

Peste Porcina Clásica: diagnóstico y control (Classical Swine Fever: diagnosis and control)

Pérez Rodríguez, Lester Josué y Díaz de Arce Landa, Heidý.
Grupo de Virología Animal. Dirección de Microbiología. Centro
Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).
Email: lesterjosue@censa.edu.cu

REDVET: 2008, Vol. IX, Nº 11

Recibido 27.05.2008 - Ref. prov. M013 - Revisado 11.10.08 - Ref. def. 111104_RED VET - Aceptado 30.10.08 -
Publicado 01.11.08.

Este artículo de revisión está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111108.html> concretamente en
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111108/111104.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.
Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET®
- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

RESUMEN

La peste porcina clásica (PPC) es una enfermedad con elevado potencial de transmisión que ocasiona un impacto socio-económico severo en los sistemas de producción porcina en países de casi todo el mundo, por lo que es de notificación obligatoria a la Oficina Internacional de Epizootias (OIE). El agente etiológico de esta enfermedad es el virus de la peste porcina clásica clasificado dentro del género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*. Los signos clínicos y patológicos de la enfermedad son variables y pueden ser confundidos con otras afecciones del cerdo como la peste porcina africana, el síndrome de adelgazamiento multisistémico post-destete (PMWS) y el síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS), así como con salmonellosis, pasteurellosis, y otras. El diagnóstico de laboratorio puede ser directo con la detección del virus o sus constituyentes (aislamiento viral, detección de antígenos y de ácidos nucleicos) e indirectos (métodos serológicos). En muchos países la enfermedad prevalece con riesgos de re-emergencia ante fallos en las medidas de control.

Palabras claves: peste porcina clásica; diagnóstico; control.

SUMMARY

Classical swine fever (CSF) is a highly contagious disease given the rapid dissemination of the virus within and between pig populations, outbreaks cause heavy losses in pig production in almost worldwide and therefore CSF is a notifiable disease to the Office International des Epizooties (OIE).

Classical Swine Fever Virus is the causing agent of classical swine fever diseases, this virus is classified within the genus Pestivirus in the family Flaviviridae. Clinical and pathological signs of CSF are rather variable and may be mistaken for other pig diseases like as African swine fever, porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS), bacterial (such as salmonellosis, erysipelas) and others pig's diseases. Laboratory diagnosis of CSF consists of the direct detection of the virus or its constituent parts (virus isolation, detection of antigen and nucleic acid) and the indirect detection (serological methods). In many countries where it is endemic the disease shows high prevalence and has repeatedly epizootic episodes caused by failed control measures.

Key Words: classical swine fever; diagnosis; control.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de las especies animales con mayor interés económico en Cuba se encuentra el cerdo, debido a que cuenta con un corto ciclo de explotación, alimentación omnívora, buena conversión, precocidad, alto rendimiento en canal y gran cantidad de productos derivados del mismo. En el país la crianza familiar de cerdos ha cobrado una gran importancia, debido a que su carne goza de gran aceptación popular por una tradición de consumo, además de las ventajas que ofrece su explotación. La ganadería porcina, que tiene un papel fundamental en el mejoramiento de la dieta y los ingresos de los pequeños productores, trabajadores rurales y la población en general, así como en el desarrollo de la industria del turismo, está expuesta a diversas enfermedades, algunas de ellas muy graves.

En Cuba la peste porcina clásica (PPC) luego de la gran epizootia de 1993-1997 considerada como Emergencia Nacional, no ha dejado de ser la enfermedad más importante del cerdo, que sometida a una política de vacunación está entre las actividades zoonosológicas de mayor prioridad en el país. El control efectivo de esta enfermedad depende, en gran medida, de la disponibilidad de medios y métodos para la detección e identificación de su agente causal [1]

La peste porcina clásica (PPC) es una enfermedad con elevado potencial de transmisión que ocasiona un impacto socio-económico severo en los sistemas de producción porcina tanto en países industrializados como en desarrollo de casi todo el mundo y por consiguiente es de notificación obligatoria a la Oficina Internacional de Epizootias (OIE)[ii,iii].

El agente etiológico de esta enfermedad es el virus de la peste porcina clásica que junto a las especies del virus de la diarrea viral bovina 1 (BVDV1) y 2 (BVDV2) y al virus de la enfermedad de la frontera de los ovinos (BDV) es clasificado dentro del género *Pestivirus* de la familia Flaviviridae [iv,v,vi].

Las cuatro especies de *Pestivirus* están muy relacionadas genética y antigénicamente y aunque exhiben manifestaciones clínicas definidas en sus principales hospederos, pueden infectar un rango común de especies animales. El virus de la PPC puede ser transmitido al bovino, mientras que BVDV1 y BVDV2 infectan de forma natural los cerdos, ovinos, caprinos y rumiantes salvajes y el BDV que afecta principalmente a los ovinos cruza la barrera de especies e infecta cerdos [vii]. Por lo tanto, además del virus de la PPC los cerdos pueden estar expuestos al resto de los *Pestivirus*.

Mientras que la infección por el virus de la PPC en cerdos domésticos exige estrictas medidas de control, que pueden incluir la destrucción de todo el rebaño afectado y los vecinos, las infecciones de *Pestivirus* de rumiantes en cerdos no demandan medidas inmediatas [viii]. Por esta razón y el hecho de que los signos clínicos que pueden causar estos *Pestivirus* en cerdos por ej. retardo del crecimiento y adelgazamiento, sugieren infecciones por peste porcina clásica la diferenciación rápida y confiable del virus de la PPC de las otras especies de *Pestivirus* en cerdos es de vital importancia sobre todo en regiones libres de la enfermedad [ix].

El diagnóstico de PPC está basado en el reconocimiento de signos clínicos y hallazgos post-mortem en el campo, este diagnóstico presuntivo, debido a las serias implicaciones económicas de la enfermedad y a la elevada variabilidad de los signos clínicos y lesiones que se pueden presentar debe ser confirmado de forma precisa en el laboratorio [x]. El diagnóstico de laboratorio puede ser directo con la detección del virus o sus constituyentes (aislamiento viral, detección de antígenos y de ácidos nucleicos) e indirectos (métodos serológicos) [xi].

El presente trabajo tiene como objetivo aunar gran parte del nuevo conocimiento publicado sobre la peste porcina clásica: su agente etiológico, epidemiología, patogénesis, con un mayor énfasis en el diagnóstico y control de la enfermedad. Así este material puede servir como fuente de estudio para los interesados en esta temática tan importante en la medicina veterinaria.

