

Adaptación viral exitosa de la Peste Porcina Clásica (cepa C) a cultivo celular para la producción de vacunas

Mayelin Paneque Zayas, M.Sc.₁, Yenis del Toro Yen, M.Sc.₁,
Aníbal Domínguez Odio*, M.Sc.₂

¹Departamento de Investigación-Desarrollo. Empresa Productora de Vacunas Virales y Bacterianas. Grupo Empresarial LABIOFAM, La Habana, Cuba

²Unidad de Desarrollo e Innovación. Grupo Empresarial LABIOFAM. La Habana, Cuba

Recibido: 1 de noviembre del 2018

Aprobado: 12 de septiembre del 2019

*Autor de correspondencia: Aníbal Domínguez Odio. Grupo Empresarial LABIOFAM, Avenida Independencia Km 16 ½, Boyeros, La Habana, Cuba. Tel: (53) 7 6849658, correo electrónico: esp7.desarrollo@labiofam.cu

Cómo citar este artículo: Paneque-Zayas M, Del Toro-Yen Y, Domínguez-Odio A. Adaptación viral exitosa de la Peste Porcina Clásica (cepa C) a cultivo celular para la producción de vacunas. *Spei Domus*. 2018;14(28-29):1-9. doi: <https://doi.org/10.16925/2382-4247.2018.01.03>

Resumen. *Introducción:* la peste porcina clásica (PPC) es una enfermedad viral, infectocontagiosa y transfronteriza que causa importantes pérdidas económicas a nivel mundial. La inmunización sistemática y preventiva con vacunas vivas atenuadas es muy útil para su control; las vacunas lapinizadas están entre las más utilizadas. Sin embargo, las limitaciones éticas que presenta su elaboración obligan a la industria biofarmacéutica veterinaria a buscar nuevas alternativas para su producción. Este trabajo tuvo como objetivo adaptar la cepa C del virus de la peste porcina clásica a cultivo celular de conejo y cerdo. *Metodología:* se utilizaron las líneas de riñón de conejo (RK-13) y de cerdo (PK-15). Ambas fueron infectadas con un homogenizado de bazo + sangre, obtenido de conejos de la raza neozelandés blancos, inoculados con el virus semilla maestro (cepa C, 4^o pase) de la vacuna viva lapinizada contra la PPC fabricada por LABIOFAM, Cuba. Para evaluar la adaptación y replicación viral en las líneas celulares, durante los 23 pases posinfección, se empleó la identificación del fragmento del gen que codifica la proteína E2 del virus PPC, mediante la técnica transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y la cuantificación de los títulos virales infectivos ($\text{DICT}_{50} / \text{mL}$) por inmunoperoxidasa. *Resultados:* se adaptó la cepa C lapinizada a las líneas celulares RK-13 y PK-15 luego de 23 pases sucesivos, y se obtuvieron en esta última los mayores niveles de replicación viral con títulos infectivos de $10^{5.8} \text{DICT}_{50} / \text{mL}$. *Conclusiones:* las líneas celulares RK-13 y PK-15 fueron susceptibles a la infección de la cepa C, aunque la PK-15 mostró los mayores valores de replicación viral.

Palabras clave: cultivo celular, peste porcina clásica, RT-PCR, vacunas.



Successful viral adaptation of Classical Swine Fever (strain C) to cell culture in order to produce vaccines

Summary. *Introduction:* Classical swine fever (CSF) is a viral, infectious and cross border disease that causes important economic losses worldwide. Systematic and preventive immunization with live attenuated vaccines is pretty useful for its control; among these lapinized vaccines are within the most used. However, ethical limitations surrounding its production obliges bio-pharmaceutical industry to search for alternatives. The aim of this research is to adapt strain C of the CSF virus to a rabbit and pig cell culture. *Methodology:* rabbit kidney lines (RK-13) and pig's (PK-15) were used. Both were infected with an homogenous spleen + blood, retrieved from white neo-Zealand rabbits, inoculated with master seed virus (strain C, 4th pass) from lapinized vaccine against the PPC fabricated by LABIOFAM, Cuba. In order to evaluate viral adaptation and replication within cellular lines, during the 23rd passes post-infection, it was identified a fragment of gen that codifies the E2 protein from the CSF virus, through reverse transcription technique -Polymerase chain reaction (RT-PCR) and the quantification of infectious viral titles (DICT50 /mL) by immunoperoxidase. *Results:* lapinized strain C was adapted to cellular lines RK-13 and PK-15 after 23 successive passes, obtaining in the last one greater levels of viral replication with infectious titles of 105.8 DICT50 /mL. *Conclusions:* cellular lines RK-13 and PK-15 were susceptible to strain C infection, although PK-15 showed greater levels of viral replication.

