

**INMUNIZACION DE CERDAS GESTANTES CONTRA GASTRO ENTERITIS TRANSMISIBLE
MEDIANTE CELULAS LINFOIDES INTESTINALES SENSIBILIZADAS Y EL FACTOR DE
TRANSFERENCIA**

Tesis presentada ante la
División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del grado de

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

Por

BENJAMIN SUAREZ AGUILAR

Asesores:

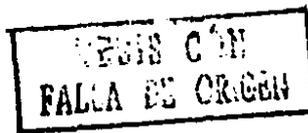
MVZ. MSc. Fernando Olgufn Romero

MVZ. Aurora Velázquez Echegaray

MVZ. PhD. José Manuel Berruecos Villalobos

México D. F.

1988





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

RESUMEN

De un total de 10 cerdas primerizas adultas y seronegativas a GET se formaron al azar 2 grupos de 5 animales cada uno que recibieron alimentación y alojamiento semejante pero cuya diferencia fué el tratamiento que se les aplicó para provocar en ellas inmunidad adoptiva. El primer grupo fué tratado con células linfoides asociadas al intestino provenientes de una cerda inmune a gastroenteritis transmisible (GET). Cada cerda recibió entre los 70 a 85 días de gestación 6×10^9 células linfoides como mínimo una sola vez:

La primera cerda fué inmunizada por vía oral

La segunda cerda fué inmunizada por vía diatélica (inoculación dentro del pezón en glándula mamaria).

La tercera cerda fué inoculada por vía intraperitoneal.

La cuarta cerda fué inoculada por vía linfática (gánglios linfáticos cervicales superiores).

La quinta cerda quedó como testigo sin ningún tratamiento.

El segundo grupo fué tratado con el extracto dializable de un lizado de la misma clase de células provenientes del mismo animal inmune contra GET. Cada cerda recibió el extracto proveniente de 6×10^9 células (2 U de factor de transferencia), los animales se inocularon en la forma semejante a las del grupo anterior y la quinta quedó también como testigo sin tratamiento.

Una vez transcurrida la gestación y cuatro a cinco días después del parto todos los lechones que nacieron de todas las cerdas fueron expuestos al virus virulento de GET cepa FMVZ-69 para ser desafiados.

Se observó el efecto de la exposición de los lechones y de las cerdas al virus en cuanto a signos clínicos y mortalidad, estas observacio

nes se relacionaron con la presencia de anticuerpos en el calostro, la leche y el suero de los lechones.

Los datos de mortalidad por camada, tratamiento y vía de inoculación, se compararon estadísticamente con los obtenidos en los animales testigo sin tratamiento. Prueba de Ji cuadrada.

| Vía de Administración | Muertos | Vivos | Total |
|-----------------------|---------|-------|-------|
| Oral | 0 | 8 | 8 |
| Intraperitoneal | 0 | 9 | 9 |
| Diatélica | 0 | 7 | 7 |
| Linfática | 0 | 8 | 8 |
| Testigo | 7 | 0 | 7 |

(P < 0.01)

1 - 5 11.25 (P < 0.01)

2 - 5 12.19 (P < 0.01)

3 - 5 10.28 (P < 0.01)

4 - 5 11.25 (P < 0.01)

Este trabajo pretende demostrar que las células linfoides asociadas al intestino o las sustancias contenidas en dichas células identificadas como factor de transferencia obtenidas por la infección oral de una cerda, son capaces de inducir inmunidad en animales susceptibles sin necesidad de que estos animales se infecten o entren en contacto con el antígeno.

LISTA DE CONTENIDO

| | <u>Página</u> |
|-----------------------------|---------------|
| Introducción | 1 |
| Antecedentes Bibliográficos | 3 |
| Importancia en GET | 5 |
| Material y Métodos | 18 |
| Resultados | 22 |
| Discusión | 34 |
| Bibliografía | 39 |

LISTA DE CUADROS

| <u>Cuadro</u> | | <u>Página</u> |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Signos clínicos y respuesta serológica de una cerda gestante después de la inoculación con virus virulento de Gastroenteritis Transmisibile. | 24 |
| 2 | Signos clínicos observados en cerdas gestantes susceptibles a GET, después del tratamiento en células linfoides asociadas al intestino (C.L.A.T.) o con factor de transferencia (F.T.) obtenidos de una cerda inmune. | 25 |
| 3 | Títulos de anticuerpos precipitantes en suero sanguíneo, calostro y leche de cerdas susceptibles a GET después del tratamiento durante la gestación con células linfoides intestinales obtenidas de una cerda inmune a GET. | 26 |
| 4 | Títulos de anticuerpos precipitantes en suero sanguíneo, calostro y leche de cerdas susceptibles a GET, después del tratamiento durante la gestación con factor de transferencia obtenido de una cerda inmune a GET. | 27 |
| 5 | Signos clínicos observados después del desafío, 5 a 8 días pos-parto, con virus virulento de GET en lechones de cerdas tratadas durante la gestación con células linfoides intestinales o con F.T. de un animal inmune. | 28 |
| 6 | Lesiones macroscópicas y sub microscópicas observadas en lechones muertos después del desafío con virus virulento de Gastroenteritis Transmisibile. | 29 |
| 7 | Título de anticuerpos precipitantes en suero sanguíneo y reacción de LIF anti GET en lechones nacidos y amamantados por cerdas tratadas con células linfoides intestinales de un animal inmune a Gastroenteritis Transmisibile. | 30 |
| 8 | Título de anticuerpos precipitantes en suero sanguíneo y reacción LIF anti GET en lechones nacidos y amantados por cerdas tratadas con Factor de Transferencia durante la gestación, obtenida de un animal inmune a Gastroenteritis Transmisibile. | 31 |

Cuadro

Página

| | | |
|----|--|----|
| 9 | Mortalidad observada en lechones nacidos de cerdas inoculadas con factor de transferencia y desafiadas con virus de Gastroenteritis transmisible | 32 |
| 10 | Mortalidad observada en lechones nacidos de cerdas inoculadas con células linfáticas asociadas al intestino. | 33 |

INTRODUCCION

a) Presentación del problema.

La Gastroenteritis transmisible (GET) es una enfermedad viral de los cerdos, caracterizada por una rápida difusión, diarrea profusa, deshidratación y muerte de más del 90% de los animales afectados menores de 2 semanas de edad (4,8,11,12). El virus de esta enfermedad puede infectar a cerdos de todas las edades, pero las manifestaciones clínicas son muy severas únicamente en lechones. Los cerdos adquieren resistencia contra los efectos del virus a medida que avanzan en edad, de tal forma que la mortalidad disminuye drásticamente en animales mayores de 2 semanas y a las 5 semanas de edad rara vez mueren por efecto de la infección con el virus (8, 11,12).

La enfermedad fué reportada por primera vez en los Estados Unidos de América (EUA) en 1946, pero posteriormente se ha identificado en todo el mundo, incluyendo México, en las principales áreas productoras de cerdos (19, 20,32,62). En todos los países donde se ha reportado la enfermedad produce anualmente una gran mortalidad de lechones, provocando pérdidas considerables a la porcicultura (6,54). Desgraciadamente en México no existen datos oficiales que cuantifiquen dichas pérdidas.

Hasta la fecha no se han desarrollado, o no se conocen medicamentos eficaces para el tratamiento de esta enfermedad (58,65,76). Las vacunas desarrolladas han mostrado tener solo una eficacia relativa (10,53,73,76,86,-88,95), y la única forma satisfactoria de protección de los lechones es mediante la inmunidad pasiva que les confieren las madres cuando se han infectado con virus virulento por vía oral durante la gestación, 30 a 40 días antes del parto; ya sea en forma natural o experimentalmente (1,5,9,10,11,33,-35,36,41,43,61,63,64,73,76,77).

Se han llevado a cabo varios trabajos para investigar las razones por las cuales la vacunación con cepas atenuadas del virus aplicado por vía oral o parenteral, provoca una respuesta semejante a la infección oral con virus virulento, ya que la inoculación parenteral u oral de cerdas gestantes con virus atenuado, produce una respuesta serológica manifiesta desde 5 a 7 días pos -inoculación (P.I.) pero el título de anticuerpos en la secreción láctea sólo se mantiene durante 2 ó 3 días pos -parto, dejando sin protección a los lechones durante el resto de la lactancia (26,32,41,61,63). Por otra parte, se sabe que la infección de cerdas gestantes por vía oral con virus virulento de cerdas gestantes, 30 a 40 días antes del parto, provoca la formación de altos títulos de anticuerpos del tipo IgA secretor que se eliminan en el calostro y leche durante toda la lactancia (5,11,14,40,57,71,73,74,76,77).

Un procedimiento que se ha utilizado para asegurar la inmunidad pasiva que proteja a los lechones, es la inoculación deliberada de cerdas gestantes con intestinos de lechones muertos por GET; lo cual ha ayudado a la difusión más rápida de la enfermedad; además de provocar la disminución de otros patógenos del cerdo que pudieran estar presentes en los intestinos de los lechones infectados (8,56,82).

Se ha especulado, pero a la fecha no se ha obtenido ninguna evidencia directa (18,57,71,76), de que la infección oral con el virus virulento de GET provoca una sensibilización en las células linfoides asociadas al intestino que migran hacia la glándula mamaria en donde transfieren información a las células de dicha glándula induciéndolas a producir Ig del tipo A secretor. La infección parenteral u oral con virus atenuado no provoca este mecanismo a juzgar por la falta de secreción de IgA secretora en la glándula mamaria de las cerdas tratadas con esta clase de virus (10,11,61,76). La -

inoculación parenteral de cerdas gestantes con el virus virulento tampoco provoca la formación de IgA secretora específica en su glándula mamaria (61,81,87,95).

b) Antecedentes bibliográficos:

I Patogenia de la GET.

Haelterman y Pensaert (37) y Hooper y Haelterman (43) demostraron que el síndrome que se observa cuando los lechones se infectan con el virus de GET se debe a la replicación del virus en las células epiteliales funcionales de la mucosa del intestino delgado. Estos mismos autores, también demostraron que los anticuerpos neutralizantes que circulan en el plasma sanguíneo no evitan que el virus se replique en las células mencionadas.

La patogenia de la gastroenteritis transmisible se ha descrito recientemente por Moon (55) y por Shepherd et al. en 1979 (79). Estos autores señalan que en los lechones, el virus es ingerido probablemente junto con material fecal proveniente de la madre o de algún otro lechón enfermo que contiene grandes cantidades de virus.

Experimentalmente se ha reproducido la enfermedad por inoculación oral o nasal, en este último caso, el virus de cualquier modo es dirigido hacia la nasofaringe en donde es deglutido hacia el tracto digestivo (43).

El virus resiste el pH ácido del estómago y la acción proteolítica de las enzimas digestivas; una vez en el intestino delgado, entra en contacto con las células epiteliales de las vellosidades, y éstas una vez que son infectadas, se destruyen rápidamente, lo que resulta en una reducción dramática de la capacidad de absorción de nutrientes y en un descenso rápido de la actividad enzimática del intestino delgado. Ambas funciones, absorción y producción de enzimas, se llevan normalmente a cabo por las células epiteliales ya mencionadas (12).

