

ANTICUERPOS MATERNOS FRENTE AL VIRUS DE LA PESTE PORCINA CLÁSICA EN CRIAS DE CERDAS INMUNIZADAS CON CANDIDATO VACUNAL DE SUBUNIDAD PROTEICA (E2)

E. Vega*, Maritza Barrera*, María A. Abeledo*, M. del Pilar Rodríguez Moltó**, Sara Castell*, M. Teresa Frías Lepoureau*

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

RESUMEN: Con el objetivo de determinar la duración de la inmunidad pasiva en cerdos procedentes de madres inmunizadas con un candidato vacunal de subunidad proteica E2 contra el virus de la peste porcina clásica (VPPC) y con la vacuna viva atenuada de la cepa China (LABIOFAM), se inmunizaron seis cochinitas seronegativas al VPPC con el candidato vacunal de subunidad proteica E2 y seis cerdas con antecedentes de tres inmunizaciones como mínimo con la vacuna viva atenuada de la Cepa China lapinizada y tiempo máximo de 6 meses transcurridos desde la última aplicación con la propia vacuna viva atenuada de la Cepa China. La primera dosis del candidato vacunal se aplicó después de la detección del celo y la segunda dosis 21 días después, mientras que se aplicó una dosis de la vacuna viva atenuada de la Cepa China una semana antes de la cubrición. Se conformaron dos grupos con los cerdos procedentes de las madres inmunizadas con una y otra vacuna respectivamente. Se determinaron los títulos de anticuerpos maternos neutralizantes desde la segunda hasta la octava semana de edad. Los cerdos procedentes de madres inmunizadas con el candidato vacunal de subunidad proteica E2 mostraron títulos de anticuerpos maternos significativamente superiores durante el periodo evaluado con duración de los títulos protectivos hasta las 8 semanas de edad. En los cerdos procedentes de madres inmunizadas con la vacuna viva atenuada se observaron títulos de anticuerpos maternos protectivos hasta la segunda semana de edad.

(Palabras clave: Peste porcina clásica; anticuerpos maternos; vacuna de subunidades; vacuna viva atenuada)

MATERNAL DERIVED ANTIBODIES AGAINST CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS IN PIGLETS FROM SOWS IMMUNIZED WITH A VACCINE CANDIDATE OF SUBUNIT PROTEIN (E2)

ABSTRACT: To determine the duration of maternal neutralizing antibodies in their offspring, six gilts seronegative to classical swine fever virus (CSFV) were immunized with the subunit vaccine candidate against CSFV based on glycoprotein E2. A first dose of the vaccine candidate was applied after detection of estrus, and a second dose 21 days later. Six sows with at least three previous immunizations with the live modified vaccines based on the Chinese lapinised strain and maximum of 6 months since the last application of the vaccination were immunized with one dose of live modified vaccine based on the Chinese lapinised strain (LABIOFAM) a week before detection of estrus. Two groups were conformed with offspring from both groups of sows. The maternal derived antibodies titers from 2 weeks to 8 weeks old were determined. The maternal derived antibodies titers of subunit vaccine candidate E2 were significantly higher during the period evaluated with a duration of protective titers until 8 weeks of age. In offspring from mothers vaccinated with the live attenuated vaccine protective maternal derived antibodies titers until the second week of age were observed.

(Key words: Classical swine fever; maternal derived antibodies; vaccine subunit; vaccine Chinese lapinised strain)

INTRODUCCIÓN

La peste porcina clásica (PPC) es producida por un virus que pertenece al género pestivirus de la familia *Flaviviridae*. Su genoma viral está formado por una molécula simple de ARN. Se han caracterizado cuatro proteínas estructurales del virus, la proteína C (p14), componente de la nucleocápsida y tres glicoproteínas, la proteína E1 (gp33), la proteína E2 (gp55) y la Erns (gp44/48). La proteína E2 es la inmunodominante y junto con la Erns inducen anticuerpos neutralizantes (1).

