



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



[Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0)

Esta licencia permite a otras combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial, siempre y cuando den crédito y licencia a nuevas creaciones bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>



CONSTANCIA DE REVISIÓN

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud a la Tesis cuyo título es:

"Evaluación de una vacuna de virus vivo adaptado a cultivo celular para el control de la peste clásica porcina"

presentado por:

SERNA MURRUGARRA LIZHARDO

Estudiante del nivel **PREGRADO** de la Facultad de **MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**. El resultado obtenido es 10% por el cual se otorga el calificativo de: **APROBADO**, según Reglamento de Evaluación de la Originalidad.

Se adjunta al presente el reporte de evaluación con el software de verificación de originalidad.

Observaciones: Ninguna

Ica, 14 de abril del 2022

.....
MARÍA EMILIA DÁVALOS ALMEYDA
DIRECTOR DE UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA DE ICA"
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



“EVALUACIÓN DE UNA VACUNA DE VIRUS VIVO ADAPTADO A CULTIVO CELULAR PARA EL CONTROL DE LA PESTE CLÁSICA PORCINA”

PRESENTADO POR:

BACHILLER:

SERNA MURRUGARRA LIZHARDO

EJECUTOR

BACHILLER: SERNA MURRUGARRA LIZHARDO

ASESOR

MV. MANUEL ALBETIS APOLAYA

CHINCHA – PERU

2022

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi madre que ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles.

Al hombre que me dio la vida, que siempre ha estado junto a mí brindándome su apoyo.

A mi familia en general, porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo momentos buenos y malos.

A mis maestros, por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis; al Doctor Manuel Albetis Apolaya por su apoyo ofrecido en este trabajo; por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional, al Decano en ese entonces Juan De Dios Sandoval que Dios lo tenga en su gloria por apoyarnos en su momento.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por protegerme durante todo mi camino y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de mi vida.

A mi madre que con su demostración de ser una madre ejemplar me ha enseñado a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre perseverar a través de sus sabios consejos.

A mi padre, por acompañarme durante todo este arduo camino y compartir conmigo alegrías y fracasos.

Al Doctor Manuel Albetis Apolaya asesor de tesis, por su valiosa guía y asesoramiento de la misma.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

INDICE

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTO.....	4
INDICE.....	5
INDICE DE CUADROS.....	7
INDICE DE GRAFICOS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACTO.....	10
I. INTRODUCCION.....	11
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	
2.1. Antecedentes.....	14
2.2. Marco Teórico.....	16
III. MATERIALES Y METODOS	
3.1. Lugar y Fecha de ejecución	30
3.2. Ubicación Geográfica Del Experimento.....	30
3.3. Fecha de Ubicación.....	31
3.4. Materiales y Equipo.....	31
3.5. Tipo de Investigación.....	34
3.6. Metodología de la Investigación.....	34
3.7. Diseño Experimental.....	37
3.8. Variables de Estudio.....	37
3.9. Análisis Estadístico.....	37
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	
4.1. Evaluación de la eficacia de la vacuna contra la Peste Clásica Porcina (PCP) a virus vivos adaptada en cultivo celular.....	38
4.2. Evaluación de los parámetros productivos de los cerdos vacunados y no vacunados contra Cólera Porcina.....	38
4.3. Temperatura corporal de los cerdos vacunados y no vacunados contra el Cólera Porcina(°C).....	39

4.4.	Necropsia de los cerdos vacunados y no vacunados contra el Cólera Porcina.....	40
4.5.	Test de inmunofluorescencia (IFI) para detectar la presencia del virus contra Cólera Porcino.....	43
4.6.	Test de PCR en tiempo real para la detección del virus contra Cólera Porcina en cerdos vacunados y no vacunados.....	44
4.7.	. Determinación de la eficacia inmunológica de la vacuna contra Cólera Porcina elaborado en tejido celular en los cerdos vacunados.....	45
4.8.	Respuesta inmune celular inducida por la vacuna elaborado en cultivo celular.....	46
V.-	CONCLUSIONES.....	47
VI.-	RECOMENDACIONES.....	48
VII.-	BIBLIOGRAFIA.....	49

Índice de cuadros

Tablas 1: Parámetros productivos de los cerdos vacunados contra cólera porcina.....	38
Tablas 2: Parámetros productivos de los cerdos no vacunados contra cólera porcina.....	39
Tablas 3: Evaluación de la temperatura corporal post desafío de los cerdos vacunados.....	39
Tablas 4: Evaluación de la temperatura corporal post desafío de los cerdos no vacunados	39

INDICE DE GRAFICOS

Figura 1: Cerdos vacunado y no vacunados contra el Cólera Porcina.....	40
Figura 2: cerdos mostrando signos clínicos de las enfermedad	40
Figura 3: Necropsia de los animales con signos de Cólera Porcina.	41
Figura 4: Riñón con petequias (Huevo de pava)	41
Figura 5: Ganglio retro faríngeos infartados y agrandados.....	42
Figura 6: Ganglios mesentéricos hemorrágicos y agrandados.....	42
Figura 7: test de inmunofluorescencia (IFI) para detectar la presencia del virus contra cólera porcino.....	43
Figura 8: visualización de RT-PCR convencional para la detección del gen E2 del Cólera Porcina.....	44
Figura 9: Títulos de anticuerpos anti-Cólera en los cerdos vacunados frente a los no vacunados con una prueba de ELISA.....	45
Figura 10: Respuesta inmune celular inducida por la Vacuna contra Cólera Porcina elabora en cultivo celular.....	46

RESUMEN

- 1. INTRODUCCIÓN.** La Peste Clásica Porcina (PPC) es una enfermedad altamente infecciosa que produce alta mortalidad en la especie porcina y grandes pérdidas económicas en el mundo, para su control se usa la vacunación con virus vivo. **OBJETIVOS.** Evaluar el uso de una vacuna de virus vivo adaptado a cultivo celular para el control de la Peste Porcina Clásica. **MÉTODO.** Se utilizaron 20 lechones distribuidos en 2 grupos vacunados y uno control. La vacuna se aplicó a las 8 semanas de edad. El lugar de ejecución, el Distrito de Alto Laran, Provincia de Chincha, Departamento de Ica, con una altitud de 97 msnm. Y se evaluaron mediante técnicas de laboratorio, para las muestras colectadas a las 8 y 15 semanas de edad. La temperatura corporal, ganancia de peso, conversión alimenticia y consumo se determinó por cada semana. **RESULTADOS.** Los cerdos vacunados y desafiados no mostraron signos clínicos de la enfermedad. Los cerdos control o no vacunados presentaron el cuadro típico de la enfermedad. Todos los cerdos del grupo control murieron de la enfermedad. Las técnicas de laboratorio dieron negativo a los cerdos vacunados y también mantuvieron sus parámetros productivos normales al esperado. **CONCLUSIÓN.** El uso de la vacuna de virus adaptada a cultivo celular demostró ser efectiva contra la peste porcina clásica sin mostrar efectos negativos y mantener los parámetros productivos esperado del cerdo
Palabras claves. Peste clásica Porcina, cultivo celular, inmunofluorescencia, Lapinizada

ABSTRACTO

INTRODUCTION. Classical swine fever (CFP) is a highly infectious disease that produces high mortality in swine and great economic losses in the world, for its control vaccination with live virus is used. **OBJECTIVES.** To evaluate the use of a live virus vaccine adapted to cell culture for the control of Classical Swine Fever. **METHOD.** We used 20 piglets distributed in 2 vaccinated groups and one control group. The vaccine was applied at 8 weeks of age. The place of execution is the District of Alto Laran, Province of Chincha, Department of Ica, with an altitude of 97 meters above sea level. And laboratory techniques were evaluated for the samples collected at 8 and 15 weeks of age. Body temperature, weight gain, feed conversion and consumption were determined per week. **RESULTS.** Vaccinated and challenged pigs showed no clinical signs of the disease. The control or non-vaccinated pigs presented the typical picture of the disease. All the pigs in the control group died of the disease. The laboratory techniques were negative for the vaccinated pigs and also maintained their normal production parameters as expected. **CONCLUSION.** The use of the virus vaccine adapted to cell culture proved to be effective against classical swine fever without showing negative effects and maintaining the expected productive parameters of the pig

Keywords. Classical Pest Swine, cell culture, immunofluorescence, Lapinizada

I. INTRODUCCIÓN

La industria porcina en el Perú ha tenido en los últimos años un crecimiento notorio en el sector pecuario debido a un mejoramiento en la tecnificación del sector a nivel mundial, y al incremento de las necesidades de proteína de origen animal para la población humana en un crecimiento constante. Este desarrollo ha llevado a un mejoramiento y desarrollo de nuevas razas y líneas genéticas porcinas, las cuales se caracterizan por un alto rendimiento y conversión de alimento, generando carnes magras y de alto valor nutricional. **(MINAG, 2006)**

En este rápido desarrollo el sector porcino ha tenido que implementar medidas sanitarias, las cuales buscan reducir el riesgo de infección y presentación de enfermedades porcinas en explotaciones intensivas en diferentes países. Para ello, ha sido necesario realizar campañas de control y erradicación de enfermedades de tipo viral y de carácter epidémicas tales como: Enfermedad de Aujeszky (EA) y el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRSS), que son las constituyen causas importantes de pérdidas económicas en el sector porcino y muchas de estas limitan el comercio internacional de animales vivos, productos y subproductos de la industria porcina. **SENASA 2013**

La Peste Porcina Clásica (PPC) o Cólera Porcino, se describió por primera vez en 1810 en Tennessee en Estados Unidos de Norteamérica. Otros autores afirman que posiblemente ocurrió por primera vez en Francia en 1822. **OIE. 1997**

La PPC es una enfermedad viral altamente infecciosa caracterizada por producir un cuadro clínico complejo en los cerdos, que, dependiendo de la edad, estado inmune del individuo y características propias del virus, puede tener un desenlace fatal, llevando a la muerte a los cerdos afectados. Los animales que logran sobrevivir pueden desarrollar infecciones crónicas a veces imperceptibles, que los retrasan en su crecimiento y que muchas veces se convierten en portadores y fuente de infección para animales susceptibles. **Haines et al., 2013**

En ciertos países latinoamericanos como México, Chile, Argentina, Uruguay y Brasil, han organizado campañas de erradicación que han llevado a la declaración de zonas libres o de países libres de PPC. Esto se ha logrado gracias a la implementación de estos programas utilizando vacunas de diferentes tipos en campañas de control y erradicación. Actualmente en el país, se está llegando al final de un programa de control y erradicación de Peste Porcina Clásica (PPC), lo cual en el futuro le garantizará la apertura al comercio internacional de porcinos vivos, productos y subproductos de la industria porcina. **Pereda et al., 2005.**

Para el programa de control y erradicación de la PPC en el país, se viene recomendando una vacuna comercial de origen argentino, la cual utiliza una cepa viral conocida como cepa China. Estas vacunas están constituidas por un virus atenuado lapinizado en riñón de conejo.

Esta vacuna por ser a virus vivo atenuado, trae una serie de problemas, entre unos de ellos es que es teratógeno y por lo tanto no es recomendable su uso en cerdas preñadas al menos en los primeros meses de gestación, puede producir mortalidad embrionaria y otros problemas reproductivos.