2. DESARROLLO

2.1 ETIOLOGÍA

La Peste Porcina Clásica (PPC) es una enfermedad infectocontagiosa viral del cerdo, tanto doméstico como salvaje, está ampliamente distribuida geográficamente, es altamente contagiosa y se caracteriza por un cuadro hemorrágico con una alta morbilidad y mortalidad en los rebaños[xii,xiii].

El agente causal es un virus ARN que pertenece al género *Pestivirus*, dentro del cual se incluyen otros virus genética y antigénicamente relacionados: el virus de la *peste porcina clásica* (PPCV), el virus de la *diarrea viral bovina* tipos 1 (BVDV1) y 2 (BVDV2), y el virus de la *enfermedad de la frontera* (BDV) los cuales causan la peste porcina clásica en cerdos y jabalíes, la

diarrea viral bovina en rumiantes domésticos y salvajes y la enfermedad de la frontera en ovinos, respectivamente^[v,vi]. Este género, anteriormente clasificado dentro de la familia *Togaviridae* por sus características morfológicas y la polaridad de su genoma, se reclasificó taxonómicamente dentro de la familia *Flaviviridae* sobre la base de la organización del genoma y la estrategia de replicación viral ^[xiv,xv,xvi,xvii,xviii].

Los *pestivirus* pueden ser citopatogénicos o no citopatogénicos en monocapas de cultivo de células. En general los aislados de PPC son no citopatogénicos, aunque recientemente se han descrito varios biotipos citolíticos ^[xix].

Debido a la presencia de lipoproteínas en su envoltura, el virus se inactiva rápidamente con solventes orgánicos, como cloroformo, éter, y con los detergentes Nonidet P-40, desoxicolato y saponina ^[xii]. Las enzimas proteolíticas como la tripsina ejercen una inactivación moderada de la infectividad, que se afecta además por la acción de radiaciones ultravioletas ^[xx].

El virus de la PPC es muy estable en un amplio rango de pH que va desde 5 hasta 10, a temperaturas de -20°C y -70°C y liofilizado [**Error! Marcador no definido.**^{xx}]. La inactivación de este agente viral se alcanza con hipoclorito al 2%, cresol al 6%, fenol al 5% e hidróxido de sodio al 2% ^[xxi]. *In vitro*, se replica en varias líneas celulares de origen porcino como las de riñón de cerdo *PK15* y *SK6*, linfoma porcino *38A1D* y en cultivos primarios de riñón porcino, testículo de ratón y cerdos, células porcinas embrionarias, cultivos primarios de células de riñón de cobayo y conejo ^[xii,xxii]. Comparado con otros virus como la enfermedad vesicular del cerdo, *PPCV* se multiplica con bajo título ^[xxiii].

2.1.1 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA VIRAL

El genoma viral es una molécula ARN de simple cadena, polaridad positiva, coeficiente de sedimentación de 40-45S y una longitud de aproximadamente 12.284 nucleótidos ^[xxiv]. Contiene un único marco abierto de lectura (Open Reading Frame del inglés **ORF**), flanqueado por dos regiones no codificantes altamente conservadas (5'NCR y 3'NCR), que se traduce en una poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos la cual, por posteriores procesamientos co- y post- traduccionales rinde 11 proteínas, cuatro estructurales, que incluyen la proteína C, la Erns, E1 y E2 y ocho no estructurales (N^{PRO}, NS3,P7, NS2, NS4A-B, NS5A-B) Figura 2.1 ^[xix,xxiv,xxv].

La región 5'NCR carece de estructura tipo I Cap, contiene entre 372-385 nucleótidos aproximadamente, que conforman una estructura secundaria de lazos, los cuales originan tres dominios Ia, Ib, II y III, que son importantes para la replicación viral. El extremo 3' NCR carece de cola de poly A, posee entre 229-273 nucleótidos que forman dos lazos complementarios (*harpins del inglés*), seguidos de una región de monocatenaria, estas conformaciones de estructura primaria y secundaria

funcionan como elementos en *CIS* relacionados con el proceso de iniciación en la síntesis de la cadena negativa [xix].

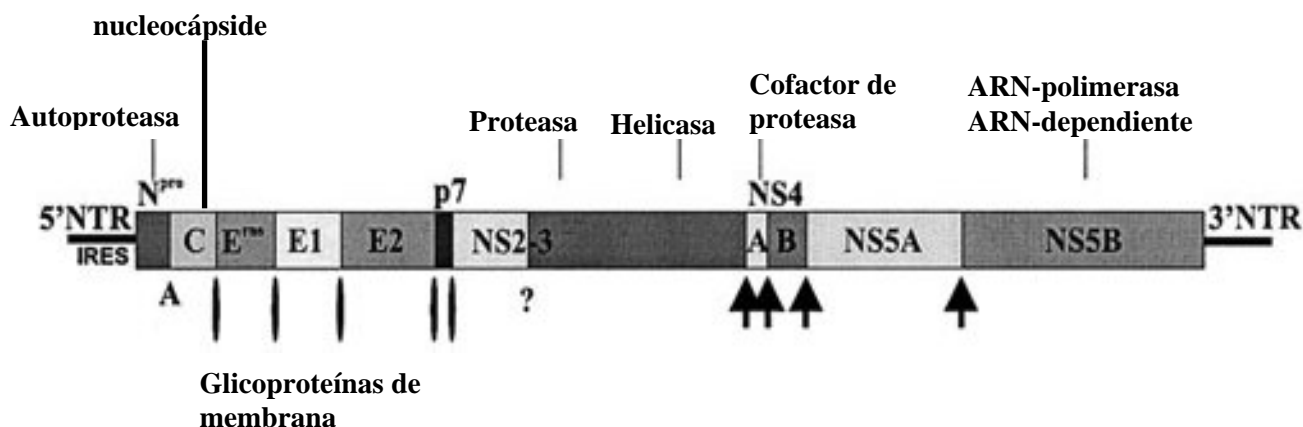


Figura 2.1. Organización del genoma del PPCV.

