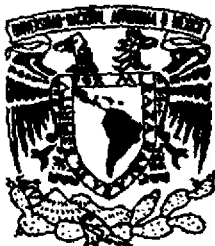


11



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACION DE LA VACUNACION CONTRA EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY CON EL USO DE DOS MODULADORES INMUNOLOGICOS

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**  
P R E S E N T A:  
**MARIO ENRIQUE ESPINOSA GONZALEZ**

283746

ASESORES: MVZ GABRIELA CALZADA NOVA  
MVZ CARMEN MERCADO GARCIA  
MVZ M en C ROSALBA CARREON NAPOLES



MEXICO, D. F.

2000



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.

## DEDICATORIA

A Dios por las bendiciones que me ha dado.

A mis padres Carlos y María Elena por su amor, paciencia y apoyo.

A Lalo por que es una fortuna tener como hermano a un gran amigo.

A mi tío Daniel y familia por sus consejos y ejemplo en mi formación profesional, familiar y profesional.

A toda mi familia por su incondicional apoyo en especial, a mi abue y mi tia.

A Graciela por su amor, cariño y, sobre todo por llenar de dulzura mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación recibida.

A mis asesores MVZ Gabriela Calzada Nova, MVZ Carmen Mercado García y MVZ M en C Rosalba Carreón Nápoles por su apoyo, paciencia y amistad que me ayudó a realizar este trabajo.

A mi jurado por sus valiosas aportaciones y comentarios.

A todos mis amigos y compañeros por los momentos vividos, por su complicidad y apoyo incondicional.

A todos los animales de práctica y a aquellos que ofrecieron su vida para mi formación.

# CONTENIDO

Página

RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	2
MATERIAL Y METODOS .....	8
RESULTADOS .....	11
DISCUSION .....	17
CONCLUSIÓN .....	22
LITERATURA CITADA .....	24

## RESUMEN

ESPINOSA GONZALEZ MARIO ENRIQUE. Evaluación de la Vacunación contra el Virus de la Enfermedad de Aujeszky con el Uso de Dos Moduladores Inmunológicos (bajo la dirección de: MVZ Gabriela Calzada Nova, MVZ Carmen Mercado García y MVZ M en C Rosalba Carreón Nápoles).

Se evaluó la respuesta inmune de 25 cerdos con el uso de dos moduladores inmunológicos. Se verificó que los cerdos estuvieran libres de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA). En este trabajo se valoró temperatura, peso y título de anticuerpos por seroneutralización, y al sacrificio se determinó el porcentaje de daño pulmonar y se intentó el aislamiento del VEA. Los cerdos se dividieron en cinco grupos: al grupo I se le aplicó una vacuna inactivada, al grupo II una vacuna atenuada, al grupo III la vacuna inactivada más Factor de Transferencia, al grupo IV la vacuna inactivada más *Parapoxvirus ORF* cepa 17071 (Baypamun de laboratorios Bayer), y el grupo V recibió un placebo. Se aplicaron los inmunomoduladores dos días antes de la primera vacunación. La segunda vacunación se realizó 15 días después. Los cinco grupos fueron desafiados con la cepa Shope del VEA. Con base en los resultados se confirma que la vacuna gE evita la propagación del VEA en el sistema nervioso. Los cerdos que recibieron la vacuna inactivada con o sin inmunomodulador (grupos I, III y IV) no presentaron fiebre en ninguna de las evaluaciones y el grupo II presentó un corto periodo de fiebre. El grupo III presentó signos moderados y menos lesiones pulmonares que el resto de los grupos. En la serología no se encontró diferencia entre los grupos vacunados con o sin inmunomodulador. El resultado más relevante de este trabajo es el aislamiento viral negativo de muestras de tejido pulmonar del grupo III, mientras que en los grupos restantes los aislamientos resultaron positivos. Se confirmó que al utilizar la vacuna atenuada se observaron mejores resultados que con la vacuna inactivada al obtener en la primera mayor peso y menores lesiones en los pulmones que en el resto de los grupos. Se puede concluir que el uso de inmunomoduladores, principalmente el Factor de Transferencia, disminuye la presentación de signos clínicos y activa en forma eficaz la inmunidad mediada por células.

## INTRODUCCIÓN.

### HISTORIA.

La enfermedad de Aujeszky (EA), fue descrita por vez primera en los Estados Unidos de América (EUA) en 1813, en el ganado bovino. El término pseudorrabia se utilizó por vez primera en Suiza en el año de 1849 debido a que los signos clínicos en el ganado eran similares a los de la rabia. En 1902 en Hungría, Aujeszky estableció al agente causal como no bacteriano.<sup>1</sup> En 1910 Shmiedofer confirmó su origen viral<sup>2</sup> y en 1931 Shope probó que la "comezón loca" que padecían los bovinos de Iowa, EUA, era en realidad la EA.<sup>3</sup> En 1934 Sabin y Wright identificaron que el VEA está relacionado inmunológicamente a los virus Herpes Simple tipo 1 y Herpes B.<sup>1,4</sup>

En México, la EA fue identificada en 1945 por Batchold en bovinos. Posteriormente Ramírez y Téllez observaron algunos casos en la misma especie en Guanajuato.<sup>4,5</sup> El primer caso informado en cerdos fue en La Piedad, Michoacán en 1969 por Martell y cols., quienes realizaron también el aislamiento y la identificación serológica del VEA.<sup>4,6</sup>

La EA es un padecimiento altamente contagioso que se caracteriza por presentar signos respiratorios y nerviosos asociados a un aumento de la temperatura corporal y muerte de los animales jóvenes. La infección en animales adultos puede ser inaparente o estar asociada con la presencia de lechones paridos muertos, momificados y abortos.<sup>1,7,8,9</sup>

Los signos clínicos dependen de la cepa del virus, la dosis infectante y la edad de los cerdos afectados, así como de su estado inmunitario.<sup>1,10</sup> Típicamente los primeros signos son fiebre, anorexia, tos, pelo reseco, ataxia y convulsiones.<sup>11</sup> La presentación de estos signos es más frecuente mientras menos edad tengan los animales. En lechones de dos semanas de edad la morbilidad y mortalidad son del 100%. Cuando tienen 3-4 semanas la tasa de morbilidad disminuye al 80% y la mortalidad al 40-60%, mientras que en cerdos de crecimiento y engorda disminuyen hasta un 10-20% y 5-10% respectivamente. Los animales del pie de cría son menos propensos a padecer la enfermedad pero pueden quedar como portadores sanos diseminando el virus.<sup>1,12</sup> La infección con el virus de la EA (VEA) ocurre a través de ingestión o inhalación. El virus se establece en la nasofaringe donde inicia su replicación, invade pulmones y los macrófagos alveolares, lo cual permite el crecimiento de gérmenes secundarios. El VEA puede infectar el sistema nervioso central provocando signos de moderados a severos.<sup>13</sup>

### CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS.

El VEA está clasificado como Herpesvirus suis 1, pertenece a la familia Herpesviridae, subfamilia alfaherpesvirinae, la cual se caracteriza por tener una amplia gama de hospederos y provocar efecto citopático como formación de sincitios y redondeamiento celular en una gran variedad de cultivos celulares. Serológicamente se conoce sólo un tipo.<sup>14,15,16</sup>

El VEA posee envoltura en forma icosaédrica y su genoma es de ADN. El tamaño varía de 150 a 180 nanómetros de diámetro. El VEA es sensible a solventes de los lípidos como los detergentes, cuaternarios de amonio, así como a urea, cloro, formalina y también a enzimas como la tripsina. La heparina impide su adsorción a las células por lo que las muestras sanguíneas no deben contener este producto. El virus es inactivado por los rayos X y por la luz ultravioleta.<sup>10</sup> Posee siete glicoproteínas que se pueden clasificar como esenciales, gB, gD, gL, gH que son indispensables para la infectividad del virus y las glicoproteínas gE, gC, gI las cuales no son esenciales para su replicación en cultivo celular, otra glicoproteína no esencial es la gG que no está presente en el virión pero es secretada por las células infectadas.<sup>17</sup>

### EPIDEMIOLOGÍA.

La EA presenta distribución mundial; se encuentra en la mayoría de los países de Europa, también se ha señalado su presencia en África, Asia y Oceanía. En América está muy difundida, principalmente en Argentina, Brasil, Colombia, Cuba, EUA, Guatemala, Venezuela y México.<sup>18,19</sup>

El VEA tiene un gran número de hospederos los cuales mueren después de la infección, con la excepción del cerdo adulto, el cual sobrevive, y por lo tanto, es el principal eslabón para mantener la cadena de infección.<sup>10</sup> En animales domésticos la infección natural se presenta en bovinos, caprinos, ovinos, caninos y felinos.<sup>1</sup> También se presenta en animales silvestres como liebre, conejo salvaje, marta, hurón, venado, ciervo, puerco espín, mofeta, oso polar, chacal, leopardo, rata y ratón. No se ha informado de la infección natural en caballos y aves, sin embargo, experimentalmente la infección en estos animales es posible si se administran grandes cantidades de virus.