Por lo que en el presente trabajo se evaluara una vacuna producida por el Laboratorio Farvet, la vacuna a virus adaptada a cultivo celular.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ANTECEDENTES

Campo 1998, realizó un estudio para evaluar tres vacunas contra la Peste Porcina Clásica, producidas en células y comercializadas en Colombia. Se desarrollaron los experimentos con el fin de evaluar la calidad de las vacunas mediante las pruebas de inocuidad y de potencia en cerdos. No se observaron reacciones desfavorables locales o sistémicas atribuibles a la aplicación de los tres productos. Con fines diagnósticos, se determinó la persistencia del virus vacunal en amígdala por lo menos hasta los 35 días post-vacunación.

Portilla et al., (2009) realizó un estudio para evaluar la persistencia de los anticuerpos pasivos contra el virus de la Peste Porcina Clásica (vPPC) en lechones de dos granjas tecnificadas (A y B) con distintas estrategias de vacunación contra el vPPC. En la granja A, las marranas fueron vacunadas a los 90 días de gestación y en B a los 18 a 21 días post-parto. Se colectó muestras de sangre de lechones de ambas granjas durante la primera (n=15), tercera (n=15), quinta (n=15) y séptima (n=15) semana de edad, así como de 15 marranas por granja para la detección de los anticuerpos mediante la prueba de ELISA indirecta.

Todos los lechones presentaron anticuerpos pasivos en la primera semana de edad, persistiendo en la mayoría de los lechones hasta la séptima semana de edad. Hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en los niveles de anticuerpos pasivos entre los lechones de las dos granjas en la primera y tercera semana de edad. Asimismo, se observó una mayor variabilidad en los niveles de anticuerpos en lechones y en marranas de la granja A. Los resultados sugieren que los niveles y la persistencia de los anticuerpos pasivos contra el vPPC se afectan por la estrategia de vacunación contra la PPC.

Según (Rosa Genghini, Ivan Tiranti y Enrique Zamorano-Ponce, 2005). La Peste Porcina Clásica (PPC) es la enfermedad virósica de los cerdos más importante por ser muy contagiosa y causar altas tasas de morbilidad y mortalidad. El virus causal puede inducir mutaciones cromosómicas en los animales enfermos, como así también en los inmunizados con vacunas a virus vivo atenuado. Éstas fueron durante mucho tiempo un medio eficaz para el control de la enfermedad; sin embargo, en 1990 la Unión Europea prohibió la vacunación debido a la imposibilidad de distinguir serológicamente a los cerdos enfermos de los vacunados. En los países que aún controlan la PPC mediante la inmunización, es relevante el estudio del potencial mutagénico de estas vacunas. Dado que en Argentina no existían antecedentes en dicha temática, iniciamos en 1997 una línea de investigación en tal sentido.

Se realizaron 5 tipos de ensayos:

I) Empleando cerdos experimentales del Servicio Nacional de Sanidad Animal, pertenecientes a las pruebas oficiales de inocuidad y potencia de vacunas.

II) Utilizando cerdos criados a campo en las condiciones en que los productores de cerdos inmunizan habitualmente a sus animales.

III) Ensayos in vitro con sangre de lechones no vacunados.

IV) Ensayos in vitro para medir daño directo sobre el ADN.

V) Efecto de la vacuna sobre la fertilidad de cerdas preñadas. Todos los ensayos efectuados permitieron determinar que el virus vacunal de la PPC conserva su potencial genotóxico cuando se encuentra atenuado, efecto que se manifiesta tanto a nivel citogenético como citomolecular y que es fuertemente dependiente de la dosis del inmunógeno utilizado.

2.2. MARCO TEORICO

2.2.1. PESTE CLÁSICA PORCINA (PCP)

2.2.1.1. ETIOLOGÍA

La PPC está producida por un virus perteneciente al género Pestivirus y familia Flaviviridae. (Franki, 1991). La partícula vírica presenta un diámetro de entre 40 a 50 nm con envuelta, la cápside tiene forma icosaédrica. Su genoma viral está formado por una molécula de RNA de banda simple y polaridad positiva que presenta una longitud de 12,284 nucleótidos (2,2 Kb) con una fase de lectura abierta capaz de codificar 3.989 aminoácidos.

El genoma viral actúa como ARN mensajero y se traduce en una poliproteína que, procesada por la acción de proteasas virales, no bien conocidas, y de la célula huésped, para dar lugar a las proteínas maduras. El genoma ha sido clonado y secuenciado en su totalidad caracterizándose cuatro proteínas estructurales, la proteína p14, localizada en la nucleocápsida y tres glicoproteínas: gp 55, también denominada (E1), gp 44, también conocida como E2 y gp 33. Las gp 55 y 44 están localizadas en la envuelta. Existe al menos una proteína no estructural denominada gp 2. **(Weiland y col. 1992, Ruggli y col. 1996., Van Rijn y col. 1997).**

2.2.1.2. Propiedades físico químicas.

Debido a la presencia de lipoproteínas en su envoltura, el virus se inactiva rápidamente con disolventes orgánicos, como cloroformo y éter, así como detergentes, como Nonidet P-40, desoxicolato y saponina. También es sensible a la acción de radiaciones ultravioleta y a pH entre 3-4 y 11-12. La infectividad se destruye fácilmente sometiendo al virus a temperaturas de 60°C durante un mínimo de 10 minutos.

El virus de la PPC es estable en un rango de pH entre 8 y 9, a temperaturas de -20°C y -70°C, y liofilizado, donde puede mantenerse durante años.

Asimismo, puede durar semanas a temperatura de refrigeración en recipientes de cristal herméticos, sin una disminución marcada de la infectividad, los conservantes, como glicerina al 1% o bien fenol al 0,5%, aumentan la efectividad del proceso de conservación. La destrucción del virus se aconseja en hipoclorito 2%, cresol 6%, fenol 5%, hidróxido sódico 2% y lechada de cal al 5%.

2.2.1.3. Multiplicación y propagación del virus

El único Hospedador natural del virus de la PPC es el cerdo tanto doméstico como silvestre, aunque el virus es capaz de replicarse en otras especies animales como rumiantes domésticos, venados y animales de experimentación, provocando una reacción febril, prácticamente asintomático. Entre ellas, el conejo es la más importante, ya que dieron lugar a la obtención de las clásicas cepas vacunales atenuadas, utilizadas en Europa en los años 70 y primeros de los 80 para el control y erradicación de la enfermedad. **Aynaud, J.M., Aso, J., 1970.**

La replicación del virus “in vitro” en cultivos primarios se produce en células de riñón porcino, testículos de ratón y cerdo, células porcinas embrionarias, cultivos primarios de células de riñón de cobayo, zorro, conejo y ardilla entre otros.

2.2.1.4. Patogenia y transmisión.

El VPPC suele penetrar en el organismo por ingestión, inhalación, piel, o semen. Una vez en el animal, el virus se replica en amígdalas (infección oral o nasal) o en los ganglios linfáticos regionales (vaginal, piel). Tras una primera fase de replicación el virus pasando a sangre produciendo viremia (12 a 20 horas post infección hasta varias semanas). Tras esta fase el virus se localiza en los órganos diana (bazo, ganglios, riñón, pulmón, médula ósea) donde se producen nuevas replications víricas y las lesiones características de carácter hemorrágico. **Lange et al., 2011.**

El contacto directo entre animales infectados (en fase aguda o portadores) y animales sanos es la forma más común de transmisión del VPPC.

La eliminación del virus en animales infectados puede comenzar a partir del segundo día post infección por saliva, secreciones oculares y nasales, aire. Después de unos días el virus se puede eliminar también por orina, heces y semen. Es importante, destacar la transmisión de madres portadoras inaparentes a sus lechones u a otros animales adultos susceptibles. **Prodanov et al. 2008.**

2.2.1.5. Patogenia y transmisión

Los recientes brotes de PPC en Europa han puesto de nuevo de manifiesto que el transporte juega un papel muy importante en la transmisión de la PPC, así se ha podido comprobar que del 25 al 50% de los brotes estaban originados por el transporte contaminado.

Sánchez-Vizcaíno, 1999.

2.2.1.6. Cuadro clínico y anatopatológico.

La PPC puede cursar con una enorme variedad de manifestaciones clínicas y anatomopatológicas dependiendo de la virulencia de la cepa, del estado inmunitario y edad del animal. Las lesiones características descritas para esta enfermedad, en general, se presentan solamente con cepas de alta virulencia, en animales no inmunizados y con más facilidad en lechones que en adultos. Pueden existir animales portadores asintomáticos de gran importancia en la eliminación de virus. **Sánchez-Vizcaíno, 1999.**

En general se han descrito en cerdos adultos las formas: aguda, subaguda y crónica de la enfermedad. Además, existe una forma trasplacentaria de la PPC que puede dar lugar a diversas afecciones fetales y neonatales e infecciones persistentes asintomáticas. **Moening y Greiser-Wilke. 2008.**

2.2.1.7. Diagnóstico.

- **Detección de virus o antígenos virales.**

Son varias las técnicas disponibles para la detección de virus o antígenos vírales en la PPC. La elección de una u otra se determina según los siguientes criterios: Infección primaria, rapidez, número de muestras a analizar, disponibilidades técnicas y económicas.

Según estos criterios los métodos más utilizados serían:

Aislamiento viral, inmunofluorescencia directa, Elisa de captura.

Aislamiento viral: El aislamiento del VPPC en cultivos celulares está considerada en la actualidad como la técnica de referencia obligada en zonas exentas de la enfermedad o como técnica confirmatoria en caso de dudas. Este método está basado en la capacidad de multiplicarse el VPPC en la línea celular de riñón de cerdo conocida como línea PK 15.

Inmunofluorescencia directa en tejidos: Consiste esta técnica en la puesta en evidencia de antígenos virales en corte histológico de los órganos sospechosos mediante la tinción con un conjugado policlonal (contra todas las proteínas del virus, no permite la diferenciación entre los pestivirus) o monoclonal (frente a la proteína gp 55, permite la diferenciación entre los diferentes pestivirus) marcado con fluoresceína o peroxidasa.

Elisa de captura: Recientemente, se ha utilizado con éxito, dado el aceptable nivel de correlación con el aislamiento viral, sobre todo a partir de los 7 a 10 días post infección, la detección de un sistema ELISA de captura para la detección de los antígenos virales a partir de órganos o de leucocitos sanguíneos de animales sospechosos. La técnica está basada en un sistema ELISA sandwich en el que se utilizan anticuerpos monoclonales (diferenciales de pestivirus) para capturar y revelar la captación de los antígenos virales. Esta técnica presenta, frente a la anterior, la capacidad de ser utilizada para gran número de muestras, pues las diferentes etapas de la técnica ELISA, incluyendo la lectura, están automatizadas. El tiempo total de realización de este método es de 36 horas, mucho más largo que la inmunofluorescencia directa, pero mucho menos que el aislamiento vírico.

Detección del ácido nucleico viral: La técnica PCR para la detección de ácidos nucleicos virales está resultando tremendamente práctica, rápida y eficaz en el diagnóstico de gran número de enfermedades infecciosas. Consiste esta técnica en la detección de un pequeño fragmento específico del RNA del VPPC mediante la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa. Se ha seleccionado un fragmento de RNA común a todos los pestivirus y otro fragmento específico de cada uno de los componentes de este grupo viral, de manera que se puede hacer un diagnóstico diferencial de gran sensibilidad y especificidad.

