

ARTÍCULOS PRIMARIOS

PERSISTENCIA DEL VIRUS DEL CÓLERA PORCINO DE BAJA VIRULENCIA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LECHONES DE GRANJAS TECNIFICADAS¹

Hermelinda Rivera², Ruth Angeles³, Nieves Sandoval² y Alberto Manchego²

Abstract

The distribution of hog cholera virus (HCV) antigen in the central nervous system (CNS) of 28 piglets with subclinical hog cholera (HC) infection from 10 well managed farms in the Department of Lima was studied. The pigs, aged 1 to 20 days, included animals with diarrhea (n=5), pneumonia (n=5) and retarded growth (n=6), as well as normal specimens (n=7) and others which died from trampling (n=5). The presence of viral antigen in lymphoid and/or nerve tissue was used as a criteria to identify the persistence of low virulent strains of HCV. Tissue samples from tonsils, spleen, and regional lymph nodes were taken to perform the immunofluorescence test (IF). The brain, including the pituitary gland, was fixed in formalin at 10% for subsequent viral identification using the immunoperoxidase test (IP). Viral antigen was present in tonsils, spleen, lymph nodes and CNS in 42.9% (12/28) of the animals sampled. In the CNS, HCV antigen was detected in both neurons and groups of neurons in different areas of the brain. All the pigs (12/12) showed viral antigen in the cerebral cortex, 83.8% (10/12) in the cerebellum, 41.7% (5/12) in the thalamus and hypothalamus, 33.3% (4/12), in the hippocampus, 16.7% (2/12) in the medulla oblongata, and the 50% (6/12) in the pituitary gland. No viral antigen was detected in the leptomeninges or choroid plexus. The frequency of antigenic detection was found to increase as the pigs aged. The results show that low virulent HCV is present in well managed pig farms in the Department of Lima and the strains persist in the CNS, pituitary gland, and lymphoid tissues. A high percentage of pigs with diarrhea and pneumonia had viral antigen suggesting the immunosuppressive role of the HCV.

Key words: antigen, hog cholera virus, central nervous system, immunofluorescence, immunoperoxidase test, pigs.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar la persistencia del virus del cólera porcino (VCP) en el sistema nervioso central (SNC) y tejidos linfoides de lechones con

1 Estudio financiado con fondos del CSI y CONCYTEC

2 UNMSM - FMV, IVITA E-mail: d170029@unmsm.edu.pe

3 Servicio Nacional de Sanidad Animal- Ministerio de Agricultura.

infección subclínica de cólera porcino a través de la detección del antígeno viral mediante la prueba de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa. Con este fin se estudiaron 28 lechones de 1 a 20 días de edad procedentes de 10 granjas tecnificadas del Valle de Lima. Al momento del muestreo los lechones fueron de apariencia normal (n=7), otros presentaron diarrea (n=5), neumonía (n=5) crecimiento retardado (n=6) y algunos murieron por aplastamiento (n=5). De todos los lechones se obtuvieron: tonsilas, bazo, nódulos linfáticos regionales para realizar cortes congelados para la prueba de inmunofluorescencia (IF). El encéfalo incluyendo la glándula pituitaria de cada uno de los lechones fueron fijados en formalina al 10% para posterior identificación del antígeno del VCP mediante la prueba de inmunoperoxidasa (IP). El antígeno estuvo presente en las tonsilas, bazo y nódulos linfáticos, así como, en el SNC en el 42.9% (12/28) de los lechones estudiados. En el SNC fue detectado en neuronas o grupos de neuronas de las diferentes áreas del encéfalo. El 100% (12/12) de los lechones presentaron antígeno en la corteza cerebral, en el cerebelo 83.3% (10/12), en el tálamo e hipotálamo 41.75 (5/12), en el hipocampo 33.3% (4/12), en la medula oblonga 16.7% (2/12) y el 50% (6/12) en la glándula pituitaria. El antígeno viral no fue detectado en las células de la leptomeninge ni plexo coroideo de los ventrículos laterales y tercer ventrículo. Solo el 20% (2/10) de los lechones de 1 a 5 días de edad fueron positivos al VCP incrementándose progresivamente la presencia del antígeno en los lechones de mayor edad. Este incremento del antígeno viral evidencia transmisión postnatal de las cepas de baja virulencia. La presencia de cepas de baja virulencia es corroborada al detectarse que el 100 y 60% de los lechones diarreicos y neumónicos, así como, el 40 y 33.3% de los lechones con crecimiento retardado y muertos por aplastamiento presentaron antígeno viral. Los resultados indican que cepas de VCP de baja virulencia persisten en el SNC y glándula pituitaria además de los tejidos linfoides y que es prevalente en granjas porcinas tecnificadas muestreadas en el Valle de Lima. Los lechones con problemas diarreicos y respiratorios tuvieron antígeno del VCP evidenciando el rol inmunodepresor del virus.