En Cuba, desde el primer reporte ocurrido en la década de los años 30 hasta 1974, la PPC afectó la producción porcina de forma epizootica y después de un silencio epizootico de casi dos décadas, reemergió en 1993 afectando cerdos en todos los sectores productivos en la casi totalidad del territorio nacional, con formas variadas de expresión clínica y actualmente es considerada una enfermedad enzoótica (2). El programa de control se ha basado en la aplicación de la vacuna viva atenuada de la cepa China (3).

Es generalmente aceptado que la vacuna viva modificada de la cepa china es altamente eficaz, provee protección clínica y virológica completa e inmunidad estéril a la semana siguiente de la vacunación (4). La duración de la protección conferida por la vacuna de la cepa China es superior al año y muy probablemente de por vida (5).

El mecanismo inmunológico exacto por el que se produce una larga inmunidad después de una única aplicación con la vacuna viva atenuada de la cepa China se desconoce. La replicación del virus después de la vacunación puede estimular la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T y B generando eficientemente grandes cantidades de células de memoria de ambos tipos (6).

Al inmunizarse los cerdos con la vacuna viva atenuada de la Cepa China, los antígenos vacunales presentados al sistema inmune son procesados por la vía endógena y exógena, este tipo de vacuna puede activar eficientemente la inmunidad humoral (anticuerpos neutralizantes) y la inmunidad celular (linfocitos citotóxicos) (7).

Sin embargo, los anticuerpos contra las vacunas vivas atenuadas no permiten diferenciar animales infectados y vacunados. (8). Esta constituye la mayor limitación de las vacunas vivas atenuadas (9).

Por lo tanto, los nuevos avances de vacunas contra la peste porcina clásica son destinadas a cumplir con el principio de DIVA (Differentiation of infected from

vaccinated animals), lo que significa que además de una vacuna potente es necesaria una prueba diagnóstica sensible y específica que permita la diferenciación entre animales vacunados e infectados (8).

La introducción de modernas herramientas de biología molecular y genómica combinada con una mejor comprensión no sólo de los antígenos que son fundamentales en la inducción de protección, sino también de los mecanismos de defensa del huésped que debe ser estimulado, ha abierto una nueva oportunidad para desarrollar vacunas más eficaces y seguras (10).

Se han registrado dos vacunas marcadoras de subunidades contra el virus de la peste porcina clásica por las firmas Bayer (Bayovac-CSF Marker) e Intervet (Porcilis pestis) (11) en las cuales el gen de la proteína E2 ha sido clonado y expresado en células de insecto mediados por baculovirus (12). Estas vacunas tenían como objetivo ser utilizadas en condiciones de emergencia; sin embargo, se retiraron del mercado debido a varias causas, entre las que se señalan inducción de respuesta inmune tardía y menos de protectiva en comparación con las vacunas vivas atenuadas convencionales (8).

Los estudios de eficacia de las vacunas de subunidades E2 sugieren que la naturaleza del antígeno presentado al sistema inmune (procesamiento endógeno o exógeno) puede afectar significativamente la habilidad de las vacunas para inducir inmunidad protectora contra el virus de peste porcina clásica. Generalmente el procesamiento de antígenos proteicos exógenos no activan eficientemente la actividad de los linfocitos citotóxicos (CTL) (13).

Las vacunas de subunidades E2 activan principalmente la población de linfocitos T helper específicas contra el virus de la peste porcina clásica y la producción de anticuerpos neutralizantes (14, 15). Sobre este aspecto se señala que la diferencia en la inducción de la respuesta humoral activa entre la vacuna de subunidad E2 y vacunas viva atenuada de la cepa China, puede ser explicado por la naturaleza diferente de cada vacuna (16).

La glándula mamaria tiene la capacidad de expresar proteínas recombinantes glicosiladas con un correcto plegamiento de su estructura tridimensional, por lo que constituye un sistema de expresión adecuado para producir la glicoproteína E2 con una elevada inmunogenicidad y capacidad protectora (17).

Recientemente se ha desarrollado un nuevo candidato vacunal contra el virus de la peste porcina clásica, basado en la glicoproteína viral E2 obtenida a partir de la cepa Margarita y expresado en la glándula

mamaria de cabras. Este antígeno se obtuvo en leche de cabra a niveles de 1,2 g/L, y se ha demostrado que induce protección total en cerdos inmunizados y desafiados frente a una cepa altamente patógena del virus de la peste porcina clásica (18).

