

CAPACIDAD PROTECTORA CONFERIDA A LAS CRÍAS POR ANTICUERPOS MATERNOS INDUCIDOS POR UN CANDIDATO VACUNAL DE SUBUNIDAD PROTEICA (E2)

E. Vega*, Maritza Barrera*, María A. Abeledo*, M. del Pilar Rodríguez**, M. Teresa Frías *, JM. Figueredo*, Daine Chong*, C. Bulnes*, Sara Castell*

*Centro Nacional de Sanidad agropecuaria (CENSA), Apdo 10, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: evega@censa.edu.cu; ** Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Habana, Cuba.

RESUMEN: Con el objetivo de evaluar la capacidad protectora conferida por los anticuerpos maternos de crías nacidas de reproductoras inmunizadas con un candidato vacunal de subunidad proteica E2, obtenido por transfección directa al epitelio glandular mamario de cabras, de un vector adenoviral contra el virus de la Peste Porcina Clásica (VPPC) frente al reto con una dosis de 10^4 PID₅₀ (dosis infecciosa del 50% de los cerdos) de la cepa virulenta del VPPC «Margarita», se conformaron cuatro grupos de cerdos de la categoría crías de 34 días de edad promedio. El grupo 1 y 2 conformados por cinco cerdos con anticuerpos maternos transferidos pasivamente de madres inmunizadas con el candidato vacunal de subunidad proteica E2 y los grupos 3 y 4 (grupos controles), constituidos cada uno por tres cerdos seronegativos a Peste Porcina Clásica (PPC) mediante el ensayo de neutralización ligada a la peroxidasa (NPLA). Los grupos 1 y 3 se retaron por la vía intranasal, mientras los grupos dos y cuatro por la vía intramuscular. Los cerdos retados en presencia de anticuerpos maternos por la vía intranasal e intramuscular resultaron negativos a la viremia y mortalidad, mientras que los cerdos retados en ausencia de anticuerpos maternos se enfermaron y resultaron no protegidos frente a la viremia. El grupo control de cerdos retados por la vía intramuscular presentó un menor tiempo de instauración del proceso infeccioso con respecto a los cerdos retados por la vía intranasal.

(Palabras clave: Peste Porcina Clásica; anticuerpos maternos; cepa Margarita; candidato vacunal de subunidad proteica (E2))

PROTECTION CONFERRED TO SWINE OFFSPRINGS INDUCED BY A VACCINE CANDIDATE OF PROTEIN SUBUNIT (E2) OF CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS

ABSTRACT: Four groups of pigs of 34 days old were conformed in order to evaluate the protective capacity conferred for maternal antibodies to offspring from mothers vaccinated with a vaccine candidate of protein subunit E2, against Classical Swine Fever virus (CSFV), obtained for adenoviral vector transduced to the mammary gland of goats, against challenge with a highly pathogenic strain (Margarita) at doses of 10^4 PID₅₀ (infective doses 50% pigs). Groups 1 and 2 were conformed by five pigs with passively transferred maternal antibodies from mothers vaccinated with a vaccine candidate of protein subunit E2, and groups 3 and 4 (control groups), conformed by three seronegative pigs to Classical Swine Fever (CSF), determined by neutralizing peroxidase linked assay (NPLA). The groups 1 and 3 were challenged by intranasal route and groups 2 and 4 by intramuscular route. The pigs with passively transferred maternal antibodies from mothers vaccinated and challenge by intranasal and intramuscular route were negative to viraemia and mortality; while those from the control groups were found sick and not protected for viraemia after challenge. The control group challenge for intramuscular route presented a smaller time of onset of the infectious process with respect to the group challenged by intranasal route.

(Key words: Classical Swine Fever; maternal antibodies; Margarita strain; vaccine candidate of protein subunit (E2))

INTRODUCCIÓN

La Peste Porcina Clásica (PPC) es una enfermedad viral, altamente contagiosa, producida por el virus de la peste porcina clásica (VPPC) con amplia distribución mundial. Se considera una de las enfermedades infecciosas más importantes del cerdo, que afecta tanto al cerdo doméstico como al de vida salvaje (1,2).