Palabras clave: Antígeno, virus cólera porcino, sistema nervioso central, tejidos linfoides, inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, porcinos.

Introducción

El cólera porcino (CP) es una enfermedad infecciosa enzoótica en la población porcina del Perú. Es producida por el virus del cólera porcino (VCP), con genoma ARN, relacionado antigénicamente a los virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) y Enfermedad de la Frontera (EF) que afectan al bovino y ovino, respectivamente (Nettleton *et al.*, 1980). Además, estos tres agentes comparten similares características biológicas; como: el tropismo por las células del sistema inmune, el ocasionar infecciones interespecies, el inducir infecciones subclínicas y persistentes, etc. (Dahle, 1993; Rumenapf *et al.*, 1993).

Como todos los miembros de los pestivirus, el VCP posee muchas cepas las cuales pueden ser agrupadas en dos biotipos: citopático y no citopático. Las cepas del biotipo citopático no son frecuentes en la naturaleza (Meyers *et al.*, 1995). Por otro lado, las cepas del VCP existentes pueden tener diversos grados de virulencia asociados con la presentación de varias formas clínicas de la enfermedad. Las cepas virulentas son recuperadas de casos agudos mientras que cepas de moderada y baja virulencia inducen formas crónica y subclínica de la enfermedad (Terpstra, 1991; Moennig y Plagemann, 1992).

A diferencia del CP agudo que es ampliamente descrito, la forma subclínica

usualmente es poco reconocida. Las cepas de baja virulencia se difunden silenciosamente y persisten en el animal. Estas cepas probablemente van surgiendo como un mecanismo de selección ante presiones inmunológicas (Wensvoort *et al.*, 1989). La infección de los animales adultos, lechones o animales de engorde con cepas de baja virulencia es de tipo subclínico, pero el virus se replica en los tejidos linfoides del animal ocasionando inmunodepresión (Potgieter, 1995).

En marranas gestantes estas cepas producen infecciones trasplacentarias y dependiendo del período de gestación pueden inducir un conjunto de fetopatías. Así mismo, por su capacidad inmunodepresora, predispone a los animales sobre todo jóvenes a infecciones secundarias del tracto respiratorio y/o digestivas (Rios *et al.*, 1997).

Una de las consecuencias de la infección trasplacentaria con cepas del VCP de baja virulencia es el nacimiento de lechones inmunotolerantes y persistentemente infectados. Estos lechones son los reservorios del virus y son incapaces de responder adecuadamente a desafíos vacunales o infecciones por virus de campo como ocurre con terneros inmunotolerantes al VDVB (Bezek, 1995). En estos animales, el virus persiste en células de los tejidos linfoides y tejidos inmunológicamente "privilegiados", como el sistema nervioso central (SNC), glándula pituitaria (Fernández *et al.*, 1989) y/o gónadas (Brownlie *et al.*, 1997) donde permanecen protegidos de los mecanismos de defensa del animal (Rojas, 1995).

Estudios recientes por investigadores del IVITA de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, reportan alta incidencia de infecciones de CP de tipo

subclínico en animales de granjas porcinas tecnificadas, mientras que, el CP agudo es más incidente en animales criados bajo condiciones de pobre tecnología, como en la región de la sierra y selva y animales de los parques porcinos. Este aspecto epidemiológico del CP indujo a hipotetizar que las cepas de baja virulencia son más prevalentes en animales de granjas tecnificadas y que el virus persiste en algunos tejidos burlando los mecanismos de defensa del animal. El objetivo del presente estudio fue conocer la persistencia y distribución histológica del VCP de baja virulencia en el SNC y glándula pituitaria de lechones con infección subclínica de CP.