En los lechones, estas células producen principalmente lactosa, que hidroliza la lactosa para convertirla en dos moléculas de glucosa. Al faltar este mecanismo enzimático y al presentarse la incapacidad de absorción de nutrientes, los lechones presentan un síndrome agudo de malabsorción que resulta crítico para la vida (37). Además Hooper y Haelterman (43) sugieren que la presencia de leche semidigerida o no digerida en la luz intestinal, ante un epitelio destruido, ejerce una acción osmótica que provoca salida del líquido y electrolitos de los tejidos hacia el contenido intestinal. La acción irritante de la actividad viral provoca hipermotilidad, que a su vez impide una adecuada reabsorción de líquidos y electrolitos en el intestino grueso, todo lo cual se manifiesta en diarrea profusa, deshidratación y muerte por acidosis o hipercalemia (19,37,43,79).

Butler et al. (15) han señalado que un mecanismo adicional que contribuye a la diarrea es la alteración en el transporte de sodio en el yeyuno que provoca acumulación de agua y electrolitos en la luz intestinal, así como la pérdida de proteína extravascular.

La gravedad de los signos clínicos disminuye a medida que los animales avanzan en edad; varios autores han sugerido una mayor susceptibilidad al virus en los animales menores de 3 semanas de edad, y una mayor resistencia en los animales mayores, que se manifiesta por una reducción en la gravedad de la destrucción de las vellosidades intestinales (55,60).

De cualquier modo, se ha observado que en los animales mayores de 3 semanas, e incluso en los adultos, el ciclo de replicación viral es semejante al descrito en los lechones, pero que pueden existir varios mecanismos que expliquen la resistencia por edad a la acción del virus. El primero de estos mecanismos es que, en animales mayores de 3 semanas, las células epiteliales destruidas por el virus pueden ser sustituidas rápidamente

por otras células funcionales, a partir de la zona de replicación en el "cuello de las criptas de Lieberkühn". Otro mecanismo de resistencia que se manifiesta con la edad es una mayor resistencia de las células de reemplazo a la acción del virus, ya sea por la producción de interferón o por el inicio de una respuesta inmune local. La Bonnardiere y Laude (49).

Se ha observado también, que los animales mayores requieren de una mayor dosis infectante para manifestar signos clínicos, según Witte y Walther (92), se requiere 10^4 más virus para infectar a un cerdo de seis meses de edad que a un lechón en la primera semana de vida.

Es conveniente mencionar que en lechones de hasta 3 semanas de edad el virus se acumula en la parte apical, tubulovascular de las vellosidades intestinales, la cual desaparece después de dicha edad (90).

II.- Inmunidad en GET

I.- Inmunidad Activa

Según la revisión de Saif y Bohl (76) no existen aún estudios que aclaren con precisión los mecanismos mediante los cuales se establece la inmunidad después de la infección intestinal de los cerdos con el virus viru-lento. Tampoco hay estudios que aclaren el tiempo de duración de la inmuni-dad activa.

Según Stepanek (83), en las cerdas de cría es posible detectar an-ticuerpos en el suero sanguíneo durante por lo menos 6 meses después de la infección oral con el virus de campo; estos anticuerpos pueden persistir incluso durante varios años, pero el tiempo exacto no se conoce.

Olgún et al. señalan que la exposición oral de cerdos recién nacidos con una cepa atenuada del virus provoca la formación de anticuerpos detectables en el suero sanguíneo desde 5 días después de la exposición y que éstos alcanzan un título alto 7 días después.

En cerdas gestantes la administración oral del virus virulento de campo, en forma natural o experimental, provoca una respuesta de anticuerpos circulantes detectable a los 9 días posteriores a la inoculación. El título se incrementa hasta alcanzar un pico a los 21 días después de la inoculación y éste permanece más o menos constante hasta los 60 días después de la exposición y puede disminuir después de haber pasado el parto y la lactancia, sin embargo los anticuerpos persisten a títulos importantes después de 6 meses (61).

Cuando se exponen cerdas gestantes por vía oral o parenteral con cepas atenuadas del virus, se observa una respuesta semejante a lo anteriormente señalado en cuanto a anticuerpos circulantes (61).

Ya se señaló anteriormente que Haelterman (36), Hooper y Haelterman (43) y Harada et al. (39) han demostrado que los anticuerpos circulantes, adquiridos activa o pasivamente, no dan protección contra la infección oral del virus virulento de GET.

Los anticuerpos circulantes, permiten llevar a cabo el diagnóstico serológico de la enfermedad, pero no indicar el grado de protección que pudieran tener los animales, (71,76). Por otro lado, los cerdos recuperados de la infección natural generalmente resisten posteriores desafíos al virus, presumiblemente por la iniciación de inmunidad local en la mucosa intestinal (72,76).

Probablemente este mecanismo está relacionado con la producción de anticuerpos del tipo IgA secretor (SigA) a nivel de la mucosa intestinal por células linfoides dentro de la lámina propia, (11,16,24,31,32,40,41,42, 45,46,57,61,64,71,72,73,75,76,77,80,82,89).

Este tipo de anticuerpos se han detectado en el contenido intestinal de cerdos inoculados por vía oral con el virus virulento de GET pero no

cuando se inoculan por vfa parenteral, (76,77).

Sprino y Ristic (82), así como Bohl et al.(14) señalan que las cepas atenuadas del virus de GET se replican preferiblemente en la parte terminal de la mucosa del intestino delgado con lo cual causan menos daño, los síntomas son muy benignos y el estímulo inmunológico es menor.

Hess et. al. (42) señalan que hay una relación inversa entre el nivel de atenuación del virus y la extensión de la infección intestinal.

Se ha reportado que la exposición oral de lechones libres de gérmenes con el virus virulento resulta en la producción de anticuerpos circulantes y locales en el intestino desde los 5 días posteriores a la inoculación (76).

Estos mismos autores detectaron inmunocitos productores de IgA en la lámina propia del intestino de cerdos inoculados oralmente con el virus 7 días después. Estos estudios han sido confirmados posteriormente por Stone et. al. (85) quienes encontraron además inmunocitos en lámina propia del intestino de lechones recién nacidos capaces de producir IgM o IgA.

La inmunidad celular puede ser también un mecanismo importante en la inmunidad activa contra el virus de GET. Frederichk y Bohl (24) y Shimizu y Shimizu (81), han demostrado inmunidad celular con linfocitos obtenidos del tejido linfóide asociado al intestino de cerdos inoculados oralmente con el virus del GET. Cuando el virus se inoculó parenteralmente pudo demostrarse únicamente con células del bazo. Este tipo de inmunidad no demostró reacción inmune en los linfocitos circulantes.

Cepica y Derbyshire (16) reportaron que en los cerdos recién nacidos y en las cerdas pos-parturientas hay ausencia y disminución de células K y NK y que tal situación podría relacionarse con la mayor susceptibilidad de los lechones y de las cerdas recién paridas expuestas a la infección con

el virus virulento.

Todos los estudios anteriores indican que la inmunidad mediada por células es importante en la resistencia a la infección con el virus de GET.

Se ha tratado de inducir resistencia a la infección del virus en los animales recién nacidos, ya sea mediante interferencia o por el desarrollo de inmunidad activa local en el intestino, pero esto no se ha logrado. Todos los estudios indican que la resistencia por inmunidad activa local se adquiere entre 5 a 7 días después de la aplicación de vacunas según Olgún et. al. (63), y Furuuchi et. al. (25,26). De igual forma no se ha demostrado tampoco, un mecanismo de interferencia, (76).

Por estas razones la inmunización de los cerdos recién nacidos no es un método adecuado para lograr su protección inmediata ya que los deja desprotegidos durante los primeros días de vida, que son críticos en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, Bohm et. al. (14) señalan que la vacunación oral con cepas atenuadas del virus en cerdos lactantes o recién destetados podría contribuir al control de la forma enzootica de la enfermedad.

Dos estudios; el de Furuuchi et. al. (26) y el de Hess et. al. (42) reportaron que la presencia de anticuerpos adquiridos en el intestino pasivamente de la madre impide el desarrollo de inmunidad activa que de otra forma se produciría por la administración oral del virus atenuado de GET.

Inmunidad Pasiva.

Bay et. al. desde 1952, sugirieron que las cerdas recuperadas de la enfermedad transmitían inmunidad a sus lechones cuando las cerdas gestantes se infectaban y se recuperaban de la enfermedad, tres o más semanas an

tes del parto, y daban protección a sus lechones incluso cuando entraban en contacto con lechones enfermos. Posteriormente Bay 1953 et. al. (5) señalaron dos hechos importantes para el desarrollo de este tipo de inmunidad:

- a).- La inmunidad se desarrollaba únicamente en cerdas infectadas oralmente.
- b).- Eran necesarios treinta o más días entre la infección y el parto para que la cerda diera una protección efectiva a sus lechones, ya que únicamente los lechones nacidos de cerdas infectadas treinta o más días antes del parto resistían el desafío al virus virulento.

Recientemente Haelterman y Hutchings (33) sugirieron que la resistencia que mostraban los lechones nacidos de cerdas inmunes se debía a la presencia de anticuerpos en el calostro y en la leche, ya que estos animales eran muy susceptibles si se separaban de la madre antes de amamantarse. Además el suero sanguíneo de animales convalescientes no daba protección cuando se administraba parenteralmente.

En 1965 Haelterman (36) describió una serie de experimentos que aclararon el mecanismo de la inmunidad pasiva en la GET. En el primer experimento se transfirieron lechones de 3 a 5 días de edad de cerdas inmunes a cerdas susceptibles para que fueran amamantados por ellas. Los lechones enfermaron de GET cuando se expusieron al virus 24 horas después de haber estado amamantándose de las cerdas susceptibles. Por el contrario los lechones de la misma edad que se transfirieron de cerdas susceptibles a cerdas inmunes para que fueran amamantados por estas últimas resistieron el desafío con el virus virulento 24 horas después de convivir con las cerdas inmunes. En el segundo experimento los cerditos nacidos de cerdas inmunes se

hicieron susceptibles al virus de GET 4 horas después de haber sido separados de las madres y mantenidos en aislamiento.

En el experimento número 3, los lechones nacidos tanto de cerdas inmunes como susceptibles fueron separados de las madres y alimentados con una dieta artificial. Posteriormente los animales recibieron por vía paren teral suero inmune homólogo contra el virus de GET, pero estos lechones no resistieron el desafío experimental.

En el cuarto experimento los lechones de madres inmunes y susceptibles se separaron de la madre después del nacimiento y fueron alimentados con una dieta artificial más 5 a 10 ml de suero inmune homólogo antiGET cada 3 horas. Todos estos animales sin importar el estado inmune de la madre, re sistieron la infección experimental, pero cuando se suspendió la administración oral del antisuero se volvieron susceptibles. Haelteman (36) concluyó que los lechones dependían de la presencia continua de calostro, leche o suero inmune en la luz de su tracto alimenticio para tener protección. Este mecanismo de inmunidad pasiva en el cual los anticuerpos del calostro y de la leche neutralizan al virus en el interior del intestino y fué llamado "inmunidad lactogénica (31,35).