Además, es una técnica relativamente rápida y económica. Sin duda, una técnica de elección para cualquier situación.

Detección de anticuerpos: La detección de anticuerpos es de gran utilidad para comprobar la presencia o no de zonas libres y no vacunadas, pero no cuando se sospeche de una infección reciente. En ese último caso se debería realizar detección de antígeno y/o anticuerpos. Varios métodos han sido descritos para la detección de anticuerpos de PPC, de entre ellos destacaremos los siguientes: Seroneutralización, Elisa diferencial.

Seroneutralización: El método de seroneutralización (SN) consiste en determinar la capacidad que tiene el suero objeto de estudio de neutralizar el efecto de un virus sobre la línea celular PK 15. Se utilizan diferentes diluciones del suero problema y se comparan sus resultados frente a un suero control. Dado que el VPPC no produce efecto citopático, la posible acción del virus sobre la célula, se visualiza mediante fluorescencia directa o inmunoperoxidasa. La SN es una técnica muy específica y sensible, pero, tiene el inconveniente de su gran laboriosidad, por lo que no está indicada para un gran número de muestras, aunque si como técnica de referencia.

Elisa diferencial: Este método está basado en un ELISA COMPETICIÓN en el que se utiliza un anticuerpo monoclonal frente a la gp 55 lo que permite además diferenciar los anticuerpos de PPC de los de BVD.

El suero problema se pone en contacto con la gp 55 y tras un periodo de incubación se pone la mezcla a competir con un monoclonal contra la gp 55. Este método permite la realización de un gran número de muestras gracias al sistema ELISA (todas las fases se pueden automatizar) en un relativo corto periodo de tiempo

2.2.1.8. Muestras a remitir al laboratorio.

Con el fin de poder realizar un adecuado diagnóstico es muy importante que la elección de la muestra sea la adecuada, así como que llegue en buen estado al laboratorio. **NO PUEDE HABER UN BUEN DIAGNÓSTICO SIN UNA BUENA MUESTRA.**

En el caso de la PPC las muestras a enviar serían: sangre con coagulantes, sangre sin coagulantes, tonsilas, ganglio mesentérico, bazo, íleon distal, riñón.

Las muestras deben llegar a su destino de la forma más rápida y segura posible y en ningún caso deben mantenerse POR LARGO TIEMPO a temperatura ambiente.

Una vez recogidas del animal objeto de estudio, deben ser identificadas de forma inequívoca y estable (etiquetas adhesivas o rotulando los botes) y mantenidas a 4^o C. Se debe utilizar un frasco para cada animal y siempre deben quedar cerrados herméticamente.

2.2.1.9. Inmunización frente al VPPC. Muchos son los métodos que se han utilizado para inmunizar frente al VPPC desde primeros de siglo, desde la serovacunación a diferentes tipos de vacunas vivas e inactivadas han sido utilizados para combatir esta enfermedad en varios países durante las últimas décadas, la utilización de las vacunas vivas atenuadas permitió la eliminación de la enfermedad de los países de la actual unión europea entre los años 1970 y 1980.

En la actualidad, las vacunas más utilizadas en diferentes programas de erradicación de la enfermedad son las vacunas vivas atenuadas, provenientes de las conocidas como **CEPA “CHINA” y/o CEPA “THINVERVAL”**.

La conocida cepa “China es una cepa lapinizada denominada también como Cepa “Suvac”, “C” y “K”. Su origen es desconocido y según varios autores podría tener cerca de 480 pases en conejo. La cepa, que se utiliza en la actualidad, no presenta virulencia residual siendo totalmente apatógena incluso en madres gestantes y lechones. Esta cepa fue muy utilizada en la pasada década en varios países europeos con éxito. Tiene una actuación rápida por lo que además de inducir inmunidad presenta interferencia viral con el virus patógeno.

Cepa “Thival” Es una cepa de origen francés proveniente de una clonación viral sobre la línea celular PK 15. Es decir, está adaptada y producida en cultivo celular.

Se ha probado su inocuidad incluso en animales inmunosuprimidos, no presentando virulencia residual ni reversión a virulencia.

2.2.1.10. Vacunas de subunidades. Recientemente, se ha desarrollado una vacuna de subunidades formada exclusivamente por la proteína gp 55 que induce inmunidad y protección a nivel experimental contra el VPPC. El gen de la gp 55 (E2) ha sido clonada y expresada mediante un sistema de baculovirus.

2.2.1.11. Prevención control y erradicación de la PPC.

Prevención.

Para la prevención de la PPC debemos de recordar, que como se indicaba en el apartado de patogenia, el VPPC tiene una enorme capacidad de penetración en los animales susceptibles pudiendo entrar por prácticamente todas las vías posibles. Por ello, la mejor solución para que un país esté libre de la PPC es evitar la entrada del virus. Los factores a tener en cuenta según sea un país o un área libre serían:

2.2.1.12. Control y erradicación.

El control de la enfermedad se puede llevar a cabo de diferentes maneras dependiendo del tamaño del área afectada, densidad porcina, el nivel cultural y social de la zona, las medidas de bioseguridad de la explotación, los medios económicos y humanos disponibles, el mercado exterior del sector, etc., etc. En cualquier caso, se lleva la política internacional de focalización, es decir establecer una zona de protección alrededor del foco de 3 Km. de radio, donde se prohibirá el movimiento de animales hasta 30 días después del sacrificio del último foco, y otra zona de vigilancia de 10 Km de radio donde se efectuarán los controles clínicos y serológicos. Estas medidas de control pueden a su vez verse incrementadas con la utilización o no de vacunas.

La vacunación para el control y posterior erradicación de la enfermedad jugo un importantísimo papel en Europa en la década de los 70 y 80, realizándose campañas masivas de vacunación con las cepas atenuadas, descritas en el apartado de vacuna, con el fin de ir eliminando progresivamente el virus y los animales portadores. En Chile se ha podido erradicar la PPC también utilizando un programa de vacunación sistemático y eliminación de portadores.

En la actualidad, los países que están utilizando las vacunas disponibles comercialmente, dado que no es posible diferenciar los animales vacunados de los enfermos y/o portadores pierden el “estatus” de país libre prohibiéndose las exportaciones por largos períodos de tiempo.

2.2.1.13. Cultivo celular para el aislamiento del virus de PPC

El virus además replica en una gran variedad de líneas celulares establecidas de origen porcino, bovino, caprino, primate y cobayo. La de uso más frecuente en laboratorio es la línea de riñón de cerdo PK-15. Pese a que la replicación del virus en estos cultivos tiene un mayor grado de reproducibilidad y un comportamiento más uniforme, la propagación del virus en ellas solo proporciona moderados o bajos títulos virales, por lo que los rendimientos en producción no son muy elevados. **Mengeling, W, ycol. 1969.**

El uso de cultivos primarios trae consigo un elevado riesgo de contaminaciones con otros virus, bacterias y microplasma procedentes del organismo donante. Este riesgo disminuye en gran medida con el uso de líneas celulares establecidas. En este caso último caso, la contaminación más importante es la infección del cultivo con el virus de BVD, que puede ir contaminando el suero fetal bovino, utilizado en los cultivos como nutriente.

Por tanto, es necesario realizar comprobaciones periódicas frente a los distintos agentes contaminantes y principalmente frente a este virus. Las células primarias de origen ovino o cultivos permanentes que contengan suero ovino como nutriente presentan el mismo problema de contaminación con el virus de BD.

La replicación del virus en las diferentes líneas celulares no produce efecto citopático en la célula infectada, con la excepción de muy reducido número de cepas citopatopatógenicas, por lo que para su detección ha de ser monitorizado por distintas técnicas serológicas de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa. **Weiland y col. 1992, Ruggli y col. 1996., Van Rijn y col. 1997.**

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- LUGAR Y FECHA DE EJECUCIÓN

3.1.1. Lugar De Estudio. El trabajo se realizó en las instalaciones de la Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia, ubicada en el Sector Hijaya del Distrito Alto Laran, Provincia Chincha, Capital Ica. Propiedad de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica

3.2. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL EXPERIMENTO

Latitud.....	12°25'34"
Longitud.....	76°08'35"
Altitud.....	97 msnm
Temperatura mínima.....	19.25 °C
Temperatura máxima.....	26.95 °C
Humedad relativa min. Promedio.....	58.75%
Humedad relativa máx. Promedio.....	93.25%

Fuente: Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú SENAMHI-LIMA (2012).

3.3. FECHA DE EJECUCIÓN

El trabajo experimental tuvo una duración de 8 semanas, donde se realizará la elección de las muestras, toma de muestra entre la semana a los 10 días de vacunados y 4 semanas después, durante los meses de NOVIEMBRE Y DICIEMBRE de 2017.

3.4. MATERIALES Y EQUIPO

Materiales físicos:

- Overol
- Botas
- Guantes
- Tubos vacutainer 5 ml
- Jeringas 10ml
- Termo refrigerante
- Algodón
- Gradilla
- Gel refrigerante
- Etiquetas
- Equipo para sujeción de animales

- Cámara fotográfica
- Termo refrigerante.

- **Materiales químicos:**

- Alcohol

- **Materiales biológicos:**

- Cerdos
- Vacunas Cepa China Lapinizada
- Vacunas muertas cultivada en células madres

- **Materiales de laboratorio:**

- Pipetas de precisión monocanal o multicanal apropiadas para distribuir de 10-1000 ul.
- Puntas de pipetas desechables.
- Recipiente graduado de 500ml para la solución de lavado.
- Agua bio-estilada o agua de milli Q
- Sistema de recogida del aspirado y del desinfectante.
- Cámara húmeda y cubiertas de plástico o selladores de placas
- Lector de micro placas provisto de filtro de 450nm o usando doble longitud de onda, a 450nm y 650nm Vortex
- Tubos para centrifuga o micro tubos
- Termo registradores de ambiente
- Cronómetro de laboratorio (Timer).
- Basureros con identificación de basura común y de riesgo biológico.

- Vasos de precipitación de 50, 100 ml
- Agitador de placas con temperatura y cronómetro regulable.
- Refrigeradora de 0 °C a 4 °C
- Congelador de -20 °C
- Termo registradores tipo Rogget con conexión USB
- Magnetos para agitación de diluciones.
- Crioviales
- Placas tapizadas con Antígeno CSFV
- Control Positivo
- Control negativo
- Conjugado (anti-CSFV HRPO)
- Diluyente de la Muestra
- Substrato TMB n.º12
- Solución de Frenado n.º3
- Solución de Lavado Concentrada (10X)
 - **Materiales biológicos:**
 - Suero porcino
 - **Materiales de escritorio:**
 - Hojas de campo
 - Papel

- Computadora
- Calculadora
- USB
- Cuadernos

3.5. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo consistió en una Investigación experimental, cuantitativo, cualitativo y prospectivo

3.6. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.6.1. Proceso de fabricación de la vacuna PPC adaptada a cultivo celular

- **Adaptación del virus en el cultivo celular**
 - Obtención del virus: Se obtuvo la cepa China CSFV atenuada certificada
 - Inoculación viral en el cultivo celular
 - Adaptación del virus CSFV en el cultivo celular.
 - Cuantificación del virus de Cólera Porcina presente en la vacuna VACFAR-CP y una cepa comercial lapinizada, analizado por PCR en tiempo real.
- **Desarrollo de la vacuna VACFAR-CP en cultivo celular contra Cólera Porcino.**

Upstream

- Virus del Cólera Porcino (Cepa china)
- Infección y adaptación viral en células huésped: Se le coloca en una línea celular susceptible al virus Cólera Porcino. Se obtiene un virus adaptado y atenuado por pasajes sucesivos (P1.....PN).
- Producción celular masiva: Sistema Roller, para la producción viral a grande escala.