Keywords: Cell culture, classical swine fever, RT-PCR, vaccines

Adaptação viral bem-sucedida da febre suína clássica (cepa C) para cultura de células para produção de vacina

Resumo. *Introdução:* a peste suína clássica (LCR) é uma doença viral, infecciosa e trans-fronteiriça que causa perdas econômicas significativas em todo o mundo. A imunização sistemática e preventiva com vacinas vivas atenuadas é muito útil para o seu controle; Entre elas, as vacinas lapinizadas estão entre as mais utilizadas. No entanto, as limitações éticas de sua produção obrigam a indústria biofarmacêutica veterinária a buscar novas alternativas para sua produção. Este trabalho teve como objetivo adaptar a cepa C do vírus da peste suína clássica para cultura de células de coelhos e suínos. *Metodologia:* foram utilizadas as linhagens de rim de coelho (RK-13) e porco (PK-15). Ambos foram infectados com um homogenato de baço + sangue, obtido de coelhos brancos da Nova Zelândia, inoculado com o vírus semente mestre (cepa C, 4ª passagem) da vacina lapinizada viva contra CSF fabricada por LABIOFAM, Cuba. Para avaliar a adaptação e replicação viral em linhagens celulares, durante as 23 passagens pós-infecção, foi utilizada a identificação do fragmento do gene que codifica a proteína E2 do vírus PPC, por meio da reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) e a quantificação dos títulos virais infecciosos (TCID50 / mL) por imunoperoxidase. *Resultados:* a cepa C lapinizada foi adaptada às linhagens celulares RK-13 e PK-15 após 23 passagens sucessivas, obtendo nesta última os maiores níveis de replicação viral com títulos infectantes de 105,8 TCID50 / mL. *Conclusões:* As linhas celulares RK-13 e PK-15 foram suscetíveis à infecção pela cepa C, embora PK-15 tenha apresentado os maiores valores de replicação viral.

Palavras-chave: Cultura de células, peste suína clássica, RT-PCR, vacinas



Introducción

La peste porcina clásica (PPC) es una enfermedad transfronteriza y altamente transmisible, que afecta porcinos domésticos y silvestres de todas las edades. El agente causal es un virus de la familia *Flaviviridae*, y género *Pestivirus* estrechamente relacionado, desde el punto de vista antigénico y genético, con los virus de la diarrea viral bovina (DVB) y la enfermedad de la frontera (EF) [1].

Los brotes de PPC amenazan la seguridad alimentaria de los pueblos y, por ende, su calidad de vida, pues la especie porcina está ampliamente difundida en modelos industriales y familiares. Las graves afectaciones económicas se explican por su alta morbilidad y mortalidad; bajas conversiones de peso del animal enfermo, elevados costos de los servicios veterinarios, así como el cierre de mercados internacionales para los productos y subproductos porcinos [2] y [3].

Aunque la PPC se erradicó con éxito en 32 países, siete de los cuales están en América (Canadá, EUA, México, Costa Rica, Paraguay, Argentina y Chile); aún representa un serio problema sanitario en el presente y posiblemente en el futuro para Asia y Europa (figura 1). Los factores asociados a la ocurrencia de la enfermedad son de índole diversa, donde la circulación de cepas virales con una amplia e incrementada diversidad genética es

una de las causas fundamentales que complica su control [2] y [4].

