

DETECCIÓN DE LAS INFECCIONES CONGÉNITAS Y PERSISTENTES POR EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA CLÁSICA*

**De la Rosa ZR¹, Mogollón JD², Rincón MA³, Preciado P⁴,
Cepeda BM⁵, Ruiz S^{6**}**

RESUMEN

Se estudió mediante la técnica de RT-PCR anidada, las infecciones virales persistentes y congénitas causadas por el virus de la Peste Porcina Clásica (PPC) en muestras de tejidos de casos positivos de campo, tonsilas de cerdas gestantes descartadas con sus respectivas camadas y tonsilas de cerdas de descarte. Para la detección del ácido nucleico se emplearon oligonucleótidos para el gen de la glicoproteína E2, los cuales amplifican un fragmento de 270 pares de bases. A continuación, los amplificados fueron analizados mediante la técnica de RFLPs utilizando las enzimas de restricción *AvaII*, *BanII* y *PvuII* y se clasificaron antigenicamente las muestras positivas con un panel de anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa. Se logró la amplificación del fragmento del gen de la glicoproteína E2 en 14 casos de campo de los 20 analizados. De igual modo, se obtuvo la amplificación en ocho muestras de tonsilas de cerdas, de las cuales seis amplificados pertenecían a las tonsilas obtenidas de las cerdas gestantes y dos de las tonsilas de cerdas de descarte. Al analizarse los casos positivos por RT-PCR anidada con el panel de anticuerpos monoclonales, estos fueron clasificados como cepas de campo. Mediante el análisis de los amplificados con las enzimas de restricción, se logró agrupar con la enzima *AvaII* los amplificados en el grupo 4 y con la enzima *PvuII* en el grupo 1; mientras que con la enzima *BanII*, hubo digestión parcial o nula de los productos de amplificación, lo que imposibilitó el agrupamiento de estos, a los patrones establecidos por esta enzima.

Palabras Claves: Peste Porcina Clásica, RT-PCR, Infecciones Persistentes y Congénitas.

Contribución del Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario Instituto Colombiano Agropecuario ICA-CEISA

** Respectivamente: 1. Bacterióloga Msc Fundación Santa Fe. 2. Médico Veterinario PhD UNAL. 3. Médico Veterinario Msc ICA. 4. Médico Veterinario ICA. 5. Médico Veterinario ICA. 5. Bacterióloga ICA.

E-mail: direccion.ceisa@ica.gov.co

DETECCION OF CONGENITAL AND PERSISTENT INFECCION OF THE CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS *

SUMMARY

Persistent infections and congenital disease caused by Classical Swine Fever Virus (CSFV) were studied using RT-nested PCR. For this purpose, tissues samples collected from positive field cases, tonsils from discarded gestating sows with their litter and other tonsils also from discarded sows were examined. In order to detect the viral nucleic acid a set of oligonucleotides primers directed to E2 gene were used to amplify a fragment of 270pb. Then, those amplified were cut with restriction enzymes to generate RFLP's. Positives samples were antigenically studied by using monoclonal antibodies conjugates with peroxidase. The fragment belonged to E2 gene was amplified in 14 out of 20 field cases analyzed. Similarly, the viral genome was also detected in 8 tonsils sows samples, 6 of which belonged to gestating sows and the other 2 to discarded sows. The positive samples by RT-PCR were classified as field strains by monoclonal antibody. The PCR amplified were grouped within group 4 using the *AvaII* enzyme and within group 1 by digestion with enzyme *PvuII*. It noticed a partial digestion when using *BanII* enzyme. The epidemiological significance of these findings is discussed.

Key Words: RT-PCR, CSFV, congenital infections

INTRODUCCIÓN

La peste porcina clásica, es una enfermedad viral altamente contagiosa del cerdo y económicamente importante para la industria porcícola en el mundo, se caracteriza por fiebre alta y hemorragias. La enfermedad puede cursar en forma aguda, crónica, subclínica o inaparente; dependiendo de la virulencia de la cepa, la dosis infectante del virus, así como de la edad, estado nutricional e inmunitario del cerdo (Hofmann y col., 2000).