Downstream

- Cosecha de antígenos
- Concentración y purificación viral
- Elaboración de la vacuna liofilizada.

Control de calidad

Mediantes pruebas de:

- Inmunofluorescencia
- ELIPOST
- Citometria de flujo
- ELISA
- PCR en tiempo real

3.6.2. De los animales

Se usaron animales cruzados, del sexo macho, de aproximadamente 60 días de edad, todos del sexo macho. Se formaron 2 grupos con 10 cerdos cada uno; un grupo vacunado con VACFAR-CP con 2 ml., el otro grupo no vacunado.

3.6.3. De la alimentación

Los animales recibieron por diez días alimento de inicio y luego recibieron la ración de crecimiento hasta el final de la experiencia. Las raciones fueron isocalóricas e isoproteicas. La alimentación que recibieron fue ad libitum. Para el control del consumo de alimento se pesaba diariamente la ración a dar y en la tarde se pesaba el sobrante.

3.6.4. De la toma de temperatura.

La temperatura se tomaba diariamente para verificar algún problema infeccioso que pueda alterar el trabajo y también se controló después de la vacuna al grupo con vacuna; así mismo que controló la temperatura después de la infección con el virus del Cólera Porcino, todo esto se registró.

3.6.5. De la observación de la morbilidad y mortalidad.

Después de la vacuna se registró posibles reacciones post vacunales y a los lechones se controló diariamente la presencia de alguna enfermedad. Después de la vacunación al grupo correspondiente se le registro la morbilidad y mortalidad; lo mismo se hizo con el grupo control que no recibió vacunación.

3.6.6. De la necropsia de los animales.

Después del enfrentamiento con el virus del Cólera Porcino y los animales que murieron se les realizó la necropsia, para observar los signos compatibles con PCP.

3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL

- Tratamientos Experimentales

Tabla 1. De combinaciones o tratamientos del experimento

Tratamientos	Observaciones				Totales	
					Yij	Promedio
CONTROL	Y ₁	Y ₂	Y ₁₀		
Vacuna PCP	Y ₁	Y ₂	Y ₁₀		

3.8. VARIABLES EN ESTUDIO

Variables Independientes

Aplicación de la vacuna contra Cólera Porcino.

Variables Dependientes

Tabla 2: De combinaciones o tratamientos del experimento

Variables	Medición
Consumo de alimento	Expresado en kg
Morbilidad	$M = \frac{\# \text{ Lechones total}}{\# \text{ lechones enfermos}} \times 100$
Mortalidad	$M = \frac{\# \text{ Lechones total}}{\# \text{ lechones muertos}} \times 100$

Análisis estadístico

El análisis estadístico para los datos paramétricos sumatoria promedio y desviación estándar; para los datos descriptivo se tomó en consideración los promedios.

IV. Resultados y discusión

4.1 Evaluación de la eficacia de la vacuna contra la Peste Clásica Porcina (PCP), a virus vivos adaptada en cultivo celular.

El experimento de campo se realizó con dos grupos de 10 cerdos, de 60 días de edad, vacunados con 2ml de la vacuna contra PCP y no vacunados. Fueron desafiados a los 28 días post-vacunal con cepa de virus de PCP virulento de campo, y se midió la temperatura corporal 3 días antes del estudio y 21 post desafío. Se realizó aislamiento viral en cultivo celular a partir del pool de tejidos linfoides de los animales sacrificados y muertos de los vacunados y no vacunado y se confirmó por las pruebas de inmunofluorescencia y PCR a tiempo Real como se mostrará a continuación.

4.2. Evaluación de los parámetros productivos de los cerdos vacunados y no vacunados contra Cólera Porcina

1.-Tabla de los parámetros productivos de los cerdos vacunados contra Cólera Porcina							
	EDAD DIAS	EDAD SEM	PESO VIVO (kg)	CONSUMO (Kg/SEM)	CONVERSIÓN DE ALIMENTO	GANANCIA PESO DIARIA (kg)	TIPO DE ALIMENTO
Vacunados	60	8	20.00	7.00	1.75	0.57	Crecimiento 1
	67	9	24.50	8.40	1.87	0.64	
	74	10	29.00	9.10	2.02	0.57	
	77	11	33.50	10.15	2.26	0.64	
	81	12	38.50	11.20	2.24	0.57	
Desafío	88	13	43.50	12.25	2.45	0.71	
	95	14	48.50	13.30	2.66	0.57	
	102	15	54.00	14.35	2.61	0.79	
	109	16	60.00	15.75	2.63	0.57	
Total	49	8	40.00	101.50	2.275	0.627	

2.-Tabla de los parámetros productivos de los cerdos no vacunados contra Cólera Porcina							
	EDAD DIAS	EDAD SEM	PESO VIVO (kg)	CONSUMO (Kg/SEM)	CONVERSIÓN DE ALIMENTO	GANANCIA PESO DIARIA (kg)	TIPO DE ALIMENTO
Vacunados	60	8	20.00	7.10	1.78	0.57	CRECIMIENTO I
	67	9	24.50	8.45	1.88	0.64	
	74	10	29.00	9.20	2.04	0.57	
	77	11	33.50	10.10	2.24	0.64	
	81	12	38.50	11.15	2.23	0.57	
Desafío	88	13	32.10	8.00	-1.25	-0.91	
Total	28	5	12.1	54.00	4.46	0.348	

4.3 Temperatura corporal de los cerdos vacunados y no vacunados contra el Cólera Porcina (°C)

Tabla 3.- Temperatura corporal post desafío (° c) cerdos vacunados									
Días/Cerdos	1	2	3	4	5	6	Sumatoria	promedio	D.S
1	39.2	38.5	38.8	38.9	38.4	39.1	233.9	38.82	0.32
2	39.4	38.6	38.5	38.6	39.2	38.7	235.0	38.83	0.37
3	38.8	38.8	37.5	38.2	38.6	38.8	233.7	38.45	0.52
4	38.7	39.1	38.6	38.9	38.9	38.6	236.3	38.72	0.25
5	39.1	39.3	38.2	39.2	38.6	38.7	238.1	38.85	0.42

Tabla 4.- Temperatura corporal post desafío (° c) cerdos no vacunados									
	1	2	3	4	5	6	Sumatoria	promedio	D.S
1	39.6	39.5	39.8	40.9	40.4	37.8	239.0	39.67	1.06
2	39.5	39.6	41.4	39.6	41.2	37.9	241.2	39.87	1.29
3	38.8	40.8	41.2	40.2	41.1	39.5	244.6	40.27	0.96
4	38.9	39.5	39.6	40.4	40.9	39.8	243.1	39.85	0.71
5	39.1	39.5	40.1	40.2	41.4	37.8	243.2	39.70	1.21

4.4. Necropsia de los cerdos vacunados y no vacunados contra el Cólera

Porcina



Figura 1.- Cerdos vacunado y no vacunados contra el Cólera Porcina



Figura 2.- cerdos mostrando signos clínicos de la enfermedad

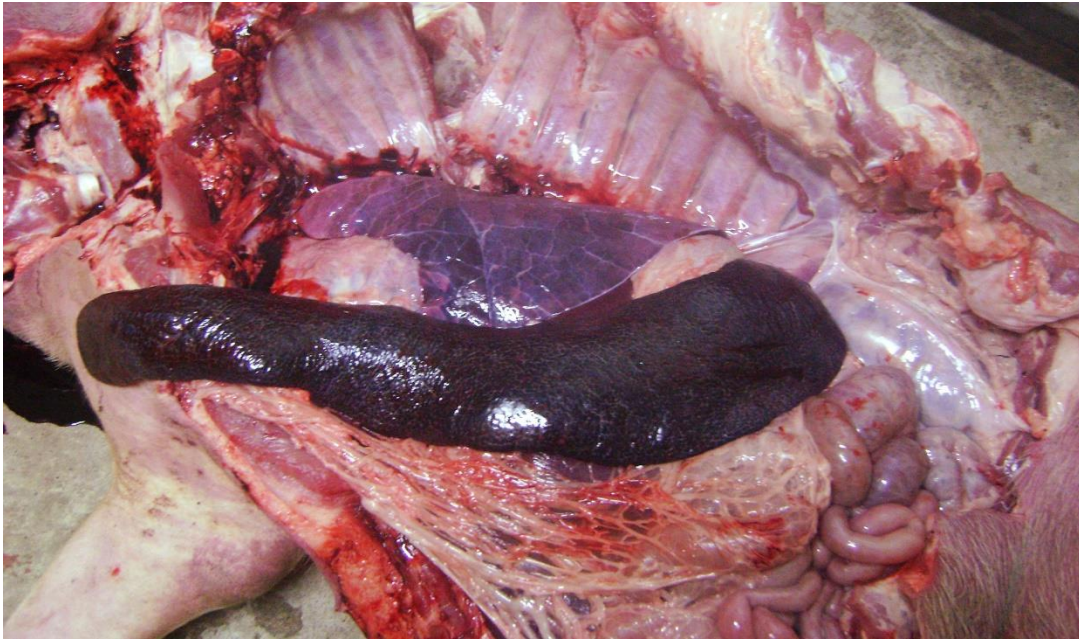


Figura 3.- Necropsia de los animales con signos de Cólera Porcina. Se puede observar hemorragia a nivel del pulmón hígado, bazo e intestinos.