Materiales y Métodos

Animales

Se estudiaron 28 lechones escogidos de 1 día de nacido a 20 días de edad procedentes de 10 granjas tecnificadas del Valle de Lima. Los lechones no presentaron signos clínicos de CP agudo, pero en general fueron de pobre condición física comparado con el resto de su camada. Cinco de estos lechones presentaron cuadros diarreicos, cinco problemas respiratorios, cinco murieron por aplastamiento, seis tuvieron evidente retardo en el crecimiento y siete fueron de apariencia normal.

Muestras

Cada uno de los lechones, excepto los muertos por aplastamiento, fueron sacrificados en el lugar de origen o en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria. Estos animales fueron necropsiados en busca de posibles lesiones macroscópicas y obtener muestras de tonsilas, nódulos linfáticos retrofaríngeos, bazo, cerebro o encéfalo, incluida la glándula pituitaria. De todos los tejidos colectados, sólo el cerebro y la glándula

pituitaria fueron fijados en formol al 10%, para ser utilizados en la prueba de inmunoperoxidasa en caso de resultar previamente positivo al VCP mediante la prueba de inmunofluorescencia.

Detección de antígeno del VCP. Prueba de inmunofluorescencia (IF).

El antígeno del VCP fue detectado en cortes congelados de las muestras de tonsilas, bazo, nódulo linfático y timo, mediante la técnica de IF utilizando un conjugado policlonal (National Veterinary Services, Ames - Iowa, USA), de acuerdo al procedimiento descrito en el manual del Organismo Internacional de Epizootias (OIE, 1996).

Detección de antígeno del VCP en cerebro

y glándula pituitaria. Prueba de inmunoperoxidasa (IP).

Diferentes porciones del cerebro y glándula pituitaria fijadas, fueron incluidas en parafina y procesadas hasta el desparafinado dentro de las 96 horas de incluidas según la técnica histológica convencional (H&E). El procedimiento de la técnica de IP fue de acuerdo a lo descrito por Fernández *et al.*, (1989) utilizando un conjugado monoclonal contra la proteína 55 del VCP marcado con peroxidasa (Institute for Animal Science and Health, Lelystad, The Netherlands).

Tamaño muestral

El tamaño de la muestra fue obtenida en base al método no paramétrico de

Cuadro 1. Detección del antígeno del VCP en lechones de diferentes edades. IF.

Edad (días)	Número de Lechones	Antígeno Viral Positivo	%
1 - 5	10	2	20.0
6 - 10	4	1	25.0
11 - 15	7	4	57.1
16 - 20	7	5	71.4
Total	28	12	42.9

muestreo simple al azar, tomando como referencia una prevalencia del 50% de la presencia de antígeno del VCP en tejidos de animales de granjas porcinas obtenido previamente por investigadores del IVITA y un nivel de confianza del 99%.

en sus tejidos linfoides: tonsilas, bazo y nódulos linfáticos, mediante la técnica de IF.

La distribución del antígeno en el SNC no fue uniforme en todos los lechones y sólo en uno se observó antígeno en todas las áreas del cerebro incluyendo glándula pituitaria (Cuadro 2).

Resultados

El 42.9% (12/28) de los lechones de 1 a 20 días de edad presentaron antígeno del VCP

La corteza cerebral (100%), seguida por el cerebelo (83.3%), glándula pituitaria (50%), tálamo e hipotálamo (41.7%),

Cuadro 2. Distribución del antígeno del VCP en el sistema nervioso central de los lechones. IP.

Lechón (N°)	Edad (días)	Antígeno Viral en Áreas del SNC*					
		CC	H	TH	MO	C	GP
1	20	+	-	-	-	+	-
2	18	+	-	-	-	+	-
3	2	+	-	-	-	-	+
4	17	+	-	+	-	-	-
5	1	+	+	+	-	+	+
6	14	+	-	-	-	+	+
7	17	+	-	-	-	+	-
8	16	+	+	+	-	+	+
9	12	+	-	-	+	+	-
10	9	+	+	+	+	+	+
11	14	+	+	+	-	+	+
12	13	+	-	-	-	-	-

* CC = Corteza cerebral, H = Hipocampo, TH = Tálamo e hipotálamo, MO = Médula oblonga, C = Cerebelo, GP = Glándula pituitaria.

hipocampo (33.3%) y médula oblonga (16.7%) fueron las áreas de preferencia del VCP (Cuadro 3). El antígeno viral fue observado en el citoplasma de escasas neuronas de la capa granular externa, capa de células piramidales y capa de células polimórficas. Las células que tapizan los ventrículos laterales no presentaron antígeno viral en ninguno de los lechones.