Debido a que la mayor susceptibilidad y las consecuencias más graves de la enfermedad se presentan en lechones recién nacidos es muy deseable que éstos obtengan protección, la cual se logra en forma efectiva hasta ahora, mediante la inmunidad lactogénica. Una forma de lograr el desarrollo de inmunidad lactogénica es la infección deliberada de las cerdas gestantes 30 a 40 días antes del parto. La cerda gestante presentará inapetencia, depresión y algunas veces diarrea durante algunos días, pero sus lechones quedarán protegidos al nacimiento. Este método ha sido rechazado porque en la práctica ha provocado nuevos brotes de la infección y la diseminación de - otros organismos patógenos del cerdo, ya que la fuente de virus para la in-

fección de las cerdas generalmente es una suspensión de intestinos de lechones muertos por GET sin ningún control (5,8,34,43).

Por las razones especificadas ha existido un interés de las compañías productoras de los productos biológicos y de los veterinarios investigadores a fin de desarrollar un producto que no tenga los peligros de la infección deliberada y que sea efectivo para provocar una inmunidad lactogénica adecuada en las cerdas reproductoras que lo reciben.

Olgún (61) comparó la respuesta serológica de cerdas gestantes a la inoculación oral y parenteral con virus virulento y virus atenuado de GET y encontró que las cerdas inoculadas con el virus virulento por vía oral desarrollaban títulos de anticuerpos en el suero sanguíneo, detectables 9 días después de la inoculación y que después del parto era posible detectar en ellas anticuerpos neutralizantes en el calostro y en la leche, ya que dichos anticuerpos permanecían a altos títulos durante toda la lactancia (de 30 a 42 días). En un caso en que la lactancia se prolongó hasta 8 semanas, los anticuerpos en la leche seguían, aún a altos títulos. Por otra parte, la inoculación oral o parenteral con el virus atenuado, produjo una respuesta de anticuerpos en el suero sanguíneo semejante a la que produjo el virus virulento, pero después del parto los títulos de anticuerpos se mostraron altos en el calostro y en la leche únicamente durante los 2 primeros días de lactancia y fueron prácticamente indetectables después del sexto día posparto, lo cual dejaba sin protección a los lechones durante casi toda la lactancia. Este mismo investigador sugirió, en base al comportamiento que tenían los anticuerpos absorbidos del intestino por los lechones después del primer amantamiento, que los anticuerpos liberados en la leche de las cerdas inmunizadas con el virus atenuado o con el virus virulento, eran de diferente clase. Los anticuerpos liberados en el calostro y leche de las cerdas inoculadas con el

virus virulento serían de la clase IgA secretora y los de las cerdas inoculadas con el virus atenuado, de la clase IgG, ya que estos últimos eran absorbidos fácil y rápidamente por los lechones una vez que mamaban y los anticuerpos del calostro y leche de cerdas infectadas oralmente con el virus virulento se absorbían a una tasa menor dentro de la circulación general de los lechones. Esta sospecha fué confirmada posteriormente por Bohl y colaboradores (11), quienes determinaron directamente las diferentes clases de inmunoglobulinas que se producen en el calostro y la leche como respuesta a la inoculación oral con virus virulento y la inoculación oral y parenteral con virus atenuado.

Abou-Youssef y Ristic (1) así como Bohl y colaboradores (11) encontraron que las inmunoglobulinas presentes en el calostro y leche de cerdas inoculadas oralmente con virus virulento eran del tipo IgA, y que las inmunoglobulinas en el calostro y leche de las cerdas inoculadas con cepas atenuadas eran del tipo IgG. El primer tipo de inmunoglobulinas da una protección más efectiva pero las IgG también dan protección siempre y cuando se mantengan a altos títulos durante toda la lactancia (77)

Para explicar la presencia de inmunoglobulinas del tipo A en la leche después de la infección intestinal se ha propuesto el siguiente mecanismo por Saif y Bohl (76):

Después de la sensibilización por la infección oral en el intestino, algunos inmunocitos productores de IgA migran a la glándula mamaria donde se localizan y segregan ellos mismos o inducen a otros inmunocitos a segregar anticuerpos del tipo IgA secretor. Este eje inmunológico "intestino-glándula mamaria" es muy importante que se establezca si se quiere lograr un procedimiento efectivo para inducir la inmunidad lactogénica. Hasta la fecha el autor de este trabajo no ha encontrado en la literatura reporte de

evidencia de que efectivamente los inmunocitos sensibilizados del intestino de la cerda, inducen la producción de IgA en la glándula mamaria.

3) Vacunación en la GET.

Algunos autores como Kaji y Shimizu en 1978 (46), Saif y Bohl en 1979 (72) y Saif y Bohl en 1981 (73) han revisado los procedimientos de vacunación y el tipo de vacunas que se han utilizado para inmunizar cerdas -- gestantes. En general, la administración oral de virus virulento produce los mejores resultados debido a que se han presentado los niveles más altos de inmunoglobulinas del tipo IgA secretor que persisten durante largo tiempo en el calostro y en la leche.

Según Saif y Bohl (74) la vacunación oral de las cerdas gestantes con las cepas atenuadas con el virus de GET parecería ser la vía lógica de vacunación para estimular la producción de IgA secretora en la leche, de tal forma que se imite la ruta de infección natural y la inducción de inmunidad. Sin embargo, los resultados de este procedimiento con cepas atenuadas ya sea por vía oral o intranasal han dado resultados desalentadores (40,72,73,87, 89,). En algunos estudios con cepas atenuadas aplicadas por vía oral o por vía intramuscular únicamente se detectaron bajos títulos de IgA secretora en la leche y la mortalidad en los lechones después de que fueron desafiados, varió entre el 25 al 100% (23,27,57,58).

Algunos autores (41,89) han indicado que esta falta de estímulo - adecuado que muestran las cepas atenuadas se debe a que tal vez no sobreviven al pH ácido del estómago y por lo tanto han utilizado inóculos del virus dentro de cápsulas de gelatina con capa entérica.

En un estudio, Hess, et. al. (41) reportaron que utilizando este procedimiento se obtenían altos títulos de IgA en la leche y únicamente con 10% de mortalidad en lechones después del desafío, pero en otro estudio, con

el mismo procedimiento y la misma cepa del virus se encontró que 6 cerdas de un total de 9 inoculadas fallaron en producir este tipo de anticuerpos y hubo un 44% de mortalidad de lechones después del desafío.

Se ha intentado la inoculación directa del virus atenuado dentro de la luz intestinal, pero los resultados también han sido poco favorables. Estos estudios han mostrado cierta variación en la mortalidad de los lechones después del desafío utilizando diferentes cepas atenuadas del virus de GET (23).

En algunos otros estudios, se declara que las vacunas administradas oralmente con diferentes cepas atenuadas del virus de GET producen más del 90% de protección de lechones al virus virulento (92), pero otros autores utilizando las mismas vacunas y los mismos procedimientos han encontrado que la mortalidad de lechones es similar a la de los lechones amamantados por cerdas no vacunadas después del desafío (14,58,74).

Hasta la fecha persiste el dilema de cómo producir una vacuna con cepas atenuadas del virus que estimule suficientemente a la cerda gestante para que produzca IgA a títulos protectores para los lechones y que al mismo tiempo esté suficientemente atenuada para no producir la enfermedad (76).

Se ha utilizado también la vía intramuscular para inmunizar cerdas gestantes con virus atenuado. Este procedimiento busca inducir inmunidad en la cerda y evitar la diseminación de la enfermedad a los lechones. Generalmente se utilizan dos dosis; 6 y 2 semanas antes del parto. Los resultados indican una reducción de mortalidad de lechones después del desafío con virus virulento en comparación con los lechones de las cerdas testigos no vacunadas (38 a 56% de mortalidad en los vacunados Vs. 71 a 92% en los testigos) (10,58,87,89). Sin embargo, los resultados son muy pobres si se compara con el cero por ciento de mortalidad que se obtiene en casi todas las cerdas infectadas en forma natural. Según Bohl 1982 (14) la vacunación intra-

muscular tiene dos grandes desventajas:

- a) Las cerdas vacunadas no desarrollan o desarrollan muy poco inmnidad activa en el intestino y cuando son espuestas al virus de GET enferman.
- b) Los anticuerpos contra el virus de GET que se detectan en la leche de cerdas vacunadas están a títulos bajos, son del tipo IgG, y no protegen óptimamente al intestino del lechón.

La inoculación intramamaria del virus atenuado de GET en cerdas gestantes ha dado por resultado la producción de altos títulos de anticuerpos del tipo IgG, en la leche, pero cuando se ha aplicado virus atenuado por la misma vía en cerdas lactantes, se ha observado que aparecen en la leche anticuerpos del tipo IgM e IgA pero a títulos no muy altos (74,75). Cuando los lechones que mamaban de cerdas vacunadas por vía intramamaria durante la gestación se exponían al virus virulento se observaba una protección bastante buena (14 a 26% de mortalidad) que se atribuyó a los niveles excepcionalmente altos de anticuerpos IgG, que persistían en la leche al tiempo de exposición (11,80).

Numerosas experiencias clínicas de campo indican que el suero homólogo inmune utilizado para dar protección pasiva artificial a lechones por vía oral, también tiene un efecto protector si se aplica frecuentemente (cada 4 a 5 horas) (*).

Se han utilizado vacunas heterólogas, con virus vivo virulento de coronavirus felino que produce la peritonitis infecciosa de los gatos (97, 98) y con virus de bronquitis infecciosa de las aves (66), ambos intentos con resultados totalmente desalentadores.

Se han utilizado también vacunas con cepas de virus de GET que en forma natural presentan poca virulencia, como la variante SP ("small pla-

* Olgufn Romero, F.E. comunicación personal 1987.

ques") de Woods (95,97) y la cepa "ALMA" de Olguin y Velázquez (63), las cuales ofrecen algunas posibilidades de éxito pero aún requieren estudios en un mayor número de casos.

Se han intentado la inmunización de cerdas gestantes con subunidades del virus virulento de GET tales como las proyecciones de la superficie del virus (peplómeros VPI o subunidades de los viriones). Estas vacunas se aplicaron por vía parenteral o indujeron la producción de anticuerpos neutralizantes en el suero sanguíneo y en el calostro pero no en la leche de las cerdas vacunadas durante la gestación. Los anticuerpos del calostro fueron principalmente del tipo IgG excepto en una marrana que presentó anticuerpos del tipo IgG e IgA. Sin embargo, la protección de los lechones ante el desafío con el virus virulento fué muy pobre, en la mayoría de los casos con el 100% de mortalidad (28,30).

En un estudio, Gough y colaboradores (30) utilizaron subunidades no definidas del virus GET de bajo peso molecular con las cuales inyectaron cerdas primerizas gestantes por vía intramuscular. Estos autores observaron anticuerpos neutralizantes tanto en el suero sanguíneo como en la leche y reportaron una buena protección de los lechones al desafío (únicamente 4% de mortalidad). Saif y Bohl (74,76) señalan que actualmente sería muy costoso producir una vacuna comercial de tales características y además, debido a que no se caracterizaron las subunidades del virus no se podrían hacer lotes uniformes de un producto inmunizante de esta naturaleza. Por otra parte, en vista de los resultados contradictorios del estudio con peplómeros, es necesario llevar a cabo mejores estudios para poder ser tomados en consideración y determinar con exactitud cual sería la respuesta inmune a tales productos.