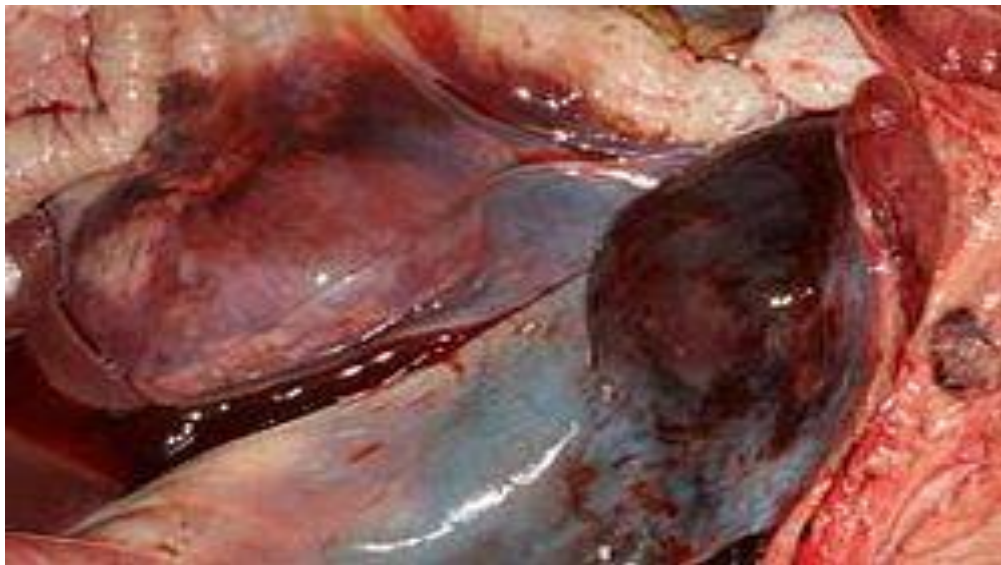


Figura 4.- Riñón con petequias (Huevo de pava)



Figura 5.- Ganglio inflamados y focos necróticos en las tonsilas

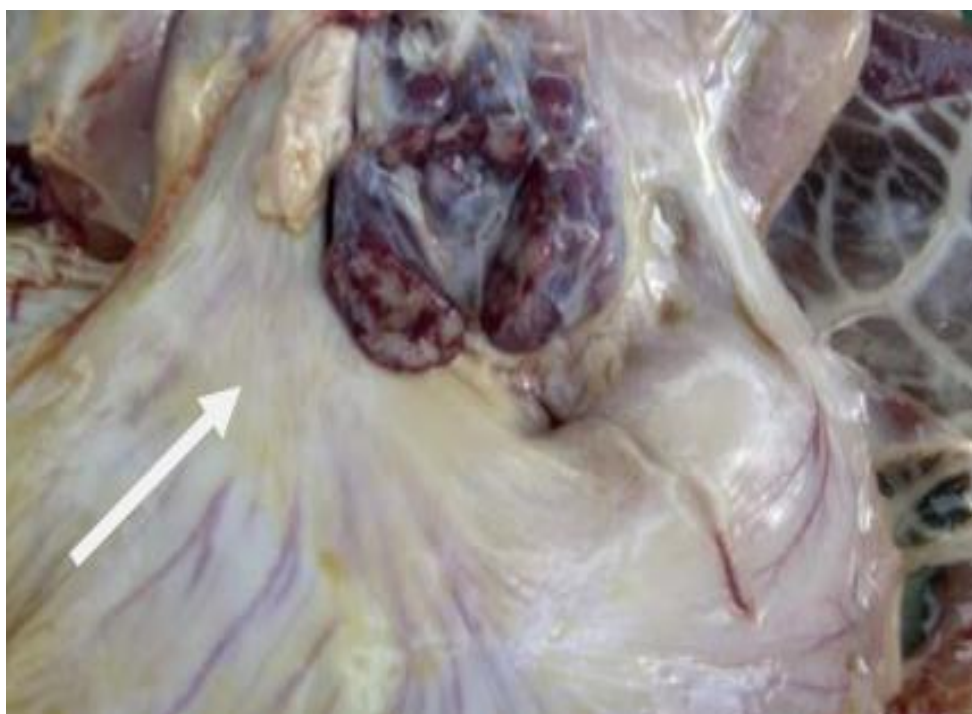


Figura 6.- Ganglios hepatogasticos hemorrágicos y agrandados

4.5. Test de inmunofluorescencia (IFI) para detectar la presencia del virus contra Cólera Porcino

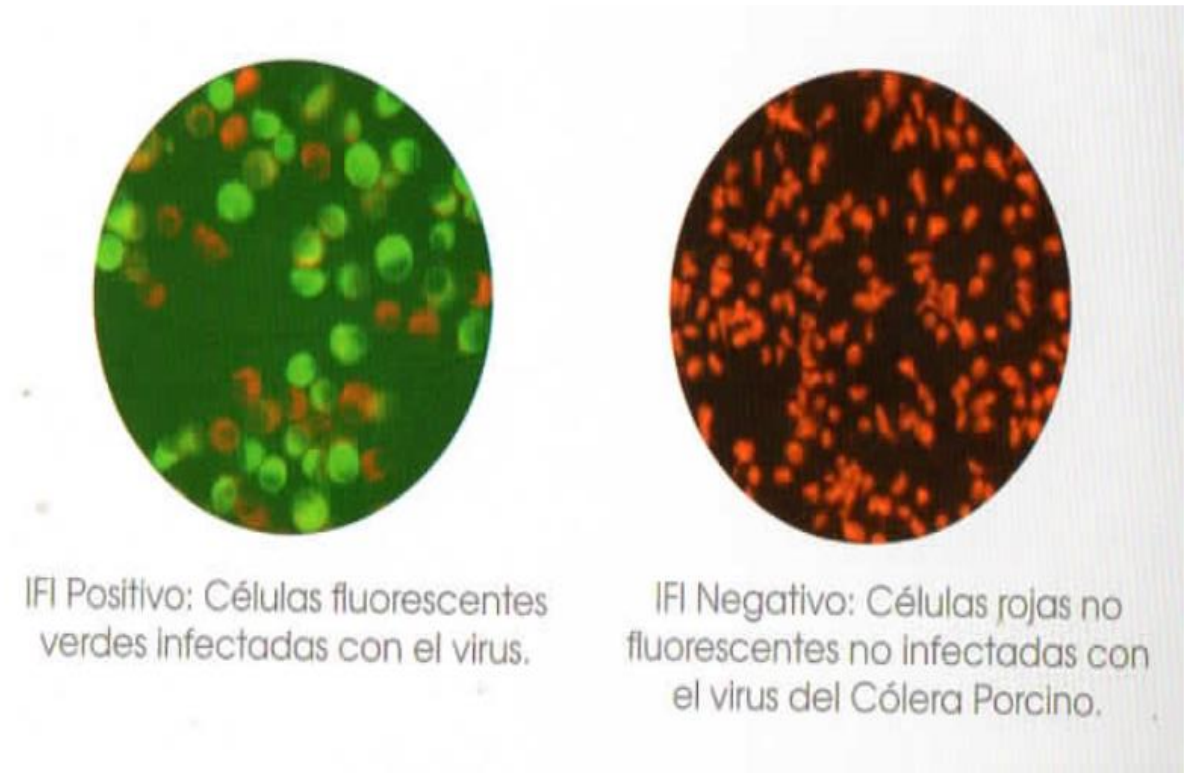


Figura 7.- test de inmunofluorescencia (IFI) para detectar la presencia del virus contra cólera porcino

El test de inmunofluorescencia (IFI) de la foto nos muestra los casos positivos a la presencia del virus del Cólera Porcina en cerdos no vacunados (microfotografía con fluorescencia verde) y los negativos a la presencia del virus en los cerdos vacunados (microfotografía con fluorescencia roja).

4.6. Test de PCR en tiempo real para la detección del virus contra Cólera Porcina en cerdos vacunados y no vacunados

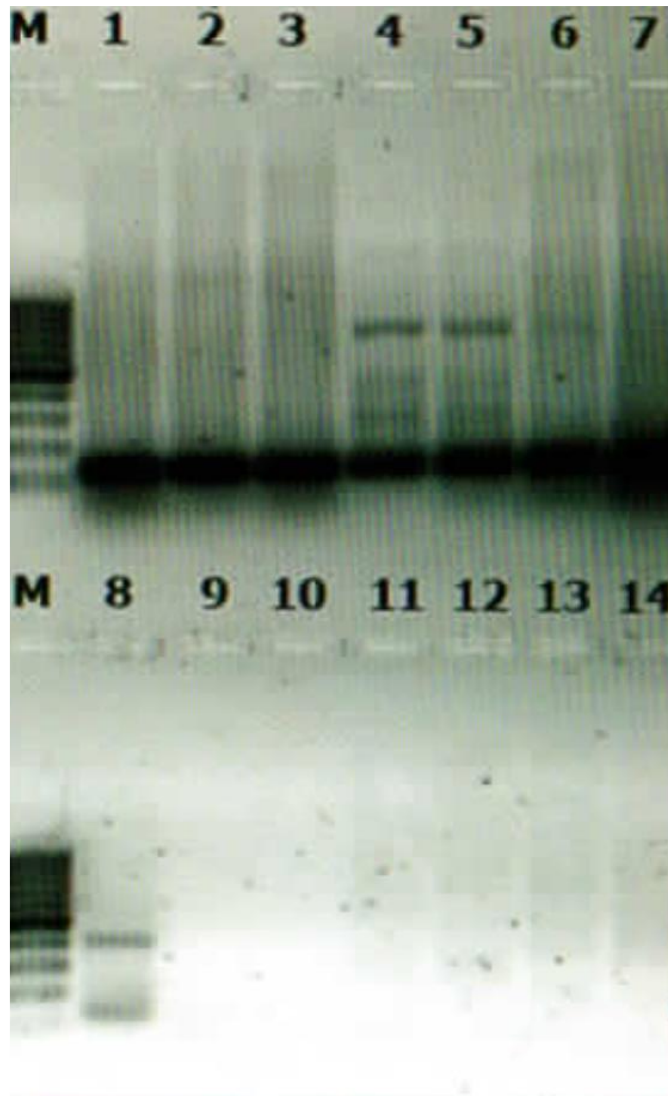


Figura 8.- visualización de RT-PCR convencional para la detección del gen E2 del Cólera Porcina, generados en el termoreciclador Applied Biosystems en gel de agarosa al 1.5%, M. Marcador de peso molecular; 1: Control positivo La foto nos muestra la placa de gel agarosa del 2 al 8 positivo para el grupo control o no vacunado, y del 9 al 14 de cerdos vacunados. Las bandas son muy claras y señalan la presencia de la proteína viral, por el contrario, en los vacunados no aparece banda alguna de proteína viral infecciosa en los no vacunados.

4.7. Determinación de la eficacia inmunológica de la vacuna contra Cólera Porcina elaborado en tejido celular en los cerdos vacunados.

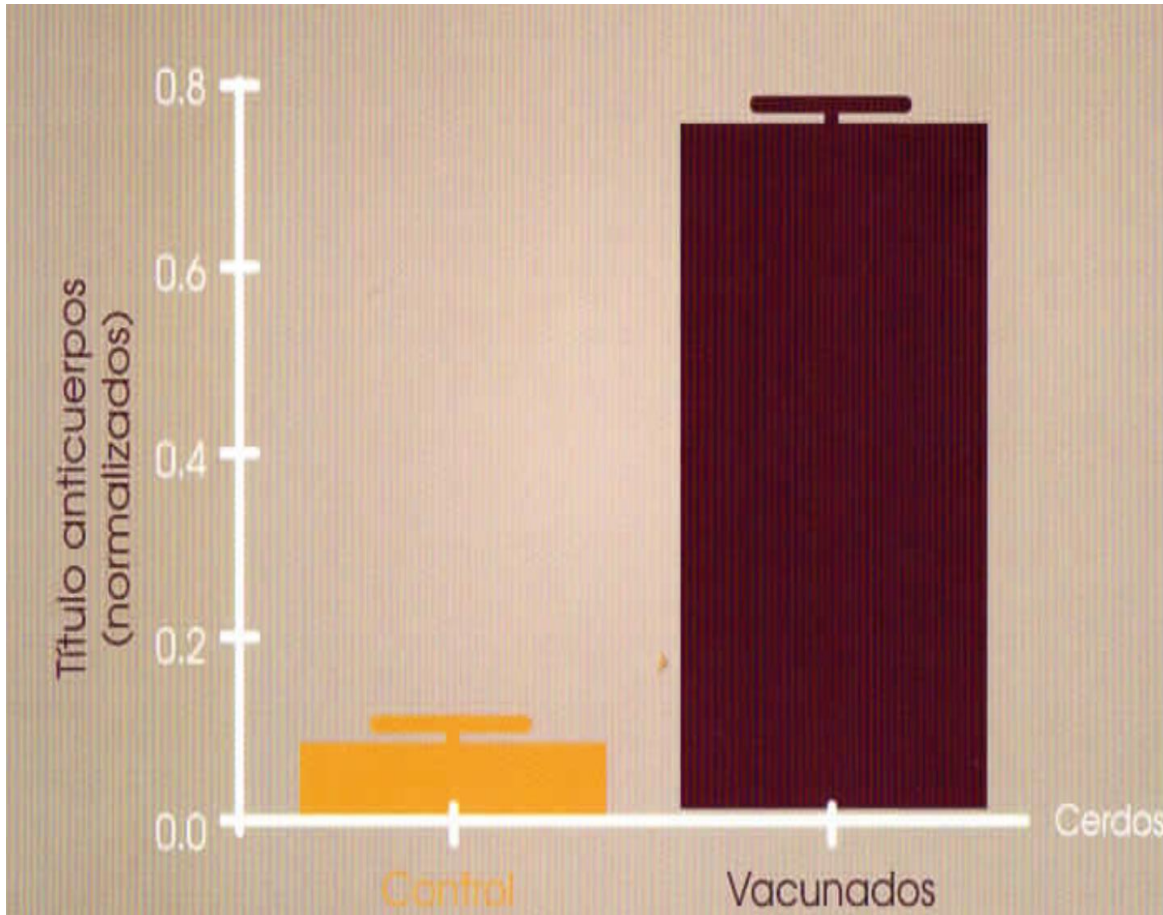


Figura 9.- Títulos de anticuerpos anti-Cólera en los cerdos vacunados frente a los no vacunados con una prueba de ELISA

La figura nos muestra la respuesta inmune post-vacunal de la vacuna contra Cólera Porcina en cultivo celular en los cerdos vacunados frente a los no vacunados por medición del título de anticuerpos.