En el hipocampo, tálamo y médula oblonga el antígeno del VCP fue observado

en neuronas individuales de la capa granular externa y capa de células piramidales, pero no se observó en las células del epitelio que recubre el tercer ventrículo. En el cerebelo, el antígeno del VCP se observó principalmente en las células de purkinge. No se observó antígeno viral en las células de la leptomeninge que recubre el cerebro.

El 50% (6/12) de las muestras de glándula pituitaria presentaron antígeno viral en las células de la región de la

Cuadro 3. Detección del antígeno del VCP en las diferentes áreas del SNC (n= 12). IP.

Áreas del SNC	Antígeno del VCP	
	Positivos	%
Corteza cerebral	12	100.0
Cerebelo	10	83.3
Glándula pituitaria	6	50.0
Tálamo e hipotálamo	5	41.7
Hipocampo	4	33.3
Médula oblonga	2	16.7

adenohipófisis pero no en las células de la región de la neurohipófisis (Cuadro 3, Figura 1).

Presentaron antígeno viral el 100 y 60% de los lechones con cuadros diarreicos

y respiratorios, así como, el 40 y 33.3% de los muertos por aplastamiento y aquellos con retardo en el crecimiento respectivamente. Las muestras de los lechones con apariencia normal no presentaron antígeno del VCP (Cuadro 4).

Cuadro 4. Presencia de antígeno del VCP en lechones con diferentes condiciones clínicas (n=28). IF.

Condición Clínica	Número de Lechones	Antígeno Viral Positivos	%
Diarrea	5	5	100.0
Neumonía	5	3	60.0
No presisado (aplastado)	5	2	40.0
Crecimiento retardado	6	2	33.3
Apariencia normal	7	0	00.0
Total	28	12	42.9