El virus de la peste porcina clásica, es un pequeño virus ARN envuelto que pertenece al género pestivirus de la familia *Flaviviridae*, dentro de este género se incluyen además el virus de la diarrea viral

bovina (DVB) y la enfermedad de las fronteras (EF) (Becher y col., 1999).

En el ámbito nacional el sector porcícola ha realizado en los últimos años importantes actividades de fomento con el fin de mejorar la rentabilidad de la industria. Sin embargo, una de las grandes limitaciones es la presencia de enfermedades de tipo endémico como la peste porcina clásica, que no sólo afecta la productividad de las granjas sino que limita las oportunidades para participar en los mercados internacionales de carne y subproductos de origen porcino.

Teniendo en cuenta que los planes de erradicación se deben fundamentar sobre un diagnóstico preciso que elimine la posibilidad de falsos positivos o negativos; se hace imprescindible utilizar técnicas de biología molecular, para el reconocimiento de porcinos infectados con cepas de baja virulencia, las cuales son difíciles de reconocer clínicamente o a través de pruebas convencionales, lo que constituye un foco residual del virus en el campo, siendo un riesgo para los propósitos de erradicación (Harding y col., 1996).

El objetivo del presente trabajo fue detectar infecciones congénitas y persistentes causadas por el virus de la Peste Porcina Clásica por medio de las técnicas de Inmunofluorescencia Directa (IFD), Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (RT-PCR anidada), Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs) e Inmunoperoxidasa Directa en muestras de tonsila obtenidas a partir de cerdas de descarte, tejidos fetales colectados de cerdas gestantes llevadas a matadero, así como de casos positivos remitidos para el diagnóstico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

El estudio de detección de la infección aguda se realizó en tejidos tales como: tonsila, ganglio, bazo y riñón de un animal inoculado experimentalmente por la vía intramuscular con 100DI₅₀ de una cepa del virus de la PPC (cepa Santander) empleada por el ICA para los estudios de evaluación de la vacuna. Además, se procesaron muestras de tonsila, ganglio, riñón y bazo de 20

casos de campo positivos a PPC por las técnicas de Inmunofluorescencia Directa e histopatología, las cuales fueron remitidas al Laboratorio Nacional de Diagnostico del ICA entre enero de 1997 y Junio del 2002. Para el estudio de las infecciones persistentes se colectaron las tonsilas de 49 cerdas gestantes de descarte y 158 cerdas, llevadas a las plantas de sacrificio de los frigoríficos de San Martín y Guadalupe en la ciudad de Bogotá. Las primeras fueron colectadas en el año 2000 y las segundas en el 2001 y conservadas a -70°C. Para el estudio de las infecciones congénitas se colectaron las camadas de las 49 cerdas de descarte gestantes muestreadas en el año 2001; en este experimento se procesaron muestras fetales de tonsila, bazo, ganglio y riñón. En fetos menores de 8 cm se hicieron pooles de órganos para lograr la cantidad apropiada de la muestra.

Inmunofluorescencia directa

Para la detección del antígeno viral de la PPC se utilizó un conjugado policlonal para pestivirus marcado con fluoresceína obtenido del laboratorio Lelystad (Holanda). Se realizaron cortes de tejido en criostato¹, de 3µ de grosor los cuales se procesaron siguiendo la metodología previamente estandarizada en el Laboratorio Nacional de Diagnostico Veterinario del ICA-CEISA, Bogotá.

Técnica RT-PCR anidada

Para la extracción del ARN viral se utilizó, el reactivo TRIZOL² adaptado según el método descrito por Chomczynsky y Sacchi (1987) y siguiendo las indicaciones del productor (Hofmann y col., 2000).