Se sabe que sustancias extraídas después de la lisis de linfocitos circulantes o de ganglios y bazo de animales inmunes, pueden inducir inmuni-

dad celular en animales susceptibles que reciben dichos extractos por vía oral o parenteral (22,48,50,68,69). Lawrence (50), reportó el descubrimiento de una sustancia de bajo peso molecular que extraída por dialisis después de la lisis de linfocitos de animales inmunes, podría inducir diferentes manifestaciones de inmunidad celular específica en animales normales - que nunca habfan tenido contacto con el antígeno. Esta sustancia fué llamada "factor de transferencia"(48, 50).

Según Klesius y Kyrkpatrick (48) el factor de transferencia promueve la quimiotaxis de monocitos y neutrófilos; acelera la formación de rosetas de células T; aumenta o reprime las respuestas blastogénicas anti-antígenos y mitógenos, promueve la producción de linfocinas; inducen la formación de poblaciones de linfocitos que reaccionan específicamente ante un antígeno; expande la población de tales linfocitos y proporciona al animal receptor información para entrar en un estado de inmunidad celular.

Debido a que según la revisión de la literatura la inmunidad celular es muy importante para el establecimiento de la resistencia contra la GET. y que este tipo de inmunidad también parece ser indispensable para que se establezca lo que Saif y Bohl han denominado "eje inmunológico intestino-glandula mamaria", se piensa que se podría inducir inmunidad celular con células linfoides sensibilizadas completas o con extractos dializables (factor de transferencia) de dichas células. El autor no ha encontrado en la revisión bibliográfica, referencia alguna relacionada con factor de transferencia y GET.

MATERIAL Y METODOS

1.- Inmunización.

Se inocularó una cerda adulta a los 70 días de gestación por vía oral con 1000 D.I.L.% del virus virulento de GET cepa F.M.V.Z. 69 (Proporcionado por el Departamento de Virología e Inmunología, según fué descrito por Olguin (57)).

2.- Prueba de Inmunidad.

21 días después de la inoculación se tomó muestra de sangre del animal inoculado con y sin anticoagulante. La muestra con anticoagulante fué procesada según Retana (67), para obtener la capa blanca y con los leucocitos llevar a cabo la prueba de M.I.F. (Factor inhibidor de los macrófagos), según se describe en el mismo trabajo.

Con la muestra sin anticoagulante se procedió a obtener el suero y con él, llevar a cabo la prueba de precipitación en agar según describió Amaro.

3.- Obtención de células linfoides asociadas al intestino.

Poco antes del parto la cerda inmunizada fué sacrificada mediante choque eléctrico y sangrado en blanco. El manejo de la sangre que se colectó con anticoagulante se describe en la siguiente sección. Se procedió a la disección inmediata del intestino delgado, al desalojo de su contenido y al lavado con agua corriente. Lo más rápidamente posible se trasladó al laboratorio en forma aséptica en donde se procedió a un lavado minucioso y disección de la mucosa en las áreas donde se observó tejido linfoide. Los trozos de mucosa con tejido linfoide fueron lavados con solución estéril de Hanks con antibiótico y se trataron como si se fueran a obtener células para cultivo celular primario según la técnica descrita por Bohl y Kumagai (7) con la modificación de dar una pri

mera tripzinización en un tiempo máximo de media hora. La cosecha de la segunda tripzinización se neutralizó rápidamente con albúmina sérica bovina y se procedió a su centrifugación a 1,500 RP.M. durante 10 minutos al final de los cuales se separaron las células blancas. Inmediatamente después se identificaron mediante frotis microscópicos y se procedió a su cuantificación según la técnica de Coffin (17), o la cuenta aproximada que corresponda al volumen que marque en el tubo de centrifuga según Bohl (7). Estas células linfoides fueron conservadas en solución balanceada de Hanks, estéril en refrigeración durante un máximo de 18 a 24 horas e inmediatamente se procedió a la inoculación de cerdas gestantes normales y susceptibles a GET.

4.- Obtención del Factor de Transferencia.

La sangre que se obtuvo con anticoagulante después de aplicar la eutanasia de la cerda inmunizada, fué procesada según describieron Estrada et. al. (22) para obtener leucocitos circulantes. Con la misma técnica se procedió a lisar los leucocitos mediante congelación y descongelación repetida 10 veces. En cada ciclo de congelación se alternó con descongelación en baño maría a 37°C (68). Una vez terminado este paso el lisado pudo ser congelado hasta su uso para proceder a la separación del factor de transferencia mediante diálisis a través de una membrana con poro de corte 12000 = < 14000*.

Inmunización de cerdas gestantes con células linfoides o su lisado dializable.

Diez cerdas gestantes primerizas de la Granja Experimental Porcina serológicamente negativas a GET, se utilizaron en el siguiente procedimiento de inmunización cuando se encontraban entre 70 a 85 días de gestación: 5 de ellas se inocularon con una suspensión de células lin-

* Spectrapor 4.

fofdes asociadas al intestino conteniendo (un mínimo de 6×10^9 células en cada inóculo para cada animal), por las siguientes vías:

- 1 Cerda por vía oral en cápsula de gelatina con capa entérica.
- 1 Cerda por vía intraperitoneal
- 1 Cerda por vía intramamaria
- 1 Cerda por vía ganglios linfáticos superficiales (ganglios cervicales superiores)
- 1 Cerda quedó como testigo (sin ningún inóculo)

Las 5 cerdas restantes fueron inoculadas con el dializado purificado de células, que contenía 2 U. de factor de transferencia * para cada animal utilizando las siguientes vías de inoculación:

- 1 Cerda por vía oral
- 1 Cerda por vía intraperitoneal
- 1 Cerda por vía intramamaria
- 1 Cerda por vía ganglios linfáticos superficiales (ganglios cervicales superiores)
- 1 Cerda quedará como testigo (sin ningún inóculo)

Se dejó que las cerdas continuaran la gestación normalmente hasta 7 días antes del parto cuando fueron trasladadas a 10 corrales de aislamiento en FMVZ. A los prodromos del parto y durante éste se obtuvo calostro y suero sanguíneo de todas las cerdas y además después del parto se procedió a tomar suero sanguíneo de 2 lechones de cada camada (total 20), antes de que dichos animales ingieran calostro y 24 horas después de haberlo ingerido se tomó nuevamente una muestra de suero sanguíneo.

Cuatro días después del parto se separó un lechón de cada camada (10 lechones) y se alojaron individualmente en Unidades Horsefall. Durante su estancia en ella se alimentaron con una dieta que sustituyó a la leche

* 1 Unidad de FT es igual al dializado purificado de 3×10^9 cels.

materna *; 24 horas después se inoculó a cada uno de los lechones con virus virulento de GET cepa FMVZ 69 por vía oral con 100 dosis infectante lechón 50 % (DIL 50). Cuando los lechones presentaron los signos claros de GET - (vómito y diarrea), fueron incorporados a la camada para que sirvieran como fuente de infección a todos los lechones de cada camada. A partir de este momento se observaron cuidadosamente los signos clínicos que se registraron 3 veces al día.

Los días 1, 3, 5, 12, 21 y 30 posparto se tomaron muestras sanguíneas de algunos de los lechones de cada camada para probar la presencia de anticuerpos contra GET en el suero Sanguíneo, además en las mismas fechas se tomaron muestras de leche de las hembras para determinar la presencia de anticuerpos en el suero de dicha leche, siguiendo para este propósito la técnica descrita por Olgufn, (61) para separar el suero de la leche y la técnica de contrainmunolectroforesis para probar la presencia de anticuerpos según Hudson (44).

* Leche de vaca más un huevo de gallina batido por cada litro. Todo esterilizado por ebullición y conservado en refrigeración. Los lechones tomarán esta dieta ad libitum.

RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se resumen en los cuadros 1 al 10.

Una cerda adulta inoculada a los 70 días de gestación por vía oral con la cepa virulenta de virus de gastroenteritis transmisible, mostró las reacciones típicas de las cerdas susceptibles ante la infección con este virus. Clínicamente se detectó inapetencia, depresión ligera, constipación y fiebre desde 24 horas después de la inoculación. Setenta y dos horas después de la exposición se notó diarrea e intentos de vómito. Estos signos desaparecieron al día siguiente, pero la depresión continuó hasta el quinto día posterior a la inoculación.

Se detectaron anticuerpos precipitantes en el suero sanguíneo de esta misma cerda desde el 9º día pos-inoculación. A los veintiún días pos-inoculación el título de anticuerpos precipitantes fué de 1:64 y la reacción de inhibición de leucocitos circulantes fué positiva con 85% de inhibición.

Las cerdas gestantes susceptibles tratadas, tanto con células linfoides asociadas al intestino, como con Factor de Transferencia de 30 a 40 días antes del parto, no mostraron reacciones clínicas adversas atribuibles al tratamiento.

El apetito, el comportamiento y la temperatura rectal permanecieron normales durante 7 días de observación posteriores al tratamiento. Estos animales continuaron su gestación y al término de ésta parieron lechones normales. Los títulos de anticuerpos precipitantes detectados en suero, calostro y leche de las cerdas tratadas tanto con células linfoides intestinales (CLI) como con factor de transferencia se muestran en los cuadros 3 y 4 .

Las camadas de las cerdas tratadas y de las cerdas testigo, fueron expuestas al virus virulento 4 ó 5 días después del parto. Los signos clínicos observados en los lechones y en las cerdas después de la exposición se describen en el cuadro 5. Es de llamar la atención que los cerdos amamantados por

las cerdas tratadas (F.T. y C.L.A.I.) no mostraron signos atribuibles a gastroenteritis transmisible durante 28 días posteriores a la exposición. En un caso el lechón se desafió, dos días antes de reincorporarse a su camada y de ser amamantado por una cerda tratada con F.T., dejó de presentar diarrea y sobrevivió durante el resto del período de lactancia.

Todos los lechones nacidos de y amamantados por las cerdas sin tratamiento, mostraron los signos típicos de GET entre 18 a 24 horas después de la exposición al virus virulento. La mortalidad entre estos animales fue muy elevada (90 %) y a la necropsia se pudieron observar las lesiones macroscópicas típicas de la enfermedad (cuadro 6).

Los resultados obtenidos de las reacciones serológicas y de LIF con muestras de los lechones, se muestran en los cuadros 7 y 8.

Cuadro 1.- Signos clínicos y respuesta serológica de una cerda gestante después de la inoculación con virus virulento de Gastroenteritis Transmisible.*

| Signos Después de la Inoculación | Título de Anticuerpos Precipitantes en Suero Sangüíneo Días pos Inoculación. | | | | L.I.F. ** | | | |
|---|--|---|----|----------|-----------|---|----|----------|
| | 0 | 9 | 21 | Al Parto | Días P.I. | | | Al Parto |
| | 0 | 9 | 21 | Al Parto | 0 | 9 | 21 | Al Parto |
| Inapetencia, depresión, constipación, 24 hrs P.I. *** | 0 | 1 | 64 | 256 | - | - | + | + |
| Diarrea e Intentos de Vómito 72 hrs P.I. | | | | | | | | |
| La Depresión se observó durante 5 días P.I. | | | | | | | | |
| Fiebre (39.8°C) solo 24 hrs P.I. | | | | | | | | |

* 1000 Dosis infectante lechón 50 % (DIL 50) de la cepa FMVZ. 69 contenidas en 5 ml de medio de cultivo, aplicados por vía oral a los 70 días de gestación.

** L.I.F. Inhibición de leucocitos circulantes.

*** P.I. Pos inoculación.

Suero sin diluir.

