolongada, era preciso la inmunización activa con cultivos de Erysipelothrix rhusiopathiae sin atenuar.

En los primeros tiempos el procedimiento era muy incómodo en la prác-

tica, ya que eran necesarias tres inoculaciones. Con el perfeccionamiento de los sueros se logró que la aplicación de éstos y la primera dosis - del cultivo se hiciera en forma simultánea, para lo cual se empleaban -- dos jeringas diferentes, realizando las inyecciones en sitios separados. - Estos inconvenientes pudieron también evitarse cuando los estudios de - Laclainche (1900), Schombon (1922) y Maas (1926), demostraron que era - posible realizar la primera inoculación con el suero y el cultivo mezclados en la misma jeringa (9).

Después de la Segunda Guerra Mundial, este método ha sido substituído - en muchos países, primero por inmunógenos inactivados y luego por vacu - nas atenuadas (3, 9 y 18).

En México no se utiliza este tipo de inmunización, pero en algunos países se sigue usando.

VACUNAS CONSTITUIDAS POR BACTERIAS INACTIVADAS. - En 1935, - apareció la primer bacterina comercializada que se conoce con el nombre de "Vacuna formolada de Muronzew y Matwijkenow".

El fundamento de la preparación de esta bacterina es el siguiente: Se -- utilizó una cepa patógena de E. rhusiopathiae debidamente estandarizada, que se pasaba una o dos veces por año en lechones. Se cultivaba en caldo nutritivo, adicionado del 0.25% de agar, lo cual favorece el crecimiento de las bacterias y asegura la permanencia de las características antigénicas de los cultivos. Se incuban durante seis días y luego se inactivaban -

las células con 0.3% de formalina. Esta bacterina tuvo una amplia difusión en la Unión Soviética.

La producción de las Bacterinas contra erisipela, se basa actualmente, en las bases logradas por las experiencias de Traub, las que se presentan a continuación:

- 1) Selección de cepas con una buena capacidad inmunógena. Esta selección se hace inicialmente por medio de reacciones de hemoaglutinación indirecta, utilizando antígenos provenientes de cultivos en medios que no contengan suero equino o bien por reacciones de doble difusión, con antígenos elaborados a partir de extractos ácidos de E. rhusiopathiae, y posteriormente las vacunas obtenidas con estas cepas se evalúan mediante pruebas de protección en ratones y cerdos.
- 2) El uso de suplementos en medio líquido que faciliten el desarrollo masivo del antígeno, como es el caso, del suero de caballo.
- 3) La selección del mejor adyuvante, utilizando para este fin hidróxido de aluminio o fosfato tricálcico.
- 4) El establecimiento de la concentración adecuada de formalina para la inactivación de las bacterias (3).

VACUNAS CONSTITUIDAS POR CEPAS ATENUADAS. - Estas se preparan con cepas avirulentas aisladas de casos benignos, con cepas envejecidas o con cepas desarrolladas en medios pobres o adicionados de agentes que disminuyen su virulencia.

En los últimos años se han empleado principalmente los siguientes tipos --

de cepas para la producción de vacunas:

- 1) Cepa H-7 de Hausmann y Flatken. Se trata de un grupo de cepas de serotipo B envejecidas.
- 2) Cepa avirulenta R-9 de Sandstedt y Swahn, pertenece al serotipo A y es atenuada con tripaflavina.
- 3) Cepa avirulenta de Staub, pertenece al serotipo B y es atenuada por cultivo a 40°C.
- 4) Cepa VR₂ de Bucarest, pertenece al serotipo N. Es avirulenta para cerdos y ratones y ha demostrado su efectividad tanto en las pruebas de laboratorio como en los estudios de campo.
- 5) Cepa NL11, atenuada con tripaflavina. Esta vacuna está comercializada en México (9).

CAPITULO II
MATERIAL Y METODOS

Equipo:

Nefelómetro

Estufa de incubación a 37° C

Aparato de virtis, No. 23 (Homogenizador)

Campana de flujo laminar

Cuenta colonias

Aglutinoscopio

Material de Vidrio y Otros:

Frascos de Cosecha

Frascos de Roux de 1000 ml

Frasco ámbar de 500 ml

Frascos ampula de 50 ml

Matraces Erlenmeyer de 1000 ml

Cajas de petri

Tubos de 16 x 150 mm

Pipetas de 10 ml, divididas 1/10

Pipetas de 1 ml divididas 1/100

Placas para prueba de aglutinación

Portaobjetos

Jeringas desechables de 2.5 ml

Jeringa automática de 10 ml

Agujas del No. 22 de 3 cm. de largo

Agujas del No. 16 de 3.5 cm de largo

Asa c/ portasa

Mechero de Bunsen

Material Biológico:

Cepa de E. rhusiopathiae El-M27 (cepa avirulenta - - aislada en el Edo. de Hidalgo, clasificada así para los registros del Departamento de Bacteriología del INIP).

Cepa El-6 de Exposición Americana, proporcionada -- por el Dr. Shuman del Departamento de Agricultura de U.S.A.

Antígeno de E. rhusiopathiae elaborada a partir de cepas Mexicanas, aisladas en el Departamento de Bacteriología del INIP.

Vacuna comercial de erisipela, proporcionada por el - Departamento de Control de Medicamentos de Sanidad - Animal de la S.A. R.H.

Bacterina de referencia, proporcionada por el Departamento de Agricultura de los U.S.A.