Se ha confirmado el efecto de la inmunidad materna en las primeras etapas de vida en el cerdo, donde la protección depende de los anticuerpos maternos (19). El estudio de la cinética de anticuerpos maternos es fundamental para determinar el momento de declinación de los mismos, conocer el tiempo de susceptibilidad y establecer el momento óptimo de la primo vacunación. Este trabajo se realizó con el objetivo de determinar la duración de la inmunidad pasiva en cerdos procedentes de madres inmunizadas con un candidato vacunal de subunidad proteica y con la vacuna viva atenuada de la cepa China (LABIOFAM).

MATERIALES Y MÉTODOS

Vacunas

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. Se aplicaron 2mL (25 μ g), adyuvado con Montanide por vía intramuscular profunda en la tabla del cuello.

Vacuna viva atenuada de la Cepa China lapinizada producida por LABIOFAM, contra el virus de la peste porcina clásica. Se aplicaron 2 mL por vía intramuscular profunda en la tabla del cuello.

Vacunación

Seis cochinitas seronegativas a PPC se inmunizaron con el candidato vacunal oleoso de subunidad proteica E2 en el momento de detectarse el estro y una segunda dosis de manera similar, 21 días después.

Seis cerdas con antecedentes de tres inmunizaciones como mínimo con la vacuna viva atenuada de la Cepa China y tiempo máximo de 6 meses transcurridos desde la última aplicación de la vacuna se inmunizaron con la propia vacuna viva atenuada de la Cepa China una semana antes de la cubrición.

Conformación de grupos

Grupo 1: 18 cerdos de la categoría crías procedentes de madres inmunizadas con el candidato vacunal de subunidad proteica E2.

Grupo 2: 14 cerdos de la categoría crías procedentes de madres inmunizadas con la vacuna viva atenuada de la Cepa China.

Grupo 3: 5 crías porcinas libres de anticuerpos específicos frente a PPC procedentes de madres que recibieron placebo, también libres de anticuerpos contra el virus de la PPC.

Para evaluar la cinética de anticuerpos neutralizantes se realizó extracción de sangre (2mL) por el seno venoso oftálmico desde el momento cero y posteriormente con intervalo de dos semanas hasta las 8 semanas de edad (0, 2, 4, 6 y 8) en todos los grupos experimentales. La determinación se realizó mediante la técnica de neutralización de la inmunoperoxidasa (NPLA) (OIE, 2008) en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos con células PK-15 y 100 DICT₅₀ de la cepa Margarita.

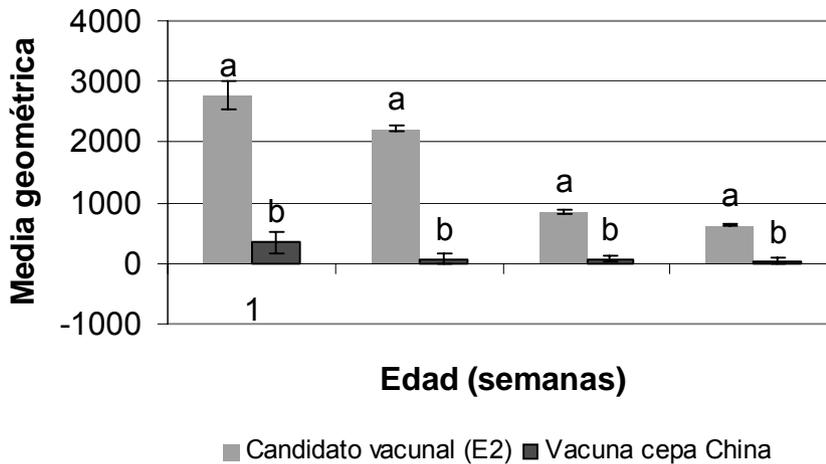
Para comparar el comportamiento de los títulos de anticuerpos en los diferentes grupos se utilizó el Test de Student, previa transformación de los datos a logaritmo mediante Window SAS System, version 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la segunda semana de edad los títulos de anticuerpos maternos neutralizantes fueron significativamente superiores en los cerdos procedentes de madres inmunizadas con el candidato vacunal de subunidad proteica E2 con media geométrica de 2776,4 con respecto a los cerdos de procedentes madres inmunizadas con la vacuna viva atenuada de la Cepa China que presentaron media geométrica de 307,14 (Figura 1); los que se consideran protectivos para los grupos en estudio, de acuerdo con lo afirmado por Parchariyanon *et al.*, 1994 (20) señalan que títulos de anticuerpos maternos ≥ 256 son requeridos para obtener protección clínica en los cerdos.