Los países afectados por PPC reconocen e incorporan en sus respectivos programas de control, la vacunación sistemática como herramienta fundamental para erradicarla. Mientras que, en aquellos con estatus libre de la enfermedad o erradicación en progreso, la vacunación está generalmente suspendida o en proceso de exclusión [5]-[8]. En este contexto las vacunas vivas atenuadas, siempre que se requieran, son una alternativa interesante para promover una respuesta inmune protectora con menores costos [9] y [10].

Existen en el mercado varias formulaciones elaboradas a partir de cepas vacunales atenuadas tales como: Thiverval, PAV-250, GPE-, cepa K y cepa C. Esta última es una de las más utilizadas a nivel global, y fue obtenida en 1956 tras 480 pases en conejos. El principal factor limitante para la fabricación de vacunas a partir de la cepa C lapinizada es la utilización de órganos de conejos infectados (bazo, ganglios linfáticos y sangre), ya que esta es una práctica éticamente no recomendable [5].

Sobre la base de las dificultades antes mencionadas, Cuba se esfuerza por la obtención de una formulación inmunogénica similar en cultivo celular. En tal empeño, aprovecha los conocimientos acumulados en el empleo líneas celulares para la propagación de patógenos intracelulares a

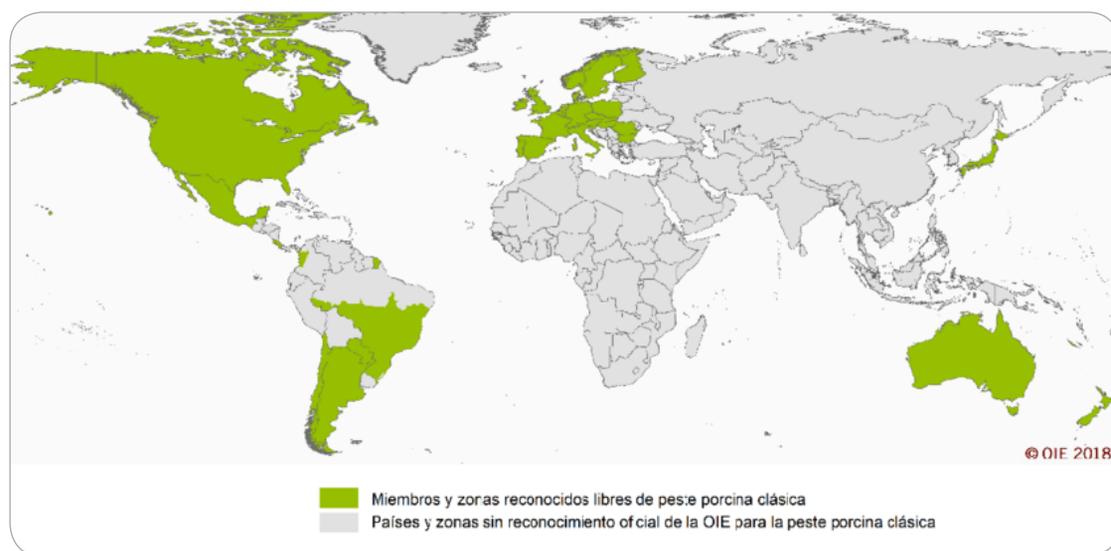


Figura 1. Estatus oficial de los países miembros de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para la Peste Porcina Clásica en Animal.

Fuente: Organización Mundial de Sanidad Animal, mayo, 2018.

gran escala [11] y [12]. En este sentido, los resultados en las líneas de riñón de cría de hámster sirio (BHK-21) para la fiebre aftosa y encefalomiocarditis porcina viral [13] y [14], riñón de mono verde africano (Vero) para la fiebre del valle del Rift e influenza porcina [15] y [16], línea celular procedente de *Rhipicephalus appendiculatus* (RAE25) para *Anaplasma centrale* [17], son ejemplos útiles y recientes.