Cerdos híbridos Duro-Yorkshire y Landrace-Duroc de -- aproximadamente 30 Kg. de peso, Ratones de 16 a 25 --

gr., Cuyes de 250 a 300 grs.

Medios de Cultivo:

Placas de agar sangre

Placas de Triptosa agar, (DIFCO)

Tubos con medio de Sabouraud, (USP)

Tubos de caldo infusión cerebro corazón, (DIFCO)

Tubos de tioglicolato fluido (USP)

Medios de triptosa (DIFCO)

Tubos con caldo para prueba de reducción de nitratos
(DIFCO)

Tubos con medio de SIM (DIFCO)

Los medios de cultivo anteriores se prepararon a partir de medios deshidratados siguiendo las especificaciones del fabricante.

Medio desarrollado para la obtención de la vacuna (Medio de Triptona modificado)

Triptona (DIFCO)	17.0 gr
Extracto de carne (Merck)	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Azida de sodio	0.1
Cristal violeta	0.01
Fosfato de potasio dibásico	2.5
Tris buffer	3.0
Agua destilada	1000 ml

Este medio se esteriliza a 15 lb de presión y 121°C durante 20 minutos. Se enfria a 45°C y se adiciona 10% de suero equino estéril.

Reactivos y Soluciones:

Glucosa (Merck)

Saca rosa (Merck)

Lactosa (Merck)

Reactivo para prueba de indol, según Koback (Merck)

Cloruro de sodio al 0.85%

Glucosa estéril al 10%

Leche descremada al 20%

M E T O D O S

1. - Definición: La vacuna contra erisipela es un producto liofilizado que contiene 2×10^9 microorganismos/ml, no lleva conservador.
2. - Cepa; Para la producción de la vacuna se usó una cepa avirulenta - - aislada en el Edo. de Hidalgo, que se conserva en medio inclinado de infu sión cerebro corazón a 4°C.
3. - Controles a la cepa y al lote de siembra:
 - 3.1. - Pruebas de pureza, se hace frotis del desarrollo y se tiñen, por el método de gram, deberán observarse bacilos gram positivos de aproximadamente 0.2×0.6 micras, desechándose las cepas que muestren formas filamentosas o cadenas de bacilos muy largas, tampoco deberán observar se otros microorganismos. Se siembran muestras del desarrollo en me-

dios de infusión de cerebro corazón agar y en tioglicolato fluido. Se incuban durante 7 días a 30°C en aerobiosis, también se siembran en medio de Sabouraud, el cual se incubaba 14 días a 18-22°C. En los medios de Sabouraud, tioglicolato e infusión cerebro-corazón agar, no deberá haber desarrollo.

3.2. - Pruebas de identidad: Las características del desarrollo en el medio de triptona modificado, en donde se obtienen colonias incoloras, - - translúcidas, cóncavas y pequeñas, confirman la identidad de la cepa, - así como las reacciones bioquímicas que se dan a continuación:

Catalasa	-
Reducción de NO_3	+
Movilidad	- ?
Producción de H_2S	+
Producción de indol	-
Glucosa	+
Lactosa	+
Sacarosa	+

4.0. - Obtención de la Vacuna:

4.1. - Se utilizan tres a cuatro tubos que hayan cumplido los requerimientos anteriores. Se resuspende el desarrollo de cada uno de los tubos con solución isotónica estéril y se siembran con ayuda de una pipeta estéril - los frascos de Roux conteniendo medio de triptona modificado. Las bote-

llas sembradas, se incuban horizontalmente por 24 - 48 hrs. a 37° C.

Después de este tiempo se observa la morfología de las colonias. Se deberán apreciar colonias con las características típicas antes mencionadas. De los frascos que muestren un desarrollo típico se hacen frotis -- que se tiñen por el método de Gram para confirmar que los cultivos son puros.

4.2. - Se adicionan a cada frasco de 6 a 8 ml de solución salina estéril y se agita suavemente para desprender el desarrollo bacteriano, el cual se pasa a una botella de Virtis, para homogenizar el desarrollo bacteriano, durante 20 minutos a 300 - 400 rpm. El sistema que se utiliza para esta operación se muestra en la figura 1.

4.3. - Una vez terminado el tiempo de homogenización del producto, éste se lleva a un frasco de cosecha, tal como se muestra en la figura 2.

5. - Controles al producto intermedio:

5.1. - Cálculo de la concentración de microorganismo por nefelometría: se toma una alicuota del frasco de cosecha y se mide la capacidad contra el estándar correspondiente.

5.2. - Cuenta de microorganismos viables: se toma una muestra de 1 ml con el cual se hacen diluciones con solución salina isotónica estéril, que comprenda de 10^{-1} a 10^{-10} ; con cada dilución se siembran por lo menos tres cajas con medio de triptosa agar. Se incuban a 37° C durante 24 -- hrs. se cuenta el número de colonias en la placa con 20 a 100 colonias y se calcula el número de bacterias viables por ml.

5.3. - Pureza: se hace una tinción de Gram y se siembra 0.1 ml del producto en tubos conteniendo medio de triptona modificado, caldo infusión cerebro-corazón, medio de tioglicolato fluido (USP) y caldo Sabouraud - (USP). Con excepción de este último que se incubaba a 28°C por 14 días, - los demás se incuban a 30°C por 7 días. No deberá observarse desarrollo en ninguno de los tubos.