En el cerdo, el paso transplacentario de inmunoglobulinas al feto es limitado debido al tipo de placenta que presenta; como consecuencia, los neonatos dependen completamente de la protección que suministran los anticuerpos maternos en el periodo que el sistema inmune neonatal está insuficientemente desarrollado para responder activamente (3). En este periodo se necesitan niveles excepcionalmente altos de anticuerpos maternos neutralizantes para proteger pasivamente a los cerdos contra el desafío frente al VPPC (4).

Se ha reportado previamente, la obtención de un candidato vacunal de subunidad proteica, basado en la glicoproteína viral E2 del VPPC, obtenida a partir de la cepa «Margarita» del virus de la PPC y expresado en la glándula mamaria de cabras por transfección directa al epitelio glandular mamario de un vector adenoviral (5). La cepa Margarita es producto de un aislado nativo cubano caracterizada desde el punto de vista antigénico, biológico y molecular (6).

Este candidato vacunal ha mostrado una alta capacidad inmunogénica y protectora en animales vacunados (5,7,8); sin embargo se desconoce la capacidad protectora que confiere a las crías los anticuerpos maternos derivados de la vacunación de las madres con este candidato, aspecto que constituye el objetivo del presente estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Vacuna

Candidato vacunal oleoso de subunidad proteica E2, contra el virus de la peste porcina clásica obtenido mediante la transducción por un vector adenoviral en la glándula mamaria de cabras y purificado a partir de la leche.

Vacunación

Se aplicaron 2 mL (25 µg), adyuvado con Montanide 888, por vía intramuscular profunda en la región del cuello, en una cerda clínicamente sana con antecedente de dos inmunizaciones como mínimo con el candidato vacunal de subunidad proteica E2 y un año de aplicada la última dosis.

Una cerda seronegativa a NPLA frente al VPPC recibió placebo aplicado en igual momento y de manera similar a lo descrito para la cerda anterior.

Conformación de grupos

Se conformaron de manera aleatoria cuatro grupos de cerdos de la categoría crías, de uno y otro sexo, nacidos en la misma semana tecnológica; destetados a los 34 días de edad promedio.

Grupo 1: Cinco cerdos con anticuerpos maternos específicos frente a PPC (1/6400-1/12800), retados por vía intranasal, procedentes de madre inmunizada con el candidato vacunal E2.

Grupo 2: Cinco cerdos con anticuerpos maternos específicos frente a PPC (todos con 1/12800), retados por vía intramuscular, procedentes de madre inmunizada con el candidato vacunal E2.

Grupo 3: Tres cerdos sin anticuerpos maternos específicos frente a PPC, retados por vía intranasal, procedentes de madre seronegativa al VPPC.

Grupo 4: Tres cerdos sin anticuerpos maternos específicos frente a PPC, retados por vía intramuscular, procedentes de madre seronegativa al VPPC.

Los cerdos se identificaron de manera individual a través de muescas en las orejas y fueron trasladados a un área especial con condiciones de aislamiento. Los animales se confrontaron con la Cepa Margarita, a razón de 10^4 DL₅₀ (dosis infecciosa del 50% de los cerdos) en 2 mL por la vía intranasal e intramuscular profunda, según lo descrito anteriormente para cada grupo experimental.

Diariamente se realizó inspección clínica, la cual incluyó medición de la temperatura corporal. Se tomaron muestras de sangre, empleando la vía del seno venoso oftálmico (2mL), las que se colectaron individualmente en tubos con anticoagulante (EDTA) para el conteo de leucocitos totales, conteo diferencial y aislamiento viral a partir de sangre total en los días 0, 3, 5, 7, 9, 12 y 14 post-confrontación, se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante para detección de anticuerpos neutralizantes en el momento del reto (día cero) y 14 días después.

El aislamiento del VPPC se realizó a partir de sangre total en células PK15 en rápida división, por la siembra simultánea en placas de 96 pocillos. Las placas se examinaron después de incubación a 37°C, en incubadora con atmósfera húmeda y 5% de CO₂, por 48 horas, las monocapas se fijaron por 2 horas a 80°C, y fueron recubiertas por un suero hiperinmune porcino contra el virus, producido en el laboratorio. La reacción

se reveló con el empleo de un conjugado proteína A-peroxidasa (Sigma) y del cromógeno 3-amino-9 ethyl carbazole (9).