2.1.2 PROTEÍNAS VIRALES.

2.1.2.1 ESTRUCTURALES.

La proteína C tiene un peso molecular de 14 kDa, el 21% de los restos aminoácidos que la constituyen son residuos de lisina (Lys), esto le confiere una carga neta positiva, que facilita su interacción con el ácido nucleico viral, para formar la nucleocápside. La extensión exacta del dominio C-terminal se desconoce pero es altamente hidrofóbica y sirve como señal para la liberación de la E^{rns} en lumen del Retículo endoplasmático de la célula del hospedero [xix].

La E^{rns}, E1 y E2 son las glicoproteínas de membrana. La E^{rns} es altamente glicosilada con 7-9 sitios de glicosilación [xxv]. A través de estudios de cambios en el potencial de membrana se demostró que el anclaje de esta proteína a la membrana viral ocurre por interacciones del tipo no covalente, se encuentra en forma de homodímeros e interactúa fuertemente con receptores celulares como los glucosaminoglucanos, inhibe de forma específica la infección viral y tiene actividad ribonucleasa por residuos de Uridina [xxvi,xxvii].

E2 tiene un peso molecular de 55 kDa, se ancla a la membrana viral a través del extremo C-terminal covalentemente en forma de homodímeros y heterodímeros junto con la glicoproteína E1. La E2 posee entre 4 a 6 sitios de N-glicosilación y es la más inmunogénica de las tres[vii].

E1 tiene 33 kDa de peso molecular es hidrofóbica y puede funcionar como una proteína de transmembrana, sirve como ancla para la E2 es la menos inmunogénica de todas y tiene entre 2-3 sitios de N-glicosilación[xxviii].

2.1.2.2 NO ESTRUCTURALES.

La N^{Pro} es la primera proteína codificada en el genoma viral, tiene un peso molecular de 23 kDa, es una cisteína proteasa del tipo de la subtilina, con actividad autoproteasa, que escinde en una secuencia sitio específica (Cys/Ser) de la región C-terminal que es altamente conservada en todos los Pestivirus. Es similar a la Ubiquitina celular, por lo que esta última la puede sustituir en su actividad biológica^[xix]. Esta autoproteasa viral libera la porción que contiene además la proteína C ^[xxix].

P7 contiene una región central cargada, separada de la porción terminal que es hidrofóbica, esta proteína es ineficientemente separada de la E2, por lo que puede encontrarse tanto como proteína individual o unida a la E2. Al parecer es esencial para la infección viral, aunque no participa la replicación viral^[xix]

NS2 de 54 kDa es la porción N-terminal de NS3, existe una relación directa entre la eficiencia de replicación viral y la eficiencia de corte entre NS2/NS3. La NS3 es una serin-proteasa, escinde en una secuencia específica Leu/(Ala,Asn) con actividad ARN helicasa y requiere de NS4 como cofactor. Las proteínas maduras NS4A y NS4B, tiene un peso molecular similar, la NS5A tiene un peso molecular de 58 kDa y es altamente fosforilada, la NS5B de 75 kDa contiene varios motivos de ARN polimerasa ARN dependiente (RdRPs), tiene como funciones biológicas: la iniciación y elongación del genoma, así como elonga ARN de doble cadena^[xxx,xxxi]

El ciclo de replicación de los pestivirus se inicia a partir de la penetración de la célula por endocitosis mediada por un receptor específico, aún no identificado entre los principales candidatos están: una pareja de proteínas de 60 kDa y 93 kDa respectivamente, glucosaminoglucanos y los LDLR, todos sustentados sobre la base de la unión independiente de las proteínas E2 y E^{rns}, y el uso de anticuerpos monoclonales contra estos receptores celulares bloquean la entrada del virus a la célula, seguida por la liberación del genoma viral en el citosol^[xix].

La segunda fase del ciclo de replicación se inicia con la liberación del ARN viral, en forma de un complejo de ribonucleoproteína, en el citosol de la célula, los componentes celulares que participan en el proceso de desnudamiento del ARN viral aún no se han dilucidado. Posteriormente los elementos reguladores localizados en el sitio IRES de la región 5' NCR se unen a la subunidad 40S del ribosoma sin necesidad de la cooperación de factores transcripcionales de la célula como eIF4A, eIF4B, eIF4F. Inicialmente se traduce una poliproteína que se procesa co y post-traducionalmente ^[xix].

La N^{PRO} libera el polipeptido (N^{PRO}/C), mientras que peptidasas señal del hospedero participan en escindir las uniones entre (C/Erns), (E1/E2), (E2/p7) y el extremo C-terminal, la posterior separación de Erns y E1 ocurre por un mecanismo desconocido.

El procesamiento de las proteínas NS2/NS3, se lleva a cabo por mecanismos desconocidos pero al parecer mediados por proteasas celulares del hospedero que en dependencia de la especie viral y la cepa, dan lugar a diferencias en la razón de concentración entre NS2-3 unido y NS2, NS3 libre. Tanto NS2-3 como NS3 escinden corriente abajo sitios que permiten la liberación y maduración de las otras proteínas no estructurales virales [xxx,xxxii].

Una vez que se produce la RdRPs, el ciclo de vida viral entra en la fase de replicación de su genoma. Primero, se forma una cadena negativa del ARN genómico (ARNc) que se puede detectar a partir de las cuatro horas posterior a la infección para servir de molde y segundo, se sintetiza la progenie del ARN genómico (ARNv), a partir del ARNc del paso previo. Con el empaquetamiento del ARN progenie y el ensamblaje de los viriones que ocurre en el retículo endoplásmico o en el Golgi, donde los viriones adquieren una envoltura lipídica, el ciclo entra en su etapa final. Los virus alcanzan el compartimiento extracelular por transporte vesicular (exocitosis) a las 10 horas post-infección [xxxiii].

2.2. RELACIONES GENÓMICAS Y ANTIGÉNICAS ENTRE LOS PESTIVIRUS.

La genética molecular de los *pestivirus* se ha estudiado intensamente en la década del 90 [xxiv,xxxiv]. Análisis de secuencias nucleotídicas de diferentes partes del genoma procedentes de aislados internacionales de los *pestivirus* han permitido su clasificación en cuatro especies [vi].

Diferentes regiones del genoma de los *pestivirus* han sido empleados para el estudio de su diversidad genética, incluyendo partes variables de la región no codificante 5', así como los genes que codifican para las proteínas C, E2, NS3 y otras proteínas no estructurales [xxxiv].