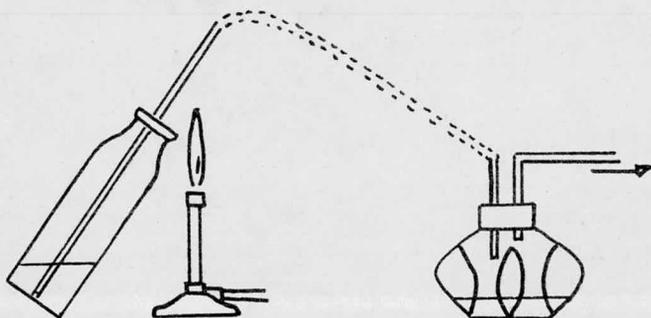


figura # 1

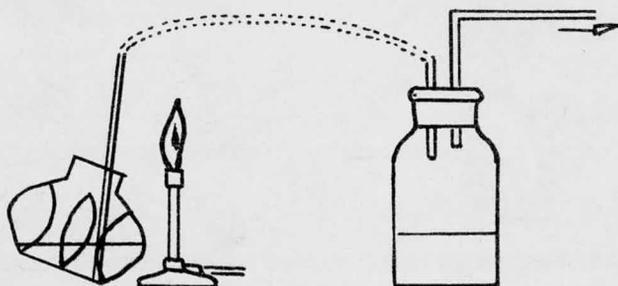


figura # 2

5.4. - Ajustes de la concentración y liofilización: Se ajusta la concentración de microorganismos a tener 10^8 bacterias viable/ml con solución salina isotónica estéril y se adiciona un volumen igual de leche descremada para uso bacteriológico al 20% estéril. Se envasa el producto en volúmenes de 10 ml en frascos ampula y se liofiliza.

6.0. - Controles al producto terminado:

6.1. - Pruebas de pureza: Se siembra 0.5 ml de la vacuna reconstituida con agua destilada estéril, en dos de cada uno de los siguientes medios: agar sangre, triptona-modificado, triptosa agar, medio fluido de tioglicolato (USP), infusión cerebro corazón y medio de Sabouraud (USP). Con excepción de este último que se incuba a 28°C por 14 días, todos los demás se incuban a 32°C durante 7 días. No se deberá observar desarrollo microbiano en ningún tubo.

6.2. - Pruebas de inocuidad: cada inmunógeno utilizado (vacuna experimental, vacuna comercial y bacterina de referencia), se prueba en lotes de 8 ratones, a los cuales se inocula 0.5 ml de cada producto por vía intraperitoneal. Los ratones se observan diariamente durante catorce días. Asimismo, se realizan pruebas en cuyes, inoculando 5 ml de vacuna por vía intraperitoneal en lotes de 3 animales por cada producto. Los cuyes se observan diariamente durante 14 días. Los animales deben sobrevivir este período de observación sin presentar ninguna alteración, en caso de muertes se deberá efectuar la necropsia para determinar la causa de la enfermedad.

6.3. - Pruebas de identidad (ver incisos: 3.1 y 3.2)

6.4. - Pruebas de potencia:

A. - Se utilizan 25 cerdos libres de anticuerpos contra E. rhusiopathiae.

B. - Los cerdos se distribuyen en la forma siguiente: lote 1. - Vacuna experimental, 8 cerdos. Lote 2. - Vacuna comercial, 5 cerdos. Lote 3. - Bacterina de referencia, 6 cerdos. Lote 4. - Controles, 6 cerdos.

C. - Dosificación y vía de inoculación:

Immunizante	Dosis
Bacterina de referencia	2 ml
Vacuna comercial	2 ml
Vacuna experimental	2 ml

La vía de inoculación para todos los productos es intramuscular, en la región glútea.

D. - Preparación de la dosis de exposición: A partir de una semilla de la CepaEl-6 de Exposición Americana, se siembran tubos con medio inclinado de triptone modificado y 10% de suero equino. Se incuban a 37°C por 24 hrs. De aquí se inoculan matraces Erlenmeyer con 500 ml del mismo medio se incuban a 37°C por 48 hrs. Después se homogenizan las células en un aparato de Virtis por 20 min. Se ajusta la concentración nefelométricamente a 125×10^6 bacterias/ml y se realiza cuenta viable. La prueba es válida si el inóculo contiene 200 millones de unidades formadoras de colonias por cada 2 ml, lo cual equivale a una dosis de exposición según el Estándar de Requerimientos B-46 para vacunas y bacterinas del -

Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (21).

E. - Para que el ensayo sea válido, según el Estándar antes mencionado ninguno de los cerdos vacunados debe tener temperatura mayor a 40.3°C en las primeras 24 hrs. En tanto que los animales del lote control deberán presentar fiebre de 41.7°C o más dentro de las primeras 16 hrs., - o de 40.9°C dentro de las 48 hrs. siguientes a la exposición, también deberá observarse en estos animales signos característicos de la enfermedad.

CAPITULO III

RESULTADOS

Ocho días antes de la fecha fijada para la exposición (14 días después -- de la vacunación), se presentó un cuadro neumónico en los cerdos. Murió un cerdo del lote de la vacuna experimental y otro de la vacuna comercial. Se practicó la necropsia de donde se logró aislar e identificar Pasteurella multocida, a partir del pulmón. Se practicaron antibiogramas y la bacteria aislada resultó sensible a la cloromicetina. Los cerdos se trataron durante cuatro días.

Siete días después de dar por terminado el tratamiento se eliminaron tres cerdos del experimento, por presentar signos de enfermedad en el momento de la exposición, uno de ellos pertenecía al lote control, otro al de la bacterina y uno más al de la vacuna comercial.