Criostato-Minotome. International Equipment Company-Division Damon. USA
Gibco BBL. Gaithersburg MD. USA

La síntesis del cADN del genoma viral de la Peste Porcina Clásica, fue realizada en un volumen de 20µl de una mezcla que contiene 5µl de ARN, 1µl de Hexameros al azar³ (30ng/ml), 1µl de dNTP's³ (10µM), 4 µl de buffer 5X-RT³, 0.5 µl de RNAsin³ (40U), 0.5 µl de la enzima transcriptasa reversa del Virus de la Leucemia murinica Moloney M-MLV³ (200U) y 8 µl de Agua-DEPC. El ARN viral fue inicialmente denaturado con los hexameros al azar a 70°C por 5 minutos y posteriormente se adicionó la mezcla de la transcripción reversa y fue llevada al termociclador GeneAmp PCR System 2400⁴ a 42°C por 1 hora, luego a 94°C por 5 y llevada finalmente a 4°C.

Para la amplificación del cADN se utilizaron 2 pares de oligonucleotidos del gen de la glicoproteína E2⁵, descritos por Paton y colaboradores, los cuales tienen la siguiente secuencia: oligonucleotidos externos E2a: (5' AGR CCA GAC TGG TGG CCN TAY GA 3') y E2b: (5' TTY ACC ACT TCT GTT CTC A 3') los cuales amplifican un fragmento de 671 nucleótidos entre E1-E2 y oligonucleotidos internos E2c: (5' TCR WCA ACC AAY GAG ATA GGG 3') y E2d: (5' CAC AGY CCR AAY CCR AAG TCA TC 3') que amplifica un fragmento del gen de la glicoproteína E2 de 270 nucleótidos.

Luego se adicionaron 2µl de cADN a una mezcla que contenía 5µl de buffer 10X³, 3µl de MgCl₂³ (25µM), 1µl de dNTP's³ (10µM), 1µl de los cebadores externos de cada región en diferentes reacciones,

(10µM), 0.2µl de Taq Polimerasa³ (5U) y 36.8µl de Agua-DEPC, para un volumen final de 50 µl.

Para las reacciones de amplificación se utilizó un termociclador GeneAmp PCR System 2400⁴, programado a 20 ciclos para la primera ronda, consistente de 1 minuto de denaturalización a 94°C, 1 minuto de anillamiento a 50°C y 1 minuto de extensión a 72°C.

La segunda ronda de la PCR, se llevo con las mismas condiciones de la premezcla, utilizando 2µl de los productos amplificados de la primera ronda, con los siguientes parámetros de amplificación, denaturación a 94°C durante 1 minuto, anillamiento a 60°C durante 1 minuto y la extensión a 72°C durante 1 minuto, durante 30 ciclos. En ambas rondas de amplificación se realizó una extensión final durante 10 minutos a 72°C.

El cADN amplificado fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con 1.5 µl de Bromuro de Etidio⁶ (10mg/ml). Los productos de la PCR fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta⁷ Como marcador de peso molecular se utilizó 2µl de 100pb DNA leader³.

Técnica de Inmunoperoxidasa Directa

Para la clasificación y diferenciación de los casos positivos, se empleó un panel de anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa de rábano picante los cuales fueron obtenidos en el laboratorio de Lelystad

³ Promega Corporation. USA

⁴ Perkin Elmer. USA

Gibco Life Technologies. USA

ICN. USA

Sigma Chemical Company. USA

(Holanda); Para esta técnica, se hicieron cortes en criostato¹ de riñón y tonsilas, los cuales tenían un grosor de 3µ. Las muestras fueron procesadas siguiendo la metodología descrita por el laboratorio productor.

La presencia de gránulos pardos rojizos en el citoplasma de las células epiteliales de las criptas de la tonsila y tubulos ascendentes del asa de henle en el riñón, indicaron el reconocimiento del virus por los respectivos conjugados, considerándose esta reacción como una prueba positiva.

Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs)

Para determinar las diferencias en el patrón de pares de bases en los productos obtenidos por la RT-PCR anidada, se realizó la digestión de los amplificadores obtenidos del gen E2, utilizando para ello las enzimas *AvaII*³, *BanII*³ y *PvuII*³, descritas por Parchariyanon y col. (2000).