El hombre es considerado no susceptible al VEA, así como, el mono Grivet, Rhesus y el macaco, pero no así en el chimpancé. Con respecto a los animales de laboratorio el conejo es uno de los más susceptibles. Las ratas y los ratones de un día de edad son altamente susceptibles, y la resistencia aumenta con la edad.<sup>19</sup>

En México desde 1969 se tiene la primera evidencia del VEA en cerdos y no es hasta 1992 que se plantea la



necesidad de iniciar una Campaña Nacional contra la EA. En 1994 se publica la norma oficial NOM-007-ZOO-1994, que consta de cinco niveles: control con evidencia, control, escasa prevalencia, erradicación y libre.

#### INMUNIDAD.

Con un virus de campo de la EA los cerdos desarrollan anticuerpos específicos que son detectados en suero a los seis días post-infección (PI). Primero aparece la IgM, a los 6 u 8 días aparece IgA seguida de IgG. En el suero las IgM e IgG son capaces de neutralizar al VEA junto con la acción del complemento. Las inmunoglobulinas IgM e IgA se pueden encontrar en distintas secreciones, saliva, lágrimas y fluidos pulmonares por un periodo de 6 a 10 días PI y se pueden detectar hasta por tres meses. No hay una protección completa en la mucosa ya que no existe una fuerte respuesta de memoria de IgA.<sup>17</sup>

El VEA puede mantenerse latente dentro de las células sin destruirlas. Esto origina que no haya una manifestación aparente de la enfermedad. Ante esta situación, el sistema inmune puede controlar la infección pero no eliminarla y el virus permanece en los cerdos de por vida.<sup>12</sup>

Aunque la respuesta humoral sea eficaz contra algunos agentes invasores es posible que no sea tan eficaz contra algunos otros, principalmente contra los patógenos intracelulares como los virus. Cuando el sistema inmune es estimulado por la presencia de un antígeno, un tipo de respuesta inmune es más dominante que la otra.<sup>20</sup> En el caso de la influenza porcina los anticuerpos son los que controlan la infección, mientras que en la EA la inmunidad mediada por células es la más importante.<sup>21</sup> Una predominante respuesta humoral contra virus citopáticos podría no ser suficientemente protectora.<sup>20</sup> Como en el virus herpes varicela zoster (VZV), los anticuerpos juegan un papel secundario en comparación al control que se logra con la inmunidad mediada por células. La integridad de la rama celular del sistema inmune es crítico para el control de las enfermedades causadas por herpesvirus.<sup>22</sup> Un componente de la respuesta inmune celular es la secreción de citocinas por los linfocitos T, células NK, macrófagos y células dendríticas principalmente. Una de esas citocinas es el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). El IFN- $\gamma$  tiene efecto antiviral por inhibir la replicación del virus, sin embargo, su acción inmunomoduladora es más importante, ya que induce la actividad de los linfocitos T, aumenta la citotoxicidad, activa a los macrófagos para que sintetizen el factor de necrosis tumoral, y aumenten la expresión de las moléculas de complejo principal de histocompatibilidad e inhiban su migración. En linfocitos B disminuye la producción de IgE y aumenta la actividad de las células NK. El IFN- $\gamma$  producido por células

NK y linfocitos T CD4 y CD8 positivos, desempeña un papel central en el control de infecciones por herpesvirus como el VEA y el HSV-1, y en desarrollo de la inmunidad protectora. Otra citocina que interviene en el desarrollo de la respuesta inmune es la interleucina-12 (IL-12). La IL-12 es secretada por macrófagos principalmente, y es el factor más importante para la diferenciación de células T en las células T de memoria y efectoras que producen IFN- $\gamma$ , y es capaz de incrementar la actividad citolítica de las células NK del cerdo.<sup>20</sup>

Para la protección contra el VEA existen vacunas de virus inactivado (VI) y vacunas de virus atenuado (VA). Estas son eficaces en reducir los signos clínicos y la diseminación del virus dentro de la piara. En México sólo está autorizado el uso de VI con delección de la gE (gI).<sup>1,19</sup>

Existe una marcada dicotomía entre la respuesta inmune humoral y celular en los dos tipos de vacunas. Mientras que algunas VI son capaces de inducir iguales o más altos títulos de anticuerpos neutralizantes que las VA, estas últimas estimulan un gran número de células productoras de IFN- $\gamma$  específico del virus. Algunos trabajos indican que la respuesta inmune tanto celular como humoral de los cerdos es regulada de manera independiente. Las VA contra la EA son más eficaces que las VI en generar inmunidad protectora.<sup>20</sup>

Las VA tienen la ventaja de que se replican principalmente en el sitio de aplicación y en los ganglios linfáticos regionales y estimulan principalmente la respuesta inmune mediada por células. Se ha mencionado que el virus vacunal se elimina en secreciones nasales en niveles muy bajos, que existe el riesgo de que revierta su virulencia y se transmita a más cerdos o a otra especie.<sup>17,19</sup> Esta posible reversión de las VA ha conducido a la mejoría de las VI.<sup>10,17</sup>

Una forma de mejorar la inmunización es con el uso de inmunomoduladores. Desde que se emplean vacunas se vienen efectuando estudios y descripciones científicas de la activación de los mecanismos de defensa inespecíficos. Al llevar a cabo las primeras vacunaciones contra la viruela y tuberculosis se informó de una estimulación de mecanismos de defensa inespecíficas, que aparecen simultáneamente con la vacunación. La intensa búsqueda de estos inmunomoduladores llevó a la identificación de una serie de sustancias inductoras, las cuales se dividen en dos grupos: los obtenidos de microorganismos o plantas y los elaborados de forma químico-sintética.<sup>23</sup> La función de éstos es estimular la respuesta inmune mediada por células y modular la respuesta inmune por anticuerpos. Los inmunomoduladores aumentan la protección inespecífica, eliminan la debilidad inmunológica causada por estrés o medicamentos. Algunos ejemplos son: levamisol, caseinatos,

interferones, poxvirus y parapoxvirus purificados, factor de transferencia, citocinas y algunos antibióticos.<sup>24,25,26</sup> Para el presente estudio fueron seleccionados el Baypamun y el factor de transferencia.