Se determinó la presencia de anticuerpos neutralizantes (NPLA) mediante la técnica de neutralización ligada a la inmunoperoxidasa (NPLA)(10), en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos con células PK-15 y 100 DICT₅₀ de la cepa Margarita.

Se determinaron los parámetros hemáticos de leucocitos totales y el conteo diferencial. El conteo de leucocitos totales se realizó en cámara contadora de Neubauer. Para el conteo diferencial se realizaron frotis teñidos con Giemsa y la diferenciación de 200 células en microscopía óptica siguiendo el método de zig-zag (11).

Se realizó la necropsia de los animales que resultaron muertos durante el experimento así como de los sacrificados en estado agónico, con el objetivo de evaluar el cuadro lesional, mientras que los cerdos sobrevivientes a la confrontación se sacrificaron con igual propósito a los 14 días después de la misma. Para el sacrificio se empleó el método de desangrado. En todos los casos se realizó exámen anatomopatológico.

Análisis estadístico

Para evaluar la existencia de diferencias significativas en la proporción de animales que presentaron signos clínicos y lesiones macroscópicas *post-mortem*, entre los diferentes grupos, se realizó un análisis de Comparación de Proporciones (Compapro), SPC versión 2.1, Censasoft, 1988 desarrollado en el CENSA.

Criterios de protección

Se establecieron los siguientes criterios de protección frente al reto con el VPPC.

Protección contra los signos clínicos y mortalidad

Los cerdos no muestran signos compatibles con PPC tales como: fiebre ($\geq 40^{\circ}\text{C}$), leucopenia (conteo total de leucocitos $\leq 9 \times 10^9$ c/L) por dos o más días consecutivos, inapetencia, hemorragias cutáneas (cambio de coloración en la piel desde enrojecimiento hasta cianosis) en hocico, cara, oreja, abdomen y extremidades, conjuntivitis, secreciones nasales, estreñimiento o diarrea (desde pastosa hasta sanguinolenta), e incoordinación motora (ataxia, posición de sentado, caída del tren posterior, entre otros).

Protección de lesiones anatomopatológicas

Al examen macroscópico no se detectan alteraciones de tipo hemorrágico en parénquima renal, mucosa de la vejiga y vesícula biliar, ganglios linfáticos particularmente gastrohepáticos y mesentéricos, infartos marginales en bazo y lesiones necróticas o supurativas

en las tonsilas. En caso de alteraciones gastroentéricas se pueden constatar lesiones hemorrágicas en ganglios mesentéricos no significativas para PPC.

Protección Viroológica

Los cerdos con anticuerpos maternos no presentan viremia o esta es significativamente menor, tanto en número de animales como en días de duración, en comparación con los cerdos de los grupos controles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron diferencias significativas de los grupos con anticuerpos maternos (grupos 1 y 2) con respecto a los grupos 3 y 4, para los signos clínicos de inapetencia, conjuntivitis, leucopenia y fiebre, los que son considerados como signos clínicos compatibles con Peste Porcina Clásica (12, 13, 14, 15, 16). Sin embargo, los cerdos confrontados en presencia de anticuerpos maternos (grupo 1 y 2) mostraron procesos diarreicos no hemorrágicos, sin evidenciar diferencias estadísticas con relación a los grupos 3 y 4 respectivamente. Esto pudiera estar relacionado con los cambios en las condiciones de manejo, tenencia y alimentación, lo cual es considerado un factor predisponente para la aparición de diarrea (17). Además de los signos clínicos señalados anteriormente, se encontraron dos cerdos con cianosis en abdomen y un cerdo con incoordinación a los 5 días post-confrontación (dpc) en el grupo 4 (grupo control), con un aumento significativo ($p < 0.05$) en la presentación de cianosis con relación a los grupos 1 y 2. Los grupos 3 y 4 revelaron un comportamiento estadístico similar (Tabla 1).