Para realizar este ensayo se tomaron 5µl del producto de amplificación del gen E2, se le adicionó 2µl de Buffer 10X³, 0.2µl de Suero Bovino Acetilado (BSA)³ (1mg/ml), 0.2 µl de la enzima correspondiente (*AvaII*, *BanII* y *PvuII*) y 12.6µl de agua-DEPC, para un volumen final de 20µl. A continuación se homogenizaron y se incubaron a 37°C durante 3 horas en un baño serológico⁸; después de la incubación se adicionó a la mezcla 2µl de buffer de carga 6X³ para realizar la electroforesis.

Los patrones de RFLP para cada enzima fueron establecidos teniendo en cuenta los tamaños de las bandas descritas por estos autores.

Las muestras fueron corridas en geles de agarosa al 4% con Nusieve⁹ 3:1 en buffer TBE 0.5X a 95V durante 90 minutos, utilizando como referencia de tamaño el marcador de peso molecular de 25pb DNA Step Ladder³.

RESULTADOS

Detección de las infecciones agudas

Inicialmente se logró la estandarización de la técnica de RT-PCR anidado en las muestras de tejidos obtenidas del animal infectado experimentalmente con la cepa Santander de PPC usada como referencia nacional. Mediante esta estandarización se determinó la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos utilizados determinándose una temperatura de anillamiento para oligonucleótidos externos de 50°C y de 60°C para los oligonucleótidos internos; así como la concentración óptima de los oligonucleótidos de 10µM.

En 14 de los 20 casos positivos analizados, se obtuvo la amplificación de un fragmento de 270pb del gen de la glicoproteína E2 en todos los tejidos analizados (Tabla 1). Siete de estos casos fueron colectados en el periodo comprendido entre 1997-2001, uno de Antioquia, tres de Cundinamarca y tres casos de Putumayo. Los siete restantes corresponden a casos detectados en el departamento Cundinamarca durante el primer semestre del 2002 (Fig. 1).

Mediante el análisis de los 14 productos de amplificación por medio de la técnica de RFLPs se obtuvo con la enzima *AvaII* tres fragmentos de 132, 89 y 49 pb correspondiente al grupo cuatro y para la

⁸ Memmert. Schwabach. Alemania

⁹ FMC Bioproductos. Rockland, Maine. USA

Tabla1. Resultados de la Inmunofluorescencia Directa, RT-PCR anidado, RFLPs e Inmunoperoxidasa Directa de los casos de campo colectados entre 1997-2002.

Depto.	N° Casos estudiados	N° Casos positivos por IFD	N° Casos positivos por RT-PCR anidado	Patrones de RFLPs			N° Casos positivos por IMP
				Avall	PvuII	BanII	
Antioquia	1	1	1	4	1	DP	1
Cund/marca	10	10	10	4	1		8
Putumayo	7	7	3	4	1		1
Valle del Cauca	1	1					
Nario	1	1					
Total	20	20	14				10

DP: Digestión parcial

enzima PvuII un fragmento de restricción de 270pb. Con la enzima BanII no hubo digestión en todos los productos amplificados (Tabla 1).

A través de la técnica de Inmunoperoxidasa Directa se clasificaron diez casos como cepas de campo, uno de Antioquia, ocho de Cundinamarca y uno de Putumayo (Tabla 1).

Detección de las infecciones persistentes

A través de la técnica de Inmunofluorescencia Directa, se detectaron cinco muestras positivas dentro de las tonsilas colectadas en el año 2000 y tres de las amígdalas colectadas en el año 2001, las cuales eran procedentes de granjas ubicadas en los departamentos de Antioquia (4), Boyacá (1), Cundinamarca (1) pero en dos animales no se pudo establecer su procedencia (Tab. 2 y 3).

A partir de las muestras de amígdalas obtenidas de cerdas gestantes descartadas recolectadas en el año 2000, se logró la amplificación del fragmento del gen de la glicoproteína E2 en seis de las 49 muestras analizadas, y de las 158 tonsilas colectadas en plantas de sacrificio durante el año 2001, se obtuvo la amplificación en dos muestras. Estas cerdas de descarte, eran procedentes