Cuadro 2.- Signos clínicos observados en cerdas gestantes susceptibles a GET, después del tratamiento con células linfoides intestinales (C.L.A.I.) o con factor de transferencia (F.T.) obtenidos de una cerda inmune.

| Vfa de Aplicación | Signos Clínicos Observados Después del Tratamiento * con: | |
|-------------------------|--|--------|
| | Células | F.T. |
| Oral | Normal | Normal |
| Intraperitoneal | Normal | Normal |
| Diatélica | Normal | Normal |
| Linfática | Normal | Normal |
| Testigo sin Tratamiento | Normal | Normal |

* Se utilizaron 10 cerdas serológicamente negativas a GET entre 74 a 84 días de gestación; una cerda por cada vfa de aplicación y por tratamiento y una cerda testigo por tratamiento. Los animales se examinaron clínicamente durante 7 días después del tratamiento. Todas las cerdas permanecieron normales sin cambios clínicos aparentes.

Cuadro 3.- Títulos de anticuerpos precipitantes en suero sanguíneo, calostro y leche de cerdas susceptibles a GET después del tratamiento durante la gestación con células linfoides intestinales obtenidas de una cerda inmune a GET

| | | TITULO DE ANTICUERPOS PRECIPITANTES | | | | | | | | | |
|-------------------|------------------------|-------------------------------------|---|-------|----|----|---------------------|-------|-----|------|-----|
| | | (Días pos- Tratamiento) | | | | | (Días pos- Parto) | | | | |
| Vía de Aplicación | | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 | Parto | Exp.* | 12 | 21 | 28 |
| Oral | Suero Calostro y Leche | 0 | 0 | N.p** | 16 | 32 | 64 | 32 | 64 | 128 | 64 |
| | | | | | | | 128 | 64 | 128 | 128 | 64 |
| Intraperitoneal | Suero Calostro y Leche | 0 | 0 | N.P** | 16 | 16 | N.p | 32 | 64 | 128 | 64 |
| | | | | | | | 128 | 64 | 128 | 128 | 64 |
| Diatélica | Suero Calostro y Leche | 0 | 0 | N.p** | 32 | 64 | 64 | 32 | 64 | 128 | 64 |
| | | | | | | | 512 | 512 | 512 | 1024 | 256 |
| Linfática | Suero Calostro y Leche | 0 | 0 | N.p** | 32 | 64 | 256 | 128 | 256 | 512 | 256 |
| | | | | | | | 256 | 128 | 256 | 512 | 128 |
| Testigo s.t.*** | Suero Calostro y Leche | 0 | 0 | N.p** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 64 | N.p |
| | | | | | | | 0 | 0 | 0 | | |

* Día de exposición al virus virulento. Se aisló un lechón de cada camada en Unidades Horsefall, se alimentó artificialmente y se inculó a 100 DIL 50 del virus virulento, cuando presentaba signos de la enfermedad se reincorporó al resto de la camada.

** N.p.+ No se probó.

*** S.T. Sin tratamiento = Células dadas en cápsula de gelatina con capa entérica.

Cuadro 4 .- Títulos de anticuerpos precipitantes en suero sanguíneo, calostro y leche de cerdas susceptibles a GET, después del tratamiento durante la gestación con Factor de Transferencia obtenido de una cerda inmune a GET.

| | | TITULO DE ANTICUERPOS PRECIPITANTES | | | | | | | | | |
|-----------------|------------------|-------------------------------------|---|--------|----|----|--------------------|-------|-----|------|-----|
| | | (Días pos- Tratamiento) | | | | | (Días pos Parto) | | | | |
| Aplicación | | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 | Parto | Exp.* | 12 | 21 | 28 |
| Oral | Suero | 0 | 0 | N.p.** | 4 | 32 | 64 | 32 | 64 | 128 | 64 |
| | Calostro y Leche | | | | | | 128 | 64 | 128 | 128 | 64 |
| Intraperitoneal | Suero | 0 | 0 | N.p. | 16 | 64 | 64 | 32 | 64 | 64 | 64 |
| | Calostro y Leche | | | | | | 128 | 128 | 256 | 128 | 64 |
| Diatélica | Suero | 0 | 0 | N.p. | 4 | 16 | 32 | 32 | 64 | 128 | 54 |
| | Calostro y Leche | | | | | | 256 | 256 | 512 | 1024 | 512 |
| Linfática | Suero | 0 | 0 | N.p. | 32 | 64 | 128 | 32 | 128 | 128 | 54 |
| | Calostro y Leche | | | | | | 256 | 128 | 256 | 128 | 128 |
| Testigo s.t. ** | Suero | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 128 | 64 |
| | Calostro y Leche | | | | | | 0 | 0 | 0 | | |

* Día de exposición de virus virulento, Se aisló un lechón de cada camada en Unidades Horsefall. Se alimentó artificialmente y se inoculó con 1000 DIL 50 del virus virulento. Cuando presentaba signos de la enfermedad, se reincorporó al resto de la camada.

** N.p. = No se probó.

*** S.T. = Sin tratamiento.

Cuadro 5.- Signos clínicos observados después del desafío, 5 a 8 días pos-parto, con virus virulento de GET* en lechones de cerdas tratadas durante la gestación con células linfoides intestinales o con F.T. de un animal inmune.

| Datos | | Signos Clínicos Observados |
|--------------------------------|-------------------------|---|
| Tratamiento ** por desafío | | |
| Células Linfoides Intestinales | 0 a 14 | Todos los animales normales (cerdas y lechones) 0/33. |
| Testigo | 1 | Diarrea acuosa amarillenta *** 6/7 |
| | 2 | Vómito 4/7 |
| | 3 | Depresión, diarrea, intentos de vómito en la cerda. |
| | 4 | Muerte 1/7 |
| | 5 | Vómito, diarrea, deshidratación 6/7 |
| | 7 a 9 | Muerte 7/7 |
| | Factor de Transferencia | 0 a 14 |
| Testigo | 2 | Un animal inoculado para desafío empezó a mostrar mejoría |
| | 4 | El mismo animal ya no mostraba diarrea |
| | 1 | Diarrea acuosa amarillenta 5/8 |
| | 2 | Vómito 6/8 . Depresión en la cerda |
| | 3 | Intentos de vómito y diarrea en la cerda |
| | 5 a 9 | Muerte de lechones 7/8 |

* Cuatro a 7 días pos parto se tomó al azar un lechón de cada camada, se aisló en Unidades Horsefall, se alimentó artificialmente y se expuso a 1000 DFL 50. - - Cuando el lechón mostró signos de gastroenteritis se reincorporó con el resto de la camada que permaneció con su cerda.

** Se incluyen las 4 cerdas por tratamiento que corresponden a las vías de administración del tratamiento.

*** El numerador indica el número de lechones observados con signos y el denominador el número de lechones en la partería.

Animal de desafío en la cerda de la camada tratada por vía diatélica.

Cuadro 6.- Lesiones macroscópicas y sub microscópicas observadas en lechones -
muertos después del desafío con virus virulento de gastroenteritis transmisible*.

| Lesiones | Observado en: |
|---|---|
| - Deshidratación | Todos los lechones de las cerdas testi-- gos y en los lechones de desafío' |
| - Intestino delgado distendido traslú- cido, lleno de gas y líquido amari- llento. | Todos los lechones de las cerdas testi-- gos y en los lechones de desafío. |
| - Vasos quilíferos vacíos. | Todos los lechones de las cerdas testi-- gos y en los lechones de desafío. |
| - Hemorragia submucosa en la región fúndica del estómago. | Cuatro lechones de las cerdas testigas. |
| - Atrofia y fusión de vellosidades del intestino delgado excepto en la primera porción del duodeno. | Todos los lechones de las cerdas testi-- gos y en los lechones de desafío. |

* Murieron solo los animales inoculados oralmente con 1000 DIL 50 de virus viru-
lento, cuando se encontraban en Unidades Horsefall y los lechones de las cer-
das testigos después de convivir con los animales inoculados.

Cuadro 7.- Título de anticuerpos precipitantes en suero sanguíneo y reacción de LIF* anti GET en lechones nacidos de y amamantados por cerdas tratadas con células linfoides intestinales de un animal inmune a gastroenteritis transmisible.

| Vía de Administración del Tratamiento. | Anticuerpos Precipitantes en Suero Sanguíneo ** | | | | | | Reacción LIF* | | | | | |
|--|---|-----|------|-----|-----|-----|---------------------------|---|---|------|----|----|
| | (Días post- Nacimiento) | | | | | | (Días post- Nacimiento) | | | | | |
| | 0 | 5 | 7 | 12 | 21 | 35 | 0 | 5 | 7 | 12 | 21 | 35 |
| Oral | 0 | 64 | 128 | 256 | 512 | 128 | - | - | - | ± | + | + |
| Intraperitoneal | 0 | 54 | 106 | 213 | 384 | 106 | - | - | - | + | + | + |
| Diatélica | 0 | 128 | 128 | 256 | 512 | 128 | - | - | - | + | + | + |
| Linfática | 0 | 64 | 64 | 128 | 512 | 128 | - | - | - | + | + | + |
| Testigo S.T. | 0 | 0 | N.p. | - | - | - | - | - | - | N.p. | - | - |

* Reacción de inhibición de migración de linfocitos; Se considera positiva si existe -- 15 % de inhibición de migración en relación a la migración que muestran los leucocitos en ausencia del antígeno:

** Título promedio de 3 lechones.

*** Exposición al virus virulento entre 5 a 8 días post nacimiento.

N.p.= No se probó.

S.T.= Sin tratamiento

Cuadro 2.- Título de anticuerpos precipitantes en suero sanguíneo y reacción LIF* anti GET en lechones nacidos de y amamantados por cerdas tratadas con Factor de Transferencia durante la gestación, obtenido de un animal inmune a gastroenteritis transmisible.

| Vía de Administración del Tratamiento. | Anticuerpos Precipitantes en Suero Sanguíneo ** | | | | | | Reacción LIF * | | | | | |
|--|---|-----|------|-----|-----|-----|--------------------------|------|------|----|----|----|
| | (Días post-Nacimiento) | | | | | | (Días post Nacimiento) | | | | | |
| | 0 | 5 | 7 | 12 | 21 | 35 | 0 | 5 | 7 | 12 | 21 | 35 |
| | *** | | | | | | *** | | | | | |
| | Exp. | | | | | | Exp. | | | | | |
| Oral | 0 | 53 | 64 | 128 | 256 | 128 | 0 | N.p. | N.p. | + | + | + |
| Intraperitoneal | 0 | 54 | 106 | 213 | 384 | 106 | 0 | " | " | - | + | + |
| Diatética | 0 | 128 | 128 | 256 | 512 | 128 | 0 | " | " | + | + | + |
| Linfática | 0 | 64 | 64 | 128 | 512 | 128 | 0 | " | " | + | + | + |
| Testigo S.T. | 0 | 0 | N.p. | - | - | - | 0 | " | " | - | + | + |

* Reacción de inhibición de migración de linfocitos; se considera positiva si existe - 15 % de inhibición de migración en relación a la migración que muestran los leucocitos en ausencia del antígeno.