Las comparaciones de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de algunos *Pestivirus*, han revelado entre 66% y 85% de identidad de secuencias respectivamente. Este hecho justifica una elevada similitud en el procesamiento de la poliproteína, un alto grado de conservación y por tanto, una similitud funcional de las respectivas proteínas [vii].

Como resultado de esta elevada homología, los antisueros policlonales contra los *Pestivirus* generalmente son incapaces de distinguir especies, cepas o aislados cuando se emplean en técnicas de inmunodifusión o inmunofluorescencia [i].

Existe consenso acerca de que hay un espectro relativamente amplio de variaciones antigénicas solapadas entre las tres especies de *pestivirus*, más que la existencia de un punto de corte claro, así como cierto número de regiones de divergencias interesantes, de las cuales la más importante es una inserción de 270 nucleótidos localizada en la secuencia del BVDV dentro de la región codificante para una proteína de 115-125kD altamente

conservada. Los 90 aminoácidos, derivados de esta secuencia adicional, reflejan exactamente la diferencia en capacidad codificante del largo marco de lectura abierto entre los genomas de BVDV y del virus de la PPC [^{vii,xxxv}].

Fue a través de ensayos de neutralización cruzada que se establecieron evidencias de la diversidad antigénica entre los *pestivirus*, y fueron los únicos capaces de diferenciarlos. Sin embargo, solo con el desarrollo de anticuerpos monoclonales (AcM) contra el virus, en los últimos años de la década de los 80, fue posible definir la variabilidad con mayor precisión y desarrollar mejores métodos de diagnóstico [^{xxxvi}].

Muchos grupos han reportado anticuerpos monoclonales con especificidad pan-*pestivirus*, ellos detectan epítopes altamente conservados, que han sido encontrados en células infectadas con todos los *pestivirus* ensayados. La mayoría de ellos están dirigidos contra la proteína no estructural designada p125/80 (NS3 en el virus de la PPC) [^{xxxvii}].

Específicamente para del virus de la peste porcina clásica, se demostró la existencia de cuatro dominios antigénicos sobre dos unidades estructurales de la mitad N-terminal (A, B, C y D) en la glicoproteína E2, de los cuales B y C son altamente conservados y A es completamente conservado entre todas las cepas de PPC e inducen AcM neutralizantes [^{xxxviii}].

Estos aspectos son de considerable importancia práctica para el diagnóstico y la epidemiología de éstos virus [^{vii,xxxix}].

2.3. EPIDEMIOLOGÍA

Para PPCV no existen otros reservorios naturales que las propias especies afectadas. Esta característica epidemiológica es muy importante en el control de la enfermedad, ya que dirige la lucha únicamente hacia la especie porcina a diferencia del resto de los *Pestivirus* [^{xx}].

El contacto directo entre animales infectados y susceptibles es la forma más común de transmisión del virus de la PPC. En condiciones naturales las vías oral e intranasal son las más importantes, también pueden ocurrir infecciones a través de la piel erosionada y por agujas contaminadas [^{xx, xxiii}].

El virus puede excretarse incluso durante el período de incubación [^{xi}]. En las infecciones agudas aparecen altos niveles de virus en sangre y otros tejidos. Se excretan grandes cantidades de virus en saliva y cantidades menores en orina y secreciones nasales y oculares [^{xii}]. La excreción viral continúa hasta la muerte o en los animales que se recuperan hasta que los anticuerpos se establecen [^{xx}].

En las infecciones crónicas, el virus es excretado continuamente o de forma intermitente hasta la muerte del animal. Las infecciones transplacentarias pueden dar lugar a animales persistentemente infectados, que excretan virus en grandes cantidades, durante meses, sin signos clínicos de enfermedad ni desarrollo de respuesta de anticuerpos [^{xii,xi}].

En la transmisión de la enfermedad desempeñan un papel muy importante las infecciones inaparentes, como son las crónicas, persistentes y de sintomatología atípica. Estos animales pueden actuar como fuente de virus no reconocida y durante meses mantenerse eliminando virus, por lo que suponen un reservorio de virus muy peligroso, que causa en muchas ocasiones nuevos brotes sin explicación aparente. El movimiento de cerdos no controlado constituye la manera de diseminación más común del virus [xx]

Otra fuente de infección muy importante son los productos cárnicos de origen porcino infectados con virus de la PPC. En la carne y productos cárnicos, el virus se mantiene infeccioso durante largos períodos que van desde los 27 días en el tocino hasta los 1 500 días en la carne congelada. Sin embargo, en jamones y lomos elaborados, el virus desaparece antes de finalizar el proceso de curación comercial [xlii].

No se han encontrado vectores biológicos de importancia epidemiológica, lo que sí se ha demostrado es que en ocasiones, los dípteros pueden servir de vectores mecánicos transportando el virus entre animales infectados y susceptibles [xliii].

La transmisión mecánica por el hombre es de mayor significación en áreas con una elevada densidad de cerdos, él puede transmitir el virus a través de instrumentos contaminados y drogas de uso parenteral al no descartar jeringuillas y agujas. La transmisión por ropas, calzado y roedores es rara, ya que la dosis de virus que puede ser transferida está usualmente por debajo de la dosis infectiva mínima para los cerdos [xx]

2.4. MANIFESTACIONES Y SIGNOS CLÍNICOS, PATOGÉNESIS Y RESPUESTA INMUNE.

En condiciones naturales la infección oronasal es la de mayor probabilidad de ocurrencia. Luego de la infección el virus se disemina siguiendo tres fases: linfática, virémica y visceral las cuales son independientes de la ruta de infección, ya que el virus alcanza rápidamente los órganos dianas. La tonsila es el sitio primario de replicación del virus una vez que ocurre la infección, es el primer y último órgano en mantenerse positivo [xliv,xlv].

A partir de las tonsilas y a través de los vasos linfáticos el virus llega a los ganglios linfáticos regionales. De ahí pasa a sangre periférica, dando lugar a una viremia que facilita la diseminación de las partículas víricas, con lo que se produce una nueva multiplicación en el bazo, médula ósea y otros ganglios linfáticos [xlv].

PPCV tiene la capacidad de cruzar la barrera placentaria de la cerda gestante e infectar el feto. Las afectaciones que sufren los fetos dependen, sobre todo del tiempo de gestación y de la virulencia de la cepa, provocando: abortos o nacidos muertos, malformaciones, cerditos con viremia congénita desde el

nacimiento hasta la muerte y cerdos normales no infectados con PPC. Las cerdas infectadas (ya sea con virus de campo o virus vacunal) transmiten anticuerpos a sus camadas a través del calostro que pueden proteger a los cerdos durante las primeras 5 semanas de vida, pero no de la replicación viral, lo cual adquiere una gran importancia epidemiológica, ya que estos animales aparentemente inmunotolerables perpetúan el virus en los cerdos domésticos y salvajes [^{xiii,xlvii}].

