

ASPECTOS MOLECULARES DEL VIRUS DE LA FIEBRE PORCINA CLASICA.

DR. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION, FESC-UNAM.

1. INTRODUCCION

La FPC, es una enfermedad altamente contagiosa, que afecta al sistema nervioso, endotelios vasculares y células reticuloendoteliales; se caracteriza por la presencia de hemorragias generalizadas e infartos en los órganos internos.

1.1. ASPECTOS EPIZOOTIOLÓGICOS DE LA FIEBRE PORCINA CLASICA.

La epizootiología de la FPC está influenciada por un gran número de factores, entre los cuales se pueden mencionar: el sistema de producción; el precio del cerdo; el precio de la carne, mucho hacinamiento, el tamaño y la densidad de la granja y de la región, y no menos importante la virulencia de la "cepa" del virus de la FPC circulante; esto aunado a las medidas aplicadas para el control o erradicación de la enfermedad, incluyendo regímenes de vacunación y métodos de diagnóstico utilizados. (Terpstra, 1988).

Se considera como un factor y es aceptado, la relación que existe entre el número de brotes y la densidad de las granjas en una cierta área. Además existen indicadores de una correlación positiva entre el número de brotes en una área y la producción de cerdos. En ciertas áreas hay un alto riesgo, ya que el virus tiende a establecerse por muchos años con una baja incidencia de la enfermedad. Liess *et al* (1975) demostraron que en más del 5% de las unidades en crecimiento, que son serológicamente positivas pueden presentarse períodos epizooticos dentro de ella, con respecto a la FPC.

Existen evidencias circunstanciales que indican que el síndrome de la "cerda portadora" y los cerdos infectados en forma crónica y persistentemente, son otros factores responsables de mantener la infección en la granja, especialmente en piaras medianas y grandes. La estrecha relación entre el riesgo de infección, el tipo de granja; el tamaño de la piara; y las áreas de producción intensiva de cerdos. (Terpstra, 1988).

1.3. EVIDENCIACIÓN DE "CEPAS" DE DIFERENTES GRADOS EN PATOGENICIDAD.

En un trabajo realizado por (Caij., *et al.*, 1989), se encontraron diferencias cualitativas y cuantitativas en una gran variedad de tejidos estudiados, con respecto al título viral, cuando los cerdos fueron inoculados con dos diferentes "cepas" del virus de la FPC ("cepa" Weybridge o "cepa" New South Wales NSW). Los títulos encontrados con la cepa Weybridge, fueron más altos que los encontrados con la cepa NSW. Esta correlación

correspondió con la fuerte severidad del síndrome clínico-patológico, inducida por la cepa Weybridge. La implicación de la diferenciación del virus de la FPC en tejidos mediante el diagnóstico por inmunofluorescencia fue discutible, quedando como conclusión que solo con el uso de anticuerpos monoclonales se podría diferenciar entre las "cepas" del virus de la FPC y las del virus de la Diarrea Viral Bovina (BVD). (Kresse *et al.* 1976).

Las infecciones persistentes son generalmente producidas por el virus de la FPC de baja a moderada virulencia. Se han encontrado diferentes formas de persistencia viral y arbitrariamente las identifican dentro de la forma crónica (Mengeling y Packer, 1969) y una forma de brote tardío (Van Oirschot y Terpstra, 1977). En el primer caso se distinguen tres fases clínicas denominadas: enfermedad aguda, mejoría clínica y exacerbación de la enfermedad aguda.

La fase aguda es esencialmente la misma, como ocurre con la FPC aguda, el virus se disemina más lentamente y las concentraciones en el suero y órganos, tiende ser menor. En el segundo período de Mejoría Clínica los títulos virales en el suero son bajos o ausentes y hay evidencia de una excesiva formación de células plasmáticas y de un incremento de inmunoglobulinas en el suero. El virus de la FPC tiende a limitarse a las células epiteliales de las tonsilas, y de tejidos del ileon, glándulas salivales y riñones. El virus desaparece temporalmente del suero, probablemente como resultado de la formación de anticuerpos específicos y/o disminución del número de células que producen al virus. Finalmente, en la tercera fase o exacerbación de la enfermedad aguda, el virus se disemina en todo el organismo, este puede ser provocado por el agotamiento del sistema inmune, que parece desarrollar cerdos infectados crónicamente. Estos animales se encuentran más susceptibles a las infecciones bacterianas secundarias (caso típico de una Pasteurelisis pulmonar, demostrado por Pijoan y Ochoa, 1978).