El Baypamun está formulado a partir de un aislamiento del Parapoxvirus ovis D-17071 en cultivos celulares de riñón de bovino inactivado con beta-propiolactona. Estimula la actividad de polimorfonucleares, macrófagos, activador de linfocitos asesinos NK, actúa como inductor de interferón, factor de necrosis tumoral, el sistema complemento-opsonina-properidina, y linfocitos-T.<sup>23,27,28</sup> También inhibe el efecto inmunodepresor de la dexametasona. Se ha utilizado en el control de enfermedades virales y bacterianas, en la activación precoz del sistema inmune en animales jóvenes y en combinación con la inmunización en bovinos, cerdos, caballos, perros, gatos y peces.<sup>23,27,29</sup>

El factor de transferencia (FT) descrito por Lawrence en 1954, obtenido a partir de un extracto dializable de leucocitos, es capaz de transferir inmunidad celular de un individuo a otro. El empleo terapéutico del FT se comenzó a difundir en la década de los setentas.<sup>22,25</sup> Su característica principal es el bajo peso molecular, menos de 10 000 Daltons, lo cual es sumamente relevante y además no contiene sustancias que pudieran causar efectos indeseables, aun en dosis repetidas, como antígenos de histocompatibilidad, antígenos de grupos sanguíneos, proteínas séricas o virus.<sup>30,31,32</sup> Es altamente resistente a enzimas lisosomales, ADNasa, ARNasa y tripsina. También puede ser liofilizado sin dañar su actividad.<sup>30,31</sup> El FT tiene efectos positivos en la rehabilitación del sistema inmune en ratones irradiados, es capaz de inducir respuesta inmune celular, estimular la producción de anticuerpos, del factor inhibidor de la migración de macrófagos e IL-1, IL-2, factor de necrosis tumoral y en general, normalizar parámetros inmunológicos,<sup>33</sup> e incrementar los niveles de IFN- $\gamma$  y de linfocitos CD4+.<sup>34</sup> El FT se ha estudiado y aplicado en desórdenes de inmunodeficiencia congénita, enfermedades infecciosas (de etiología viral, bacteriana, parasitaria o fúngica), neoplásicas y autoinmunes.<sup>31</sup> En medicina humana se ha empleado en enfermedades crónicas y neoplásicas con resultados variables.<sup>22,25,32</sup> En medicina veterinaria se ha utilizado sobre todo como modulador inmunológico en algunas enfermedades como melanoma en ratones, síndrome diarreico neonatal en becerros, enfermedad de Newcastle en aves y colibacilosis, rinitis atrófica, gastroenteritis transmisible, fiebre porcina clásica y enfermedad de Aujeszky en cerdos.<sup>30,32,35,36,37,38,39</sup>

La EA es uno de los padecimientos que causa más daño a la porcicultura nacional. En la actualidad existe la Campaña Nacional para el Control y la Erradicación de la EA, en la que se establecen diversas estrategias de control principalmente la vacunación.<sup>14,19,40</sup> En años recientes se ha introducido a la medicina veterinaria la inmunoterapia con los llamados modificadores de la respuesta biológica. Se ha mencionado la relevancia de los moduladores inmunológicos en la regulación de la respuesta inmune, en general, con resultados satisfactorios tanto en medicina veterinaria como en humana, ya sea como terapéutico o como profiláctico en la vacunación al estimular la respuesta inmune mediada por células y modular la respuesta inmune medida por anticuerpos. Por ello se les puede considerar como una herramienta muy valiosa para la porcicultura. Por tal motivo el objetivo de este trabajo es evaluar la respuesta inmune al utilizar dos inmunomoduladores y aplicarlos simultáneamente con la vacunación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Departamento de Producción Animal: Cerdos (DPA:C) conjuntamente con el Departamento de Microbiología e Inmunología, ambos pertenecientes a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Se utilizaron 25 cerdos de 5 semanas de edad libres de anticuerpos contra el VEA por la técnica de SN. Los cerdos se agruparon aleatoriamente como sigue: (n=5)

Grupo I. Vacuna inactivada (PRONABIVE).

Grupo II. Vacuna atenuada (PRONABIVE EXPERIMENTAL).

Grupo III. Factor de Transferencia más vacuna inactivada.

Grupo IV. Baypamun\* más vacuna inactivada.

Grupo V. Placebo.

Los cerdos de los grupos III y IV recibieron el modulador inmunológico correspondiente 2 días antes de la primera vacunación, en dosis de 2 ml de Baypamun y 2 unidades de FT (1U= extracto dializable de leucocitos  $5 \times 10^8$ ).

El día 0 todos los cerdos fueron vacunados y 15 días después recibieron una segunda vacunación como refuerzo. El grupo V recibió 2 ml de un placebo que consistió en PBS estéril con pH 7.2.

Previo al desafío se realizó el pesaje de los animales, y el día 31 se realizó el segundo pesaje de los animales.

El sacrificio se llevó a cabo el día 32 para observar lesiones a la necropsia y tomar muestras de encéfalo y pulmón de las cuales se realizó el aislamiento viral.

Virus. Se utilizó la cepa Shope tanto para el desafío como para la prueba de seroneutralización.<sup>41</sup> Se le realizó un pase en cerdo para reactivación de la misma. Posteriormente se le realizaron tres pases en cultivo celular para obtener un mayor efecto citopático y se tituló en cultivo celular. Se fraccionó en volúmenes de 10 ml y se almacenó a -70°C hasta el desafío.

El desafío se realizó el día 19, se aplicaron 2 ml para cada cerdo con un título de  $10^{6.25}$  DICC<sub>50</sub>/ml por vía intranasal. A partir de éste día se llevó el registro diario de temperatura y observación de signos clínicos.

Cultivo celular. Los pases celulares y la prueba de seroneutralización se realizaron en células de riñón de bovino MDBK que se obtuvieron de la sección de virología del DPA:C. Estas células crecen a 37°C con MEM adicionado con suero fetal bovino y antibiótico.

Colcección de muestras sanguíneas. Se obtuvieron por punción venosa en el confluente de las yugulares, los días 0, 7, 13, 18, 25 y 32. Cada muestra se identificó y fue llevada al laboratorio para obtener el suero. Éste se inactivó a 56°C durante 30 minutos y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Seroneutralización (SN). Se realizó el método beta de SN.<sup>8</sup> Las muestras de suero inactivadas se colocaron en placas de microtitulación en las que se realizaron diluciones dobles seriadas desde 1:2 hasta 1:256. Se agregaron 0.05 ml. de antígeno previamente titulado con 300 DICC<sub>50</sub>/ml. Se incubó 60 minutos a temperatura ambiente y por último se agregaron aproximadamente 24 000 células en cada pozo. La lectura se realizó a las 72 y a las 120 horas. El título se consideró como el logaritmo inverso de la dilución más alta del suero que neutraliza al virus. Esto es la ausencia de efecto citopático.<sup>42</sup>

Factor de transferencia. Se preparó de acuerdo a la metodología descrita por Lawrence<sup>22,25</sup>. Se tomó el concentrado leucocitario de sangre venosa de cerdos sanos. El sobrenadante se centrifugó a 5000 g durante 30 minutos a 4°C. El sedimento se colectó en 10 ml de solución salina amortiguada (Tris-HCl pH 7.4). Este sedimento se sometió a congelación y descongelación rápida de -70 a 37°C en baño maría alternándose 10 veces. El material obtenido se colocó en una bolsa de diálisis, la cual se realizó en 100 ml de agua bidestilada. La sustancia resultante contenía el FT, se ajustó a una unidad equivale a  $5 \times 10^8$  de leucocitos. Se conservó a -70°C hasta su uso.

El Baypamun\* utilizado en el presente estudio contenía Parapoxvirus ORF, cepa 17071 con un título de  $10^{6.75}$  DICC<sub>50</sub> antes de su inactivación.

---

\* Laboratorios Bayer.<sup>®</sup>

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados obtenidos en la seroneutralización fueron evaluados mediante un análisis de varianza completamente aleatorizado previa transformación logarítmica ( $\log_2$ ) de cada uno de los valores y posteriormente las medias se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis.

Los valores obtenidos en las variables de peso y temperatura se analizaron por análisis de varianza y posteriormente se analizaron con la prueba de Tukey a un nivel de significancia de 0.05.

## RESULTADOS.

### SIGNOLOGÍA.

Se observó el comportamiento de los cerdos dos veces al día durante los periodos de alimentación, la temperatura rectal fue tomada diariamente. Al inicio se estableció que la alimentación fuera a libre acceso pero cerdos del grupo I y del grupo V presentaron diarrea por lo que se determinó que la alimentación se ofreciera en dos periodos diarios con duración de 20 - 30 minutos cada uno. Se hicieron dos mediciones de peso, el primero, el día del desafío y el segundo el día del sacrificio. A cada grupo se le evaluó desde el desafío hasta el sacrificio fiebre, signos respiratorios y neurológicos. Los signos respiratorios comprenden descarga nasal, tos y respiración forzada. Los signos nerviosos lo componen comezón, ataxia, parálisis, temblor y convulsiones.

El comportamiento de los grupos hasta el desafío fue semejante, excepto el grupo II que a partir de la segunda vacunación aumentó su consumo de agua.