Una vez que los cerdos se ponen en contacto con el virus los anticuerpos neutralizantes aparecen entre 14 y 28 días posteriores a la infección. Solo en los casos crónicos de la enfermedad es posible detectar virus y anticuerpos en la sangre durante períodos prolongados [^{xlviii}].

La fase virémica comienza a las 14-24 horas post-infección y puede durar hasta poco antes de la resolución de la enfermedad. Las hemorragias múltiples que caracterizan las infecciones por el virus de la PPC se deben, a la degeneración de las células epiteliales junto con una fuerte trombocitopenia y a la alteración de los mecanismos de coagulación de la sangre. Este virus afecta fundamentalmente a los tejidos epiteliales y al sistema retículo-endotelial. La infección del endotelio vascular causa edema e inflamación, lo que resulta en la interrupción del flujo de los vasos sanguíneos e infartos [^{xlvi}].

La extensión de la leucopenia en los cerdos infectados con PPC es variable pero bien reconocida. La aparición relativamente tardía de anticuerpos en los animales convalecientes indica que la PPC retarda los mecanismos tempranos de la inmunidad humoral, posiblemente por infección de los linfocitos B [^{xliv}].

Se sugiere que el virus afecta tanto a los linfocitos B como T [^{xliv,xlix,l}]. Se ha identificado un epítipo de células T, el cual es reconocido por linfocitos T citotóxicos específicos contra PPC [^{li}]. Se demostró que, la dramática depleción de linfocitos B causada por la destrucción de los centros germinales en los tejidos linfoides, es la consecuencia patoinmunológica de la infección aguda por PPC. La replicación del virus en los folículos B es un evento temprano y específico, y precede a la infección generalizada. Claramente, la depleción de linfocitos B no puede responder por todos los síntomas pleiotrópicos de la enfermedad, pero el tropismo del folículo B es un determinante importante en el curso de la infección [^{lii}].

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad cursan desde un cuadro agudo caracterizado por fiebre y múltiples hemorragias, crónico e incluso por un cuadro clínico inaparente y se pueden distinguir unas de otras [^{xii}]. El período de incubación puede variar entre 2 y 14 días, y los cerdos pueden eliminar virus desde esta etapa [^{xlviii}]. La variabilidad del cuadro clínico y lesiones post-mortem de la PPC es producto de diversos factores como son, vía de infección, factores del hospedero (estado inmunitario, fondo genético, edad y condiciones nutricionales), vías de infección y la existencia de cepas de baja virulencia [^{xii,xlviii}]. De modo general la enfermedad causa una mortalidad superior en cerdos jóvenes que en adultos [^{liii}].

En la forma aguda se presentan fiebre, anorexia, letargo, conjuntivitis, signos respiratorios, nódulos linfáticos aumentados de tamaño, constipación seguida por diarreas, signos neurológicos y hemorragias típicas en la piel de las orejas, abdomen y parte interior de las extremidades durante la segunda y tercera semana de infección y hasta la muerte ^[iv]. En general la forma aguda de PPC debe ser diferenciada de otras enfermedades virales tales como la peste porcina africana, el síndrome de adelgazamiento multisistémico post-destete (PMWS) y el síndrome de dermatitis y nefropatía porcina (PDNS), así como condiciones septicémicas como salmonellosis, pasteurellosis, actinobacilosis e infecciones por *Haemophilus suis*, envenenamiento por anticoagulantes y enfermedad hemolítica del recién nacido. Las bacterias con frecuencia aparecen como infecciones entéricas o respiratorias secundarias concurrentes con el virus de la PPC debido a la naturaleza inmunosupresora del virus ^[iv].

La forma crónica se desarrolla cuando los cerdos no pueden levantar una respuesta inmune efectiva contra el virus y siempre es fatal. Los signos clínicos son similares a la infección aguda, luego se observan signos clínicos menos específicos y debe ser considerada dentro del diagnóstico diferencial de un amplio rango de enfermedades ^[iv].

En la infección prenatal o de aparición tardía cuando ocurre al inicio de la gestación puede resultar en abortos, crías muertas, momificaciones y malformaciones. La infección de cerdas alrededor de los 50-70 días de gestación puede dar lugar al nacimiento de crías persistentemente virémicas, con pobre crecimiento, adelgazamiento y ocasionalmente temblor congénito. La PPC debe considerarse dentro del diagnóstico diferencial de fertilidad reducida debida a parvovirus, síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), leptospirosis, y enfermedad de Aujeszky ^[iv].

2.5. DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico de PPC en la actualidad se basa en cuatro elementos complementarios: presencia de signos clínicos en campo, descubrimientos de lesiones patológicas, detección directa (aislamiento viral, detección de antígeno y ácido nucleico) e indirecta (métodos serológicos) en el laboratorio ^[xi].

Los signos clínicos y patológicos de la PPC no son patognomónicos propios de la enfermedad sino que pueden confundirse con otras enfermedades febriles/hemorrágicas de los cerdos, por lo que el diagnóstico diferencial incluye la peste porcina africana (PPA), el síndrome de neuropatía y dermatitis porcina, bacterias septicemias tales como: *Salmonellas* y *Erysipelas* y la enfermedad del recién nacido^[x, lvi, lvii, lviii, lix]. El ya extensivo diagnóstico diferencial de PPC se ha complicado aún más con la emergencia de nuevas enfermedades del cerdo tales como el PRRS y el PDNS ^[iv].

El análisis de signos clínicos y patológicos relacionados con la PPC constituyen herramientas limitadas, pero de gran utilidad en el diagnóstico temprano de la enfermedad, a usarse como primera línea en la estrategia para impedir su transmisión con la aparición de un brote, unido al diagnóstico de laboratorio de las muestras seleccionadas y colectadas de animales con sospechas de PPC en el esclarecimiento de la presencia del agente infeccioso por detección directa y/o indirecta [xi].