En el caso de la forma correspondientes a los brotes tardíos, la FPC se caracteriza clínicamente por un período inicial largo, con una virtual ausencia de signos clínicos; este tipo de infecciones generalmente siguen un curso posterior a una infección viral durante el período fetal, cuando la cerda se infecta con "**cepas**" de **reducida virulencia**; los lechones nacen con altos títulos virémicos, que son suprimidos temporalmente cuando ingieren el calostro. El virus de la FPC se encontrará difundido en todo el organismo, en los tejidos epiteliales, linfoides y retículo-endoteliales. Estos cerdos no producen anticuerpos neutralizantes lo que contribuye a una viremia persistente. (Terpstra, 1988).

Esta serie de evidencias nos muestran claramente que el virus de la FPC se presenta en las granjas con diferente grado de virulencia, de tal manera que podemos observar su patogenidad de la siguiente forma:

Las "cepas" de alta virulencia generalmente causan muerte en un período entre la segunda y tercera semana de edad, mientras que "**cepas**" de **baja virulencia** no producen la enfermedad a menos que los cerdos hayan sido infectados "*in utero*". Las epizootias producidas por "cepas" de **baja virulencia** difieren en tres aspectos de las causadas por las "**cepas**" virulentas.

1. **Las "cepas" de baja virulencia** inducen una alta proporción relativa de infecciones inaparentes, atípicas y crónicas, no dejando ver su presencia, como ocurriría con una cepa virulenta. Una piara en crecimiento que se encuentra infectada, puede transmitir el virus imperceptiblemente a un gran número de animales; mientras que en las piaras en engorda

que también se encuentran infectadas, puede también no notarse la presencia del virus, generándose así una cadena de contaminación.

2. Se ha mencionado que la transmisión de "**cepas**" de **baja virulencia**, tienden a ser lenta a través de la piara, lo cual también contribuye al curso de la enfermedad en forma menos alarmante.

3. El síndrome de la cerda portadora, juega un papel altamente significativo en las epizootias causadas por "cepas" de baja virulencia. Mientras que las cerdas gestantes e infectadas con "**cepas**" **virulentas**, mueren, o en caso de sobrevivir, producen abortos, o lechones enfermos o débiles al nacer, los cuales sucumben en un corto período después de nacer. La infección de las cerdas por "cepas" de baja virulencia generalmente pasa desapercibida, la progenie pueden lucir saludablemente, sin embargo pueden estar sufriendo una infección congénita, con tolerancia inmunológica, eliminando una gran cantidad de virus, pasando semanas o meses sin poder detectarlo. (Terpstra, 1988).

1.4. ASPECTOS DE CONTROL RESPECTO A LA EPIZOOTIOLOGÍA DE LAS DIFERENTES "CEPAS" DEL VIRUS DE LA FPC.

Las medidas de control adoptadas, también influyen grandemente la epizootiología de la enfermedad. Cerrando los mercados para tratar de controlar la diseminación del virus, eliminando los focos de infección, medidas que necesariamente tendrán que ser apoyadas por policías veterinarios y normas zoonosanitarias. Estas medidas han sido exitosas para la eliminación de la enfermedad en algunos países tales como: Escandinavia, Irlanda, Reino Unido, Suiza, Australia, Canadá y EUA. En varios países de Europa del este y oeste, Japón y el Estado de Singapur en donde las áreas de producción son granjas de producción intensiva, las medidas mencionadas han mostrado ser adecuadas.

Consecuentemente la vacunación ha sido aplicada en gran escala, como ayuda para eliminar la enfermedad o reducir el número de brotes, hasta un nivel en el que podría ser factible la erradicación por medidas sanitarias (Van Bekkum, 1976). Aunque las vacunas vivas modificadas, no producen efectos colaterales (Oláh, y Palatka 1969; Sasahara *et al*, 1969) bajo ciertas condiciones, éstas si pueden tener influencia no esperada sobre la epizootiología de la FPC. La vacunación de cerdos infectados inaparentemente puede permitir la distribución del virus iniciando un brote en la piara (Terpstra y Robijns, 1977). Por otro lado los animales vacunados con vacunas de potencia insuficiente pueden desarrollar una infección subclínica, cuando se exponen a las "cepas" de campo del virus de la FPC; mientras que las cerdas gestantes pueden transmitir el virus en forma horizontal y por vía placentaria (Leunen y Strobbe, 1977). Además la camada procedente de las cerdas vacunadas está protegida por un período largo contra una infección letal, durante las primeras semanas de vida, pero no contra la multiplicación y excreción del virus (Leunen y Strobbe, 1977). Cada cerdo puede experimentar una infección subclínica invariablemente ante una cepa de alta virulencia (Biront, 1983).