Se ha descrito la presencia de fiebre, trombocitopenia y leucopenia como los signos clínicos indicativos de Peste Porcina Clásica más constantes después de la confrontación experimental con diferentes cepas del VPPC (18), en cerdos jóvenes un hallazgo constante es la fiebre, generalmente superior a 40°C (15), considerada como el signo clínico post-confrontación más consistente en los cerdos controles, en los diferentes estudios realizados (19).

Los cerdos confrontados en presencia de anticuerpos maternos (grupo 1 y 2) no mostraron fiebre durante el periodo de tiempo evaluado, con excepción de un cerdo del grupo 2, confrontado por la vía intramuscular que presentó fiebre (40°C y $40,1^{\circ}\text{C}$), en el séptimo y octavo dpc, con regreso a la temperatura corporal fisiológica después de este momento. El mismo no presentó otras alteraciones clínicas compatibles con la enfermedad. Sin embargo, los animales del grupo 3 mostraron fiebre a partir del séptimo dpc,

TABLA 1. Principales signos clínicos post-confrontación./ *Main post-challenge clinical signs*

Grupos	Signos clínicos													
	Inapetencia		Cianosis en abdomen		Conjuntivitis		Diarrea		Incoordinación		Leucopenia $\leq 9 \times 10^9$ CIL		Fiebre $\geq 40^\circ\text{C}$	
	PA ^c	DP ^d	PA ^c	DP	PA ^c	DP	PA ^c	DP	PA ^c	DP	PA ^c	DP	PA ^c	DP
Grupo 1	0/5 ^a	---	0/5 ^a	---	0/5 ^a	---	3/5 ^a	(2-5)	0/5 ^a	---	0/5 ^a	---	0/5 ^a	---
Grupo 2	0/5 ^a	---	0/5 ^a	---	0/5 ^a	---	2/5 ^a	(8-11)	0/5 ^a	---	0/5 ^a	---	1/5 ^a	(7-8)
Grupo 3	3/3 ^b	(4-11)	0/3 ^b	---	2/3 ^b	(3-5)	3/3 ^a	(8-10)	0/3 ^a	---	3/3 ^b	(5-11)	3/3 ^b	(7-12)
Grupo 4	3/3 ^b	(4-9)	2/3 ^b	(5-8)	3/3 ^b	(5-8)	3/3 ^a	(5-8)	1/3 ^a	(5-9)	3/3 ^b	(5-8)	3/3 ^b	(4-7)

Letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos para ($p \leq 0.05$).

PA^c: Proporción de animales con presentación de signos clínicos. Cantidad de animales afectados/ total de animales para cada grupo.

DP^d: Valores entre paréntesis, significan los días de presentación de cada signo clínico.

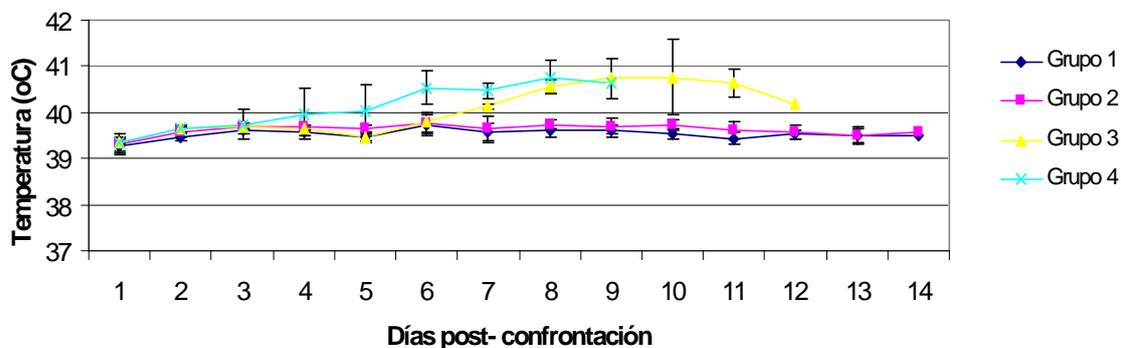
mientras que en el grupo 4 la fiebre comenzó a partir del cuarto dpc y se mantuvo en el transcurso de los días hasta cerca del momento de la muerte o sacrificio de los cerdos, donde se observó una tendencia a disminuir (Figura 1).