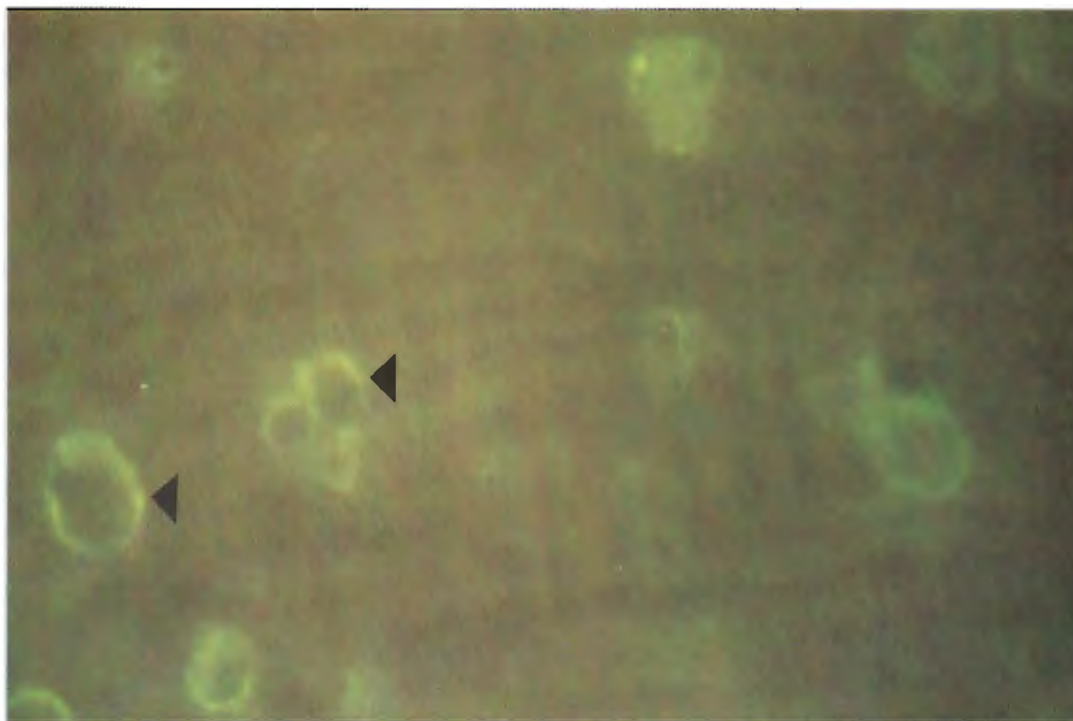


Figura 1. Corte en congelación de la glándula pituitaria. Nótese el antígeno viral en el citoplasma de algunas células. Inmunofluorescencia. 100X.

Discusión

Estudios realizados previamente por nuestro grupo demostraron que 30 a 60% de los lechones, de 1 a 30 días de edad, procedentes de granjas porcinas tecnificadas y muertos por problemas respiratorios y/o digestivos sin signos clínicos agudos de CP, presentaban el antígeno viral (datos no publicados). Estos resultados sugirieron que las infecciones subclínicas de CP prevalentes en crianzas porcinas no tecnificadas (Rios *et al.*, 1997), lo eran también en algunas granjas tecnificadas del Valle de Lima.

El 42.9% (12/28) de los lechones estudiados presentaron antígeno del VCP en tejidos linfoides y el SNC, esta alta prevalencia del virus en lechones de 1 a 20 días de edad sin presentar signos clínicos de la enfermedad indican, sin duda, infecciones pre y post natales con cepas del VCP de baja virulencia y que el virus persiste en el SNC y tejidos linfoides de los animales infectados (Cuadro 1).

Estudios sobre VDVB, indican que la persistencia viral es producto de infección por cepas no citopáticas durante el primer tercio de la gestación (Bolin *et al.*, 1985; McGowan *et al.*, 1995) y que el virus persiste en los tejidos linfoides y otros tejidos "privilegiados" como el SNC (Fernández *et al.*, 1989). El presente estudio determinó también que el SNC es uno de los lugares de persistencia del VCP, pues el 100% de los lechones con antígeno viral en sus tejidos linfoides también presentaron antígeno en el SNC mediante la prueba de inmunoperoxidasa (Cuadro 2).

Como ocurre con el VDVB, probablemente el VCP alcanza el SNC vía sanguínea durante los estadios tempranos del desarrollo fetal, cuando la barrera hematoencefálica es más permeable; luego,

en el SNC, el virus podría difundirse vía célula-célula (Fernández *et al.*, 1989; Wohrmann *et al.*, 1992). A diferencia, durante la infección postnatal aguda y sistémica del CP, el virus se replica activamente en las células del sistema inmune, así como en las células del endotelio de los vasos sanguíneos de todo el organismo incluyendo el SNC, causando, en este último, un proceso inflamatorio y probablemente favoreciendo su acceso al mismo.

Las células del tejido nervioso tienen poca habilidad de expresar antígeno de histocompatibilidad mayor de clase I (MHC-I), evitando así reacciones inflamatorias fatales en este tejido. Ciertos virus como el de la Coriomeningitis linfocítica (VCML) y el VDVB encuentran en las neuronas sitios favorables de persistencia (Joly *et al.*, 1991; Hewicker *et al.*, 1992). El VCP de baja virulencia podría tener el mismo mecanismo que los virus arriba mencionados.

El VCP tuvo amplia distribución en el cerebro de los lechones estudiados como lo indica la presencia de antígeno en la corteza cerebral del 100% de los lechones, seguido por el cerebelo (83.3%), glándula pituitaria (50%), tálamo e hipotálamo (41.7%), hipocampo (33.3%) y médula oblonga (16.7%) (Cuadro 3). Al parecer la alta frecuencia de infecciones prenatales, la prolongada viremia y la inmunotolerancia, que caracterizan a ciertas infecciones virales, son factores que facilitan el acceso del virus al SNC como lo indica estudios referentes al VCML en el ratón (Oldstone *et al.*, 1982).