Experiencias europeas nos informan que el virus de la FPC puede ser erradicado de áreas enzoóticas, si existe un régimen estricto y sistemático de vacunación, apoyado por policías veterinarios y medidas estrictas zoo-sanitarias y si se continua por largo tiempo (Terpstra, 1977; Terpstra, 1982). Contrariamente, los programas de la Comunidad Económica Europea para la erradicación de la FPC han demostrado que en regiones con un sistema

de vacunación incompleto y no sistemático, apoyado de medidas suplementarias, el número de brotes han comenzado a aumentar. El efecto verdadero de la vacunación, tiende a ser fuertemente vigilado por la autoridades veterinarias nacionales e internacionales responsables de las enfermedades notificables y de las zonas de control (Terpstra, 1988).

1.5. IMPORTANCIA DEL DIAGNOSTICO SEROLOGICO.

El diagnóstico serológico de la FPC es una herramienta útil que permite evaluar fallas en la vacunación, además permite detectar animales con la enfermedad subclínica (cerdos infectados asintomáticos), mediante la determinación los perfiles serológicos, o bien para utilizarla como un sistema de vigilancia epizootológica, diagnóstico necesario para la última fase en la Campaña de Erradicación. Algunas pruebas están disponibles para la detección de anticuerpos contra la FPC, tal es la prueba de neutralización viral que es específica para diferenciar anticuerpos entre FPC y Diarrea Viral Bovina; otro ensayo de neutralización unida a peroxidasa ha dado buenos resultados.

En la actualidad no se cuenta con una técnica serológica práctica y rápida que permita a los veterinarios de campo diagnosticar la FPC y mucho menos para poder diferenciar entre la presencia de animales con anticuerpos producidos por virus de campo patógenos, anticuerpos vacunales; debido primordialmente a que las vacunas preparadas con "**cepas**" **vivas atenuadas** y además los virus de campo con "**cepas**" **de baja virulencia**, pueden estimular títulos de anticuerpos que pueden persistir algunas veces durante toda la vida económica del animal. (Terpstra, 1988).

1.6 TRABAJOS REALIZADOS EN LA FESC

Se realizaron una serie de trabajos en la FESC. Que tuvieron diferentes objetivos, el primero de ellos tuvo como objetivo encontrar diferencias biológicas entre las "cepas" de campo, de referencia y vacunales, del virus de la FPC. Se adquirieron 5 "cepas" vacunales (China, GP, PAV-1, PAV-250), tres "cepas" de referencia (Lederle, ALD y Ames), también se trabajaron 9 "cepas" de campo (VC-91-039; VC-90-039 VC-89-55; VC-89-102; VC-89-55; VC-90-1591; VC-89-126; VC-90-127; VC-90-1234). Todas las "cepas" se cultivaron en la línea celular PK-15 y se cosecharon después de 4 días de incubación. Al mismo tiempo se adquirieron dos cerdos SPF, que se sacrificaron y de sus órganos linfoides se hicieron cultivos primarios de células no clasificadas, las "cepas" se inocularon en esta suspensión celular y se incubaron de 4 a 5 días, posteriormente se cosecharon, y se liofilizaron. A las 17 "cepas" se les determinó la concentración de proteínas y se titularon por inmunofluorescencia directa (IFD). En la determinación proteica se encontró que la concentración de proteínas fluctuó en las "cepas" vacunales entre 82.00 y 87.40 mg/ml; en las "cepas" de referencia entre 86.8 y 88.41 mg/ml; mientras que en las "cepas" de campo 83.37 y 88.74 mg/ml. El medio de cultivo presentó una concentración 79

mg/ml. Los resultados de los títulos por IFD, mostraron que las "cepas" vacunales estuvieron en un rango de $10^{5.1536}$ a $10^{6.5500}$; las "cepas" de referencia estuvieron en un rango de $10^{6.2374}$ a $10^{7.5405}$ y las "cepas" de campo de $10^{1.7567}$, a $10^{4.8446}$. Las "cepas" de campo tuvieron un comportamiento muy variable lo que se sugiere que existen "cepas" de diferente grado de patogenicidad.