Diferentes autores han señalado que los procesos leucopénicos asociados a peste porcina clásica en condiciones experimentales se caracterizan por un conteo total de leucocitos $\leq 9 \times 10^9$ c/L (20,21,22,23).

Las variaciones hemáticas observadas comenzaron a partir del quinto dpc, cerdos de los grupos controles (grupos 3 y 4), caracterizado por un proceso de leucopenia (conteo total de leucocitos $\leq 9 \times 10^9$ c/L) con linfopenia (conteo total de linfocitos $\leq 50\%$) con una aparente recuperación de la leucopenia en el séptimo dpc sin embargo, a los 9 dpc la totalidad de los cerdos controles presentaron leucopenia con linfopenia. Por otra parte, los cerdos confrontados en presencia de anticuerpos maternos, tanto por la vía intranasal como por la intramuscular (grupo 1 y 2) tuvieron un comportamiento leucocitario similar entre sí, sin alteraciones significativas (Figura 2).

Los cerdos con anticuerpos maternos E2 no mostraron en su conjunto signos clínicos indicativos de peste porcina clásica, mientras que los cerdos confrontados en ausencia de anticuerpos maternos evidenciaron alteraciones clínicas compatibles con la enfermedad, las que se presentan más tempranamente en el grupo de cerdos retados por la vía intramuscular. Lo que confirma que títulos de anticuerpos maternos ≥ 256 protegen contra el reto con una cepa virulenta del virus de la Peste Porcina Clásica (4), así como, que la presentación de signos clínicos por la vía intramuscular podría ser menor del esperado en condiciones naturales debido a que la vía intramuscular no es la vía natural de infección (9).

Los resultados del examen anatomopatológico mostraron que el aumento de tamaño de los ganglios linfáticos mesentéricos, las hemorragias en la mucosa de la vejiga, el infarto marginal del bazo y las lesiones necróticas o supurativas en tonsilas, fueron constatadas exclusivamente en los animales de los grupos controles, las que se corresponden con las lesiones macroscópicas descritas como indicativas de PPC

**FIGURA 1.** Temperatura rectal post-confrontación./ *Post-challenge rectal temperature.*

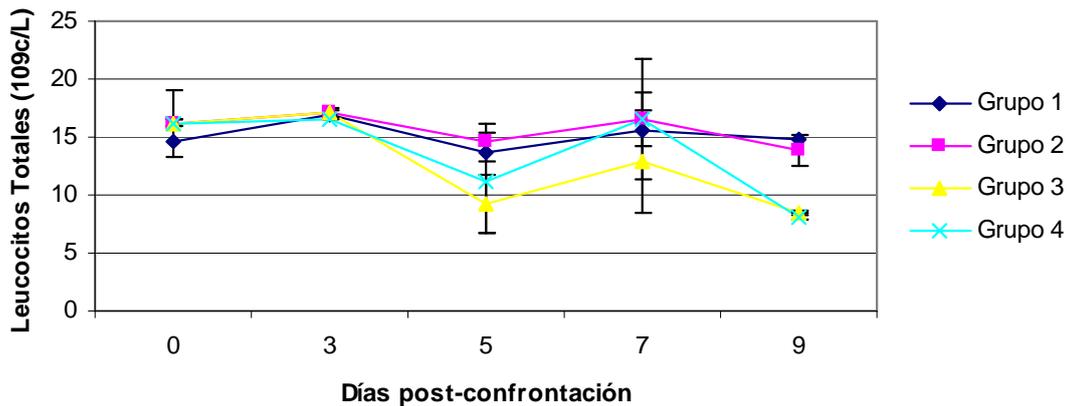


FIGURA 2. Leucocitos Totales post-confrontación./ *Post-challenge total leucocytes.*

(12,13,15). En el caso de las lesiones en las tonsilas se encontraron diferencias significativas entre los grupos con anticuerpos maternos y controles. La comparación entre los grupos 1 y 2 así como, entre los grupos 3 y 4, no mostró significación estadística (Tabla 2).