Grupo I. El día del desafío tuvieron un peso promedio de 16 kg. Los días 2 y 3 PD aumentaron el consumo de agua, ya no durmieron juntos en batería sino separados. El día 6 PD se acercaron un poco más para descansar, disminuyó el consumo de alimento y pasaron la mayor parte del tiempo descansando. Durante los días 7 y 8 PD presentaron secreción mucosa en los ojos y se regularizó el consumo de agua, desde el día 9 PD hasta el sacrificio aumentó el consumo de agua y de alimento.

Grupo II El día del desafío el peso promedio del grupo fue de 19 kg, después de la segunda vacunación aumento su consumo de agua. Los días 2 y 3 PD durmieron separados y entre los días 3 y 4 PD aumentaron también su consumo de alimento. El día 5 PD descansaron separados sobre el slatt. Los días 7 y 8 empezaron a estar más tiempo despiertos y conservaron mejor aspecto que los otros grupos hasta el sacrificio.

Grupo III El promedio de peso de este grupo el día del desafío fue de 19.66 kg. Los días 4 y 5 PD los cerdos durmieron separados con ligeros signos respiratorios. Los días 7 y 8 PD volvieron a juntarse para dormir y jugar, presentaron consumo de alimento regular. No se apreció aumento en el consumo de agua durante el experimento.

Grupo IV. Este grupo tuvo un peso promedio de 17 kg el día del desafío. No se apreció aumento en el consumo de agua. Los días 4 y 5 PD descansaron separados. El día 6 PD hubo disminución en el consumo de alimento excepto un cerdo que no aceptó comer y éste presentó moderados signos respiratorios y no



volvieron a dormir juntos hasta el día 10 PD.

Grupo V El promedio de peso el día del desafío fue de 16.33 Kg previo al desafío aumentó ligeramente el consumo de agua. Los días 2 y 3 PD se observaron deprimidos excepto al servir el agua que es cuando todos se levantaban. El día 6 PD presentaron anorexia y dedicaron más tiempo a estar acostados sobre el slatt. Únicamente se levantaban a tomar agua. Presentaron secreción mucosa en los ojos y signos respiratorios evidentes. Por la tarde el cerdo que tenía apariencia más saludable comenzó a deprimirse, buscando la zona más oscura del corral. Las heces de este grupo estaban más secas que las de los otros cuatro. Los días 7 y 8 se hicieron más evidentes los ojos sucios del cerdo que empezó a deprimirse. Este cerdo presentó signos nerviosos y respiratorios severos tanto en la mañana como en la tarde. Los otros animales que se deprimieron desde el inicio comenzaron a recuperarse y a comer. El día 9 PD se observó una franca recuperación, durmieron juntos excepto el cerdo con signos nerviosos y respiratorios severos. Este presentó coprofagia y signos nerviosos más frecuentes por lo que se decidió pesarlo este día. El día 10 PD amaneció muerto. En los demás cerdos se notó una franca recuperación. Se regularizó su consumo de agua y de alimento hasta el sacrificio.

#### TEMPERATURA.

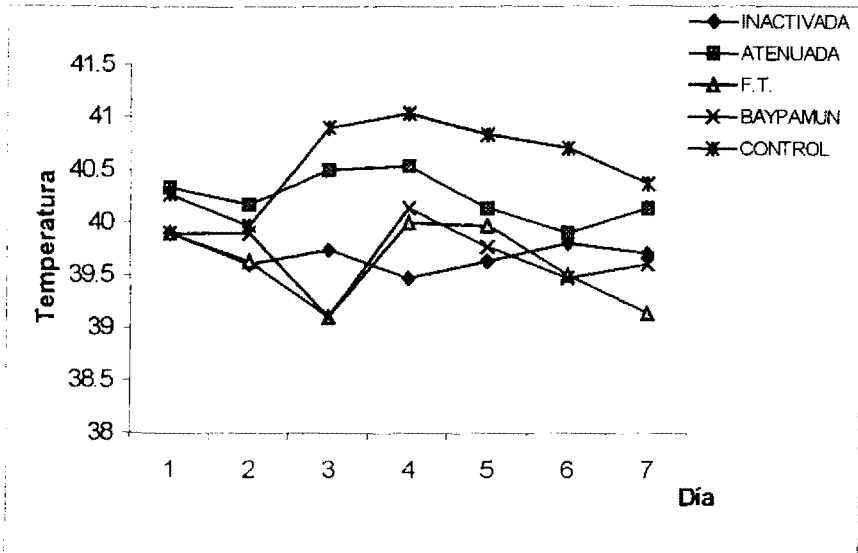
Se realizaron mediciones diarias desde el desafío hasta el día 10 PD. En la gráfica 1 se muestran los valores obtenidos por grupo. Se consideró como fiebre valores  $\geq$  a 40 °C. Las temperaturas rectales promedio muestran una hipertermia estadísticamente significativa del grupo testigo al compararlos con los vacunados excepto con el grupo II ( $p < 0.05$ ). Las medias de las temperaturas se obtuvieron de las temperaturas individuales de los cerdos de cada grupo.

Los cerdos inmunizados con la vacuna inactivada (grupo I) mantuvieron una temperatura constante durante todo el experimento. Los cerdos que recibieron la vacuna atenuada (grupo II) por el contrario manifestaron hipertermia desde el día del desafío hasta el día 6PD aunque de una magnitud menor que la de los cerdos que recibieron el placebo (grupo V).

Los cerdos a los que se les aplicó el FT más vacuna inactivada (grupo III) tampoco presentaron fiebre en ninguna de las evaluaciones, pero se observó un incremento notable de temperatura los días 3 y 4 PD. El

incremento del día 3PD al día 4PD fue de 0.8 °C. Los cerdos que recibieron el Baypamun más vacuna inactivada (grupo IV) manifestaron fiebre los días 3 y 8 PD. Los cerdos del grupo V acusaron fiebre desde el día 2 al día 6PD

### TEMPERATURAS PROMEDIO



Gráfica 1. Se observa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) del grupo testigo con respecto a los grupos con V1.

## PESO.

Los pesos promedio de los cinco grupos se observan en el cuadro 1. El grupo que recibió el placebo presentó el menor promedio de peso. Se observó diferencia estadísticamente significativa entre este grupo y el que recibió la vacuna atenuada ( $p < 0.05$ ). No existió diferencia estadísticamente significativa con los otros grupos. Los cinco grupos ganaron peso durante los 10 días PD. No murió ninguno de los cerdos de los grupos vacunados. Los cerdos del grupo V tuvieron el menor peso promedio al final de la prueba y uno de ellos murió.

**PESOS PROMEDIO**

GRUPO	PESO 1	PESO 2	PESO 1/ PESO 2
I	16	22	6
II	18.6	25.33	6.73
III	19.66	22.66	3
IV	17	20	3
V	16.33	18.33	2

Cuadro 1. Se observa la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre el grupo II y el Grupo V. Y diferencia entre el primer pesaje y el segundo de cada uno de los grupos.

## AISLAMIENTO VIRAL.

El resultado del aislamiento realizado a partir de encéfalo y pulmón se observa en el cuadro 2.

GRUPO	ENCEFALO	PULMON
I	-	+
II	-	+
III	-	-
IV	-	+
V	+	+

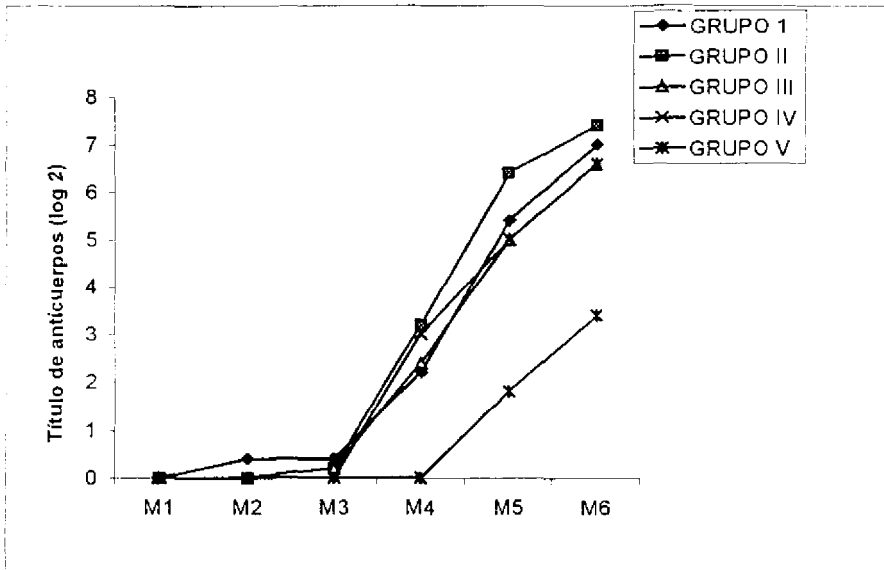
Cuadro 2. El resultado más relevante se observa en el aislamiento negativo de pulmón del grupo III.