Los cerdos restantes se expusieron a 200 millones de unidades formadoras de colonias, de la Cepa El-6 de Exposición Americana, por vía intramuscular. Esto se realizó 25 días después de la inmunización de los cerdos.

Las pruebas de esterilidad, inocuidad, identidad y pureza, fueron satisfactorias para cada uno de los productos en estudio. En cuanto a las pruebas de potencia, se tienen los siguientes resultados.

Lote de la bacterina de referencia. - Se presentó un esquema febril como se muestra en la gráfica No. 1, en el que se observa que ninguno de -

los cerdos manifestó fiebre de 40.3°C durante las primeras 24 hrs. de la exposición. De hecho, ninguno rebasó las 40.1°C en los siguientes días a excepción de la máxima temperatura registrada por uno de ellos de 41.1°C al sexto día, lo que no es significativo.

Ninguno de los cerdos presentó lesiones cutáneas ni modificaciones en el comportamiento general.

De acuerdo con el Estándard de Requerimientos B-46 para vacunas y bacterinas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica ninguno de los cerdos puede considerarse susceptible (21).

Lote de la vacuna comercial. - Ninguno de los tres cerdos restantes en este lote presentó fiebre superior a los 40.9°C durante más de 48 hrs., (gráfica No. 2). Uno de los cerdos presentó una lesión característica en la región dorsal. Ninguno presentó cambios en el comportamiento general.

Lote de la vacuna experimental. - De los siete cerdos de este lote, ninguno presentó temperatura de 40.3°C en las primeras 24 hrs. ni mantuvo fiebre de 40.9°C por más de 48 hrs. (gráfica No. 3). Las variaciones observadas son mínimas, con 1.5°C , de diferencia máxima. En los siguientes días se hace mucho más estable, siendo la diferencia de 0.5°C entre la temperatura mínima y máxima hacia el 5° día de la aplicación de la dosis de prueba.

Ninguno de los cerdos presentó lesiones cutáneas ni cambios en el comportamiento general.

De acuerdo con el estándar de requerimientos B-46 para vacunas y bacterinas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica ninguno de los cerdos puede considerarse como susceptible (21).

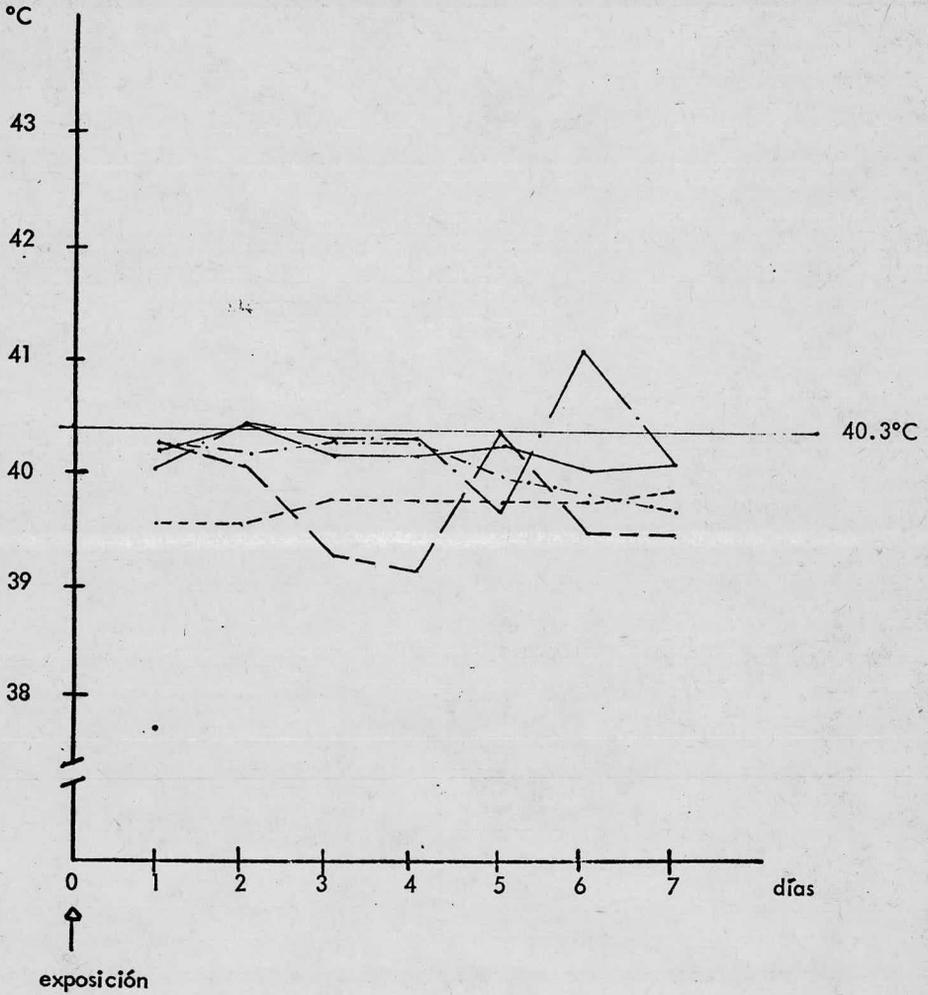
Lote control. - Constó finalmente de cinco cerdos, presentó el cuadro febril que se muestra en la gráfica No. 4.