El beneficio de los sistemas de propagación masiva de células como sustrato implica muchas ventajas para la industria biofarmacéutica veterinaria, entre ellas la estabilidad productiva y los altos rendimientos [18]. A partir de estas consideraciones éticas, técnicas y económicas, esta investigación se propuso como objetivo adaptar la cepa C del virus de la peste porcina clásica a las líneas celulares de riñón de conejo (RK-13) y de riñón de cerdo (PK-15) para explorar la posibilidad de utilizar estas líneas para la replicación y obtención de una vacuna en cultivo celular contra la PPC.

Materiales y métodos

Consideraciones éticas

La manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de animales de laboratorio con fines investigativos establecidos en Cuba y a nivel internacional [19], [20], [21], [22]. Los procedimientos empleados en el estudio con animales fueron aprobados por el comité de ética institucional de la empresa LABIOFAM, Cuba. El sacrificio de los animales se realizó por inhalación de dióxido de carbono según lo establecido en las guías para la eutanasia de animales de la Asociación Médica Veterinaria Americana (AVMA) [23].

Cepas de ensayo y de referencia

- Inóculo primario: homogenizado de bazo+sangre desfibrinada obtenida de conejos inoculados con el virus semilla maestro (4^{to} pase) de la vacuna viva lapinizada contra PPC fabricada por el Grupo Empresarial LABIOFAM, Cuba. Para la obtención del inóculo primario se utilizaron 8 conejos de la raza Nueva Zelanda, adultos de ambos sexos, procedentes del Centro

de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba), cuyo peso corporal osciló entre 2,2-2,7 kg. De ellos 5 fueron inoculados por la vena marginal de la oreja con el vsm y 3 se mantuvieron como control del experimento, a los que no se les administró el inóculo.

Los animales se colocaron en jaulas individuales y se adaptaron durante 14 días a las condiciones experimentales antes del inicio de las inoculaciones con la cepa vacunal del virus de la peste porcina clásica lapinizada. Se mantuvieron en condiciones adecuadas de temperatura (22 °C ± 2 °C), humedad (68 % ± 2 %) y ciclos luz-oscuridad de 12 h. El agua y la comida fueron suministradas *ad libitum*. Se utilizó como alimento pienso completo, balanceado y libre de antibióticos en cantidades adecuadas para la especie y edad, producido en el CENPALAB.

- Vacuna China-Vac., fabricada por James Brown Pharma C.A (Ecuador). Título viral ≥10³ DL50 % IFCT.

Línea celular

- Línea celular de riñón de conejo (RK-13), Sigma-Aldrich, Acc 00021715, pase 10.
- Línea celular de riñón de cerdo (PK-15), del Banco de Células Maestra (BCM), pase 54 (LABIOFAM), obtenido a partir de la ATCC, libre de pestivirus.

Replicación viral en las líneas celulares

Se descongelaron dos criotubos que contenían las líneas celulares RK-13 y PK-15 a 37 °C en baño de maría. Luego, las células fueron centrifugadas a 450 G durante 10 min y resuspendidas con Medio Esencial Mínimo Eagle (MEM, Sigma-Aldrich), el cual contenía suero fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich) al 10 %. En todos los casos el medio fue preparado sin antibióticos, y el suero bovino fetal y la solución Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, USA), fueron negativos a anticuerpos contra Parvovirus por Inhibición de la Hemaglutinación (HI) y a Pestivirus empleando la técnica de PCR convencional, según Chiok *et al.* [24] y Sullivan *et al.* [25], y con sus correspondientes certificados de calidad.

Las células fueron crecidas en frascos Roux de 25 cm² e incubadas a 37 °C con 5 % de CO₂, hasta obtener el 100 % de confluencia de la monocapa celular. Una vez logrado, se procedió a su desprendimiento

empleando el método de dispersión enzimática con solución Tripsina-EDTA, según el método descrito por Mather y Roberts [26].

La infección experimental de las líneas celulares se realizó al mezclar bajo flujo laminar 1 mL del inóculo primario con igual volumen de células suspendidas en medio MEM (Sigma-Aldrich, USA). Luego de 2 h en agitación, las células infectadas en suspensión fueron crecidas en frascos Roux de cultivo celular de 25 cm² e incubadas bajo las mismas condiciones referidas en un inicio.