El antígeno del VCP fue observado en el citoplasma de las neuronas de las diferentes áreas del encéfalo, pero no en las células epiteliales que recubren el tercer y cuarto ventrículo ni en las células de la leptomeninge. Joly *et al.* (1991), observaron que durante infecciones con el VCML de

tipo agudo, la replicación viral en el cerebro estaba restringida a las células de la leptomeninge y plexo coroideo, más no en las neuronas; mientras que, durante infecciones persistentes, el antígeno fue localizado principalmente en las neuronas.

La ausencia de antígeno del VCP en las leptomeninges, así como, la amplia distribución en las neuronas de las diferentes áreas del cerebro de los lechones (Cuadro 3) concuerda con lo indicado por Joly *et al.* (1991) y constituye un fuerte argumento a favor de que muchos de los lechones fueron infectados durante la etapa prenatal, es decir, por vía sanguínea y no por fluido cefaloraquídeo y que el SNC es también un lugar de persistencia del VCP.

En el presente estudio no se realizó el examen histopatológico detallado de las muestras, pero no se observó lesiones histopatológicas en los cerebros. Fernández *et al.* (1989) y Wohrmann *et al.* (1992) reportaron que las neuronas de terneros infectados persistentemente con el VDVB no presentaron aparentes lesiones morfológicas y aunque no fue posible conocer la integridad funcional de dichas neuronas, los autores mencionan que probablemente el periodo de vida de estas neuronas podrían ser mas cortas, y así mismo el daño funcional de las neuronas del sistema límbico podría ocasionar alteraciones en la conducta del animal.

Es relevante la presencia de antígeno viral en las células epiteliales de la adenohipófisis de la glándula pituitaria del 50 % de los lechones. No existe información referente al efecto del VCP en la función de estas células, pero estudios similares con el VCML se asocia la replicación viral en la adenohipófisis con disminución de la síntesis de la hormona de crecimiento, produciendo retardo en el crecimiento del ratón (Wohrmann *et al.*, 1992). Se menciona

también que algunos terneros infectados persistentemente con el VDVB tienen igualmente retardo en el crecimiento en relación a su edad. En este estudio la mayoría de los lechones muestreados tuvieron evidencias de pobre desarrollo corporal.

El VCP sólo fue detectado en 2 (20%) de los lechones de 1 a 5 días de edad. Sin embargo, se observó incremento progresivo en la detección de antígeno viral en los lechones de 6, 15 y 20 días de edad, respectivamente (Cuadro 1). Esto podría explicarse por la posible reactivación y replicación viral en los tejidos y/o nuevas infecciones postnatales con cepas de baja virulencia prevalente en las granjas como lo indica Oirschot (1980).

Por otro lado, el 100 y 60% de los lechones con problemas diarreicos y neumónicos, respectivamente, presentaron antígeno del VCP, talvés como consecuencia del rol inmunodepresor del virus y predispone sobre todo en lechones a infecciones secundarias (Cuadro 4).

En las granjas tecnificadas la prevención del CP es mediante la inmunización sistemática con vacunas preparadas a base de la cepa china lapinizada o preparada en cultivo celular. La presencia del VCP en las granjas a pesar de inmunización de los animales sugiere la existencia de cepas capaces de escapar a los anticuerpos neutralizantes de origen vacunal o inducidos por virus de campo como está ocurriendo con el pestivirus bovino (Paton *et al.*, 1992; Ridpath *et al.*, 1994).

Conclusiones

El VCP de baja virulencia es prevalente en granjas porcinas tecnificadas del Valle de Lima. Estas cepas inducen infecciones subclínicas y persisten en los

tejidos linfoides y el SNC incluyendo la glándula pituitaria.

Un 20 % aproximadamente de los lechones de 1 a 20 días de edad de pobre condición física nacen persistentemente infectados con el VCP. El porcentaje de infección subclínica se incrementa a lo largo de la vida del animal.

Altos porcentajes de lechones con problemas diarreicos y respiratorios procedentes de granjas tecnificadas tienen antígeno del VCP en sus tejidos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los poricultores que colaboraron donando los lechones para el estudio. Igualmente al Dr. Raúl Rosadio por sus valiosas sugerencias y comentarios.