Se trabajaron varias "cepas" del virus de la FPC de diversos países (A=alta virulencia; M=mediana virulencia y B=baja virulencia (vacunales), utilizando anticuerpos monoclonales (del 2 al 13) dirigidos hacia las glicoproteínas E1 y E2 de la envoltura viral. Las "cepas" procedían de varios países y fueron las siguientes: **ALEMANIA**: cepa Behring (A); **E.U.A.**: cepa Bai (A), cepa Cornell (A), cepa AMES, cepa 331 (M) y cepa PAV-250 (B); **FRANCIA**: cepa ALFORT (A), cepa ALFORT 2.3.1 (M) y cepa ALFORT 2.3.2 (M); **JAPON**: cepa New Lederle (A) y cepa ALD (A); **HOLANDA**: cepa Brescia 2.1.1 (A), cepa Baker A 1.2.1 (A), cepa Henken (B), cepa Cedipest (B) y las "cepas" de campo Jongen y Wild Boar; y finalmente las "cepas" de **POLONIA** que fueron de campo: Spruit 2 y Jongerebreur. Al analizar el determinante antigénico revelado con el monoclonal 12, presente en el grupo A (A3), éste no se encontró en las "cepas" de **ALEMANIA, FRANCIA, HOLANDA** y Polonia ("cepas" europeas), el AcM 12 también da positivo con los AcM 2 y a veces con los AcM 3, 4 y 7 y no con los AcM 9, 10 y 11 lo que se muestra solo el sitio neutralizante en el grupo A, no importando si la cepa es de alta, mediana, baja virulencia o de campo. Con respecto al AcM 6 que pertenece al grupo B no se encontró en todas las "cepas" (excepto en las polacas), también no importando su virulencia, en el caso de la cepa vacunal PAV-250 no se encontró reacción a este AcM, sitio que es neutralizante. Los AcM del grupo C como son el 1, 5 y 8, muestran que son anticuerpos que reconocen sitios neutralizantes de la glicoproteína; el AcM 5 no reaccionó en las "cepas" tanto europeas, japonesas como americanas, no importando su virulencia, solo una cepa si reconoció ese determinante antigénico y fue la PAV-250; con respecto al otro sitio del grupo C que fue el 8, no lo tuvieron las "cepas" de Alemania, Francia, Japón y algunas de EUA y fueron "cepas" de alta, mediana y baja patogenicidad; las "cepas" de Polonia y Holanda y algunas de EUA de baja virulencia y de campo si presentaron dicho determinante antigénico.

Se analizaron varias "cepas" del virus de la FPC aisladas en México, que se identificaron como A=alta virulencia; M=mediana virulencia y B=baja virulencia, y fueron los siguientes: Cepa China (B), cepa Minnesota (B), cepa PAV-1 S (B), cepa Minnesota-P (B), cepa PAV-250-P; "cepas" controles: de **ALEMANIA**: cepa Behring (A); **E.U.A.**: cepa Cornell (A), cepa AMES (M) y

cepa PAV-250 (B); FRANCIA: cepa ALFORT (A); JAPON: cepa ALD (A); HOLANDA: cepa Brescia 2.1.1 (A). Los virus fueron cultivados en las líneas celulares PK-15 y SK-6 que posteriormente fueron sembradas en placas de microtitulación. Las células/virus se fijaron y se les adicionaron los monoclonales (desde el 2 hasta el 13) y se incubaron, las placas se lavaron, y se les realizó la prueba de inmunoperoxidasa. MEXICO: cepa China: 5, 6, 13, cepa Minnesota: 5, 6, 8, 8(W) y 13, cepa PAV-1 S: 5, 6, 8, 13 (W) cepa Minnesota-P: 5, 6, 8 y 13 (W), cepa PAV-250-P: 6 y las "cepas" de campo: 4-P: 5, 6 y 8; 5-P: 5 y 6; 11-S: 5, 6 y 12 y 13-S: 5, 6 y 12. El análisis del determinante antigénico revelado con el monoclonal 12 presente en el grupo A (A3) no se encontró en dos "cepas" de campo mexicanas. Con respecto al AcM 6 que pertenece al grupo B no se encontró en todas las "cepas", también no importando su virulencia, en el caso de la cepa vacunal PAV-250 no se encontró reacción a este AcM, sitio que es neutralizante. Los AcM del grupo C como son el 1, 5 y 8, mostraron que son anticuerpos que reconocen sitios neutralizantes de la glicoproteína; el AcM 5 no reaccionó en las "cepas" aisladas en México y también no importando su virulencia, solo una cepa si reconoció ese determinante antigénico fue la PAV-250; con respecto al otro sitio del grupo C que fue el 8, no lo tuvieron las "cepas" de Alemania, Francia, Japón y algunas de EUA y México y fueron "cepas" de alta, mediana y baja patogenicidad.