En sentido general se apreció una menor proporción de animales con lesiones anatomopatológica sugestivas de PPC en los grupos de cerdos con anticuerpos maternos, con menos del 50 % de los cerdos afectados por estas lesiones, excepto el grupo 1 que mostró congestión encefálica en más del 50 % de los animales estudiados, resultados que están en correspondencia con los hallazgos encontrados en la evaluación clínica.

Se emplearon la vía de reto intramuscular y intranasal, teniendo como base que la vía establecida intramuscular es la vía establecida por la Organización Mundial de Sanidad Animal para las pruebas de

inmunogenicidad de las vacunas basadas en cepas vivas atenuadas (10), mientras que la vía intranasal es considerada la vía natural de transmisión de la enfermedad, la cual se ha establecido como la vía principal de reto para la evaluación de las vacunas de subunidades proteicas contra el VPPC (19,24,25).

Se evidenció en este estudio que la dosis de 10^4 PID₅₀ garantiza la manifestación de los signos clínicos y lesiones anatomopatológicas en los animales retados; confirmado además, por la muerte o sacrificio sanitario de todos los cerdos controles antes de finalizar los 14 días post-confrontación.

Los cerdos confrontados en presencia de anticuerpos maternos E2, no muestran viremia después del desafío frente a la cepa virulenta del virus de la Peste Porcina Clásica, en contraposición con los cerdos de los grupos controles. La viremia se observó al quinto día post-confrontación en el grupo 3, mien-

TABLA 2. Principales lesiones anatomopatológicas post-confrontación./ *Main post-challenge gross lesions*

Grupos	Lesiones macroscópicas (c)								
	Aumentados		Hemorragias						
	Ganglios linfáticos mesentéricos	Ganglios linfáticos gastrohepáticos	Parénquima renal	Mucosa de la vejiga	Mucosa Vesícula biliar	Ganglios linfáticos superficiales	Infartos marginal bazo	Lesiones necróticas o supurativas en tonsilas	Congestión encefálica
Grupo 1	0/5 ^a	1/5 ^{ab}	0/5 ^a	0/5 ^a	0/5 ^a	2/5 ^{ab}	0/5 ^a	0/5 ^a	3/5 ^a
Grupo 2	0/5 ^a	0/5 ^b	2/5 ^{ab}	0/5 ^a	0/5 ^a	1/5 ^b	0/5 ^a	0/5 ^a	2/5 ^a
Grupo 3	1/3 ^{ab}	1/3 ^{ab}	3/3 ^b	1/3 ^{ab}	0/3 ^a	3/3 ^a	0/3 ^a	2/3 ^b	1/3 ^a
Grupo 4	3/3 ^b	2/3 ^a	3/3 ^b	3/3 ^b	0/3 ^a	3/3 ^a	1/3 ^a	2/3 ^b	3/3 ^a

Letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos para ($p \leq 0.05$).

^c: Proporción de animales con lesiones macroscópicas. Cantidad de animales afectados/ total de animales para cada grupo.

TABLA 3. Títulos de anticuerpos maternos en las crías, principales signos clínicos y aislamiento viral post-confrontación./ *Maternal antibody titers in offsprings, main clinical signs and post-challenge virus isolation*

Grupos	Títulos anticuerpos (NPLA)		Fiebre ^a	Leucopenia ? 9x10 ⁹ cIL	Aislamiento Viral en linfocitos					
	0 dpc ^b	14 dpc	dpc	dpc	3 dpc	5 dpc	7 dpc	9 dpc	12 dpc	14 dpc
Grupo I										
1	12800	1600	-	-	-	-	-	-	-	-
2	6400	6400	-	-	-	-	-	-	-	-
3	6400	3200	-	-	-	-	-	-	-	-
4	12800	12800	-	-	-	-	-	-	-	-
5	12800	3200	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo II										
6	12800	3200	-	-	-	-	-	-	-	-
7	12800	800	-	-	-	-	-	-	-	-
8	12800	6400	7	-	-	-	-	-	-	-
9	12800	6400	-	-	-	-	-	-	-	-
10	12800	6400	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo III										
11	≤10	IF	7	5	-	+	+	+	(IF)	
12	≤10	IF	8	9	-	+	+	+	+(IF)	
13	≤10	IF	7	5	-	+	+	+	+(IF)	
Grupo IV										
14	≤10	IF	7	5	+	+	+	+(IF)		
15	≤10	IF	4	9	+	+	+	+(IF)		
16	≤10	IF	4	9	+	+	+	+(IF)		

^a Temperatura rectal ≥40°C,

^bdpc: Días post-confrontación.