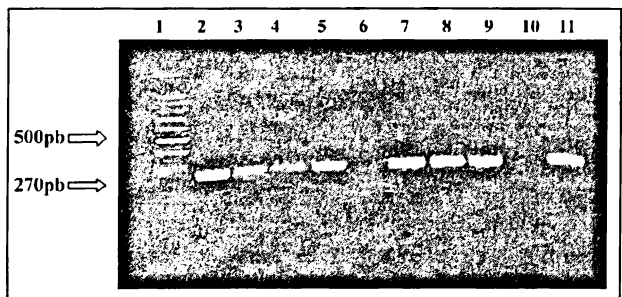


Figura 1. Producto de amplificación por RT-PCR anidado del virus de la peste porcina clásica de los casos de campo positivos del año 2002 con el gen E2. Línea 1, marcador de tamaño de 100pb. Línea 2, caso 3847. Tena (Cundinamarca). Línea 3, caso 4191. San Antonio de Tequendama (Cundinamarca). Línea 4, caso 4438 Zipaquirá (Cundinamarca). Línea 5, caso 4766 San Antonio de Tequendama (Cundinamarca). Línea 6, caso 5292 Yopal (Casanare). Línea 7, caso 4650 Zipaquirá (Cundinamarca), muestra de suero. Línea 8, caso 5160 La Calera (Cundinamarca). Línea 9, caso 3764 Zipaquirá (Cundinamarca). Línea 10, control negativo (Agua-DEPC). Línea 11, control positivo.

Tabla 2. Resultados de la Inmunofluorescencia Directa, RT-PCR anidado, RFLPs e Inmunoperoxidasa Directa para la detección de las infecciones persistentes de las muestras de tonsila colectadas en el año 2000

Depto	Nº de muestras Analizadas	Nº Muestras positivas por IFD	Nº Muestras positivas por RT-PCR	Patrones de RFLPs			Nº Muestras positivas por IMP
				Avall	PvuII	BanII	
Antioquia	2	1	1	4	1	DP	
Boyac	8	1	2	4	1	DP	
Cundinamarca	22	1					
Santander	9						
Otros	8	2	3	4	1	DP	
Total	49	5	6				0

DP: Digestión parcial

de granjas ubicadas en los departamentos de Antioquia (2), Boyacá (2) y Cundinamarca (1); sin embargo en tres animales no se pudo establecer su origen.

Al analizar los productos de ampli-ficación de estas ocho muestras mediante la técnica de RFLPs se obtuvo con la enzi-ma AvaII, tres fragmentos de 132, 89 y 49 pb siendo clasificados en el grupo cuatro, con la enzima PvuII un fragmento de res-tricción de 270pb correspondiente al grupo uno. Sin embargo con la enzima BanII no hubo digestión o fue parcial (Tablas 2 y 3).

Mediante la técnica de Inmunoperoxidasa Directa se logró clasifi-car como cepa de campo, una muestra posi-tiva por RT-PCR anidada, proveniente de Antioquia la cual había sido colectada en el 2001 (Tabla 3).

Detección de las infecciones congénitas

No se logró detectar el antígeno viral mediante la prueba de Inmunofluorescencia Directa, ni amplificar el genoma viral a tra-vés de la técnica de RT-PCR anidada en los

Tabla 3. Resultados de la Inmunofluorescencia Directa, RT-PCR anidado, RFLPs e Inmunoperoxidasa Directa para la detección de las infecciones persistentes de las muestras de tonsila colectadas en el año 2001.

Departamento	Nº de muestras analizadas	Nº de muestras positivas por IFD	Nº muestras positivas por RT - PCR anidado	Patrones de RFLPs			Nº de muestras positivas por IMP
				Avall	PvuII	BanII	
Antioquia	78	3	1	4	1		1
Boyac	15						
Cundinamarca	33		1	4	1		
Meta	2						
Santander	14						
Tolima	1						
Otros	15						
Total	158	3	2				1

DP: Digestión parcial

tejidos de tonsilas y riñón fetales de las 49 camadas examinadas.

DISCUSIÓN

La presente investigación permitió la estandarización de la técnica de la RT-PCR anidada para la detección del virus de la peste porcina clásica en muestras de tonsila de cerdas de descarte, así como en tejidos obtenidos de animales con infección aguda.