Se encontraron diferencias entre las "cepas" de campo, vacunales y de referencia, del virus de la Fiebre Porcina Clásica mediante, estudios de densidad boyante (DB) y espectroscopía en ultravioleta. Se obtuvieron un total de 12 fracciones a partir de cepa y se encontró que las fracciones 8 y 9 fueron las más importantes, para las "cepas" vacunales: Minnesota, PAV-1, PAV-250 y para las cepas de campo 89-126 y para la cepa 89-55, otras fracciones importantes fueron la 10 y la 11; para la cepa de referencia ALD las fracciones importantes fueron 3-4 y 9-10. La DB mostro ligeras diferencias entre "cepas", así las de campo mostraron una DB de 1.114 ± 0.002 g/ml; las "cepas" vacunales mostraron una DB un poco mayor 1.135 ± 0.011 g/ml, y la cepa de referencia ALD mostro una DB más elevada de 1.184 g/ml. Los espectros mostraron que todas las "cepas" presentan picos de absorbancia de aproximadamente 240 a 280 nm, que corresponden a las absorbancias de los aminoácidos aromáticos de las proteínas y a los ácidos nucleicos, respectivamente. Las cepas ADL y la 89-55 presentaron otros máximos de absorbancia.

Se determinó la presencia de partículas virales por microscopía electrónica en las fracciones correspondientes a los picos determinados por el espectro en U.V. Se utilizaron seis "cepas" en total, tres "cepas" vacunales: "cepa" Minnesota, "cepa" PAV-1 y "cepa" PAV-250; una "cepa" de referencia: ALD; y las "cepa"s

de campo: 89-126 y 89-55. Se realizó la técnica de Tinción negativa: cada muestra se fijó con glutaraldehído y se tiñió con ácido fosfotúngstico y se observó al microscopio electrónico de transmisión. Las fracciones más importantes obtenidas, que correspondieron a los picos de absorbancia de los aminoácidos y proteínas que fueron la 8 y 9 para la mayoría de las "cepas". En las fracciones del gradiente: la "cepa" Minnesota, que tuvo absorbancia a 245.86 nm, en los otros tres "picos" de absorbancia 284 nm, que pertenecieron a la fracción 8 y 9 del gradiente, se observaron partículas virales; La fracción 8 y 9 de "cepa" PAV-1, que presentó absorbancia a 242.54 nm y otra a 279.71 nm, se pudieron observar partículas virales. La "cepa" PAV-250 tuvo una fracción que absorbe a 246.20 nm y otra a 282.28 nm, en ambas se observaron partículas virales; La "cepa" de referencia ALD, que presentó en la fracción 9 y 10, con tres picos con absorbancia 255.28 a 298.57 nm, se observaron partículas virales. Las "cepas" de campo 89-126 y 89-55 mostraron en una con el BE un fracción de 236 y otro de 280.57; mientras que la otra el BE reveló una "meseta" de 264.28 a 298.57, dos "picos" de 243.07, de 280.57 y dos de 239.42, observándose virus en las fracciones 8 y 9. Se determinaron partículas completas, en fase de destrucción, observándose péplomeros alrededor del núcleo, ya que la envoltura está fuertemente adherida a la cápside, toda la partícula se observó con un perfil icosaédrico aparente. Estas partículas solo se observaron en las fracciones 8 y 9 de la "cepa"s vacunales: Minnesota, PAV-1, PAV-250, y de las de campo: 89-126 y 89-55, y en la fracción 9 y 10 de la "cepa" de referencia ALD. La técnica que se utilizó para visualizar las partículas que la tinción negativa, observándose partículas virales completas, incompletas y péplomeros.