(IF): Infección Fatal, animales muertos o sacrificados en estado agónico.

tras que en el grupo 4, la misma se detectó en el tercer día, persistiendo hasta la muerte o sacrificio sanitario de los cerdos (Tabla 3).

Resultados similares a los nuestros se han informado por diferentes autores, donde cerdos sin anticuerpos maternos, retados por la vía intranasal en dosis 10² (DL₅₀) de la cepa Brescia desarrollaron signos agudos de peste porcina clásica, con aislamiento viral entre los 7 y 9 dpc y muerte o sacrificio de todos los cerdos entre los 8 y 10 dpc (25), mientras que en cerdos retados con una dosis de 10⁶ (DL₅₀) de la cepa Margarita, por vía intramuscular el VPPC se aisló tres días después del reto(9).

La protección de los cerdos con anticuerpos maternos sobre la replicación viral puede atribuirse a los altos niveles de anticuerpos maternos E2 en el momento del desafío; basados en los criterios de que la dosis de confrontación resultó letal para todos los cerdos controles y las consideraciones que sugieren que el periodo de replicación y localización del virus están correlacionados directamente con los niveles de anticuerpos maternos (26), y que los cerdos con títu-

los de anticuerpos maternos contra el VPPC ≥ 256 están protegidos pasivamente contra el reto frente a una cepa virulenta del VPPC(4).

Para establecer un criterio de protección se debe tener en cuenta de manera integrada los hallazgos encontrados durante la inspección clínica, examen anatomopatológico y aislamiento viral post-confrontación. Los resultados obtenidos evidenciaron que los anticuerpos maternos derivados de la vacunación de las madres con este candidato protegen a los cerditos de la presentación de viremia y mortalidad frente al reto con una cepa virulenta del VPPC.

REFERENCIAS

1. Moennig V. Introduction to classical swine fever virus, disease and control policy. *Vet. Microbiol.* 2000;73(2-3):93-102.
2. Dong NX, Chen H.Y. Marker strategies and candidate CSFV marker vaccines. *Vaccine.* 2007;25:205-230.