Los métodos serológicos se usan para el diagnóstico y vigilancia en casos de sospechas de PPC en poblaciones de cerdos. Los anticuerpos se detectan de 2-3 semanas posterior a la infección, son de larga duración y son buenos indicadores de la infección a nivel de rebaño. Los ensayos diagnósticos que más se usan para la detección anticuerpos son la virus neutralización (VN), y el ELISA [ix].

La VN se considera como una técnica "Estándar de Oro", pero su trabajo es intensivo, consume mucho tiempo, necesita de las tecnologías de cultivo de células y no es automatizado por lo que no se puede emplear en el análisis de un gran número de muestras, además este método es incapaz de diferenciar entre anticuerpos adquiridos por la infección en campo de los animales o como resultado de la inmunización por vacunas vivas o modificadas [ixi].

ELISAs de bloqueo e indirectos para la detección de anticuerpos contra la glicoproteína E2 viral se emplean como métodos de *screening* de anticuerpos durante brotes de la enfermedad o después de estos y estudios inmunológicos post-vacunación. Moser C 1996 ELISAs para la detección de anticuerpos contra la Erns se han desarrollado como ensayos acompañantes a vacunas de subunidades a partir de la proteína E2 del virus. En general los ELISAs disponibles en la actualidad poseen limitaciones en los valores de sensibilidad/especificidad, pero son herramientas de gran utilidad en el monitoreo de PPC [xxiii,lviii,lxii,lxiii,lxiv,lxv].

El aislamiento viral (A.V) se realiza por inoculación de suspensión de órganos clarificada, plasma o células sanguíneas en cultivo de células permisivas como las obtenidas a partir de riñón de cerdo (PK15) y (SK6) [lxvi].

Debido a que el virus no ejerce efecto citopático en las células, estas se fijan y la presencia del virus se revela a través de técnicas como inmunofluorescencia (IFT), inmunoperosidasa (PLA). Este método se considera "Estándar de Oro" y es indispensable para confirmar los brotes de PPC, tiene como inconvenientes el elevado consumo de tiempo y la implementación de técnicas de cultivo celulares [lxvii].

Las herramientas diagnósticas como el A.V y la V.N se han considerado a lo largo de la historia como los "Estándar de Oro" para las investigaciones virológicas y serológicas. Sin embargo de estos ensayos no existe información oficial publicada sobre estudios de estandarización y validación de acuerdo al Manual de Estandarización y Validación de la OIE [lxvii].

La detección directa de antígenos se puede realizar por criosección de tejidos fijados y revelados a través de IFT y PLA con anticuerpos monoclonales o

policlonales, esta herramienta, ofrece resultados rápidamente por lo que es muy útil ante una sospecha de la enfermedad, sin embargo la técnica necesita una elevada experticia del personal. Debido a la frecuente inespecificidad del método los resultados no pueden ser conclusivos [xxiii].

Los primeros protocolos para la detección de ácidos nucleicos del virus de la PPC basados en RT-PCR aparecieron a inicios de los años 90 y en la última década numerosos métodos han sido reportados para la detección del virus de la PPC usando RT-PCR [lxviii, lxix]. Estos ensayos amplifican secuencias de diferentes regiones del genoma viral, incluyendo la región 5'-no codificante (5'-NCR), y partes de los genes que codifican proteínas estructurales y no estructurales del virus (E2, NS2-3, NS4 y NS5B). Algunos son específicos de PPC mientras que otros detectan *Pestivirus* adicionales por sistemas anidados [lxviii, lxx].

Recientemente, se han publicado ensayos de RT-PCR en tiempo real para la detección del virus de la PPC con las ventajas propias de esta metodología aunque con mayor costo y que no sustituyen a los ensayos de RT-PCR basados en gel necesarios para la genotipificación del virus y que permiten investigar el origen de los brotes y la evolución del virus [lxxi, lxxii].

Estos ensayos pueden emplear sangre o suero de animales vivos u órganos de animales sacrificados y se han convertido en tecnologías estándares en la mayoría de los laboratorios donde son usados como diagnóstico de rutina de PPC. El RT-PCR ha demostrado ser el método más sensible para la detección del virus de la PPC y en comparación con el aislamiento viral, detecta la presencia del virus más temprano después de la infección y por un período de tiempo más largo en los casos en que los animales se recuperan. Otra ventaja tanto de los RT-PCR basado en gel como de los RT-PCR en tiempo real es que gracias a su elevada sensibilidad podrían ser evaluadas mezclas de muestras de animales afectados. Aunque estos métodos de RT-PCR han sido evaluados en varios ensayos actualmente no se recomienda un ensayo de forma oficial [lxix, lxxiii, lxxiv].

A pesar de las ventajas de las metodologías de RT-PCR sobre los ensayos tradicionales los primeros son muy vulnerables a los resultados falsos positivos y negativos. Esto hace necesario seguir estrictas prácticas de trabajo y utilizar múltiples controles negativos así como controles positivos. Los protocolos deben ser validados y se debe participar en ensayos de laboratorio que demuestren que el desempeño de estos ensayos es confiable [lxxv].

Por otra parte, el ensayo de RT-PCR por su rapidez y elevadas sensibilidad y especificidad es una herramienta de gran valor para el diagnóstico diferencial de graves enfermedades emergentes y exóticas de los cerdos que pueden ser confundidas con PPC como son los casos de PPA y PRRS entre otras, y con ello contribuye a la reducción de la diseminación y las pérdidas que estas pudieran causar. [lxxiv, lxxvi].

Recientemente, los ensayos de PCR o RT-PCR múltiples, que exigen cuidadosas selección de los cebadores y estandarización de las condiciones de reacción, han demostrado ser valiosas herramientas para la detección múltiple y diferencial en una muestra clínica, de virus que afectan el cerdo con el consiguiente incremento en la rapidez del diagnóstico diferencial y a un menor costo [lxxvii].

Aunque numerosos ensayos simples de RT-PCR basados en gel se han reportado para la detección de los virus de la PPC y de *Pestivirus* de rumiantes hasta donde conocemos no se han publicado ensayos de RT-PCR múltiples para la detección y diferenciación de estos virus y especialistas en el diagnóstico de PPC comentan la necesidad de contar con ellos en el futuro para ser empleados en el diagnóstico de esta enfermedad [¡Error! Marcador no definido.]. De interés resulta el reporte reciente de un ensayo múltiple de microarreglo para la detección y diferenciación del virus de la PPC y otros pestivirus [lxxviii,lxxix].