En los estudios realizados por Lorena J y colaboradores, 2001 sobre la persistencia de cepas de baja virulencia se obtuvo la amplificación del fragmento del gen NS2-3 en muestras de tonsila de animales inoculados experimentalmente, resultados similares se obtuvieron en el presente trabajo utilizando cebadores que amplifican un fragmento del gen de la glicoproteína E2, el cual tiene un segmento con un grado de variabilidad alta lo cual ha permitido la realización de estudios filogenéticos sobre este virus (Paton y col., 2000; Van Rijn y col., 1997).

La amplificación de un fragmento del gen E2 del virus de PPC en las muestras de tonsilas de cerdas de descarte, permitió demostrar la presencia de infecciones virales persistentes en animales adultos de las granjas porcinas comerciales del país. Este resultado, sugiere la existencia de infecciones, asociadas a cepas del virus de la Peste Porcina Clásica de baja virulencia, que pueden estar ocasionando estados crónicos o atípicos de la enfermedad, no diagnosticados clínicamente (Gomez-Tejedor y Valenciano, 1994; Van Oirschot, 1980).

Desde el punto de vista epidemiológico este hallazgo es muy importante ya que la presencia de animales infectados en forma persistente conlleva a que el virus perma-

nezca en forma inaparente dentro de la granja y pueda ocasionar un brote agudo o infecciones recurrentes principalmente si hay una variación en su estructura antigénica o cuando el estado inmunitario de los animales de la granja es deficiente. Por otro lado, estas infecciones persistentes están asociadas a infecciones congénitas, ya que la madre portadora del virus es capaz de infectar al feto a través de la placenta; llevando a estados de inmunotolerancia o al nacimiento de lechones aparentemente sanos pero que desarrollan el Síndrome de retraso de crecimiento (Collins y col., 1999; Dahle y Liess, 1992; Van Oirschot, 1980).

La aplicación de técnicas inmunológicas, como la Inmunoperoxidasa directa, para la detección y clasificación de los pestivirus mediante el uso de anticuerpos monoclonales, permite determinar el tipo de cepa presente en una muestra, e inferir sobre el tipo de variante antigénica que está circulando en una granja o región. De acuerdo con los resultados de este estudio, su uso en cortes de tejido por congelación es particularmente eficiente en casos agudos de campo, sin embargo para la detección de infecciones persistentes en tonsilas de cerdas de descarte su aplicabilidad se ve más limitada probablemente por la escasa cantidad del antígeno viral en el tejido analizado o que cualquier cambio autolítico, que enmascara la presencia de los gránulos pardos rojizos que determinan que la prueba es positiva (Narita M y col., 2000; Martín de la Mulas y col., 1997). Además, es posible que los procesos de congelación y descongelación de las muestras hayan ocasionado alteraciones morfológicas o alterado el antígeno viral limitando su detección mediante esta técnica. Una opción en el caso de las muestras de tonsilas positivas por PCR, sería intentar su aislamiento en cultivos celulares específicos y luego realizar esta técnica sobre culti-

vos celulares infectados (Kaden y col., 1999; Koenen y col., 1998).

Con relación a los resultados obtenidos con la técnica RFLP realizada a partir de los amplificados del gen de la glicoproteína E2, no se logró agrupar los productos, de acuerdo con los patrones establecidos por Parchariyanon y col (2000). Con los resultados de las enzimas AvaII y PvuII se logró solo una aproximación al genogrupo 1.1, pero al no haber digestión con la enzima BanII, resultó imposible corroborar esta clasificación. Una hipótesis, es que los sitios de corte de la enzima BanII descritos para las cepas asiáticas sean diferentes para los amplificados colombianos y por lo tanto no se logran los mismos patrones descritos; es posible que la secuenciación de estos fragmentos ayude a explicar por que no se pudo cortar con la enzima BanII.