3. Nguyen, TV., Yuan, L., Azevedo, M., Jeong, K y González Ana-Maria, Saif, L. Transfer of maternal cytokines to suckling piglets. In vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Vet Immunology Immunopathology*. 2007;117:236-248.
4. Parchariyanon S, Tantasawasdi U, Pinyochon W, Methiyapan P. Immunity against swine fever vaccine II. Immunity against swine fever vaccine in piglets and protection level of maternal immunity in piglets before vaccination. *J. Thai Vet Med Assoc*. 1994;45(2): 37-45.
5. Toledo JR, Sánchez O, Montesino Raquel, Farnos O, Rodríguez Maria del Pilar, Alfonso P, et al. Highly protective E2–CSFV vaccine candidate produced in the mammary gland of adenoviral transduced goats. *J Biotechnol*. 2008;133:370-376.
6. Ganges Lillianne, Barrera Maritza, Díaz de Arce Heidy, Vega A, Núñez J.I, Sobrino F, et al. Antigenic, biological and molecular characterization of the Cuban CSFV isolate «Margarita». *Rev Salud Anim*. 2007;29(3):182-192.
7. Barrera Maritza, Sánchez O, Prieto Yanet, Castell Sara, Naranjo Paula, Rodríguez Maria del P, et al. Thermal stress treatment does not affect the stability and protective capacity of goat milk derived E2-marker vaccine formulation against CSFV. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;127:325-331.
8. Barrera Maritza, Sánchez O, Farnos O, Rodríguez María del Pilar, Domínguez Patricia, Tait H, et al. Early onset and long lasting protection in pigs provided by a classical swine fever E2-vaccine candidate produced in the milk of goat. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010;133:25-32.
9. Díaz de Arce Heidy, Roman G, Acevedo Ana M, Barrera Maritza. Detección del virus de la peste porcina clásica en muestras clínicas de cerdos experimentalmente infectados. *Rev Salud Anim*. 2003;25 (3):205-211.
10. Organización mundial de sanidad animal (OIE). Manual de la (OIE) sobre animales terrestres 2008. Capítulo 2.8.3. Peste porcina clásica (cólera del cerdo).
11. Schalm O.W, Jain NC, Carroll EJ. *Vet Haematol*. 1984. p.205-210. Edit Lea and febiger. Philadelphia.USA.
12. Arias M, Romero L, Gómez-Villamandos J.C, Sánchez Vizcaíno J.M. Peste porcina Clásica. 2002. Disponible en: <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/1/1-ppc.htm> [9-2-2010]
13. Elbers ARW, Jan H. Vos, Annemarie B, Van Exsel CA, Arjan S. Assessment of the use of gross lesions at post-mortem to detect outbreaks of classical swine fever. *Vet Microbiol*. 2003;96:345-356.
14. Frías-Lepoureau María T, Percedo María Irian. Reconociendo la peste porcina clásica. Manual Ilustrado. 2003. Producción gráfica MINREX.
15. Moennig V, Floegel-Niesmann, Greiser-Wilke, I. (2003): Review Clinical Signs and Epidemiology of Classical Swine Fever: A Review of New Knowledge. *Vet J*. 2003;165:11–20.
16. Pérez L.J, Díaz de Arce Heidy. Peste Porcina Clásica: Diagnóstico y control (Classical Swine Fever: diagnosis and control). *Revista electrónica de Veterinaria. REDVET*. 2008;9(11):1-22. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>. [12-1-2010]
17. García CD. Etología, manejo físico y alternativas terapéuticas en cerdos. México. 2002. Página 170.
18. Lubroth J. Epidemiología, virulencia y Peste Porcina clásica en las Américas. 1999. Disponible en: <http://www.rlc.fao.org/es> [12-1-2010]
19. Uttenthal A, Frédérique Le Potier Marie, Romero L, Mario De Mia G, Floegel-Niesmann, G Classical swine fever (CSF) marker vaccine Trial I. Challenge studies in weaner pigs. *Vet Microbiol*. 2001;83: 85-106.
20. Ahrens U, Kaden V, Drewlen Ch, Visser N. Efficacy of the classical swine fever (CSF) marker vaccine Porcilis Pesti in pregnant sows. *Vet Microbiol*. 2000;77:83-97.
21. Suradhat S, Intrakamhaeng M, Damrongwatanapokin S. The correlation of virus specific interferon gamma production and protection against classical swine fever virus infection. *Vet Immunol Immunopathol*. 2001;83:177-189.
22. Suradhat S, Damrongwatanapokin S. The influence of maternal immunity on the efficacy of a classical swine fever vaccine against classical swine fever

- virus, genogroup 2.2, infection. *Vet Microbiol.* 2003;92:187-194.
23. Suradhat S, Kedsangakonwut S, Sada W, Buranapraditkun S, Wongsawang S, Thanawongnuwech R. Negative impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the efficacy of classical swine fever vaccine. *Vaccine.* 2006;24:2634-2642.
24. Procedure No. EMEA/V/C/053/01/0/0. BAYOVAC CSF E2. Scientific Discussion. 2001 ;p.21. Disponible en : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library. [7-9-2010]
25. de Smit AJ, Bouma A, de Kluijver EP, Terpstra C, Moormann RJM. Duration of the protection of an E2 subunit marker vaccine against classical swine fever after a single vaccination. *Vet Microbiol.* 2001;78:307-317.
26. Biront P, Leunen J. Inhibition of virus replication in the tonsils of pigs previously vaccinated with a Chinese strain vaccine and challenged oronasally with a virulent strain of classical swine fever. *Vet Microbiol.* 1987;14:105-113.

(Recibido 4-3-2011; Aceptado 20-9-2011)