Desde su introducción en los laboratorios, el ensayo de PCR se ha convertido en una herramienta esencial en la investigación y en el diagnóstico de rutina de PPC. Los ensayos de RT-PCR tanto los de detección basados en gel de agarosa como los de detección en tiempo real (rt-RT-PCR) muestran mayor sensibilidad analítica en comparación con otros ensayos diagnósticos como por ejemplo el aislamiento viral, esto permite analizar muestras en *pools* lo que resulta de gran utilidad en el análisis de rebaños cercanos al perímetro donde se declaren brotes de la enfermedad [xi,lxxx].

2.6. CONTROL

Después de su primera descripción en 1830 en Ohio, EUA, el virus de la PPC ha sido reportado en la mayor parte del mundo, hoy, es enzoótico al menos en áreas de Sudamérica y Asia del Este [xx,lxxxi,lxxxii]. Los programas de erradicación de las últimas décadas han resultado exitosos en Norteamérica, Australia y en países europeos. Sin embargo, a pesar de los grandes esfuerzos que se han realizado para su erradicación, continúan ocurriendo repetidos brotes epidémicos dentro de Europa central [lxxxiii].

En muchos países la enfermedad prevalece con riesgos de reemergencia ante fallos en el control, a pesar de las medidas tomadas, por lo que la aparición de brotes agudos tiene que ser tomada como indicador de infecciones clínicas no advertidas, con significación epidemiológica sobre todo, en países como el nuestro con programas de vacunación establecidos [lxxxiv]. Las razones para esto son diversas y varían de un país a otro. Entre ellas está el movimiento no controlado de cerdos, el síndrome de la cerda portadora la circulación de cepas de baja virulencia y de pestivirus de rumiantes que pueden enmascarar el cuadro clínico y retardar el diagnóstico, fallos vacunales, el incremento de cerdos susceptibles y sobre todo, la falta de disponibilidad de herramientas diagnósticas adecuadas para

cada caso, que pueden impedir seriamente el progreso hacia la erradicación final [xii,lxxxv].

El control de la enfermedad es intentado bien por vacunación o por erradicación. Para la vacunación se han desarrollado cepas "C" lapinizadas de PPC y mutantes sensibles a la temperatura, los cuales han sido usados exitosamente en numerosos países [lxxxvi]. Sin embargo, la Unión europea prohibió la vacunación en 1990, sobre todo, porque la respuesta de anticuerpos a la vacunación o a infecciones de campo no pueden ser discriminadas [lxxxvii].

En los países en que la PPC está presente de forma enzootica se debe proceder a la vacunación sistemática, con el fin de controlar la enfermedad y reducir la pérdidas. Las vacunas que se vienen utilizando en las dos últimas décadas sin problemas son cuatro vacunas vivas modificadas: la cepa "C" lapinizada, la japonesa adaptada a cultivo celular de cobayo, la cepa francesa Thiverval adaptada a la línea celular PK-15 y la PAV-250 en PK-15. Estas cuatro vacunas no presentan virulencia residual y están consideradas como inocuas, tanto para las cerdas preñadas como para los lechones de más de dos semanas. Estas vacunas confieren una inmunidad rápida y duradera [lxxxviii].

Para un control efectivo de la PPC deben aplicarse una serie de medidas de orden sanitario, como son la eliminación de todos los cerdos en las granjas afectadas, la desinfección de las mismas, la prohibición del movimiento de animales, la vigilancia epizootiológica y las normas de repoblación [lxxxix].

La experiencia de muchos países, es que un programa de vacunación estricto y sistemático llevado a cabo durante un tiempo prolongado y acompañado de las medidas zoonosanitarias oportunas, hace desaparecer los brotes de PPC. Una vez que el país esté libre de la enfermedad, se debe tender a la erradicación prohibiendo las vacunaciones y efectuando un seguimiento serológico a los dos años de la prohibición [xc].

3. CONCLUSIONES

La peste porcina clásica es una de las enfermedades más graves que afecta al cerdo y provoca grandes pérdidas económicas en varios países de todo el mundo. En este trabajo se realizó una revisión actualizada sobre el agente etiológico de la PPC, la epidemiología de la enfermedad, entre otros aspectos con una búsqueda más profunda en el diagnóstico y el control de la misma ya que, la mejor medida para que un país libre de PPC siga siéndolo es la prevención, atendiendo a los mecanismos de transmisión expuestos anteriormente, aplicar un buen sistema de vigilancia, basado en el diagnóstico efectivo de la enfermedad, así como la capacitación del personal técnico especializado.

REFERENCIAS

1. i - 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.*
2. ii-Paton, D.J.; y Greiser-Wilke, I. 2003. Classical swine fever—an update. *Res. Vet. Sci*, vol.75,pp.69–178.
3. iii -Office International des Epizooties. Diseases notifiable to the OIE. 2006. Disponible en: <http://www.oieint/eng/maladies/en/classification.htm>
4. iv- 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.
5. v-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.
6. vi-ICTV. 2006. The International Committee on Taxonomy of Viruses [Citado 20 Enero 2008]. Disponible en URL: <http://www.virustaxonomyonline.com/virtax/lpext.dll?f=emplates&fn=main-n-h.htm>.
7. vii-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.
8. viii-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 RT-PCR. *J. of Virol Met*, vol.114, n°1, pp.77-90.
9. ix-Liess, B.; Moennig, V. 1990. Ruminant *Pestivirus* infection in pigs. *Rev Sci Tech*, vol. 9, n°1, pp.151-61.
10. x-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.
11. xi-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
12. xii-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.
13. xiii-Moennig, V. 2000. Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Vet Microbiol*, vol. 73, pp. 93–102.