4.8. Respuesta inmune celular inducida por la vacuna elaborado en cultivo celular

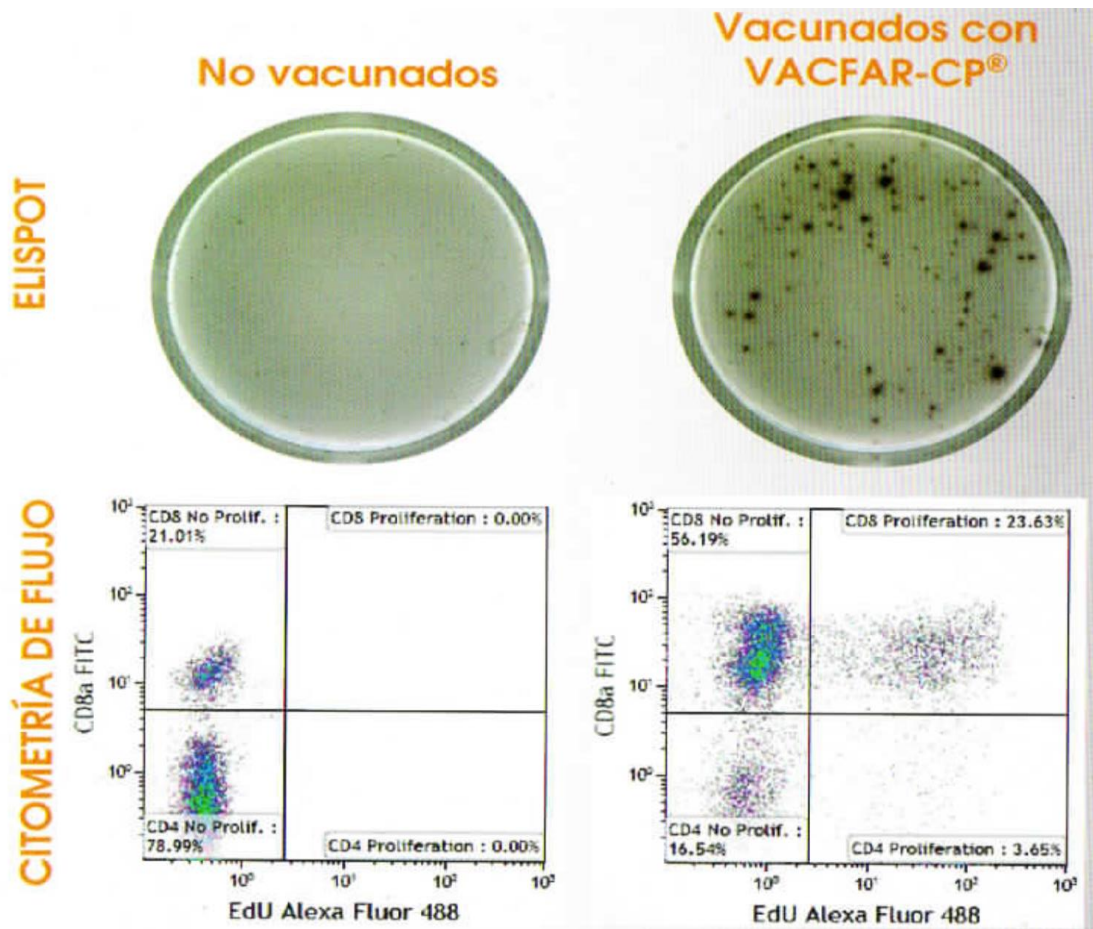


Figura 10.- Respuesta inmune celular inducida por la Vacuna contra Cólera Porcina elabora en cultivo celular.

La figura muestra los resultados comparativos del ELISPOT y la CITOMETRÍA DE FLUJO de la presencia y cantidad de células protectoras mononucleares de sangre periférica (PBMC) producida 14 días post-vacuna y cultivadas con antígeno viral de Cólera Porcina cultivada en tejido animal, este fue capaz de estimular el incremento de linfocitos antígeno-específicos anti Cólera Porcina, mediante la secreción de interferón ganma y gran proliferación clonal de linfocitos TCD8 (protectores)

V. CONCLUSIONES

2. Los cerdos vacunados y desafiados no mostraron signos clínicos de la enfermedad, ni reacciones adversas, ni lesiones. Los cerdos mantuvieron una temperatura corporal entre 37,5°C y 39,3°C. Los cerdos mantuvieron el apetito normal, y la conversión fue la adecuada con su edad y régimen alimenticio.
3. Los cerdos control o no vacunados presentaron el cuadro típico de la enfermedad con lesiones cutáneas, debilidad, apatía, falta de apetito, signos nerviosos, fiebre, conjuntivitis. La temperatura corporal varió de 37,8°C a 41,4°C. Todos los cerdos del grupo murieron de la enfermedad.
4. La prueba de Inmunofluorescencia (IFI) negativo a la presencia del virus en los cerdos vacunados (microfotografía con fluorescencia roja)
5. Al test del de PCR en Tiempo Real, no apareen banda alguna de proteína viral infecciosa en los vacunados, demostrando que no hay infección
6. La eficacia inmunológica de la vacuna contra el Cólera Porcina en cultivo celular queda demostrada cuando se realizó la medición de títulos de anticuerpos y la respuesta inmune celular inducida en los cerdos vacunados.
7. En los cerdos vacunados hubo una buena respuesta inmune celular inducida por la vacuna contra Cólera Porcina en cultivo celular

VI. RECOMENDACIONES

1. Recomendar el uso de la vacuna contra el Cólera Porcina para que se utilice en el programa para la erradicación contra Cólera Porcina.
2. Concientizar a los profesionales que usen las nuevas tecnologías para la elaboración de nuevas vacunas para el control de enfermedades.
3. También concientizar a los porcicultores de estas nuevas tecnologías mediante charlas de capacitación.
4. Publicar este trabajo y hacerlo extensiva a la comunidad de criadores y veterinarios dedicados a la porcicultura.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Agüero, M.; Fernández, J.; Romero, L.J.; Zamora, M.J.; Sánchez, C.; Bélak, S.; Arias, M.; SánchezViscaíno JM. 2004.** A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever in clinical samples. *Vet. Res*, vol.35, pp.551-563.
2. **Anonymous. 2002.** Classical swine fever diagnostic manual, Document No. C2002381. Commission Decision 2002/106/EC. *Official Journal*, L039, pp.0071–88.
3. **Aynaud, J.M., Asso, J. 1970.** La souche Lapinisée dite chinoise du virus de la Peste porcine Classique. *Rec. Med. Vet.* Cxlvii 2, 119-139.
4. **Aynaud, J.M., Asso, J. 1970.** La souche Lapinisée dite chinoise du virus de la Peste porcine Classique. *Rec. Med. Vet.* Cxlvii 2, 119-139.
5. **Becher, P.; Orlich, M.; Kosmidou, A.; Koenig, M.; Thiel, H.J. 1999.** **Genetic diversity of Pestiviruses:** Identification of novel groups and implications for classification. *Virology*; vol. 262, pp.64-71.
6. **Bloemraad, M. 2001.** Diagnóstico de laboratorio del virus de la peste porcina clásica. En: *Curso regional de epidemiología molecular y planes de emergencia para las enfermedades transfronterizas de los animales. Fortalecimiento para la prevención, control y erradicación de la peste porcina clásica en Cuba. 25 mayo-1 junio.*

7. **Bram, R.A. 1976.** The potential role of diptera in the transmission of hog cholera. Agricultural Research Seminar on hog cholera/classical swine fever, *Commision of the European Communities*.
8. **Call, D.R. 2005.** Challenges and opportunities for pathogen detection using DNA microarrays. *Crit Rev Microbiol*, vol. 31, pp.91–99.
9. **Campo Cuello Tania 1998.** Evaluación de una cepa vacunal contra la Peste Porcina Clásica. *Labiofam*. Núm. 106, p. 2.
10. **Cay, B.; Chappius, G.; Coulibaly, C. 1989.** Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestiviruses. Repport of an International workshop. *Vet. Microbiol*. Vol. 20, pp.123-129.
11. **Cheng, D.; Zhao, J.; Li, N.; Sun, Y.; Zhou, Y.; Zhu, Y.; Tian, Z.; Tu, C.; Tong, G.; Qiu, H. 2008.** Simultaneous detection of Classical swine fever virus and North American genotype Porcine reproductive and respiratory syndrome virus using a duplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods*, vol.151, no 2, pp.194-199.
12. **Ciglenecki, UJ.; Grom, J.; Toplak, I.; Jemeršic, L.; Barlic- Maganja, D. 2008.** Real-time RT-PCR assay for rapid and specific detection of classical swine fever virus: Comparison of SYBR Green and TaqMan MGB detection methods using novel MGB probes. *J Virol Methods*, vol.147, no 2, pp.257-264.
13. **Collet, M.S. 1992.** Molecular genetics of pestivirus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*. Vol. 15, pp.145-154.