Finalmente, para el desarrollo de un programa oficial de erradicación de la PPC, se requiere contar con técnicas que permitan detectar las infecciones persistentes y congénitas, en las cuales el título viral es bajo, siendo una limitante para la aplicación de los métodos rutinarios de laboratorio. Con la estandarización de métodos moleculares para el estudio de las infecciones virales agudas y persistentes se cuenta en el país con pruebas diagnósticas más sensibles y específicas como apoyo al diagnóstico rutinario y a las acciones de vigilancia epidemiológica de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Instituto Colombiano Agropecuario ICA-CEISA, a la Asociación Colombiana de Porcicultores y al Fondo Nacional de la

Porcicultura por su apoyo para la realización de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Becher P, Orlich M, Kosmidou A, König M, Baroth M, and Thiel HJ. Genetic diversity of pestiviruses: Identification of novel groups and implications for classification. *Virology* 262:64-71, 1999.
2. Collins ME, Desport M, and Brownlie J. Bovine viral diarrhea virus quasispecies during persistent infection. *Virology* 259:85-98, 1999.
3. Dahle J and Liess B. A review on classical swine fever infections in pigs: epizootiology, clinical disease and pathology. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 15: 203, 1992.
4. Gómez-Tejedor, Ortiz C y Valenciano Martínez-Orozco M. Epizootiología y Patogenia de la Peste Porcina Clásica. *Aula Veterinaria* 22:11-17, 1994.
5. Harding MJ, Prud'homme I, Gradil CM, Heckert RA, Riva J, McLaurin R, Dulac GC, and Vydelingum S. Evaluation of nucleic acid amplification methods for the detection of hog cholera virus. *J Vet Diag Invest* 8:414-419, 1996.
6. Hofmann MA, Thur B, Liu L, Gerber M, Stettler P, Moser C, and Bossy S. Rescue of infectious classical swine fever and foot-and-mouth disease virus by RNA transfection and virus detection by RT-PCR after extended storage of samples in Trizol. *J of Virological Methods* 87:29-39, 2000.
7. Kaden V, Steyer H, Strebelow G, Lande E, Hubert P, and Steinhagen P. Detection of low-virulent classical swine fever virus in blood of experimentally infected animals: comparison of different methods. *Acta Virologica* 43:373-380, 1999.
8. Koenen F, Vanderhallen H, Laevens H, and Deluyker H. Serological and virological evolution of classical swine fever diagnosis after an experimental infection simulating field conditions. *Proceedings of the 15th IPVS Congress*, Birmingham, England. Pp. 191, 1998.
9. Lorena J, Barlic-Maganja D, Lojkic M, Madic J, Grom J, Cac Z, Roic B, Terzic S, Lojkic I,

- Polancec D, and Cajavec S. Classical swine fever virus (C strain) distribution in organ samples of inoculated piglets. *Vet Microbiol* 81:1-8, 2001.
10. Martín de las Mulas J, Ruiz-Villamor E, Donoso S, Quezada M, Lecocq C, and Sierra MA. Immunohistochemical detection of hog cholera viral glycoprotein 55 in paraffin-embedded tissues. *J Vet Diagnostic Investigation* 9:10-16, 1997.
 11. Narita M, Kawashima K, Kimura K, Mickami O, Shibahara T, Yamada S, and Sakoda Y. Comparative immunohistopathology in pigs infected with highly virulent or less virulent strains of hog cholera virus. *Vet Pathol* 37:402-408, 2000.
 12. Parchariyanon A, Inui K, Pinyochon W, Damrongwatanapokin S, and Takahashi E. Genetic grouping of classical swine fever virus by restriction fragment length polymorphism of the E2 gene. *J of Virolog Methods* 87:145-149, 2000.
 13. Paton DJ, McGoldrick A, Greiser-Wilke I, Parchariyanon S, Song JY, Liou PP, Stadejek T, Lowings JP, Björklund H, and Belák S. Genetic typing of classical swine fever virus. *Vet Microbiol* 73:137-157, 2000.
 14. Van Oirschot JT. Persistent and unapparent infections with swine fever virus of low virulence. Their effect on the immune system. Thesis, Utrecht. 1980.
 15. Van Rijn P, Van Gennip HG, Leendertse CH, Bruschke CJ, Paton DJ, Moorman RJ, and Van Oirschot J.T. Subdivision of the pestivirus genus, based on envelope glycoprotein E2. *Virology* 237: 337-348, 1997.