Cuatro de los cinco cerdos, presentaron fiebre igual o superior a 41.7°C durante las primeras 24 hrs., o sea un 80% y en forma alterna, ese mismo 80% presentó fiebre de 40.9°C por más de 48 hrs., a lo largo de la observación. Uno de los cerdos mostró fiebre hasta las 72 hrs., en que alcanzó 40.5°C para bajar luego a 40.1°C a las 96 hrs. Sin embargo, se mostraba sumamente decaído y anorético, por lo que, de acuerdo con el estándar de potencia, se procedió a sacrificarlo. Como producto de la necropsia se aisló E. rhusiopathiae a partir de líquido pericárdico.

Todos los controles presentaron manchas metastásicas características en diversas localizaciones del cuerpo.

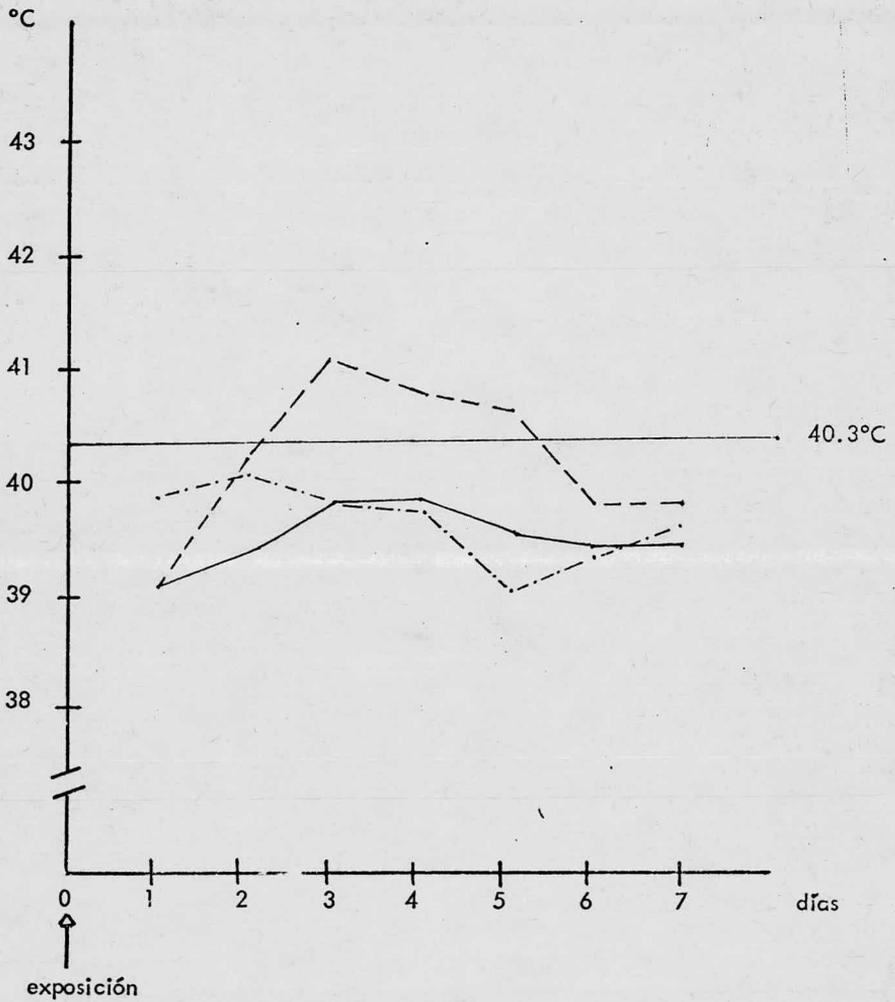
De esta forma el 100% de los controles se consideran susceptibles, de acuerdo al Estándar de Requerimientos B-46 para vacunas y bacterinas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (21).