Se observó el porcentaje de daño pulmonar ocasionado por agentes oportunistas, basándonos el lo que se informa en diferentes estudios acerca de la asociación de las lesiones neumónicas y la disminución diaria de la ganancia de peso.<sup>43</sup> Las lesiones neumónicas en general consistieron en: áreas de consolidación, zonas colapsadas alrededor de zonas pálidas con enfisemas, edema y zonas congestionadas. El porcentaje de daño pulmonar para el grupo I fue del 21%, grupo II 12%, grupo III 14%, grupo IV 18% y para el grupo V 50%.

## SEROLOGÍA.

Se realizó un muestreo previo a la aplicación de los inmunomoduladores y de la vacunación, para comprobar que los cerdos de los cinco grupos eran libres de anticuerpos contra el VEA. Los resultados obtenidos en cada muestreo se observan en la gráfica 2. Se hizo la conversión de los títulos de anticuerpos a  $\log_2$  para su análisis estadístico. El día 11 se comienzan a observar anticuerpos neutralizantes en los grupos vacunados. No existió diferencia significativa entre éstos. El grupo V presentó respuesta de anticuerpos el día 7 PD.

## TÍTULO DE ANTICUERPOS



Gráfica 2. No se observó diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en ninguno de los grupos vacunados con o sin inmunomodulador.

M. Número de muestreos.

## DISCUSIÓN.

Al utilizar la vacuna inactivada con o sin inmunomodulador (grupos I, II, III y IV) se previene de forma eficaz la presentación de fiebre ante un desafío con un VEA de campo. Y en el caso de la vacuna atenuada (grupo II) se presenta fiebre de menor duración e intensidad que en el grupo testigo. Se requiere que la vacunación provoque una alta respuesta inmune y que ésta sea protectora. Como se ha comprobado a lo largo de la historia, la vacunación es la herramienta médica más sencilla y exitosa contra las enfermedades infecciosas. La vacunación contra la EA disminuye la presentación de signos clínicos posterior a un desafío con un virus de campo, por ello es necesario una dosis mas alta para establecer una infección.<sup>41</sup> La vacunación es incapaz de evitar la replicación del VEA después de un desafío.<sup>44,45</sup> En el presente estudio se valora la vacunación contra el VEA y el uso de moduladores inmunológicos.

## SIGNOLOGÍA.

De acuerdo con los resultados obtenidos se observan marcadas diferencias entre los cerdos del grupo testigo y los grupos vacunados. La presentación de signos clínicos PD incluyendo el porcentaje de mortalidad concuerda con lo que se ha mencionado en la literatura para animales de esta edad.<sup>1</sup> Los grupos que recibieron vacuna y los que recibieron vacuna mas inmunomodulador fueron protegidos contra el VEA al presentar signos moderados y al compararlos con el grupo testigo. Las vacunas previenen la presentación de signos clínicos lo cual fue evidente en el grupo que recibió el placebo.<sup>46</sup> Diosdado informa que las vacunas de virus activo brindan la posibilidad de disminuir la prevalencia de la EA, en una zona y dentro de la granja.<sup>47</sup> Morilla concluye que donde hay una gran densidad de granjas infectadas se recomienda utilizar la vacuna atenuada gI-(gE).<sup>48</sup>

En la prueba que realizó España los signos aparecieron a los 2 días PD e informa mortalidad en su grupo testigo a la semana del desafío.<sup>49</sup> Al igual que en este trabajo, los signos aparecen el día 2 PD y un cerdo del grupo testigo murió el día 10 PD. En este estudio los grupos I y IV presentaron un porcentaje de daño pulmonar y lesiones similares con 21% 18% respectivamente, así mismo, los grupos II y III tuvieron el porcentaje de daño pulmonar parecido con 12% y 15% para cada uno y el grupo V presentó las lesiones más severas con un porcentaje de 50%. Estas lesiones confirman que la vacunación evitó la presentación de signos nerviosos pero no evitó la diseminación al sistema respiratorio con la posterior colonización de los pulmones por agentes oportunistas.

Vannier menciona que el VEA debilita inicialmente a los cerdos y esta condición favorece a la infección bacteriana provocando severas lesiones en el tracto respiratorio.<sup>42</sup> Shibata por su parte demuestra que el daño causado en los macrófagos alveolares permite la infección bacteriana de los pulmones, realizó un desafío a macrófagos alveolares sanos y a macrófagos alveolares infectados con VEA. Los primeros fueron capaces de destruir a *Pasteurella multocida* y los segundos fueron incapaces de eliminarla.<sup>50</sup> En un trabajo realizado por Ciprian y Mendoza explican que la vacunación contra el VEA no fue capaz de prevenir la multiplicación del virus en tracto respiratorio, ya que una dosis mínima de *Actinobacillus pleuropneumoniae* fue suficiente para colonizar y matar a todos los cerdos.<sup>51</sup> Torres que aplicó una sola dosis de FT y desafió con *P. multocida* observó la disminución de la incidencia de signos respiratorios y concluyó que el FT tuvo un efecto benéfico al disminuir las lesiones pulmonares, signos clínicos y aumentar la ganancia de peso en el cerdo.<sup>52</sup>

#### TEMPERATURA.

La duración de la fiebre como la intensidad de la misma fue considerablemente menor en los cerdos de los grupos vacunados al compararlos con el grupo testigo, el cual presentó fiebre desde el día 2 al día 6 PD. Vannier informa de resultados similares cuando desafió con un VEA con un título de  $10^{6.7}$  TCID<sub>50</sub>/ml, su grupo testigo presentó fiebre el día 2 PD signos respiratorios y nerviosos intensos y al día 7 PD dos de sus cerdos murieron. También el grupo en el que aplicó vacuna inactivada cursó con fiebre del día 2 PD al día 5PD y este grupo presentó signos moderados y postración pero no por más de 5 días. El grupo en el que aplicó la vacuna atenuada presentó periodos de fiebre durante 7 días.<sup>53</sup> lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo el grupo II presentó fiebre desde el día 0 al día 4 PD. Rodríguez que aplicó el FT y desafió con el VEA observó que el periodo de fiebre se acortaba. Con FT obtuvo 40.5 °C y con la VI 41.1 °C.<sup>30</sup> En este trabajo a diferencia del de Rodríguez tanto el grupo que recibió la vacuna inactivada como el grupo que recibió vacuna inactivada más el FT no presentaron fiebre, el grupo al que se le aplicó la vacuna atenuada por el contrario desde el día del desafío hasta el día 6 PD manifestaron fiebre. Los cerdos que recibieron la vacuna inactivada más Baypamun presentaron fiebre los días 4 y 9 PD y el grupo que recibió el placebo tuvo fiebre del día 2 al día 6 PD.

Castricci realizó un trabajo en el que aplicó 2ml de Baypamun subcutáneo por tres días consecutivos y después desafió a becerros con 5 ml de virus herpes bovino tipo 1 (BHV-1). Los animales tuvieron fiebre

moderada de 40.5 °C a 41.5 °C y se recuperaron sin una disminución significativa en su condición. Encontró que la fiebre duró menos tiempo en este grupo que en el grupo testigo que presentó signos clínicos severos de la rinitis infecciosa bovina (IBR).<sup>28</sup> En otro trabajo del mismo autor, en el cual también desafió con BHV-1 y aplica vacuna inactivada más Baypamun tiene una elevación de temperatura transitoria como en nuestro grupo IV en el que se aplicó VI más Baypamun. En ese trabajo se informa que los becerros presentaron fiebre por siete días.<sup>29</sup> En este estudio se encontró fiebre sólo en dos, los días 4 y 5 PD.