Transcurridas 96 horas posinfección las células de ambas líneas fueron sometidas a tres ciclos sucesivos de congelación-descongelación y centrifugadas a 3.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue empleado para realizar la reinfección experimental siguiente, este proceso se repitió tres veces, con un intervalo de 96 h. Al concluir este pase, se utilizó una alícuota de 1 mL, para infectar monocapas de las células RK-13 y PK-15 crecidas con 80 % de confluencia, realizándose 19 pases más de forma sucesivas, para un total de 23 de pases realizados durante el estudio.

El control de esterilidad se realizó inoculando 1 mL de la suspensión celular obtenida en cada uno de los pases a Caldo Triptona de Soya y Tioglicolato de Sodio (Sigma, USA), los cuales fueron observados durante 15 días consecutivos. Las muestras inoculadas en el Caldo Triptona de Soya fueron incubadas entre 20-25 °C, mientras que el Tioglicolato de Sodio fue incubado entre 30-35°C.

Observación de las líneas celulares infectadas

Los frascos Roux con cultivo celular fueron inspeccionados por observación en microscopio invertido, para evaluar sus características, en especial posibles cambios de color y en busca de eventuales contaminaciones bacterianas o fúngicas, o alteraciones morfológicas celulares.

Titulación viral por la técnica de inmunoperoxidasa (IPMA)

A partir de células RK-13 y PK-15 procedentes de los pases 1, 4, 9, 14, 19 y 23, se prepararon diluciones seriadas en base 10, en medio de crecimiento. Se mezclaron 50 µL de cada dilución con 50 µL de células PK-15 con 10⁵ cel/pocillo y fueron

crecidas en placas de 96 pocillos de cultivo celular. Se emplearon 5 pocillos por dilución.

Las placas fueron incubadas a 37 °C y en atmósfera de 5 % de CO₂ durante 7 días. Al cabo de este tiempo las monocapas se mostraron confluentes, se fijaron las células y se procedió a la titulación mediante la técnica de inmunoperoxidasa siguiendo el procedimiento descrito por la OIE, 2014. Los títulos fueron determinados mediante el método de Reed y Muench [27] y se expresaron como dosis infectiva 50 % en cultivo de tejido (DICT₅₀).

Purificación de ácido ribonucleico (RNA)

Al inóculo primario y a las células infectadas correspondientes a los pases 1, 9 y 23, se les extrajo el RNA viral para lo cual se emplearon 300 µL del inóculo primario e igual cantidad del sobrenadante de las células infectadas, las cuales habían sido anteriormente sometidas a tres ciclos sucesivos de congelación y descongelación y centrifugación a 450 G durante 10 minutos a 4°C.

La extracción y purificación del RNA se realizó con el kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA fue resuspendido en 50 µL de agua libre de DNase, (Sigma, USA) y mantenido a -70 °C hasta el momento de su utilización. La concentración y pureza fue determinada utilizando Nanodrop 2000.

Detección del virus PPC mediante RT-PCR

El PCR se realizó con el kit comercial OneStep RT-PCR (QIAGEN, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para ello se realizó una mezcla de reacción con un volumen final de 50 µL. Esta reacción contenía 10 µL de tampón 5X QIAGEN OneStep RT-PCR, con una concentración final de 2,5 mM Mg²⁺, mezcla de dNTP a una concentración final de 400 µM de cada uno, mezcla de enzima 2 µL (HotStarTaq DNA polimerasa, Omniscript y Sensiscript) y los oligonucleótidos específicos, con una concentración final de 0.6 µM (tabla 1). Se añadió 5 µL de RNA. La reacción fue completada con agua libre de ribonucleasa (RNase). Los oligonucleótidos específicos utilizados fueron: P1, 5'-ATATATGCTCAA GGGCGAGT-3' y P2, 5'-ACAGCAGTAGTATCCATTTC-3' según Chiok *et al.* [24].