BACTERINA DE REFERENCIA



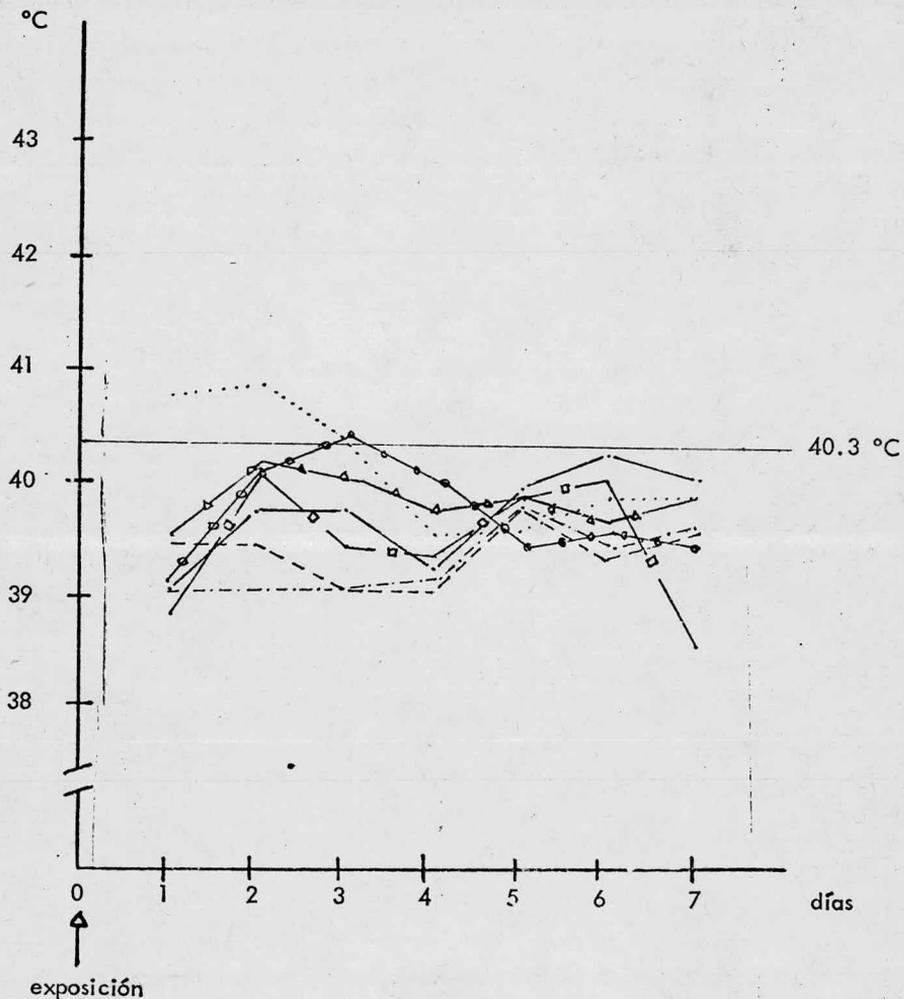
Gráfica 1

VACUNA COMERCIAL



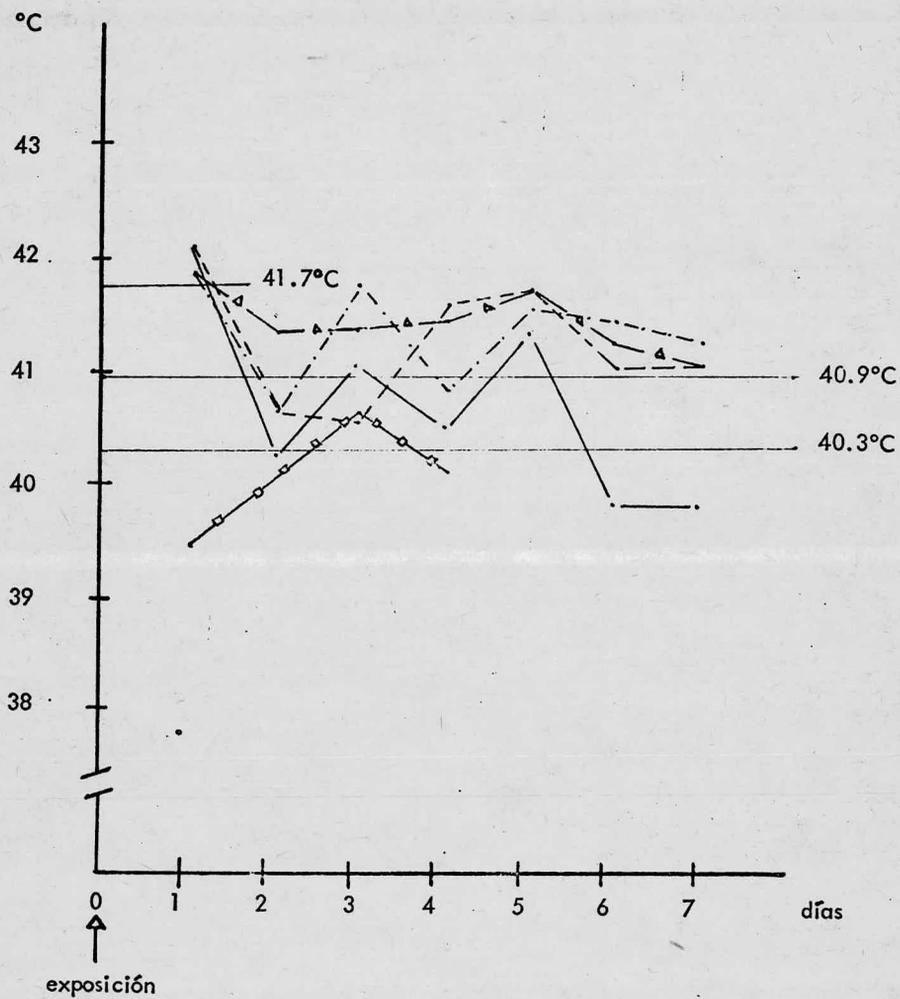
Gráfica 2

VACUNA EXPERIMENTAL



Gráfica 3

LOTE CONTROL



Gráfica 4

CAPITULO IV

DISCUSION

A pesar de la neumonía presentada en forma crítica durante el período de inmunogénesis, los cerdos de los lotes de la vacuna experimental y de la bacterina de referencia, desarrollaron una buena respuesta inmunológica contra Erysipelothrix rhusiopathiae, al pasar satisfactoriamente -- las pruebas de potencia. Sin embargo cabe suponer que la infección y la antibioterapia influyeron en forma negativa en los resultados, que en -- otras condiciones pudieran haber sido mejores aún.

Dado el reducido número de cerdos finalmente utilizados en el lote correspondiente a la vacuna comercial, no se puede comparar los resultados en las vacunas en experimentación.

La vacuna experimental resultó superior a la bacterina de referencia utilizada, ya que protegió en un 85.7% a los cerdos expuestos, en tanto que la bacterina lo hizo en un 80%.

De acuerdo al Estándard de Potencia del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica, la vacuna experimental y la bacterina de referencia proporcionada por el Dr. Shuman, son satisfactorias, ya que pasaron las pruebas establecidas por este Departamento (21).