Este comportamiento se mantuvo para los cerdos procedentes de madres inmunizadas con el candidato vacunal de subunidad proteica E2, durante todo el periodo evaluado con títulos de anticuerpos protectivos hasta las octava semana de edad, mientras que los cerdos procedentes de madres inmunizadas con la vacuna viva atenuada de la cepa China solo mostraron títulos de anticuerpos protectivos hasta la segunda semana de edad. El grupo control, se mantuvo seronegativo al virus de la peste porcina clásica durante todo el experimento.

Los títulos de anticuerpos maternos encontrados en las crías procedentes de madres inmunizadas con la vacuna viva atenuada de la cepa china son inferiores a los reportados para este tipo vacuna por diferentes autores. En este aspecto se destaca (21) que los anticuerpos maternos en cerdos persisten por más de 7 semanas, con tiempo de vida media de 8 días.



Letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0,05$.

FIGURA 1. Cinética de la inmunidad materna en crías procedentes de madres inmunizadas con el candidato vacunal (E2) y con la vacuna viva atenuada de la Cepa China./ *Kinetic of maternal immunity in offspring from mothers immunized with a vaccine candidate of subunit protein (E2) and with the live modified vaccine based on the chinese lapinised strain.*

Carranza *et al.*, 2007 (22) encontraron duración de la inmunidad pasiva en cerdos con anticuerpos maternos procedentes de la vacuna viva atenuada de la cepa China hasta los 52 días de edad, mientras (23) indican que la duración de la inmunidad materna en granjas vacunadas puede variar entre 6 – 9 semanas de edad.

Varios autores se han referido a los aspectos que pueden afectar la eficacia de la inmunización en condiciones de campo. En este particular (7) refieren que aunque se ha confirmado que la vacunas viva atenuadas contra el virus de la peste porcina clásica son capaces de inducir protección completa en cerdos vacunados, muchos factores incluyendo la inmunidad materna, la edad a la primo vacunación, protocolo de vacunación y complicaciones causadas por otros patógenos pueden afectar grandemente la efectividad de la vacunas contra peste porcina clásica en condiciones de campo. Por su parte (24) han identificado que en las zonas tropicales y subtropicales es común que los aspectos relacionados con la conservación (cadena de frío) afecte la eficacia de las vacunas atenuadas, utilizadas con frecuencia en programas de erradicación.

Estos resultados sugieren que los cerdos están desprotegidos y son susceptibles a padecer la enfermedad a partir de la segunda semana de edad hasta después del momento de la primo vacunación (33 días de edad promedio) en que se induzca una respuesta inmune activa. Sin embargo es conocido que cerdos con niveles de anticuerpos neutralizantes de origen materno $> 1:64$, tienen disminuida tanto la respuesta inmune humoral como celular, inducida por la aplicación de la vacuna viva atenuada de la cepa China (25). La primovacunación debe aplicarse cuando los títulos de anticuerpos maternos han declinado y no interfie-

ran con la vacunación; no obstante durante este periodo de ventana inmunológica en que los cerdos están desprotegidos es necesario establecer estrictas medidas de bioseguridad.

En este aspecto (26) señalan que la vacunación en un momento inadecuado impide que se desarrolle la respuesta vacunal eficaz. El animal aunque está vacunado queda desprotegido. Asimismo (27) refieren que es necesario adecuar el esquema de inmunización a emplear a las condiciones epizootológicas y los resultados de serología, para no dejar brechas inmunológicas que aumenten la susceptibilidad de los cerdos.