14. **Collet, M.S.; Anderson, D.K.; Rezal, E. 1988.** Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of Flaviviridae. *J. Gen. Virol*, vol.69, pp. 2637- 2643
15. **Corapi, W.V.; Donis, R.O.; Dubovi, E.J. 1990.** Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhoea virus. *Am. J. Vet. Res.* Vol.51, pp.1388-1394.
16. **Dahle, J.; Liess, B. 1992.** A review on classical swine fever infections in pigs: epizootiology, clinical disease and pathology. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* Vol. 15, pp.203-211.
17. **Damrongwatanapokin, S.; Patchimasiri, T.; Pinyochon, W.; Parchariyanon, S. 2002.** Efficacy of classical swine fever DLD vaccine against classical swine fever virus Chingmai/98 isolate. *J. Thai. Vet. Med. Assoc.* vol. 53, pp.5-14.
18. **De Smit H. 2000.** Classical swine fever—efficacy of marker vaccines and laboratory diagnosis. Thesis, University of Utrecht, The Netherlands pp. 20–22 [ISBN: 90-393-2423-9].
19. **Depner, K.R.; Rodríguez, A.; Pohlenz, J.; Liess, B. 1996.** Persistent classical swine fever virus infection in pigs infected after weaning with a virus isolated during the 1995 epidemic in Germany: Clinical, virological, serological and pathological findings. *European Journal of Veterinary Pathology*, vol. 2, pp. 61-66.
20. **Deregt, D.; Gilbert, S.A.; Dudas, S.; Pasick, J.; Baxi, S.; Burton, K.M.; Baxi, M. K. 2006.** A multiplex DNA suspension microarray for

simultaneous detection and differentiation of classical swine fever virus and other pestiviruses. *J. Virol. Met.*; vol.136, pp.17-23

21. **Dewulf, J.; Koenen, F.; Mintiens, K.; Denis, P.; Ribbens, S.; de Kruif, A. 2004.** Analytical performance of several classical swine fever laboratory diagnostic techniques on live animals for detection of infection. *J Virol Methods*, vol. 119, pp. 137–43.
22. **Díaz de Arce, H.; Nunez, J.; I.; Ganges, L.; Barreras, M.; Frias, M.; T.; Sobrino, F. 1998.** An RT-PCR assay for the specific detection of classical swine fever virus in clinical samples. *Vet Res*, vol. 29, pp.431–440.
23. **Donis, R.O. 1995.** Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, vol. 11, pp. 393-423.
24. **Edwards, S.; Fukusho, A.; Lefevre, P.; Lipowski, A.; Pejsak, Z.; Roehle, P.; Westergaard, J. 2000.** Classical swine fever: the global situation. *Veterinary Microbiology*, vol.73, pp.103-119.
25. **Elbers, A.R.W.; Bouma, A.; Stegeman, J.A. 2002.** Quantitative assessment of clinical signs for the detection of classical swine fever outbreaks during an epidemic. *Vet Microbiol*, vol. 85, pp.323–32.
26. **Ezmann, P.J. 1988.** Molecular Biology of the virus. In *Classical swine fever and related viral infections*. Martinus Nijhoff publishing. Boston.
27. **Felsenstein, 1989.** Pestivirus classification. Martinus Nijhoff publishing. Boston.
28. **Fernández J.; Agüero M.; Romero L.; Sanchez C.; Belák S.; Arias M.; Sanchez-Vizcaino J.M. 2008.** Rapid and differential diagnosis of foot-

- and-mouth disease, swine vesicular disease, and vesicular stomatitis by a new multiplex RT-PCR assay. *J. Virol. Methods*, vol.147, no 2, pp.301-311.
29. **Floegel-Niesmann G. 2001.** Classical swine fever CSF marker vaccine. Trial III. Evaluation of discriminatory ELISAs. *Vet Microbiol*, vol. 83, pp. 121–36.
 30. **Floegel-Niesmann, G. 2003.** Marker vaccines and companion diagnostic tests for classical swine fever. *Dev Biol Basel*, vol.114, pp.185–91.
 31. **Francki, R.I.B.; Fauquet, C.M.; Knudson, D.L.; Brown, F. 1991.** Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. *Arch.Virol. Suppl.* Vol. 2, pp. 223-233.
 32. **Frías, M. T. 2007.** Peste porcina clásica: Contribución al diagnóstico. *Tesis en opción al grado de Dr en Ciencias, Centro Nacional de Sanidad. Agropecuaria, Universidad Agraria de la Habana.*
 33. **Genghini, R.; Tiranti, I.; Zamorano-Ponce, E. 2005.** Estudio citogenético y citomolecular de la vacuna contra la peste porcina clásica. *Theoria*, vol.141, pp.103-123.
 34. **Gómez-Tejedor, C. y M.V.Martínez-Orozco, 1994.** Epizootiología y patogenia de la peste porcina clásica. *Tratado de ganado porcino. Peste Porcina Clásica*, vol. 22, pp. 11-17.
 35. **Grassmann, C. W.; Isken, O.; and Behrens, S. E. 1999.** Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhea virus during RNA replication: An in vivo and in vitro study. *J. Virol. Vol.73*, pp. 9196-9205.

36. **Greiser-Wilke, I.; Blome, S.; Moennig, V. 2007.** Diagnostic methods for detection of Classical swine fever virus—Status quo and new developments. *Vaccine*, vol.25, pp. 5524–5530
37. **Grummer, B.; Fischer, S.; Depner, K.; Riebe, R.; Blome, S.; Greiser-Wilke, I. 2006.** Replication of classical swine fever virus strains and isolates in different porcine cell lines. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, vol. 113, pp.138–42.
38. **Haines FJ, Hofmann MA, King DP, Drew TW, Crooke HR. 2013.** Development and validation of a multiplex, real-time RT PCR assay for the simultaneous detection of classical and African swine fever viruses. *PLOS One*. 2013 Jul 26; 8(7):e71019. doi: 10.1371/journal.pone.0071019. Print 2013.
39. **Hoffmann, B.; Depner, K.; Schirrmeier, H.; Beer, M. 2006.** A universal heterologous internal control system for duplex real-time RTPCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods*, vol. 136, no2, pp.200-209.
40. **Hofmann, M. A. 2003.** Construction of an infectious chimeric classical swine fever virus containing the 5'UTR of bovine viral diarrhoea virus, and its application as a universal internal positive control in real-time RTPCR *J. of Virol Met*, vol.114, no.1, pp.77-90.
41. **Hulst, M., Westra, D., Wensvoort, D., Moormann, R. 1993.** Glycoprotein of Hog Cholera virus expressed in insect cells protects swine from H.C. *J. Of Virol* 67 (9) 5435-5442.

42. **ICTV. 2006.** The International Committee on Taxonomy of Viruses [Citado20Enero2008]. Disponible en URL: <http://www.virustaxonomyonline.com/virtax/lpext.dll?f=templates&fn=main-n-h.htm>.
43. **Kaden, V.; Lange, E.; Polster, U.; Klopfleisch, R.; Teifke, J.P. 2004.** Studies on the virulence of two field isolates of the classical Swine Fever virus genotype 2.3 rostock in wild boars of different age groups. *J Vet Med B Infect Dis Vet Pub Health*, vol. 51, pp. 202–8.
44. **Kaden, V.; Ziegler, U.; Lange, E.; Dedek, J. 2000.** Classical swine fever virus: clinical, virological, serological and hematological findings after infection of domestic pigs and wild boars with the field isolate “Spante” originating from wild boar. *Berl Munch TierarztlWochenschr*, vol. 113, pp.412–6.
45. **Katherine Portilla J.; Alberto Manchego S.; Hermelinda Rivera G.; Mariluz Araínga R. ; Marcy Ramírez V. 2009.** Maternal Antibody Persistence against the Classical Swine Fever Virus in Piglets Born from Vaccinated Sows in Farms with Different Vaccination Strategies. Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. *Rev. investig. vet. Perú* v.20 n.2 Lima
46. **Kern, B.; Depner K.R, Letz, W. Rot, M.; Thalheim, S.; Nitchke, B.; Plagemann, R.; Liess, B. 1999.** Incidence of classical swine fever CSF in wild boar in a densely populated area indicating CSFV persistence as

- a mechanism for virus perpetuation. *Zbl. Vet Med B.* vol.46, no .1, pp.63-67.
47. **Knipe, D. M.; Howley, P. M.; Griffin, D.E.; Martin, M.; Lamb, R. A.; Roizman, B.; Straus, S. E. 2001.** *Fundamental Virology 4th ed, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.* pp. 614-620.
48. **Kosmidou, A.; Buttner, R.; Meyers, G. 1998.** Isolation and characterization of cytopatogenic classical swine fever virus CSFV. *Arch. Virol.* Vol. 143, pp.1295-1309.
49. **Laevens, H.; Koenen, F.; Deluyker, H.; de Kruif, A. 1999.** Experimental infection of slaughter pigs with classical swine fever virus in weaner pigs. I. Transmission of the virus, course of the disease, and antibody response. *Vet Re.* .vol.145, pp.243-248.
50. **Lange, A., Blome, S., Moennig, V. & Greiser-Wilke, I. 2011.** Pathogenesis of classical swine fever--similarities to viral haemorrhagic fevers: a review. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 124 (1-2), 36-47. Recuperado el 10 de junio de 2011, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21309164>
51. **Launais, M., Aynaud, J.M., Corthier, G. 1978** Hog Cholera virus: Active immunization of piglets with the Thirverval strain in the presence and absence of calostrual passive immunity. *Vet. Microbiology.* 3. 31-43.
52. **Le Dimna, M.; Vrancken, R.; Koenen, F.; Bougeard, S.; Mesplède, A.; Hutet, E.; Kuntz-Simon, G.; Le Potier M.F. 2008.** Validation of two commercial real-time RT-PCR kits for rapid and specific diagnosis of classical swine fever virus. *J Virol Methods,* vol.147, no1, pp.136-142.

53. **Le Potier, M.F.; Mesplède, A.; Vannier, P. 2006.** Classical swine fever and other Pestiviruses. In: B.E. Straw, J.E. Zimmerman, S. D'Allaire and D.J. Taylor, Editors, Diseases of Swine vol. 9th ed.; Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 309–322.
54. **Liess, B. 1981.** En: Virus Diseases of Food Animals. Academic Press, New York, vol. 2, pp.627-650
55. **Liess, B. 1987.** Pathogenesis and epidemiology of hog cholera. *Ann. Rech. Vet.*; vol.18, pp.139-148.
56. **Liess, B.; Moennig, V. 1990.** Ruminant *Pestivirus* infection in pigs. *Rev Sci Tech*, vol. 9, no1, pp.151-61.
57. **Lin, M.; Lin, F.; Mallory, M.; Clavijo, A. 2000.** Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain Alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum. *J. Virol.* Vol. 74, pp.11619–11625.
58. **Loeffen, W. 2005.** Evaluation of five commercially available CSFELISA kits. *Report on the annual meeting of National Swine Fever Laboratories, Grange European Commission, Brussels*, pp. 143.
59. **Lowings, P., Ibata, G., Needham, J., Paton D. 1996.** Classical swine fever virus and evolution. *J.Gen. Virology* 77, 1311-1321.
60. **Mebus, C.A.; House, C.; Ruiz Gonzalvo, F.; Pineda, J.M.; Tapiador, J.; Pire, J.J.; Bergada, J.; Yedloutschnig, R.J.; Sahu, S.; Becerra, V. and Sánchez Vizcaíno, J.M. 1993.** Survival of foot-and-mouth disease, African

- swine fever, and hog cholera viruses in Spanish serrano cured hams and Iberian cured hams, shoulders and loins. *Food Microbiology* 10, 133-143.
61. **Meyer, G.; Thiel, H.J. 1996.** Molecular characterization of pestiviruses. *Adv Vir Res.* Vol. 47, no .47 pp. 53-118.
 62. **Meyers, G.; T. Rümennapf, y H. Thiel. 1989.** Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology*, vol.171, pp.555-567.
 63. **Milorad, S.; König, M.; Saalmüller, A.; Reddehase M.J.;Thiel, H-J. 1992.** Pathogenesis of Classical Swine Fever: B-Lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *J. Virol*, vol. 66, pp.1171-1175.
 64. **Mittelholzer, C.; Moser, C.; Tratschin, J.D.; Hofmann, M.A. 2000.** Analysis of classical swine fever virus replication kinetics allows differentiation of highly virulent from avirulent strains. *Vet Microbiol*, 74,293–308.
 65. **Moennig, V. 1990.** Pestiviruses: A review. *Vet. Microbiol.* Vol. 23, pp.35-54.
 66. **Moennig, V. 2000.** Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Vet Microbiol*, vol. 73, pp. 93–102.
 67. **Moennig, V.; Floegel-Niesmann G.; y Greiser-Wilke, I. 2003.** Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge, *Vet J*, vol.165, pp.11–20.
 68. **Moennig, V.; Plagemann, P.G. 1992.**The pestiviruses. *Adv. Virus Res.*; vol. 41, pp.53-98.