** Título promedio de 3 lechones.

*** Exposición al virus virulento entre 5 a 8 días post-nacimiento.

N.p. = No se probó

S.T. = Sin tratamiento

Cuadro No. 9

MORTALIDAD OBSERVADA EN LECHONES NACIDOS DE CERDAS INOCULADAS
CON FACTOR DE TRANSFERENCIA Y DESAFIADAS CON VIRUS DE GASTRO-
ENTERITIS TRANSMISIBLE

| Vía de Administración | Muertos | Vivos | Total |
|-----------------------|---------|-------|-------|
| Oral | 0 | 8 | 8 |
| Intraperitoneal | 0 | 9 | 9 |
| Diatética | 0 | 7 | 7 |
| Linfática | 0 | 8 | 8 |
| Testigo | 7 | 0 | 7 |

(P 0.01)

| | | |
|-------|-------|------------|
| 1 - 5 | 11.25 | (P 0.01) |
| 2 - 5 | 12.19 | (P 0.01) |
| 3 - 5 | 10.28 | (P 0.01) |
| 4 - 5 | 11.25 | (P 0.01) |

Prueba de Ji cuadrada para tablas .

(X Comparaciones múltiples basadas en la tabla 2 X 2 tal como lo describe Navarro estadísticamente. *

* Navarro, F.R.: Bioestadística, análisis de variables binarias. Mc. Gram Hill. México 1988.

Cuadro No. 10.

MORTALIDAD OBSERVADA EN LECHONES NACIDOS DE CERDAS INOCULADAS
CON CELULAS LINFATICAS ASOCIADAS AL INTESTINO.

| <u>Vfa de</u> <u>Administración</u> | Muertos | Vivos | Total |
|--|---------|-------|-------|
| Oral | 0 | 8 | 8 |
| Intraperitoneal | 0 | 8 | 8 |
| Diatélica | 0 | 9 | 9 |
| Linfática | 0 | 7 | 7 |
| Testigo | 8 | 0 | 8 |

(P 0.01)

DISCUSION

Los resultados de este trabajo muestran que las células linfoides del intestino de un animal inmune a gastroenteritis transmisible, y las sustancias dialisables producidas por dichas células o por los linfocitos circulantes del mismo animal inmune, son capaces de inducir inmunidad celular y humoral específica en cerdas gestantes susceptibles y que estos animales dan protección efectiva a sus lechones ante el desafío con el virus virulento.

La respuesta provocada con los procedimientos utilizados en este trabajo, se ha denominado "Inmunidad Adoptiva" y consiste en que un animal receptor normal adquiere un estado de inmunidad específico cuando recibe células o productos de células linfoides sensibilizadas que provienen de un animal inmune (83, 85). Difiere de la inmunidad pasiva dada por anticuerpos, ya que, una vez metabolizados y eliminados por el animal receptor este deja de estar inmune. Por el contrario en el caso de la inmunidad adoptiva el animal receptor queda sensibilizado para seguir teniendo inmunidad celular y humoral específicas y con memoria.

El animal donador de células linfoides sensibilizadas y de sus productos (extracto dializable o factor de transferencia) era una cerda recuperada de la infección deliberada con el virus virulento de GET lo cual aseguraba su estado inmune. Esto fué confirmado por las pruebas positivas de difusión en agar y de inhibición de migración de linfocitos al momento de colección de dichas células.

Uno de los propósitos de este trabajo era tener la evidencia de que las células linfoides intestinales, una vez sensibilizadas al virus de GET, eran capaces de inducir al tejido de la glándula mamaria para producir anticuerpos específicos contra el virus. Esta evidencia se obtuvo claramente al implantar esta clase de células en la glándula mamaria de una cerda normal durante la gestación y observar que sus lechones resistían la exposición al virus virulento. Asimismo, los resultados con calostro, leche y suero sanguíneo de lechones, demuestran que el proceso fué efectivo. Por otra parte se sabe que la inmunización diatélica en una glándula activa provoca primeramente una respuesta local y pocos días después, la respuesta se generaliza (3), lo que explicaría claramente la presencia de anti

cuerpos específicos en el suero sanguíneo de la cerda. Roux et al (70) han demostrado experimentalmente en ratones que la presencia de anticuerpos específicos en la leche contra patógenos intestinales, se debe a la migración de células linfoides intestinales sensibilizadas in situ hacia la glándula mamaria donde colonizan e inducen a otras células linfoides adyacentes al epitelio glandular mamario. Estas células se incrementan en número notable durante las últimas fases de la preñez y la lactancia. De cualquier modo, faltaría dilucidar el mecanismo y el tiempo de migración de los linfocitos T en la cerda, como estimuladores del sistema linfático intestinal a la glándula mamaria después de la infección natural. El trabajo ya clásico de Bay et al (5) y numerosas observaciones clínicas de campo * señalan que se requiere que transcurran cuando menos 3 semanas, entre la infección natural y el desarrollo de una inmunidad que proteja efectivamente a los lechones ante el virus virulento. Esto es, que las cerdas infectadas durante un tiempo menor a 3 semanas antes del parto, no son capaces de implantar los mecanismos para que la glándula mamaria secrete la clase y la cantidad correcta de inmunoglobulinas para dar protección a sus lechones.

Se podría pensar que la inmunización parenteral, incluyendo la vía diatélica, con células completas de un donador allogénico con respecto al receptor, podría desencadenar una reacción de rechazo. Sin embargo, esta reacción no se observó, y si ésta llegó a ocurrir, se presentó en forma subclínica y sin ninguna manifestación perniciosa para la salud de las cerdas receptoras. Una posible explicación de ello podría ser que el número de células implantadas fué muy pequeño (6×10^9) y que si estas células fueron destruidas liberaron durante el proceso algunas moléculas, posiblemente factor de transferencia, que estimuló los mecanismos inmunológicos de los animales receptores. Otra posible explicación sería que las células linfoides intestinales del animal donador inmune estuvieran infectadas con cierta cantidad de virus y que este pudo producir la infección y posteriormente la inmunidad de las cerdas receptoras. Sin embargo, esta última posibilidad se rechaza al comparar la respuesta semejante que tuvieron las cerdas receptoras del factor de transferencia en donde no era posible la contaminación viral por la naturaleza del proceso de obtención del factor. Además, la respuesta serológica a la inoculación de células sensibilizadas

*Olguín, R.F. comunicación personal.

fué diferente a la que se obtiene cuando ocurre la infección oral o parenteral con el virus virulento (61).

Frederick y Bohl (24) reportaron que la inoculación oral del virus virulento de gastroenteritis transmisible provoca en los cerdos manifestaciones de inmunidad celular tanto con células linfoides intestinales como del bazo (según la prueba MIF), pero que por el contrario, cuando el virus se inocula por vía parenteral, dicha manifestación solo se logra con células linfoides esplénicas. Aquí es importante hacer notar que la producción de anticuerpos protectores a altos títulos, en forma sostenida en el calostro y la leche, se logra únicamente cuando el virus ha infectado la mucosa intestinal y estimulado las células linfoides intestinales (9, 10, 11, 40).

Los resultados obtenidos después de la exposición al virus virulento de las camadas de las cerdas tratadas por diversas vías con células linfoides intestinales inmunes a GET, hacen pensar que este tratamiento fué efectivo para desencadenar los mecanismo de la inmunidad adoptiva. Según Stites et al (83) la inmunidad adoptiva en ratones se desencadena únicamente con linfocitos poseedores del antígeno "Theta" en su superficie, o sea linfocitos T. En este trabajo no se probó si las células linfoides intestinales provenientes del animal inmune poseían el antígeno theta, pero es de suponerse que estas células estaban presentes en la preparación que sirvió como tratamiento a juzgar por el grado de protección obtenido en los lechones ante el desafío y la presencia de anticuerpos en el suero sanguíneo de las cerdas.

Se detectaron anticuerpos precipitantes en el suero de las hembras tratadas hasta veintiún días después del procedimiento. Los títulos son relativamente bajos pero pueden explicarse por la menor sensibilidad de la prueba de difusión en agar, comparada con la prueba de neutralización (reducción de placas) (7).

El tratamiento con células linfoides intestinales por vía oral se administró en una cápsula de gelatina con capa entérica como se indicó en Material y Métodos con el objeto de proteger a las células de la acción ácida del jugo gástrico. Sin embargo, se piensa que en el intestino las células fueron destruidas por la acción enzimática intestinal, pero que algún producto de ellas, seguramente factor de transferencia, quedó a salvo de esta acción y estimuló una inmunidad adoptiva. Se sabe que, efectivamente, el factor de

transferencia no es atacado por las enzimas intestinales y que puede ser absorbido del intestino (48, 90). Esta resistencia y capacidad de ser absorbido se debe a la estructura de las moléculas pequeñas que lo constituyen y a la ausencia de enzimas intestinales específicas. El extracto dializado de leucocitos responsable de los efectos de factor de transferencia es positivo al biuret y al orinol, y resistente a las *Dilasa* y *Rilasa* pancreáticas así como a la tripsina (50).

Varios trabajos en los que se ha utilizado el factor de transferencia como medio terapéutico o preventivo de diversas enfermedades de los animales, señalan que este producto provoca en los receptores, un aumento de las manifestaciones de la inmunidad celular específica (22, 47, 48, 59). Los resultados de esta investigación indican que el factor de transferencia, también puede provocar manifestaciones de inmunidad humoral. Los métodos y técnicas empleadas en este trabajo no permiten dilucidar el mecanismo mediante el cual el factor de transferencia provoca tales efectos. Sin embargo, algunas investigaciones recientes dan una base lógica para poder explicarlos. Se sabe que el extracto dializable de leucocitos es específico y está compuesto de por lo menos tres fracciones que tienen acciones estimulantes, inhibidora y adyuvante inespecífica (22, 47, 48, 50). La acción adyuvante inespecífica se debe a pequeñas moléculas farmacológicamente activas sobre la función de los linfocitos como son la serotonina, histamina, bradiquinina, ascorbato, nicotinamida, prostaglandinas y nucleótidos cíclicos (50).

Las otras dos fracciones con actividades inmunológicas estimulante e inhibidora son específicas de antígeno (47, 50), y son producidas respectivamente por los leucocitos T cooperadores y T supresores. La actividad inmunorreguladora de estas fracciones del factor de transferencia se puede inferir de los resultados de una serie de experimentos llevados a cabo por Lawrence et al. (50) en donde se pone de manifiesto que la sustancia producida por los linfocitos T cooperadores es un fragmento proteolítico dializable del receptor antigénico de dichas células y que confiere la capacidad de reacción inmune específica a otras células linfoides no inmunes. Se sabe que esta fracción del factor de transferencia tiene una composición semejante a la fracción VH de las inmunoglobulinas y que se une específicamente al antígeno. Asimismo, la fracción estimulante no contiene los determinantes del antígeno mayor de histocompatibilidad (50), lo cual explica su falta de restricción para ser utilizado en diferentes especies y en animales

alogénicos de la misma especie.

La fracción inhibidora (o "supresora" como la llaman Lawrence y Borkwsky) tiene una función fundamentalmente reguladora de la respuesta inmune. Parece ser que compite con el antígeno específico por el receptor de las células T cooperadoras y bloquea su respuesta. Esta acción se manifiesta si se añade antes que o simultáneamente con el antígeno a las células inmunizadas previamente. La acción de la fracción supresora se manifiesta también en mayor o menor escala en relación con la dosis presente (50).