CAPITULO V

R E S U M E N

En 1973, se aisló una cepa de E. rhusiopathiae en el Edo. de Hidalgo, a partir de la tonsilla de un cerdo, que no tenía erisipela. Esto motivó, -- dado que es una zona libre de erisipela y que se trataba de un hato sin va cunación, a llevar a cabo estudios conducentes a conocer las caracterís ticas de la cepa aislada.

Durante once pases sucesivos en ratones, no revertió a la patogenicidad. Y en aglutinación cruzada con otras 17 cepas de campo aisladas en Méxi-- co, reaccionó con el 77% de los anticuerpos, con esta cepa se preparó -- una vacuna experimental. Su potencia en cerdos se comparó con la de -- una vacuna comercial y una bacterina de referencia del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Los cerdos inmunizados fueron "de-- safiados" con la cepa El-6 de Exposición Americana, empleando como -- controles cerdos sin inmunizar.

La vacuna experimental resultó superior a los otros inmunógenos, ya que protegió en un 85.7% a los cerdos expuestos en tanto que la bacterina de-- referencia lo hizo en un 80%, la vacuna comercial no pudo ser evaluada. - Los controles fueron susceptibles en un 100%.

C O N C L U S I O N E S

1. - La vacuna experimental confirió una buena inmunidad contra erisipela

porcina, al probarse con una cepa de exposición estandarizada.

2. - El experimento y los resultados son válidos ya que los cerdos del lote control fueron susceptibles en un 100% y los inmunógenos utilizados -- cumplieron satisfactoriamente los requerimientos del Estándard de Potencia del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (21).

3. - Se hace necesario tipificar la cepa vacunal en un Laboratorio de Referencia para disponer de un Patrón de la semilla.

4. - Es importante comprobar, la no regresión a la patogenicidad de la cepa vacunal.

5. - Se requiere hacer estudios para conocer el período de inmunidad con ferida por esta cepa, y es deseable que éste abarque cuando menos el período productor de la hembra.

Es necesario conocer también si hay transmisión pasiva de esta inmunidad. Otro aspecto interesante es conocer los efectos secundarios de esta vacuna.

6. - Se hace necesario el diseño de un método de producción a escala industrial de esta vacuna que incluya el proceso de liofilización, compatible con la supervivencia de un número de unidades formadoras de colonias equivalentes al inoculado en la presente experiencia.

7. - Por otro lado se sugiere practicar las pruebas de campo necesarias para garantizar la eficacia del producto en la lucha contra la erisipela --

porcina y de otras especies en México.

8.- Finalmente se recomienda determinar el comportamiento de la cepa vacunal en humanos, que han tenido contacto con los animales vacunados, mediante la búsqueda de anticuerpos.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

1. - Ando, K., y Morilla, Y. 1959: Studies on the effect of the Tween 80 on the growth of Erysipeolothrix Insidiosa Japan J. Microb. 3: 86.
2. - Atkinson, N. 1941: A study of some Australian strains of Erysipelothrix. Austral. J. Exptl. Biol. 19: 45.
3. - Blood, C.D., y Henderson, A.J. 1974. Veterinary Medicine, 4th E. The Macmillan Publishing Co. Inc. N.Y. 312.
4. - Buchanan, R.F., y Gibbons, N.E. Editors, 1974: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th E. The Williams and Wilkins Co. Baltimore: 597.
5. - Correa, G.P.; Lydia, H.M. y Vargas, Gr. 1972: Pureza e inocuidad de cinco bacterinas y una vacuna comercial contra erisipela porcina y su potencia ante una cepa mexicana y una americana. Memorias del IV Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
6. - Dougherty, R.W., Shuman, R.D. Ullenax, C.H., Witzel, D.A. Buck, W.B. Wood, R.L. y Cook, H.M., 1965: Physiopatological studies of erysipelas in pigs. Cornell Vet., 55: 87.
7. - Dunnes, W.H. Editor. 1958: Diseases of swine, The Iowa State University Press Ames. Iowa.

8. - Esparza, H. y Ramírez, R. 1968: Boletín del Colegio Nacional de --
Médicos Veterinarios Zootecnistas de México. 5: 17 y
50.
9. - Fechner, J. 1966: Vacunas y vacunación de los animales domésticos,
1o. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 51
10. - Harrington, R. Jr. 1973: Transmission of Erysipelothrix rhusiopa-
thiae In swine by a slap tatto instrument. Am. J. Vet. --
Res. 33: 1109.
11. - Harrington, R. Jr. and Ellis, E.M. 1972: Erysipelothrix Infection -
in swine suspected of having hog cholera. Am. J. Vet. --
Res. 33: 853.
12. - Hugo, B.W. Editor 1971: Inhibition and Destruction of the Microbial
Cell Academic Press. N. Y.
13. - Inst. Mex. Del Seguro Social (IMSS), 1977: Boletín Epidemiológico --
Mensual. 5 (4): Cuadros, C-2A, C-5 y C-7.
14. - Kalf, F.G., y Grace, A.M. 1964: The antigenic components of Ery-
sipelothrix rhusiopathiae. III Purification of B and C --
antigens. Arch. Blochem. and Biophys., 107: 141.
15. - Kalf, F.G., y White, G.T. 1963: The antigenic components of Ery-
pelothrix rhusiopathiae. II Purification and chemical - -
characterization of type specific antigen. Arch. Biochem
and Biophys. 102: 39.
16. - Kwapinski, J.B.G. 1969: Analitical serology of microorganisms. --
Vol. II. Editorial John Wiley and Sons. 537. N. Y.