Se estudiaron por electroforesis las proteínas y glicoproteínas del VFPC con la finalidad de encontrar diferencias entre las "cepas" de referencia, vacunales y de campo; además se investigaron por medio de la técnica de inmunotransferencia, con sueros de algunos lugares de la República Mexicana, con el objeto de detectar el reconocimiento de estas proteínas por sueros de cerdos de diferentes "status" inmunológico. Mediante las pruebas de electroforesis y las tinciones realizadas se observaron bandas bien definidas; con nitrato de plata se lograron visualizar bandas anteriormente y no reportadas en la bibliografía, entre las que se encuentran las glicoproteínas E1 y E2, además la proteína de cápside y la proteína de 31K. Se observaron proteínas de alto peso molecular en todas las "cepas". Los pesos moleculares se calcularon a partir de la regresión lineal, con los datos de los Rf(s) de los pesos moleculares de las proteínas controles; y posteriormente se correlacionaron los Rf(s) de cada muestra, para calcular su PM. Por otro lado se realizó la tinción también con Concanavalina A-peroxidada para detectar glicoproteínas. Con respecto a los resultados de

inmunotrasferencia, realizados con los sueros contra el VFPC, provenientes de las diferentes zonas del país; y con respecto al porcentaje de animales positivos, se observó que: Sonora tuvo 10 animales positivos un total de 21 (47.62%); Guanajuato 11 animales de 22 (50%); Yucatán 9 animales de 23 (39.13); de los animales desafiados, 11 animales de 18 (61.11), y finalmente de los controles 0 de 3 (0%), fueron positivos. Con respecto a los sueros de Sonora, no se encontró una respuesta asociada a las "cepas" patógenas de campo, exceptuando los sueros donde se encontró respuesta solamente en contra de las bandas de 23Kd y 51Kd, que correspondieron a proteínas comunes a todas las "cepas" vacunales. asó como las de referencia; sin embargo, se encontraron reacciones aisladas en contra de fracciones de 210 y 219 Kd, las cuales no se encuentran reportadas con anterioridad. Con respecto a los sueros del Edo. de Guanajuato, se encontró una reacción importante contra: una de las "cepas" patógenas de campo, a las 2 vacunales y a la de referencia. Con respecto a los sueros de Yucatán las bandas fueron positivas moderadamente en contra de las "cepas" de campo. Estos resultados nos muestran que los sueros que reaccionaron a las "cepas" 3 y 4 de campo, no reaccionaron de igual manera a la de referencia y a las vacunales, esto puede descartar la posibilidad de que las "cepas" de campo sean "cepas" vacunales; mientras que la cepa a la que más reaccionaron los sueros fué a la cepa 5 (vacuna-PAV-250). Se encontraron varias bandas no reportadas con anterioridad. El pérfil electroforético de las "cepas", se encontraron proteínas que al parecer son propias de las "cepas" de campo. Por lo que esta información puede ser de vital importancia para tomarlas como marcadores y poder diferenciar anticuerpos vacunales, de anticuerpos infectantes, lo cuál podría ser investigado en trabajos posteriores.

7. BIBLIOGRAFIA

Biront, P. Leunen J, Depierreux R., Vandeveld A, Pastoret P.P., Dewaele A (1983): La peste porcine classique, diagnostic, transmission et prphylaxie. Ann Med Vet (127):547-563.

Bradford, M.N., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microquantities of protein. Anal. Biochem.72, pp.248.

Comité en Fiebre Porcina Clásica. 1994 "Fiebre Porcina Clasica" Investigaciones Actuales: Necesidades y Perspectivas para el diagnóstico. Memorias de la tercera reunión anual del Consejo Tecnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal, pp 222.

FAO, 1993. Aislamiento Viral e Inmofluorescencia. Manual de Técnicas de Diagnóstico Viroológico. Red de Cooperación Técnica. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, pp. 12-44.

Kamolsiriprichaiporn, S., Morrissy, C.J. and Westbury, H., 1992. A comparison of the pathogenicity of two strains of hog cholera virus. 2 Virological Studies. Australian Veterinary Journal 69:10, pp 245-248.

Kresse, B.S., Stewart, W., Carbrey, E., Snyder, B., 1976. Sensitivity of swine buffy coat culture to infection with Hog Cholera Virus. Am J. Vet. Res. Vol. 37 No. 11, pp.1315-1318.

Launis, M. Aynaud, J.M., Corthier G., 1972. Peste porcine classique: Propriétés d'un clone (souche Thiverval) isolé en culture cellulaire á basse temperature. Application dans la vaccination. Rev Med Vét (123):1537-1554.