Los resultados de este trabajo abren grandes posibilidades para la prevención de diversas enfermedades infecciosas de los animales domésticos, ya que se pone de manifiesto que es posible lograr la inmunización sin necesidad de que los animales entren en contacto con el antígeno. Tal vez las mejores posibilidades se ofrezcan a la clínica porcina en donde no ha sido posible el control efectivo de algunos padecimientos por la inmadurez inmunológica que tienen los lechones al nacimiento. El factor de transferencia ofrece la posibilidad de "capacitar" inmunológicamente y en forma específica a los animales.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Abou-Youssef, M.F., and Ristic, M.: Distribution of antibodies to transmissible gastroenteritis virus in serum and milk of sows: Isolation and identification of the immunoglobulin classes of swine serum and milk. Am. J. Vet. Res. 33:975-979 (1972).
- 2.- Amaro, G.R.: Encuesta serológica para la determinación de anticuerpos contra el virus de gastroenteritis transmisibile en los cerdos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1977).
- 3.- Araiza Soto, M.A.: "Inoculación de virus rábico por vía diatélica para la producción de lactoglobulinas inmunes. Tesis. UNAM. Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México, 1966.
- 4.- Bay, W.W.: Doyle, L.P. and Hutchings, L.M.: Some properties of the causative agent of transmissible gastroenteritis in swine. Am J. Vet. Res. 13:318-321 (1952).
- 5.- Bay, W.W.: Doyle, L.P. and Hutchings, L.M.: Transmissible gastroenteritis in swine. A study of immunity. J. Am. Vet. Med. Assoc. 122: 200-202(1953).
- 6.- Berruecos, J.M.: Análisis estadístico de la relación entre el número de lechones nacidos, destetados y porcentaje al destete en la raza Duroc. Jersey. Tec. Pec. 6:36-37 (1965)
- 7.- Bohl, E.H. and Kumagai, T.: The use of cell cultures for the study of swine viruses. Proc. US Livest, Sanit, Assoc 69: 343-350 (1965).
- 8.- Bohl, E.H.: Easterday, B.C.: Healtermann, E.O.: Kirkham, W.W.: McClurkin, A.W.: and Pilchard, E.I.: Report of the Subcommittee on Transmissible Gastroenteritis of Swine. Proc. US Livest. Sanit. Assoc. 72nd Ann. Meeting. (1968).

- 9.- Bohl, E.H.: Gupta, R.K.P.: Olguin, M.V.F.: and Saif, L.J.: Antibody responses in serum, colostrum and milk of swine after infection or vaccination with transmissible gastroenteritis virus. Infect. Immun. 6:289-301. (1972).
- 10.- Bohl, E.H.: Frederick, G.T.: and Saif, L.J.: Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: Intramuscular injection of pregnant swine with a modified live-virus vaccine. Am.J.Vet. Res. 36: 267-271 (1975).
- 11.- Bohl, E.H. and Saif, L.J.: Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: Immunoglobulin characteristics of antibodies in milk after inoculating virus by different routes. Infect. Immun. 11: 23-32 (1975).
- 12.- Bohl, E.H.: Diagnosis of diarrhoea in pigs due to transmissible gastroenteritis virus or rotavirus. In Viral Enteritis in Humans and animals. Ed. F. Bricout and R. Scherrer. INSERM (Paris) 90:341-343 (1979).
- 13.- Bohl, E.H.: Coronaviruses: Diagnosis of infections. In Comparative Diagnosis of Viral Diseases, Vol.4. Ed. E. Kurstak and C. Kurstak. New York: Academic Press, pp. 301-328 (1981).
- 14.- Bohl, E.H.: Saif, L.J. and Jones, J.E.: Observations on the occurrence of transmissible gastroenteritis (TGE) in a vaccinated herd, Ohio Swine Res, Ind. Rep.; Anim. Sci. Serv. 82-1, Ohio State Univ., pp 66-69 (1982).
- 15.- Buttler, D.G.: Gall, D.G.: Kelly, M.H. and Hamilton, J.R.: Transmissible gastroenteritis: Mechanisms responsible for diarrhea in an acute enteritis in piglets. J.Clin. Invest. 53: 1335-1342 (1974).
- 16.- Cepica, A. and Derbyshire, J.B.: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against cells infected with porcine transmissible gastroenteritis virus. Can. J.Comp. Med. 47: 298-303 (1983).

- 17.- Coffin, L.D.: Laboratorio Clínico en Medicina Veterinaria. Ed. La Prensa Médica Mexicana S.A. (1981).
- 18.- Chu, R.M. ; Glock, R.D. and Ross, R.F.: Changes in gut-associated lymphoid tissues of the small intestine of eight-week-old pigs infected with transmissible gastroenteritis virus. Am. J. Vet. Res. 43: 67-76 (1982).
- 19.- Cornelius, L.M.: Hooper, B.E. and Haelterman, E.O: Changes in fluid - and electrolyte balance in baby pigs with transmissible gastroenteritis. Am. J. Clin. Pathol. 2: 105-113 (1968).
- 20.- DeBouck, P.: Callebaut, P. and Pensaert, M.: Prevalence of the porcine epidemic diarrhea (PED) virus in the pig population of different countries. Proc. 7th Int. Congr. Pig Vet.Soc. México, City, p.45 (1982)
- 21.- Doyle, L.P. and Hutchings, L.M.: A transmissible gastroenteritis in - pigs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 108: 257-259 (1946).
- 22.- Estrada, P.S.: Velasco, G.O.: Rebora, F.: Díaz, M.L. y Padrierna, J.: Inmunoterapia de la tuberculosis pulmonar avanzada con factor de transferencia específico. Sal. Publ. Mex. 25: 579-589 (1983).
- 23.- Fichtner, D.: Leopoldt, D. and Meyer, U.: Untersuchungen zur Ermittlung der minimalen ant-gegenmenge bei der oralen Muttertierimmunisierung gegen die Transmissible gastroenteritis der schweine mit Riemser TGE-vakzine. Arch. Exp. Veterinaermed 36: 577-585 (1982).
- 24.- Frederick, G.T. and Bohl, E.H.: Local and systemic cell-mediated immunity against transmissible gastroenteritis, an intestinal viral infection of swine. J.Immunol. 116: 1000-1004 (1976).
- 25.- Furuuchi, S.: Shimizu, Y. and Kimagai, T.: Vaccination of newborn virus. Am. J. Vet. Res. 37: 1401-1404 (1976).
- 26.- Furuuchi, S.: Shimizu, M. and Shimizu, Y: Field trials on transmissible

- gastroenteritis live virus vaccine in newborn piglets. Natl. Inst. Anim. Health Q. (Tokyo) 18: 135-142 (1978).
- 27.- Furuuchi, S.: Shimizu, Y. and Kumagai, T.: Multiplication of low and - high cell culture passaged strains of transmissible gastroenteritis virus in organs of newborn piglets. Vet. Microbiol. 3:169-178 (1979).
- 28.- Garwes, D.J.: Lucas, M.H.: Higgins, D.A.: Pike, B.V. and Cartwright, S.F.: Antigenity of structural component from- porcine transmissible gastroenteritis virus. Vet. Microbiol. 3: 179-190 (1979).
- 29.- Goodwin, R.F.W. and Jennings, A.R.: A highly infectious gastroenteritis of pigs. Vet. Rec. 70: 271-272 (1958).
- 30.- Gough, P.M.: Ellis, C.H.: Frank, C.J. and Johnson, C.J.: A viral subunit immunogen for porcine transmissible gastroenteritis. Antiviral Res. 3: 211-221 (1983).
- 31.- Gough, P.M.: Frank, C.J.: Moore, D.F. : Sagona, M.A. and Johnson, C. J.: Lactogenic immunity to transmissible gastroenteritis virus induced by a subunit immunogen. Vaccine 1: 37-41 (1983).
- 32.- Graham, J.A.: Indiction of active immunity to TGE in neonatal pigs nursing seropositive dams. Vet. Med. Small Anim. Clin. 75: 1618-1619 (1980).
- 33.- Haelterman, E.O. and Hutchings, L.M.: Epidemic diarrheal diseases of viral origin in newborn swine. Ann. NY. Acad. Sci. 66: 186-190 (1956).
- 34.- Haelterman, E.O.: Epidemiological studies of transmissible gastroenteritis of swine . Porc. US Livest, Sanit. Assoc. 66: 305-315 (1962)
- 35.- Haelterman, E.O.: Transmissible gastroenteritis of swine. Porc. 17th World Vet. Congr. Hannover 1: 1615-1618 (1963).
- 36.- Haelterman, E.O.: Lactogenic immunity to transmissible gastroenteritis of swine. J. Am. Vet. Med, Assoc. 147: 1661 (1965).

- 37.- Haelterman, E.O. and Pensaery, M.B.: Pathogenesis of transmissible - gastroenteritis of swine. Proc. 18th World Vet. Congress pp. 569-571 (1967).
- 38.- Harada, K.: Kumagai, T. and Sasahara, J.: Cytopathogenicity of transmissible gastroenteritis virus in pigs. Natl. Inst. Anim. Health Q. (Tokyo) 3: 166-167 (1963).
- 39.- Harada, K.: Furuuchi, S.: Kumagai, T. And Sasahara, J. Pathogenicity, immunogenicity and distribution of transmissible gastroenteritis virus in pigs. Natl Inst. Anim. Health Q (Tokyo) 9: 185-192 (1969).
- 40.- Henning, E.R. and Thomas, P.C.: Comparison of intramuscular and oral modified live virus TGE vaccines. Vet. Med. Small. Anim. Clin. 76: 1789-1792 (1981)
- 41.- Hess, R.G.: Bachmann, P.A. and Mayr, A.: Attempts to develop an immunoprophylaxis against transmissible gastroenteritis (TGE) in pigs. III. Passive immune transfer after oral vaccination with attenuated TGE virus strain Bl. Zentralbl Veterinaermed (B) 25:308-318 (19878).
- 42.- Hess, R.G.: Chen, Y.S. and Bachmann P.A.: Active immunization of feeder pigs against transmissible gastroenteritis (TGE): Influence of maternal antibodies. Proc, 7th Int. Congre. Pig. Vet. Soc. México, City p.1. (1982).
- 43.- Hooper, B.E. and Haelterman . E.O.: Concepts of pathogenesis and passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine. J. Am. Vet. Med. Assoc, 149: 1580-1586 (1966).
- 44.- Hudson, L.F. and Hay, C.: Inmunología práctica. Ed. Jims, Barcelona (1982).
- 45.- Husband, A.J. and Watson, D.L.: Immunity in the intestine Vet. Bull. 48: 911-920 (1978).