Con independencia de los múltiples aspectos evaluados anteriormente que pueden influir en los resultados analizados, y teniendo en cuenta que la conformación de los grupos objeto de estudio difieren con respecto a la categoría zootécnica (cochinatas y cerdas) lo que lleva implícito diferencias de edad y esquema de inmunización aplicado en uno y otro grupo respectivamente, consideramos que las marcadas diferencias encontradas entre la vacuna viva atenuada de la cepa china y el candidato vacunal no son solo atribuibles a estos elementos.

Se ha descrito que la eficacia en la inducción de la respuesta inmune está determinada entre otros factores por la edad de los animales (7) y por el esquema de inmunización utilizado (23). No obstante lo planteado, otro elemento a considerar y que pueden explicar las diferencias estadísticas observadas en los títulos de anticuerpos maternos de los cerdos procedentes de una y otra vacuna respectivamente es la diferencia en la naturaleza de los antígenos vacunales presentados al sistema inmune entre las vacunas vivas atenuadas y las vacunas de subunidades (16). Las vacunas

de subunidades E2 activan principalmente la población de linfocitos T helper específicos contra el virus de la peste porcina clásica y la producción de anticuerpos neutralizantes (14-15) mientras que los antígenos vacunales de las vacunas vivas atenuadas son procesados por la vía endógena y exógena, activando la inmunidad humoral y celular (7).

Es de interés destacar que los títulos de anticuerpos maternos en las crías de madres vacunadas con el candidato vacunal de subunidad proteica E2 fueron superiores a los reportados para otras vacunas de subunidades E2 evaluadas. Así Klinkenberg *et al* (16) encontraron títulos de anticuerpos maternos desde 1:32–1:512 a las 2 semanas de edad en cerdos de madres vacunadas con una vacuna E2. Teniendo en cuenta que existe correlación positiva entre los títulos de anticuerpos maternos específicos contra el virus de la peste porcina clásica en los cerdos lactantes y los títulos de anticuerpos neutralizantes en las cerdas (7); consideramos que estos resultados corroboran los criterios expuestos anteriormente y confirman la capacidad de la glándula mamaria como sistema de expresión adecuado para producir la glicoproteína E2 con una elevada inmunogenicidad y capacidad protectora (17).

Otro elemento a valorar para este tipo de vacuna (subunidades) y que constituye materia de discusión por diferentes autores, es la posibilidad de inmunizar cerdos en presencia de anticuerpos maternos sin que estos interfieran en la inducción de la respuesta inmune. En tal sentido sería oportuno evaluar en el futuro, el efecto de los anticuerpos maternos ante la inmunización con el candidato vacunal E2, considerando que la eficacia de la inmunización con una vacuna de subunidad proteica E2 no es afectada por la presencia de anticuerpos maternos (28). De corroborarse este aspecto, permitiría inmunizar a los cerdos antes que los anticuerpos maternos descendieran a títulos no protectivos, impidiendo que se produzca la ventana inmunológica.

En base a lo señalado anteriormente podemos inferir que el candidato vacunal de subunidad proteica E2 posee una elevada inmunogenicidad con títulos de anticuerpos maternos protectivos hasta la octava semana de edad, superiores a los obtenidos con la vacuna viva atenuada de la Cepa China con duración de los títulos protectivos hasta la segunda semana de edad.