Leunen, J, Strobbe, R., 1977. Capacity of attenuated swine fever vaccines to prevent virus carriers in the vaccinated pigs after contact with field virus. Arch Exp. Vet. Med (31):533-537.

Liess B, Röder, B., Eife K, Hirschert, K, Berger J, Bachmann, C., 1975. Untersuchungen über die Europäische Schweinwenepest. V. Ermittlung inapparent infizierten Schweine in der Ferkelerzeugenbeständen in drei Ortschaften. Berl Munch Tierärztl Wschr (88)397-409.

Mendoza, E.S., Correa, G.P., Hernández, B.E., y Ciprián, A.C., 1992. Perspectiva de un Método de diagnóstico serológico rápido para la FPC. XXVII Congreso Nacional AMVEC, Acapulco, Gro. pp. 54.

Mendoza, E.S., Correa, G.P., Ayala, G., Hernández, B.E. y Ciprián, A.C., 1994. Biological differences among field reference and vaccinal strains of hog cholerae virus. Proc. Int. Pig. Vet. Congr, Bangkok, Thailandia, pp. 83.

Nettles, V., Corn, J., Erickson, G., and Jessup, D., 1989. A survey of wild swine in the United States for evidence of hog cholera. Journal of Wildlife Diseases 25(1) pp61-65.

Oláh P., Palatka, Z., 1967. Immunobiological study of lapinized Hog Cholera virus strains. Acta Vet. Acad Sci Hung (17), pp239-247.

Rovozzo, G., Burke, C. 1973. A Manual of Basic Virological Techniques. Prentice Hall. PP.38-62.

Sasahara, J., Kumagai, T., Shimizu, Y., Furuuchi S., 1969. Field experiments of Hog Cholera live vaccine prepared in guinea pig kidney. Nat Inst Anim Health Quart (9):83-91

Terpstra, C, Robijns K.G., 1977. Experience with regional vaccination against Swine Fever in enzootic areas for limited periods using C-strain virus. Arch Exp. Vet. Med. (31):533-576

Terpstra, C., 1977. The immunity against challenge with Swine Fever virus of piglets from sows vaccinated with C-strain virus. Tijdschr Diergeneesk (102):1293-1298.

Terpstra, C., 1982. Control of Swine Fever in enzootic areas by regional vaccination for limited periods using C-strain virus. Proc. Int. Pig. Vet. Congr, Mexico City (7):127.

Terpstra, C; Bloemradd, M. and Gielkens, A.L.(1984). The neutralizing peroxidasa-linked assay for detection of monoclonal antibodies.in Epitopes on structural proteins of Hog Cholerae (Swine Fever) virus. Vet Microbiol 9: 113-120.

Terpstra, C., 1988. Epizootiology of Hog Cholera. Liess, B: Classical Swine fever and Related Viral Infections. Martinius Nijhorff Publishing, Boston, pp 201-216.

Van Bekkum, J.G., 1976. Impact control programs on the epizootiology of the disease in the field. In: CEC seminar on "Diagnosis and epizootiology of classical Swine Fever". Amsterdam, EUR 5486, pp. 211-229.

Wensvoort, G. Terpstra, C., Boonstra, J., Bloemraad, M. and Van Zaane, D., 1986. Production of monoclonal antibodies against Swine Fever virus and their use in laboratory diagnosis. Veterinary Microbiology 17, 129-140.

Wensvoort, G., Bloemraad M y Terpstra C., 1988. An Enzyme Immunoassay emploting monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to Classical Swine Fever virus. *Veterinary Microbiology*, 17: 129-140.

Wensvoort, G. y Terpstra, C., 1988. Bovine viral diarrhoea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. *Research in Veterinary Science* 45, pp 143-148.

Wensvoort, G., 1989. Epitopes on structural proteins of Hog Cholera (Swine Fever) virus. Thesis doctor. Utrecht, March.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Kluyver, E.P., Kragten, C. and Warnaar, J.C., 1989. Characterization of pestivirus strains with monoclonal against Hog Cholera Virus in Epitopes on structural proteins of Hog Cholerae (Swine Fever) virus. Thesis. p. 41-50.

Wood,L., Brockman, S., Harkness, J., Edwards, S., 1988. Classical Swine Fever: Virulence and tissue distribution of a 1986 English isolate in pigs. *Veterinary Record*, 122. pp. 391-394.