- 46.- Kaji, T. and Shimizu, Y.: Passive immunization against transmissible gastroenteritis virus in piglets by ingestion of milk of sows inoculated with attenuated virus. Natl Inst. Anim. Health Q (Tokyo) 18: - 43-52 (1978)
- 47.- Kirkpatrick, C.H., Rozzo, J.S., and Mascali, J.J.: Murine transfer factor, II specific interactions Between transfer factor and antigen. J. of Immunol. 135: 6. 4027-4033, 1985.
- 48.- Klesius, P.H. and Kirkpatrick, C.H.: Dialyzable leukocyte extract containing transfer factor, it's future in veterinary medicine. Immunobiology of Transfer Factor, p. 129-140. Academic Press, Inc. (1983).
- 49.- LaBonnardiere, C. and Laude, H.: High interferon titer in newborn pig intestine during experimentally induced viral enteritis. Infect. Immun. 32: 28-31 (1981).
- 50.- Lawrence, H.S., and Borkowsky, W.: A new Basis for the Immunoregulatory activities of transfer factor an arcane dialect in the language of cell. Cellular Immunology 82, 102-116 (1983).
- 51.- Liou, P.P.: Cellular immunity in transmissible gastroenteritis virus infected pigs: Influence of viral antigen in leukocyte migration J. - Chin, Soc. Vet. Sci. 8: 135-141 (1982).
- 52.- Méndez. R. J.: Narihira, G.D.: A.L. y Sosa, M.C.: El Protocolo de Investigación. Lineamietos para su elaboración y análisis. Ed. Trillas, México, D.F. (1986).
- 53.- Matischeck, P.: Emerson, W. and Searh, R.C.: Results of laboratory and dield test of TGE vaccine. Vet. Med. Small. Anim. Clin. 77: 262-264 (1982).
- 54.- Miller, G.Y.: Kliebenstín, J. and Kirtley, C.: Some micro and macroeconomic impacts of swine disease: The case of transmissible gastroenteri-

- tis. Proc. ed. Int. Symp. Vet. Epidemiol. Econ., pp. 527-534 (1982).
- 55.- Moon, H.W.: Norman, J.O. and Lambert, G.: Age dependent resistance to TGE of swine. I. Clinical signs and some mucosal dimensions in the small intestine. Can. J. Comp. Med. 37: 157-166 (1973).
- 56.- Morin, M.: Turgeon, D.: Jollette, J.: Robinson, Y.: Phaneuf, J.B.: Sauvageau, R.: Beauregard, M: Tauscher, E.: Higgins, R. and Larivere, S.: Neonatal diarrhea of pigs in Quebec: Infectious cause of significant outbreaks. Can. J. Comp. Med. 47: 11-17 (1983).
- 57.- Moscari, E.: Vaccination experiments against transmissible gastroenteritis (TGE) of swine. VII. Immunoglobulin characteristics of antigodies in milk of sows vaccinated with the "CKp" strain of TGE virus. Acta. Vet. Acad. Sci. Hung. 28: 131-145 (1980).
- 58.- Moxley, R.A. and Olson, L.D.: Immunization and pathologic aspects of TGE Proc. 23d. Annu. George A. Young Conf. Univ. of Nebraska, pp 76-78 (1983)
- 59.- Namioka, S., Y. Kumeda, T. Kawano, C.T. Wang, Y. Nambe, and K. Murakami. The influence of immunopotentiators on suckling piglets with special reference to the incidence of pig scour. Brit. Vet. J. 138: 155-168, (1982).
- 60.- Norman, J.O.: Lambert, G.: Moon, H.W. and Stark, S.L.: Age dependent resistance to transmissible gastroenteritis (TGE). II. Coronavirus titer in tissues of pigs after exposure. Can. J. Comp. Med. 37:167-170 (1973).
- 61.- Olguín, R.F.E.: Serologic response of swine to TGE virus. Thesis of degree Master of Science. Ohio State University (1969).
- 62.- Olguín, R.F.E.: Aislamiento del virus de gastroenteritis transmisible de los cerdos. Vet. Mex. 2: 11-16 (1970).
- 63.- Olguín R.F.E.: Velázquez, A. and Elías, G.: A low virulence transmissi

- ble gastroenteritis virus and it's potencial use as immunizing agent (Alma strain). In. Pig Vet. Congr. Danmark, p. 124 (1980).
- 64.- Porter, P, and Allen, W.D.: Classes of immunoglobulins related to immunity in the pig. A review, J. Am. Vet. Assoc. 160: 511-518 (1972).
- 65.- Pritchard, G.C.: Observations on clinical aspects of transmissible - gastroenteritis of pigs in Norfolk and Suffolk, 1980-81. Vet. Rec. 110: 465-469 (1982).
- 66.- Ramirez, N.R. y Fragoso, A.H.: Experiencias de campo en la utilización de la vacuna de bronquitis infecciosa en un brote de GET. En: Resúmenes del I Congr. Lat. Vet. Esp. Cerdos, y XIII Conv. AMVEC, UAM-X. (1977).
- 67.- Retana, R.A.: La prueba del FIM en el control de vacunas contra la infección de la bolsa de Fabricio (IBF). Tesis, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Univ. Nal. Aut. Mex. (1981)
- 68.- Rodríguez, L.D.A.: El factor de transferencia en la enfermedad de Aujeszky. Tesis, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Univ. Nal. Aut. Mex. (1986).
- 69.- Rojas, B.S.D.: Uso de suero hiperinmune y del factor de transferencia para la prevención y tratamiento de la colibacilosis neonatal en lechones. Tesis, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Univ. Nal. Aut. Mex. (1987).
- 70.- Roux, M.E.: McWilliams, M.: Phillips-Quagliata, J.M.: Weisz-Carrington, P. and Lamm, M.E.: Origin of AgA-secreting cells in the mammary gland. J. Exp. Med. 146: 1311 (1977).
- 71.- Saif, L.J. and Bohl, E.H.: Role of SIgA in passive immunity of swine to enteric viral infections. In Immunology of Breast Milk. Ed. P. L. Ogra and D.H. Dayton. New York: Raven (1979).

- 72.- Saif, L.J. and Bohl, E.H.: Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: Immunoglobulin classes of milk antibodies after oralintranasal inoculation of sows with a live low cell culture-passaged virus, Am. J. Vet. Res. 40: 115-117 (1979).
- 73.- Saif, L.J. and Bohl, E.H.: Keynote address: Passive immunity against enteric viral infections. Proc. 3d Int. Symp. Neonatal Diarrhea. VI-DO, Saskatoon, Canada (1981).
- 74.- Saif, L.J. and Bohl, E.H.: Experimental studies using TGE vaccines. Ohio Swine Res. Ind. Rep.: Anim. Sci. Ser. 81-2, Ohio State Univ.pp. 58-59 (1981).
- 75.- Saif, L.J. and Bohl, E.H.: Passive immunity to transmissible gastroenteritis virus: Intramammary viral inoculation of sows. Am NY Acad.Sci. 409: 708-722 (1983).
- 76.- Saif, L.J. and Bohl, E.H.: Transmissible gastroenteritis in: Disease of swine. Edited by Lemman A.D. p. 930. 6th ed. Iowa State University Press (1986).
- 77.- Saif, L.J.: Bohl, E.H. and Gupta. R.K.P.: Isolation fo porcine immunoglobulins and determination of the immunoglobulin classes of transmissible gastroenteritis viral antibodies. Infect Immun. 6: 600-609 (1972).
- 78.- Saif, L.J.: Bohl, E.H.: Kohler, E.M. and Hughes, J.H.: Immune electron microscopy of transmissible gastroenteritis virus and rotavirus (reovirus-like agent) of swine. Am. J. Vet. Res. 38: 13-20 (1977).
- 79.- Shepherd, R.W., Gall, D.G., Buttler, D.G., and Hamilton, J.R.: Determinates of diarrhea in viral enteritis: The role of ion transport and epithelial changes in the ileum in transmissible gastroenteritis in piglets. Gastroenterology 76; 20-24 (1979).

- 80.- Shibley, G.P.: Salsbury, D.L.: Djurickovic, S.M. and Johnson, G.: Application of an intramammary route of vaccination against transmissible gastroenteritis in swine. Vet. Med. Small Anima. Clin. 68: 59-61 - (1973).
- 81.- Shimizu, M. and Shimizu, Y.: Lymphocyte proliferative response to viral antigen in feeder pigs infected with transmissible gastroenteritis. Infect. Immun. 23: 239-243 (1979).
- 82.- Aprino, P.J. and Ristic, M.: Intestinal, pulmonary and serum antibodies response of feeder pigs exposed to transmissible gastroenteritis virus by oral and oral-intranasal routes of inoculation. Am. J. Vet. Res. 43: 255-261 (1982).
- 83.- Stepanek, J.: Mensik, J.: Franz, J. and Hornich, M.: Epizootiology, diagnosis and prevention of viral diarrhoea in piglets under intensive husbandry conditions. Proc. 21st. World Vet. Congr. Moscow 6:43 (1979).
- 84.- Stites D.P., Stobo J.D., Fudenberg H.H. and Wells J.V.: Inmunología Básica y Clínica. Trad. de la 4ª ed. en inglés por Rosario Carsolio P. pag. 231. El Manual Moderno S.A. de C.V. México 1984.
- 85.- Stone, S.S.: Kemeny, L.J. and Jensen, M.T.: Serum antibody response of neonatal and young adult pigs to transmissible gastroenteritis coronavirus. Vet. Immunol. Immunopathol. 3: 529-533 (1982)
- 86.- Streilein W.J. and Hughes S.D.: Immunology a programmed text. first edit. pag. 152-187 Little, Brown and Company (Inc.) Boston. 1977.
- 87.- Tamoglia, T.W.: Present status of products available for use against transmissible gastroenteritis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 160:554-558 (1982).
- 88.- Vanner, P.: Toma, B.: Madec, F. and Aynaud, J.M.: Valuation of dura-

- tion of TGE virus spread among sows of 2 infected herds by means of a serological survey of antibodies persistence. Proc. 7th. Int. Congr. Pig Vet. Soc., México, City p. 3 (1982)
- 89.- Voets, M. Th.; Pensaert, M. and Rondhuis, P.R.: Vaccination of pregnant sows against transmissible gastroenteritis with two attenuated virus strains and different inoculation routes. Vet. 2: 211-219 (1980)
- 90.- Wagner, J.E.: Beamer, P.D. and Ristic, M.: Electron microscopy of intestinal epithelial cells of piglets infected with a transmissible gastroenteritis virus. Can J. Comp. Med. 37: 177-188 (1973).
- 91.- Wang, C.T. and Namioka, S.: Chemical Characterization of the transfer factor in swine leukocytes. Jour Chinese Soc. Vet. Sci. 9: 81-88, 1983.
- 92.- Walter, C.J.: Experimental and field evaluation of a new oral vaccine for TGE. Vet. Med. Small Anim. Clin. 75: 1757-1759 (1980).
- 93.- Witte, K.H. and Walther, C.: Age-dependent susceptibility of pigs to infection with the virus of transmissible gastroenteritis. Proc. 4th. Int. Congr. Pig Vet. Soc. Iowa State Univ. p. K3 (1976)
- 94.- Woods, R.D.: Leukocyte migration inhibition procedure for transmissible gastroenteritis viral antigens. Am. J. Vet. Res. 38: 1267-1269. (1977).
- 95.- Woods, R.D.: Small plaque variant transmissible gastroenteritis virus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 173: 643-647 (1978).
- 96.- Woods, R.D.: Studies of enteric coronaviruses in a feline cell line. Vet. Microbiol. 7: 427-435 (1982)
- 97.- Woods, R.D.: Efficacy of vaccination of sows with serologically related coronaviruses for control of transmissible gastroenteritis in nursing pigs. Am. J. Vet. Res. 45: 1726-1729 (1984).
- 98.- Woods, R.D. and Pedersen, N.C.: Cross-protection studies between feline infectious peritonitis and porcine transmissible gastroenteritis viruses. Vet. Microbiol. 4: 11-16 (1979).