#### RESPUESTA INMUNE.

La respuesta mediada por anticuerpos se determinó por SN, que es la prueba más específica.<sup>54</sup> La presencia de anticuerpos neutralizantes desde el momento de la vacunación hasta el desafío muestran títulos bajos y aumentan posterior a éste, hacia el final de la prueba se observa una evolución ascendente, no apreciándose diferencia significativa en los cuatro grupos vacunados.<sup>46,49</sup>

El título de anticuerpos en los grupos vacunados obtiene su valor más alto en los cerdos del grupo II, con una tendencia a elevarse en los grupos III y IV posterior a la segunda vacunación. La diferencia de los títulos no es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los grupos vacunados ya que los títulos de anticuerpos se homogeneizaron posterior al desafío. Distintos trabajos mencionan que la inmunidad humoral no es el principal mecanismo con el que se confiere protección y que existe una pobre correlación entre el título de anticuerpos neutralizantes y el nivel de protección.<sup>17</sup> Iglesias informa que los elementos de defensa en los cuales no hay participación de anticuerpos tienen una importancia considerable en el proceso de recuperación en los casos de infección con un herpes virus.<sup>55</sup> En estudios más recientes se señala que después de un desafío con un VEA de campo la respuesta mediada por células es la más importante.<sup>21</sup> En un estudio realizado por Kimman donde inmunizó con una VA y posteriormente desafió, observó una protección efectiva contra el VEA, una pobre respuesta mediada por anticuerpos y una fuerte respuesta celular.<sup>56</sup> De Bruin informa que cuando los cerdos son inmunizados y posteriormente desafiados con el VEA la respuesta de linfocitos T es acrecentada pero no la respuesta de linfocitos B, esta observación sugiere que los linfocitos T son los responsables de la inmunidad protectora. En este estudio De Bruin encontró que las células doble positivas CD4+-CD8+ son células asociadas con la linfoproliferación y con la producción de citocinas que activan a macrófagos y a linfocitos NK que también pueden eliminar al VEA. Así como ocurre en una infección por



HSV-1, donde, los macrófagos activados son los responsables de eliminar este virus.<sup>56</sup> Esta respuesta también se puede lograr con el uso de inmunomoduladores. Rodríguez al aplicar el factor de transferencia encontró una protección efectiva contra el VEA sin la presencia de anticuerpos y afirma que el FT otorga al receptor la capacidad de respuesta inmune celular contra el agente específico al cual es sensible el donador y aumenta en menor grado la respuesta celular inespecífica.<sup>30</sup>

Castrucci en sus trabajos no obtuvo diferencias significativas en la producción de anticuerpos neutralizantes, al aplicar Baypamun más una vacuna inactivada y posteriormente desafió con BHV-1. En este trabajo tampoco se encontró diferencia significativa en el grupo que recibió el Baypamun más la vacuna inactivada. Castrucci propone que se utilice el Baypamun junto con la vacunación, ya que con el efecto de ambos no se desarrollaron signos de la enfermedad. Este autor sugiere el uso del Baypamun en el inicio de un brote como auxiliar en el tratamiento de las enfermedades respiratorias del ganado bovino y, menciona que en asociación con la vacuna podría reducir las pérdidas económicas al limitar la presentación de nuevos casos, lo que evidentemente no ocurre cuando se utiliza sólo la vacunación.<sup>28, 29</sup>

#### ASLAMIENTO VIRAL.

El aislamiento del VEA en cultivos celulares es al igual que en el caso de otros herpesvirus relativamente sencillo y rápido, debido al efecto citopático característico de este subgrupo de herpesvirus.<sup>54</sup>

En el grupo testigo se confirma el aislamiento del VEA, sin embargo, el aislamiento negativo de encéfalo en los cerdos de los grupos vacunados reafirma que el uso de las vacunas atenuadas o inactivadas evitan la presentación de signos nerviosos pero no la replicación del virus. Kimman indica que la glicoproteína E facilita la transmisión neurona a neurona y por esta razón no se encuentra al VEA en otras regiones del encéfalo. Rodríguez en su trabajo con el FT no encuentra evidencia del virus en SNC.<sup>57</sup> El resultado más relevante en el presente estudio es sin duda el aislamiento negativo del VEA en las muestras de pulmón del grupo III. Si el FT actúa sobre los linfocitos T, linfocitos NK y macrófagos principalmente en la producción de citocinas como el IFN- $\gamma$  y la IL-12 y éstas a su vez fortalecen la respuesta inmune mediada por células del tejido linfoide de la zona, entonces al aplicarlo con una vacuna inactivada se obtiene una protección efectiva ante un desafío con el VEA.<sup>58</sup> En los cuatro grupos restantes el aislamiento a partir de este órgano fue positivo. En medicina humana se ha utilizado el FT para enfermedades infecciosas de diversas etiologías siendo la elección óptima para el tratamiento de los herpes virus (HSV-1, HVZ, hepatitis, queratitis herpética)

y también para las enfermedades en las que se ve comprometido el sistema respiratorio (coccidiomycosis, tuberculosis, sinusitis, faringitis, otitis media, rinitis atrófica primaria y escleroma respiratorio).<sup>58</sup> Missene obtiene como resultado la mejoría del cien por cien de sus pacientes con escleroma respiratorio con la recuperación del gusto, olfato, evaluación radiológica y cultivos de secreción nasal negativos.<sup>59</sup>

#### PESO

En este trabajo no se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los pesos obtenidos con cada tratamiento, este resultado puede deberse al corto tiempo de observación posterior al desafío y con base en el porcentaje de daño pulmonar podemos inferir que los grupos II y III podrían haber alcanzado mayor peso en el mismo tiempo de observación.

Los resultados obtenidos en este trabajo al compararlos con otros tanto en medicina veterinaria como en humana, indican que al combinar la acción del FT con la vacunación hay disminución de signos clínicos y en la pérdida de peso posterior a un desafío con el VEA de campo. Como señala E. Parra, es importante enfatizar que el FT específico también puede ser utilizado como profiláctico para prevenir ciertas enfermedades virales. A esta lista podemos agregar sin duda a la EA.

Vannier, Vanderpooten y Espuña mencionan en sus estudios que la fiebre y particularmente la pérdida de peso son criterios objetivos e indicadores directos de la severidad de la enfermedad.<sup>42,49,60</sup> Christine y Mousing mencionan que se pierden en la ganancia de peso diario 37gramos por cada 10% de daño pulmonar. Basándonos en estas afirmaciones podemos concluir que los cerdos que obtuvieron mayor peso estuvieron mejor protegidos.<sup>43</sup>

## CONCLUSIÓN.

Los cerdos del grupo III fueron los mejor protegidos al presentar signos moderados y menos lesiones pulmonares que los demás grupos. Por lo que se concluye que a menor severidad en la presentación de signos clínicos y lesiones pulmonares existe mayor protección.

Durante este estudio los grupos I y III tuvieron mejor desempeño en su temperatura que los otros cuatro grupos, posterior al desafío con el VEA. La diferencia fue estadísticamente significativa con respecto al grupo V. Por lo que se concluye que la vacunación con una vacuna inactivada con o sin inmunomodulador (grupos I, II, III y IV) previene de forma eficaz la presentación de fiebre ante un desafío con el VEA. Y en el caso de las vacunas atenuadas (grupo II), se presenta fiebre de menor intensidad y duración que el grupo V.

Con base en los resultados obtenidos en la serología se observó que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos vacunados con o sin inmunomoduladores, y se concluye que los anticuerpos no son los responsables de conferir protección ante un desafío con el VEA.

Con respecto al aislamiento realizado a partir de cortes de encéfalo, se puede concluir que la vacunación evita la presencia del VEA en este órgano y por lo tanto la presentación de signos nerviosos.

En el aislamiento a partir de cortes de pulmón y con base en la literatura citada se concluye que el grupo III fue el mejor protegido al no encontrar evidencia del VEA al realizar el aislamiento a este órgano.

Por lo citado con anterioridad se puede inferir que los grupos II y III podrían haber obtenido más peso que los otros grupos con mayor tiempo de observación y, concluir que los cerdos que tuvieron más peso fueron los mejor protegidos.

Se puede concluir que la vacunación es el más sencillo y el mejor método para prevenir y controlar la EA. Así mismo, se confirma que se obtiene un mejor resultado con la vacuna atenuada que con la inactivada.