17. - Lozano, S. J. L. 1971: Exploración Serológica de Erisipela en México. Tesis Profesional. Fac. de Med. Vet. y Zoot. - - U. N. A. M.
18. - Merchant, I. A. 1970: Bacteriología y Virología Veterinaria. 3a. - ed. Editorial Acribia. Zaragoza España. 478.
19. - Murase, N., and Yoichi, E. 1959: Epizootiological significance of Erysipelothrix rhusiopathiae. Harboured in the tonsils of apparently healthy pigs. Japan J. Vet. Sci. 22 : 1.
20. - Olivares, O. S., Martell, D. M. A., Torres, B. J. y Flores, A. H., - 1971: Características Generales de Veinte Cepas de -- Erysipelothrix Insidiosa. Aisladas en México. Técnica Pecuaria en México. No. 18, Pág. 32.
21. - Ose, E. E. 1972: Evaluation of Erysipela Vaccines, J. Am. Vet. Ass. 160: 603.
22. - Packer, A. R., 1943: The use of sodium azide (NaN_3) and crystal -- violet in selective medium for Streptococci and Erysipelothrix rhusiopathiae. J. Bact. 46: 343.
23. - Rosenwald, A. S., y Dickinson, M. E., 1941: Swine erisipelas in -- turkeys. Am. Vet. Res. 2: 202.
24. - Shatalov, F. V., 1962: The Path of Infections in Erysipelothrix Veterinaria. 35: 46 (Russia).
25. - Sikes, D. 1965: Some biochemic properties of a smooth colony of -- Erysipelothrix Insidiosa. used for antigen production -- in the test. Am. J. Vet. Res. 26: 636.

26. - Sikes, D. 1968: Experimental productions of rheumatoid arthritis of swine: Physiopathologic changes of tissues Am. J. -- Vet. Res. 29: 1719.
27. - Sikes, D., Neher, M.G. y Doyle, L.P. 1956: Swine erysipelas I. A discussion of experimentally disease. Am. J. Vet. Res 178: 277.
28. - Shuman, R.D., Wood, R.L., y Nord, N. 1955: The effect of passage in pigs on Erysipelothrix rhusiopathiae (insidiosa). with reference to serotype. Cornell Vet. 55: 233.
29. - Topley and Wilson's. 1964: Principles of Bacteriology and Inmunity. T.I., 5th E. Edward Arnold (Publishers) LTD. London. 523.
30. - Truszczyński, M. 1961: The Antigenic structure of virulent and avirulent strains of Erysipelothrix rhusiopathiae. I Immunobiologic properties. Am. J. Vet. Res. 22: 836.
31. - Truszczyński, M. 1961: The Antigenic structures of virulent and avirulent strains of Erysipelothrix rhusiopathiae. II Immunochemic and serologic Investigations. Am. J. Vet. Res. 22: 839.
32. - Truszczyński, M. 1961: The Antigenic structure of virulent and avirulent strains of Erysipelothrix rhusiopathiae. III The agar gel diffusion precipitation test. Am. J. Vet. Res. -- 22: 846.
33. - Vargas, G.R., Arteaga, V.J., y Correa, G.P. 1973: Pruebas de Po

- tencia de una vacuna y siete bacterinas contra la Erisipela Porcina en Cerdos y Ratones, Memorias de la X - Reunión Anual del Inst. Nal. de Invest. Pecuarias.
34. - Vargas, G. R., Correa, G.P., y Martínez, P.A. 1974: Evaluación de biológicos comerciales contra erisipela, mediante - pruebas de confrontación en cerdos. Memorias de la -- XI Reunión Anual del Inst. Nal. de Invest. Pecuarias.
35. - Vargas, G. R., Jiménez, G.A.E. y Díaz, R.C. 1974: Comparación entre las pruebas de aglutinación en placa, en tubo e - intradermo reacción, para la detección de anticuerpos - contra Erisipela. Memorias de la XI Reunión Anual del Inst. Nal. de Invest. Pecuaria.
36. - Wasinsky, K. 1976: Studies on the reversion of virulence in - - attenuated Erysipelothrix rhusiopathiae strains used for production of live vaccines. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 20: 6
37. - White, G.T., 1962: Type specificity in the vaccination of pigs with - killed Erysipelothrix rhusiopathiae. Am. J. Vest. Res. 23: 752.
38. - White, G.T., y Kalf, F.G. 1961: The antigenic components of Ery- sipelothrix rhusiopathiae. I. Isolation and serological - identification. Arch. Biochem. and Biophys. 95: 458.
39. - White, T.C., y Shuman, R.D. 1961: Fermentation reactions of Ery- sipelothrix rhusiopathiae, J. Bact. 82: 593.

40. - White, R. R. , y Verwey, W.F. 1970: Isolation and characterization of protective antigen-containing particles from culture supernatant of Erysipelothrix rhusiopathiae. Infec. -- Immun. 1: 380.
41. - White, R. R. y Verwey. F.W. 1970: Solubilization and characterization of a protective antigen of Erysipelothrix rhusiopathiae. Infec. Immun. 1: 387.
42. - Wood, L.R. 1965: A selective liquid medium utilizing antibiotics for isolation of Erysipelothrix insidiosa. Am. J. Vet. -- Res. 26: 1303.