REFERENCIAS

1. Moennig V, Greiser-Wilke I. Classical Swine Fever Virus. Encyclopedia of Virology (Third Edition). 2008.p. 525-532.
2. Instituto de Medicina Veterinaria (IMV). Programa Nacional de Prevención y Control de la peste porcina clásica. Imprenta MINAG; 2005.
3. Frías-Lepoureau, MT. Reemergence of classical swine fever in Cuba, 1993 to 1997. *Rev Salud Anim.* 2003;1(5):1-4.
4. Van Oirschot JT. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet Microbiol.* 2003; 96:367-384.
5. 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 microbial.*1987;14:105-113.
6. 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.
7. Suradhat S, Damrongwatanapokin S, Thanawongnuwech R. Factors critical for successful vaccination against classical swine fever in endemic areas. *Vet Microbiol.* 2007;119:1-9.
8. Beer M, Reimann I, Hoffmann B, Depner K. Novel marker vaccines against classical swine fever. *Vaccine.* 2007;5:5665-5670.
9. Rogan D, Babiuk LA. Novel vaccines from biotechnology. *Sci Tech Off int Epiz.* 2005;24(1):159-174.
10. Damrongwatanapokin S, Pinyochon W, Parchariyanon S, Patchimasiri T, Molee L, Udomphant S, Damrongwatanapokin T. Efficacy of classical swine fever E2 subunit vaccine in vaccinated maternal-derived antibody positive pigs. In: Proceedings of the 19th IPVS congress. Copenhagen, Denmark. 2006(2).p.119.
11. Ganges L, Nuñez CHI, Sobrino F, Borrego B, Fernández N, Frías-Lepoureau MT, et al. Recent advances in the development of recombinant vaccines against classical swine fever virus: Cellular responses also play a role in protection. *Vet J.* 2007;177(2):169-177.
12. Moormann R, Bouma A, Kramps J, Terpstra C, de Smit H. Development of a classical swine fever

- subunit marker vaccine and companion diagnostic test. *Vet Microbiol.* 2000;73: 209-219.
13. Janeway C, Travers M, Walport, M, Shlomchik. *Immunobiology*. 5th ed. Garland Publishing, New York; 2001.p.732.
 14. Dewulf J, Laevens H, Koenen F, Mintiens K, de Kruif A. An E2 sub-unit marker vaccine does not prevent horizontal or vertical transmission of classical swine fever virus. *Vaccine.* 2002;20:86-91.
 15. Utenthal 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.
 16. Klinkenberg D, Moormann RJM, de Smit AJ, Bouma A, de Jong MCM. Influence of maternal antibodies on efficacy of a subunit vaccine: transmission of classical swine fever virus between pigs vaccinated at 2 weeks of age. *Vaccine.* 2002;20: 3005-3013
 17. Toledo JR, Sánchez O, Rodríguez, Maria del Pilar, Castro FO. inventors. Method of producing recombinant proteins in the mammary gland of non-transgenic mammals. PCT WO 2004/034780 A3.
 18. 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.
 19. Baintner K. Transmission of antibodies from mother to young: Evolutionary strategies in a proteolytic environment. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;117:153-161.
 20. 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.
 21. Vandeputte J, Henry L, Too, Fook K, Cindy Chen, Kim K, Guo A. Adsorption of colostrum antibodies against classical swine fever, persistence of maternal antibodies, and effect on response to vaccination in baby pigs. *Am J Vet Res.* 2001; 62(11):1805-1811.
 22. Carranza Alicia, Ambrogi A, Pelliza B, Romanini Silvia. Respuesta de anticuerpos pasivos y efecto de la edad de los lechones en la vacunación contra el virus de la peste porcina clásica. *Revista colombiana de ciencias Pecuarias.* 2007; 20: 487-489.
 23. Mogollón DJ, Rincón Maria Antonia. Observaciones sobre la respuesta vacunal contra PPC en granjas con PMWS y en granjas con PRRS Y PMWS. *Revista Acovez.* 2007;37(1):10-14.
 24. Barrera Maritza, Sanchez O, Prieto Yanet, Castell Sara, Naranjo Paula, Rodriguez Maria 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.* 2008;127(3-4):325-331.
 25. 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.
 26. Arias M, Sierra. M.A, Sánchez Vizcaíno, J.M. La enfermedad de aujeszky. Diagnóstico de laboratorio. 2002. <http://www.sanidadanimal.org/cursos/2/prevencion.htm> [7-06-10]
 27. Román G, Barrera Maritza, Ganges Lillianne, Vega A, Frías María Teresa. Humoral response to classical swine fever virus (CSFV) in piglets coming from units with different vaccination regimes. *Rev Salud Anim.* 2001;23(2):128-132.
 28. Lipowski, A., Christa-Drexler, Pejsak Z. Safety and efficacy of a classical swine fever subunit vaccine in pregnant sows and their offspring. *Vet Microbiol.* 2000;77:99-108.

(Recibido 20-4-2010; Aceptado 15-11-2010)