Para que el FT sea utilizado de manera comercial, se necesita más investigación y que un laboratorio se interese en invertir y sacar un producto comercial, como en medicina humana, donde se tiene el Immodin SEAVAC que se aplica en intervalos de tres meses por vía subcutánea para el tratamiento de pacientes que sufren de tres o más ataques anuales de uveítis. Hana y col., informan que el 70% de estos pacientes no tuvieron recurrencias típicas. El 25% de ellos tuvieron un ligero malestar en los ojos durante tres a cinco días sin comparación con la severidad de los ataques anteriores.<sup>61</sup>

La aplicación del FT extraído de animales de la misma explotación tendría beneficios adicionales en un

programa permanente para prevenir y controlar enfermedades presentes en ésta.

En producción porcina se puede aplicar el FT en el momento que puedan inmunodeprimirse los animales, este momento lo determinaría el MVZ encargado del área o de la explotación. Sin embargo, se puede sugerir más investigación en la aplicación del FT al destete, al reagruparlos en área o sitio de crecimiento o engorda o para animales nuevos en las cuarentenas y para los reemplazos del pie de cría, donde se aplicaría el FT obtenido de la misma explotación y que sea específico para el ambiente de la misma.

Los costos de producción del FT son relativamente bajos, disminuye las infecciones secundarias y por lo tanto los gastos en medicamentos.

Es necesario que para obtener mayores beneficios con el FT se realicen más estudios dirigidos hacia el número de dosis y la frecuencia de aplicación.

Aunque en este estudio los resultados obtenidos con el Baypamun no fueron los esperados, no se puede poner en duda su acción inmunoestimulante. Por que, en estudios realizados con este producto en becerros se obtuvieron excelentes resultados al utilizarlo como inmunoestimulante o como terapéutico ante un desafío con el BHV-1. Por lo que se sugiere hacer más investigación para establecer el número de dosis y la frecuencia de aplicación en los sistemas de producción porcina.

## LITERATURA CITADA.

1. Klugge JP, Beran GW, Hill HI, Platt KB. Pseudorabies (Aujeszky's Disease). In: Leman AD, editor. Diseases of Swine. 7th ed. Iowa (USA): Iowa State University Press, 1992: 312-322.
2. Merchant IA y Packer RA: Bacteriología y Virología Veterinarias. 3ª ed. España: Acribia, 1970.
3. Medina GL y Correa GP: Presencia de anticuerpos contra la Enfermedad de Aujeszky en sueros de cerdos de diferente procedencia. Tec. Pec. Mex. 1977; 32: 93-96.
4. Martell DMA: Consideraciones sobre la Enfermedad de Aujeszky o Pseudorrabia en México. Morilla GA, Correa GP, y Stephano A, editores. En Avances en Enfermedades del Cerdo. México 1985: 195-201.
5. Alzina A, Gómez M, Rodríguez J, Villegas S y Álvarez M: Control de la Enfermedad de Aujeszky mediante el uso de vacunación gI- en una granja infectada. Memorias del XXVII Congreso Nacional De AMVEC; 1992 Acapulco (Guerrero) México. Acapulco (Guerrero): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, 1992: 224-225.
6. Rosales OC: Aspectos epizootiológicos de la Enfermedad de Aujeszky. Morilla GA, Correa GP, y Stephano A, editores. En Avances en Enfermedades del Cerdo. México 1985.
7. Taylor DJ. Pig Diseases. 6th ed. Great Britain: St. Edmundsbury Press, 1995.
8. Mohanty SB, Dutta SK. Virología Veterinaria. México: Editorial Interamericana, 1983.
9. Mettenleiter TC. Pseudorabies (Aujeszky's Disease) Virus. Aujeszky's Disease Symposium OIE Intervet. Bangkok, Thailand 1994: 1-9.
10. Correa GP. Pseudorrabia. Morilla GA, Correa GP, y Stephano A, editores. En Avances en Enfermedades del Cerdo. México 1985: 177-189.
11. Maqueda AJ: Características clínicas de la Enfermedad de Aujeszky. Morilla GA, Correa GP, y Stephano A, editores. En Avances en Enfermedades del Cerdo. México 1985.
12. Morilla GA. Aspectos inmunológicos de la enfermedad de Aujeszky. Morilla GA, Correa GP, y Stephano A, editores. En Avances en Enfermedades del Cerdo. México 1985.
13. Morilla GA. Enfermedad de Aujeszky. INIFAP-SAGAR y PAIEPEME, AC, editores. Manual para el control de las Enfermedades Infecciosas de los Cerdos. México 1997: 75-90.

14. Cuevas RS, Guzmán HM, Alvarado IA, Sánchez MP, Colmenares VG, et al. Evaluación de los métodos DOT-ELISA y seroneutralización para el diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky en cerdos. Memorias del XXX Congreso Nacional de AMVEC: 1995 Agosto 24-26; Manzanillo (Colima) México. Manzanillo (Colima): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. 1995: 70-71.
15. Campos ME, Cañedo PA. Prevalencia del virus de Aujeszky y su excreción a través del eyaculado de sementales, así como su importancia epidemiológica y económica. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de AMVEC: 1993 Septiembre 15-18; Cancún (Quintana Roo) México. Cancún (Quintana Roo): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. 1993: 100-102.
16. Mettenleiter TC, Luckacs N, Rziha HJ. Pseudorabies virus avirulent strain fail to express a major glycoprotein. *J. Virol.* 1985; 1: 307-311.
17. Kimman TG. Immunological protein against pseudorabies virus. Aujeszky's Diseases Symposium OIE Intervet. Bangkok, Thailand 1994: 11-22.
18. Anelli JF, Morrison RB, Goyal SM, Bergeland ME and Macke WJ: Pig herds having a single reactor to serum antibody test to Aujeszky's disease virus. *Vet. Rec.* 1991; 128: 49-53.
19. Vargas AM. Control y erradicación de la enfermedad de Aujeszky en un sistema múltiple de tres sitios (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, 1996.
20. Zuckermann FA, Stephen M, Husmann RJ and Brandt J. Use of Interleukin 12 to Enhance the Cellular Immune Response of Swine to an Inactivated Herpesvirus Vaccine. Ronald D. Shultz. *Veterinary Vaccines and Diagnostics. (USA)* 1999: 447-461.
21. Van Dijk PM. Working with the immune system to be in control, not on the defence. *Pig Progress.* 1999; 15: 8-11.
22. Estrada PS, Velasco CO, Rébora F, Díaz MJ, Padierna OJ. Inmunoterapia de la tuberculosis pulmonar avanzada, con factor de transferencia específico. *Salud Pública de México* 1983; 25: 589-600.
23. Strube W, Thein P, Kretzdorn D, Grunmach J. Baypamun: New Possibilities for the Control

- Infectious Diseases in Domestic Animals. *Vet Med Rev* 1989; 60: 3-15.
24. Euzeby JP. Propriétés immunostimulantes du levamisole. *Revue Med Vet* 1986; 137: 417-426.
  25. Padierna OL, Godinez CS, Díaz MJ, García E, Argaez MA, Velasco CO, et al. Factor de transferencia en pacientes con Herpes Zóster. *Infectología* 1985; 11: 293-299.
  26. Sumano H, Caballero S. Influencia de los Antimicrobianos sobre la Respuesta Inmune. Memorias del XXXII Congreso Nacional de AMVEC; 1997 Agosto 10-13 Ixtapa-Zihuatanejo (Guerrero) México. Ixtapa-Zihuatanejo (Guerrero): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos 1997: 104.
  27. Ortega C, Ruiz I, De Blas I, Muzquiz JL, Fernández A, et al. Furunculosis control using a paraimmunization stimulant (Baypamun) in rainbow trout. *Vet Res* 1996; 27: 561-568.
  28. Castrucci G, Ferrari M, Osburn BI, Frigeri F, Barreca F, et al. A non-specific defence inducer in preventing clinical signs of infectious bovine Rhinotracheitis in calves. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1996; 19: 163-169.
  29. Castrucci G, Ferrari M, Osburn BI, Frigeri F, Barreca F, et al. The use of a non-specific defence mechanism inducer in calves exposed to Bovine Herpesvirus-1 Infection: Preliminary trials. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1995; 18: 85-91.
  30. Rodríguez LD. El Factor de Transferencia en la Enfermedad de Aujeszky (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1987.
  31. Escudero AI. El Factor de Transferencia: Propiedades bioquímicas y aplicaciones clínicas (tesis de licenciatura). Cuautitlán (Estado de México)