69. **Moenning, V., Greiser-Wilke, I. 2008.** *Classical Swine Fever Virus*, [en línea]. Hannover, Germany: School of Veterinary Medicine, 525-532
70. **Moormann, R.J.M.; Bouma, A.; Kramps, J.A.; Terpstra, C.; de Smit, H.J. 2000.** Development of a classical swine fever subunit marker vaccine and companion diagnostic test. *Vet Microbiol*, vol.73, pp.209–219.
71. **Moulin, H. R.; Seuberlich, T.; Bauhofer, O.; Bennett L. C.; Tratschin, J. D.; Hofmann, M. A.; Ruggli, N. 2007.** Nonstructural proteins NS2-3 and NS4A of classical swine fever virus: Essential features for infectious particle formation. *Virology*, vol. 365, pp.376-389.
72. **Murphy, F. A.; Gibbs, E. P. J.; Horzinek, M. C. y Studdert, M. J. 1999:** *Veterinary Virology*, Third Edition.
73. **Office International des Epizooties (OIE). 1997. World Animal Health in 1997. Office International Des Epizooties. Paris.**
74. **Office International des Epizooties. Diseases notifiable to the OIE. 2006.** Disponible en: http://www.oie.int/eng/maladies/en_classification.htm
75. **OIE. 2004.** Classical swine fever Hog Cholera. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals mammals, birds and bees*. 5th ed. Paris, France: Office International des Epizooties. p. 244–252 [Part 2, Chapter 2.1.13].
76. **OIE. 2006.** Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. Chapter 1.1.3, version adopted, May.
77. **OIE. 2006.** Standard operating procedure SOP for OIE validation and certification of diagnostic assays version 1.9. [Citado 3 febrero 2008] Disponible en: http://www.oie.int/vcda/eng/en_fichier_SOP.pdf.

78. **OIE. 2008.** Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. [Chapter 1.1.5].
79. **Paton, D.; J.; McGoldrick, A.; Belak, S.; Mittelholzer, C.; Koenen, F.; Vanderhallen, H.; Biagetti, M.; De Mia, G.; M.; Stadejek, T.; Hofmann, B.; Thueer, B. 2000.** Classical swine fever virus: a ring test to evaluate RT_PCR detection methods. *Veterinary Microbiology*, vol.73, pp.159-174.
80. **Paton, D.J.; y Greiser-Wilke, I. 2003.** Classical swine fever—an update. *Res. Vet. Sci*, vol.75, pp. 69–178.
81. **Pauly, T.; Elbers, K.; Konig, M.; Lengsfeld, T.; Saalmuller, A. y Thiel, H.J. 1995.** Classical swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes and identification of a T cell epitope. *J Gen Virol*. Vol.76, no.12, pp.3039-3049.
82. **Pauly, T.; Konig, M.; Saalmuller, A.; Thiel, H.J. 1998.** Infection with classical swine fever virus: effects on phenotype and immune responsiveness of porcine T lymphocytes. *J Virol*. Vol. 79, no.1, pp.31-40.
83. **Pereda AJ, Greiser-Wilke I, Schmitt B, Rincon MA, Mogollon JD, Sabogal ZY, Lora AM, Sanguinetti H, Piccone ME. 2005.** Phylogenetic analysis of **classical swine fever** virus (CSFV) field isolates from outbreaks in South and Central America. *Virus Res*. 2005 Jun; 110(1-2):111-8.
84. **Prodanov, J., Dosen, R., Valcic, M., T. Petrovic, T., Lupuiovic, D., Pusic, I. et al. 2008.** The influence of different infection route and immunological status on the detection and distribution of viral antigen after

experimental infection in piglets with Classical Swine Fever Virus [version electrónica]. *Acta Veterinaria (Beograd)* 49 (8): 317-325.

85. **Redvet 2008.** Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504 Volumen IX Número 11. **Peste Porcina Clásica: diagnóstico y control**
86. **Ressang, A.A.; 1973.** Studies on the pathogenesis of hog cholera. *Zbl. Vet. B*, vol. 20, pp. 256-271.
87. **Rosa Genghini, Ivan Tiranti y Enrique Zamorano-Ponce 2005.** Cytogenetic and cytomolecular study of vaccine against classic swine fever. *Theoria*, Vol. 14 (1): 103-123, ISSN 0717-196X
88. **Ruggli, N., Tratschin, JD., Mittelholzer, C., Hofman, M. 1996.** Nucleotide sequence of Classical swine fever virus strain Alford 187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full length cDNA. *J. Virol.* 70 (6) 3478-3487.
89. **Ruggli, N., Tratschin, JD., Mittelholzer, C., Hofman, M. 1996.** Nucleotide sequence of Classical swine fever virus strain Alford 187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full length cDNA. *J. Virol.* 70 (6) 3478-3487.
90. **Sandoval, P. 2012.** Procedimientos específicos de diagnóstico de brucelosis bovina por la técnica de Elisa competitivo. Quito.
91. **Stark, R.; Meyers, G.; Rümenapf T. y Thiel, H.J. 1993.** Processing of pestivirus poliprotein: Cleavage site between autoprotease and

- nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J. of Virol.* Vol. 67, pp.7088-7095.
92. **Summerfield, A.; Hofmann, M.A.; McCullough, K.C. 1998.** Low density blood granulocytosed cells induced during classical swine fever are targets for virus infection. *Vet. Immunol Immunopathol.* Vol.63, pp.289-301.
93. **Suradhat, S.; Damrongwatanapokin, S.; Thanawongnuwech, R. 2007.** Factors critical for successful vaccination against classical swine fever in endemic areas. *Vet Microbiol*, vol. 119, pp.1-9.
94. **Susa, M.; König, M.; Saalmüller, A.; Reddehase, M. J. y Thiel, HJ. 1992.** Pathogenesis of classical swine fever. B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *J. Virol.* Vol. 66, no.2, pp.1171-1175.
95. **Tapiador, J.; Pire, J.J.; Bergada, J.; Yedloutsching, R.J.; Sahu, S.; Becerra, V.; Sánchez-Vizcaíno, J.M. 1993.** Survival of foot and mouse disease, african swine fever and hog cholera viruses in Spanish Serrano Cured Hams and Iberian cured hams, shoulders and loins. *Food Microbiology*, vol. 10, pp.133-143.
96. **Tautz, N.; Kaiser A.; Thiel, H. J. 2000.** NS3 Serine Protease of Bovine Viral Diarrhea Virus: Characterization of Active Site Residues, NS4A Cofactor Domain, and Protease–Cofactor Interactions. *Virology*, vol. 273, pp.351-363.
97. **Terpstra, C. 1991.** Hog cholera an upadte of present knowledge *Br. J. Vet.* Vol. 147, pp.397-406.

98. **Thiel, H.J.; Stark, R.; Weiland, E.; Rügenapf T.; Meyers, G. 1991.** Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.* Vol. 65, pp.4705-4712.
99. **Van Aarle, P. 2003.** Suitability of an E2 subunit vaccine of classical swine fever in combination with the Erns-marker-test for eradication through vaccination. *Dev Biol Basel*, vol. 114, pp.193–200.
100. **Van Oirschot, J.; T. 2003.** Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet Microbiol*, vol.96, pp.367-384.
101. **Van Oirschot, J.T. 1999.** Classical swine fever Hog cholera. In: Straw, B.E.; D’Allaire, S.; Mengeling, W.L.; Taylor, D.J. Eds.; *Diseases of Swine*. Iowa State Press, Ames, pp.159–172.
102. **Van Regenmortel, M.H.V.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Carstens, E.B.; Estes, M.K.; Lemon, S.M.; Maniloff, J.; Mayo, M.A.; McGeoch, D.J.; Pringle, C.R.; Wickner, R.B.; 2000.** Virus Taxonomy Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego.
103. **Van Rijn, P., Van Gennip, H., Leendertse, C., Brusckke, C., Paton, D., Moormann, R., Van Oirschot. 1997.** Subdivision of the Pestivirus Genus Based on Envelope Glycoprotein E2. *Virology* 237, 337-348.
104. **VanRijn. P.A. 2007.** A common neutralizing epitope on envelope glycoprotein E2 of different pestiviruses: Implications for improvement of vaccines and diagnostics for classical swine fever CSF. *Veterinary Microbiology*, vol. 125, pp.150–156.

105. **Vilcek, S.; Herring, A.J.; Nettleton, P.F.; Lowing J.P.; Paton, D.J. 1994.** Pestivirus isolates from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol*, vol.136, pp.309-323.
106. **Weiland, E., Ahl, R., Stark, R., Weiland, F., Thiel, H. 1992.** A second envelope glycoprotein mediate neutralization of pestivirus, hog cholera virus. *J. Virol.* 66. 3677-3682.
107. **Weiland, E.; Stark, B.; Haas, B.; Rumenapf T. y Thiel, H.J. 1990.** Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J.Virol.* 66, 3561-3569.
108. **Wengler, G. 1991.** Family *Flaviviridae*. In Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Springer-Verlag, Berlin*, pp.223-233.
109. **Wenland, F.; Wenland, E.; Unger. 1999.** Localization of pestiviral enveloped proteins Erns and E2 at the cell surface and on isolated particles. *J. Gen Virol*, vol. 80, pp. 1157-1165.
110. **Westaway, E.G.; Brinton, M. A.; Gaidamovich, S.Y.A.; Horzinek, M.C.; Igarachi, A.; Kaariainen, L.; Lvov, D.K.; Porterfield, J.S.; Russel, P.K.; y Trent, D.W. 1985.** *Togaviridae. Intervirology*, vol. 24, pp.125- 139.
111. **Westergaard, J.M. 1996.** The classical swine fever and African swine fever situation in Europe. Annual Meeting of National Swine Fever Laboratories. Alghero, Sardinia, Italy, Commission of the European Communities, 3-5 June.

112. **Windish, J. M.; Schneider, R.; Stark, R. 1996.** RNase of classical swine fever virus: Biochemical characterization and inhibition by virusneutralizing monoclonal antibodies. *J. Virol*, vol. 70, pp.352-358.
113. **Zhao, J.; Cheng, D.; Li, N.; Sun, Y.; Shi, Z.; Zhu, Q.; Tu, C.; Tong, G.; Qiu, H. 2008.** Evaluation of a multiplex real-time RT-PCR for quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of Classical swine fever virus. *Veterinary Microbiology*, vol.126, no 3, pp.1-10.