Literatura Citada

1. **Bezek, M.D. 1995.** Bovine diarrhea virus infection: individual and herd diagnosis. *Comp Continuing Education*. 17(8): 57-63.
2. **Bolin, S.R., A.W. McClurkin y M.F. Coria. 1985.** Frequency of persistent bovine viral diarrhea virus infection in selected cattle herds. *Am J Vet Res*. 46:2385-2387.
3. **Brownlie, J., P.J. Booth, D.A. Stevens y M.E. Collins. 1997.** Expression of non-cytopathogenic bovine viral diarrhea virus (BVDV) in oocytes and follicles of persistently infected cattle. *Vet Rec* 141: 335-337.
4. **Dahle, J., G. Schagemann, V. Moennig y B. Liess. 1993.** Clinical, virological and serological findings after intranasal inoculation of pigs. *J Vet Med*, 40:46-54.
5. **Fernández, A., M. Heweker, G. Trautwein, J. Pohlenz y B. Liess. 1989.** Viral antigen distribution in the central nervous system of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Vet Pathol*. 26: 26-32.
6. **Hewiker-Trautwein, M., G. Trautwein, V. Moennig y B. Liess. 1992.** Infection of bovine fetal brain cell culture with cytopathogenic and non-cytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol*. 33: 239-248.
7. **Joly, E., L. Mucke y M.B.A. Oldstone. 1991.** Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression. *Science*. 253: 1283-1285.
8. **McGowan, M.R y P.D. Kirkland. 1995.** Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. *Br Vet J*. 151:263-270.
9. **Meyers, G. y H-J Thiel. 1995.** Cytopathogenicity of classical swine fever caused by defective interfering particles. *J Virol*. 69(6):3683-3689.
10. **Moennig, V. y P.G.W. Plagemann. 1992.** The pestivirus. *Adv Virus Res*. 41: 53-93.
11. **Nettleton, P.F., J.A. Herring y W. Corrigall. 1980.** Isolation of bovine virus diarrhea virus from a Scottish red deer. *Vet Rec* 107: 425-426.
12. **Oldstone, M.B.A., N.Y. Sinha, P. Blount, A. Tshon, M. Rodríguez, R. Von Wedel y P.W. Lampert. 1982.** Virus induced alterations in homeostasis: alterations in differentiated functions of

- infected cells in vivo. *Science*. 218: 1125-1127.
13. **Paton, D.J., J.P. Lowings y A.D.T. Barrett. 1992.** Epitope mapping of the gp53 envelope protein of bovine viral diarrhea virus. *Virol.* 190: 763-772.
14. **Potgieter, L. N. 1995.** Immunology of bovine viral diarrhea. *Vet Clin North Am: Food Animal Practice*. 11(3): 501-520.
15. **Rumenapf, T., G. Unger, J.H. Strauss y H-J Thiel. 1993.** Processing of the envelope glycoproteins of pestivirus. *J Virol.* 67(6): 3288-3294.
16. **Ridpath, J., S. Bolin y E. Dubovi.** Segregation of bovine viral diarrhea virus genotypes. *J Virol.* 205: 66-74.
17. **Rios, M., H. Rivera, N. Sandoval, A. Manchego, C. Camacho y R. Rosadio. 1997.** Asociación del virus del cólera porcino con mortalidad neonatal en crianza porcina no tecnificada. *Rev Inv Pec IVITA (Peru)*; 8(1): 10-18.
18. **Rojas, M.W. 1995.** Inmunología. Corporación para investigaciones biológicas. 10ma ed. Colombia. p: 56-57, 216-219, 336-343.
19. **Terpstra, C. 1991.** Hog cholera: An update of present knowledge. *Br Vet J.* 147:397-400.
20. **Van Oirschot, J. 1980.** Persistent and inapparent infections with swine fever virus of low virulence their effects on the immune system. *Drukkerij Elinwijk B V-Utrecht. The Netherlands.* 67-82.
21. **Wensvoort, G., C. Terpstra, E.P. De Kluyver, C. Kragten y J.C. Warnaar. 1989.** Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus. *Vet Microbiol.* 21: 9-20.
22. **Wohrmann, T., M. Hewiker-Trautwein, A. Fernandez, V. Moennig, B. Liess y G. Trautwein. 1992.** Distribution of bovine virus diarrhea viral antigens in the central nervous system of cattle with various congenital manifestations. *J Vet Med.* 39: 599-609.