- México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, 1984.
32. Candanosa ME, Estrada PS, Trigo TF, Velázquez EA, García MI. Empleo del Factor de Transferencia (FT) de origen Bovino en el modelo tumoral murino melanoma B16. *Vet Mex* 1997; 28: 93-99.
  33. Goleva EG, Lyubchenko TA, Grodzinski DM, Kholodna LS. Transfer factor of cell-mediated immune response rehabilitation activities in irradiated mice. *Memories of the XIth International Congress on Transfer Factor*; 1999 march; Monterrey (Nuevo León ) México. Monterrey (Nuevo León) 1999:16.
  34. Estrada-Parra S, Nagaya A, Serrano E, Rodríguez O, Santamaría V, et al. Comparative study of Transfer Factor and Acyclovir in the treatment of Herpes Zoster. *In J Immunopharma* 1998; 20: 521-537.
  35. Arellano JA. Efecto de la utilización del Factor de Transferencia como inmunopotenciador para prevención y control de la rinitis atrófica (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1988.
  36. Chávez LE. Efecto de la utilización del Factor de Transferencia como inductor de la inmunidad celular en la prevención del cólera porcino (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1988.
  37. Mateos A. El Factor de Transferencia como biológico en la Inmunoterapia en becerros clínicamente enfermos (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1990.
  38. Ramírez GR. Evaluación del Factor de Transferencia en la Vacunación contra la enfermedad de Newcastle en pollos de engorda (tesis de licenciatura). México



- (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1987.
39. Rojas SD. Uso del suero hiperinmune y del factor de transferencia para la prevención y tratamiento de la colibacilosis neonatal en lechones (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1987.
  40. Coj LJ. Perfil serológico contra la Enfermedad de Aujeszky en una granja porcina donde se aplica una vacuna con delección de la glicoproteína GI (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1993.
  41. Pirtle EC, Gutekunst DE. Virus Isolation and Immune Responses in Susceptible Swine Exposed with Pseudorabies Virus (Shope Strain) National Animal Disease Center, Science and Education Administration, Federal Research. US Department of Agriculture 1978: 1367-1368.
  42. Vannier P. Experimental Infection of fattening pigs with pseudorabies (Aujeszky Disease) Virus efficacy of attenuated live- and inactivated- virus vaccines in pigs with or without passive immunity. *Am J Vet Res* 1985; 46: 1498-1502.
  43. Christensen G and Mousing J. Respiratory System. In: Leman AD, editor. *Diseases of Swine*. 7th ed. Iowa (USA): Iowa State University Press, 1992: 138-162.
  44. Bouma A, De Jong MC, Kimman TG. Comparison of two pseudorabies virus vaccines, that differ in capacity to reduce virus excretion after a challenge infection, in their capacity of reducing transmission of pseudorabies virus. *Vet Microbiol* 1997; 54: 113-122.

45. Kimman TG, Bianchi ATJ, de Bruin TGM, Mulder WAM, Priem J, et al. Interaction of Pseudorabies Virus with immortalized porcine B cells: Influence on surface Class I and II Major Histocompatibility Complex and immunoglobulin M expression. *Vet Immun. And Immunopath.* 1995; 45: 253-263.
46. Kelling CL, Staudinger WL, Rodees MB. Immune response of pigs inoculate with virulent pseudorabies virus and pigs inoculated with attenuated or inactivated pseudorabies virus vaccine before and after challenge exposure. *Am J Vet Res* 1982; 43: 2114-2120.
47. Castro GDA, Diosdado VF, González VD, Campomanes CA, Rosales DC, ET AL. Evaluación de la inmunidad e infecciosidad de una vacuna de virus vivo atenuado contra la Enfermedad de Aujeszky. *Memorias del XXXII Congreso Nacional de AMVEC; 1997 Agosto 10-13 Ixtapa-Zihuatanejo (Guerrero) México. Ixtapa-Zihuatanejo (Guerrero): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos 1997: 26.*
48. Morilla A, Diosdado VF, Castro DA, González VD, Rosales DC, ET AL. Avances en la Investigación de la Enfermedad de Aujeszky en México. *Memorias del XXXII Congreso Nacional de AMVEC; 1997 Agosto 10-13 Ixtapa-Zihuatanejo (Guerrero) México. Ixtapa-Zihuatanejo (Guerrero): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos 1997: 36.*
49. Espuña E, Riera P, Artigas C, Ferrés J y Alemany R. Actividad de un adyuvante no oleoso utilizado como diluyente de una vacuna viva liofilizada contra la enfermedad de Aujeszky. *Med Vet* 1994; 11: 359-372.
50. Shibata I, Uruno K, Samegai Y, Okada M, Inaba Y. Replication of Virulent and

- Attenuated Strains of Aujeszky's Disease Virus in Swine Alveolar Macrophages. *J Vet Med Sci* 1994, 56: 465-468.
51. Ciprian CA y Mendoza ES. Aportaciones de la FES-Cuatitlán UNAM, en las investigaciones de las afecciones respiratorias del cerdo. *Memorias del XXX Congreso Nacional de AMVEC; 1995 Agosto 24-26; Manzanillo (Colima) México. Manzanillo (Colima): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, 1995: 19-28.*
52. Torres MH. Efecto del Factor de Transferencia Específico en contra de Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 5 y Pasteurella multocida serotipo A, en Cerdos (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1997.
53. Vannier P. Testing of Aujeszky's Disease vaccines (Safety, Efficacy, Reduction of virus shedding). *Aujeszky's Diseases Symposium OIE Intervet. Bangkok, Thailand 1994: 23-31.*
54. Osorio FA. Diagnosis of Aujeszky's disease. *Aujeszky's Diseases Symposium OIE Intervet. Bangkok, Thailand 1994: 33-44.*
55. Iglesias G. Los Antígenos mas importantes del virus de la Enfermedad de Aujeszky. *Memorias del XXVIII Congreso Nacional de AMVEC; 1993 Septiembre 15-18; Cancún (Quintana Roo) México. Cancún (Quintana Roo): Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, 1993: 103-109.*
56. De Bruin MGM, De Visser YE, Kimman TG, Bianchi ATJ. Time course of the porcine cellular and humoral immune responses in vivo against pseudorabies virus after inoculation and challenge: significance of in vitro antigenic

- restimulation. *Vet Immun and Immunopath* 1998; 65: 75-87.
57. Kimman TG, Wind N, Oei-Lie N, Pol JMA, Berns AJM, et al. Contribution of single genes within the unique short region of Aujeszky's disease virus (suid herpesvirus type 1) to virulence, pathogenesis and immunogenicity. *J Gen Virol* 1992; 73: 243-251.
58. Estrada-Parra S, Cabezas QR, Velasco CO, Ondarza AR, Chávez SR, et al. Actividad Terapéutica e Inmunorreguladora del Factor de Transferencia. Memorias del 2º Simposium de Inmunoestimulación e Inmunomodulación; 1998 Noviembre 5 y 6; Cuautitlán (Estado de México) México. Cuautitlán (Estado de México), 1998: 79-92.
59. Missene OB, Vázquez SR, Soda MA, Rubio SM, Rubio MH, et al. Tratamiento de escleroma respiratorio y rinitis atrófica primaria con factor de transferencia. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx* 1992;5 (3): 123-129.
60. Vanderpooten A, Goddeeris B, De Roose P, Hendrickx L, Biront P, et al. Evaluation of parenteral vaccination methods with glycoproteins against Aujeszky's disease in pigs. *Vet Microbiol* 1997; 55: 81-89.
61. Hana I, Stara J, Bugoszaková J, Pekárek J, Ivasková E. Transfer Factor (Immodin SEVAC) Treatment of recurrent anterior uveitis- a retrospective evaluation after 10 years. Memories of the XIth International Congress on Transfer Factor; 1999 march; Monterrey (Nuevo León ) México. Monterrey (Nuevo León) 1999:7.