14. xiv-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.
15. xv-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
16. xvi-Collet, M.S. 1992. Molecular genetics of pestivirus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* Vol. 15, pp.145-154.
17. xvii-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.
18. xviii-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.
19. xix-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.
20. xx-Terpstra, C. 1991. Hog cholera an update of present knowledge *Br. J. Vet.* Vol. 147, pp.397-406.
21. xxi-Moennig, V.; Plagemann, P.G. 1992.The pestiviruses. *Adv. Virus Res.*; vol. 41, pp.53-98.
22. xxii-Kosmidou, A.; Buttner, R.; Meyers, G. 1998. Isolation and characterization of cytopathogenic classical swine fever virus CSFV. *Arch Virol.* Vol. 143, pp.1295-1309.
23. xxiii-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].
24. xxiv-Meyer, G.; Thiel, H.J. 1996. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv Vir Res.* Vol. 47, n° .47 pp. 53-118.
25. xxv-Thiel, H.J.; Stark, R.; Weiland, E.; Rümenapf T.; Meyers, G. 1991. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.* Vol. 65, pp.4705-4712.
26. xxvi-Wenland, F.; Wenland, E.; Unger. 1999. Localization of pestiviral enveloped proteins E_{rns} and E₂ at the cell surface and on isolated particles. *J. Gen Virol*, vol. 80, pp. 1157-1165.
27. xxvii-Windish, J. M.; Schneider, R.; Stark, R. 1996. RNase of classical swine fever virus : Biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J. Virol*, vol. 70, pp.352-358.
28. xxviii-Weiland, E.; Stark, B.; Haas, B.; Rümenapf T. y Thiel, H.J. 1990. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J.Virol.* 66, 3561-3569.
29. xxix-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.

30. xxx-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.
31. xxxi-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.
32. xxxii-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.
33. xxxiii-Donis, R.O. 1995. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, vol. 11, pp. 393-423.
34. xxxiv-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.
35. xxxv-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.
36. xxxvi-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 diarrhea virus. *Am. J. Vet. Res. Vol.51*, pp.1388-1394.
37. xxxvii-Cay, B.; Chappius, G.; Coulibaly, C. 1989. Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestiviruses. Report of an International workshop. *Vet. Microbiol. Vol. 20*, pp.123-129.
38. xxxviii-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.
39. xxxix-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.431-40.
40. xl-Liess, B. 1987. Pathogenesis and epidemiology of hog cholera. *Ann. Rech. Vet.*; vol.18, pp.139-148.
41. xli-Ressang, A.A.; 1973. Studies on the pathogenesis of hog cholera. *Zbl. Vet. B*, vol. 20, pp. 256-271.
42. xlii-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.
43. xliii-Bram, R.A. 1976. The potential role of diptera in the transmission of hog cholera. Agricultural Research Seminar on hog cholera/classical swine fever, *Commission of the European Communities*.
44. xliv-Susa, M.; König, M.; Saalmüller, A.; Reddehase, M. J. y Thiel, H-J. 1992. Pathogenesis of classical swine fever. B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *J. Virol.* Vol. 66, nº.2, pp.1171-1175.
45. xlv-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*.
46. xlvi-Murphy, F. A.; Gibbs, E. P. J.; Horzinek, M. C. y Studdert, M. J. 1999: *Veterinary Virology, Third Edition*.
47. xlvii-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.
48. xviii-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.
49. xlix-Summerfield, A.; Hofmann, M.A.; McCullough, K.C. 1998. Low density blood granulocytoid cells induced during classical swine fever are targets for virus infection. *Vet. Immunol Immunopathol.* Vol.63, pp.289-301.
50. l-Pauly, T.; Elbers, K.; König, M.; Lengsfeld, T.; Saalmüller, 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.
51. li-Pauly, T.; König, M.; Saalmüller, 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.
52. lii-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.
53. liii-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.

54. Iv-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.
55. Iv-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. 244–52 [Part 2, Chapter 2.1.13].
56. Ivi-Kaden, V.; Lange, E.; Polster, U.; Klopffleisch, 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.
57. Ivii-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.
58. Iviii-Floegel-Niesmann, G. 2003. Marker vaccines and companion diagnostic tests for classical swine fever. *Dev Biol Basel*, vol.114, pp.185–91.
59. Iix-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.
60. Ix-Anonymous. 2002. Classical swine fever diagnostic manual, Document No. C2002381. Commission Decision 2002/106/EC. *Official Journal*, L039, pp.0071–88.
61. Ixi-OIE. 2006. Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. Chapter 1.1.3, version adopted, May.
62. Ixii-Floegel-Niesmann G. 2001. Classical swine fever CSF marker vaccine. Trial III. Evaluation of discriminatory ELISAs. *Vet Microbiol*, vol. 83, pp. 121–36.
63. Ixiii-Loeffen, W. 2005. Evaluation of five commercially available CSF-ELISA kits. *Report on the annual meeting of National Swine Fever Laboratories, Grange European Commission, Brussels*, pp. 143.
64. Ixiv-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.209–19.
65. Ixv-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.
66. Ixvi-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.
67. Ixvii-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_SOPpdf.

68. Ixviii-Vilcek, S.; Herring, AJ.; Nettleton, PF.; Lowing JP.; Paton, DJ. 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.
69. Ixix-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.
70. Ixx-Hoffmann, B.; Depner, K.; Schirrmeyer, H.; Beer, M. 2006 .A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J Virol Methods*, vol. 136, n°2, pp.200-209.
71. Ixxi-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, n°1, pp.136-142.
72. Ixxii-Ciglenecki, UJ.; Grom, J.; Toplak, I.; Jemeršić, 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, n° 2, pp.257-264.
73. Ixxiii-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, n° 3, pp.1-10.
74. Ixxiv-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, n° 2, pp.194-199.
75. Ixxv-OIE. 2008. Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. [Chapter 1.1.5].
76. Ixxvi-Agüero, M.; Fernández, J.; Romero, LJ.; Zamora, MJ.; Sánchez, C.; Belák, 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.
77. Ixxvii-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, n° 2, pp.301-311.

78. lxxviii-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
79. lxxix-Call, D.R. 2005. Challenges and opportunities for pathogen detection using DNA microarrays. *Crit Rev Microbiol*, vol. 31, pp.91-99.
80. lxxx-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.
81. lxxxi-Liess, B. 1981. En: *Virus Diseases of Food Animals*. Academic Press, New York, vol. 2, pp.627-650
82. lxxxii-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.
83. lxxxiii-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.
84. lxxxiv-Moennig, V. 1990. Pestiviruses: A review . *Vet. Microbiol.* Vol. 23, pp.35-54.
85. lxxxv-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.
86. lxxxvi-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.
87. lxxxvii-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.
88. lxxxviii-Van Oirschot, J.; T. 2003. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet Microbiol*, vol.96, pp.367-384.
89. lxxxix-Edwards, S.; Fukusho, A.; Lefevre, P.; Lipowski, A.; Pejsak, Z.; Roehe, P.; Westergaard, J. 2000. Classical swine fever: the global situation. *Veterinary Microbiology*, vol.73, pp.103-119.
90. xc-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.