La reacción fue realizada en las siguientes condiciones: primer paso, 30 min a 50 °C; un segundo paso de 15 min a 95 °C; y el tercer paso, 30 seg. a 94 °C, 1 min a 54 °C y 1 min a 72 °C. Este fue repetido durante 35 ciclos. Finalmente se realizó un ciclo de extensión final de 10 min a 72 °C.

El producto de PCR fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2 % con transiluminador. Se empleó como control positivo la vacuna China-Vac y el marcador de peso molecular E-Gel 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Se emplearon como controles negativos los RNA obtenidos a partir de células RK-13 y PK-15 no infectadas con el virus PPC y agua libre de RNase como control de la reacción.

Resultados y discusión

En este estudio se comprobó la infección de las células de las líneas RK-13 y PK-15 con el virus semilla maestro (cepa C, 4to pase) a partir del homogenizado de bazo+sangre, obtenido de conejos de la raza neozelandés-blanca, previamente inoculados. La susceptibilidad registrada en estas dos líneas celulares fue semejante a la obtenida en otros cultivos celulares tales como riñón de cerdo recién nacido (SK6), testículo de cerdo (STE), testículo de bovino y riñón de minicerdos (MPK) [5], [28], [29], [30].

Tanto en el primer pase (96 horas posinfección), como en el 9 y el 23, se comprobó la presencia de RNA viral intracelular, mediante la amplificación del fragmento de 308 pb del gen que codifica la proteína E2 del virus de la PPC utilizando RT-PCR. En la figura 2, se aprecia una banda del tamaño esperado (308 pb) procedente de las células RK-13 y PK-15 infectadas, similar al control positivo, demostrando que el virus penetró la célula y se replicó en su interior. En el caso de los controles negativos, no se obtuvo amplificación lo cual demuestra que no existió contaminación entre las muestras.

Con relación al aspecto morfológico de los cultivos durante los 23 pases realizados, no se detectaron cambios visibles, a pesar de existir RNA viral intracelular. Este hecho no es inesperado, también ha sido reportado por otros autores tanto en PK-15 como en STE [31] y [32]. La ausencia de este efecto en las células infectadas posiblemente esté vinculada a los mecanismos antioxidantes internos,

mediados por la hemoxigenasa 1, peroxiredoxina 6, entre otras. Estos incrementan la resistencia celular frente al agente estresor (virus de PPC) y evita la citotoxicidad y la apoptosis [33] y [34].

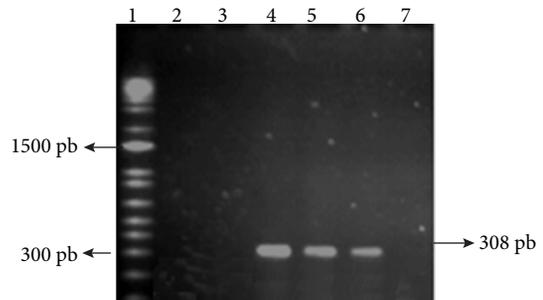


Figura 2. Amplificación de un fragmento del genoma de la proteína E2 del virus de la PPC.

Línea 1: Marcador de peso molecular E-Gel 1 Kb Plus DNA, línea 2: Control negativo de la reacción, línea 3 y 7: células RK-13 y PK-15 no infectadas respectivamente, línea 4: células RK-13 a las 96 h pi, línea 5: línea PK-15 a las 96 h pi, línea 6: Control positivo Vacuna China-Vac.

Fuente: elaboración propia

Al realizar la titulación por IPMA, en los pases 1, 4, 9, 14, 19 y 23 se confirmó la utilidad de las líneas RK-13 y PK-15 como sustrato para la replicación del virus. El incremento logarítmico del título viral se comportó desde $10^{2.47}$ DICT₅₀/mL cuantificado en el segundo pase en suspensión hasta $10^{5.1}$ DICT₅₀/mL en el pase 23 para RK-13 (figura 3). En el caso de la línea celular PK-15 el incremento fue ligeramente superior durante todo el experimento, desde $10^{3.0}$ DICT₅₀/mL hasta $10^{5.8}$ DICT₅₀/mL respectivamente.

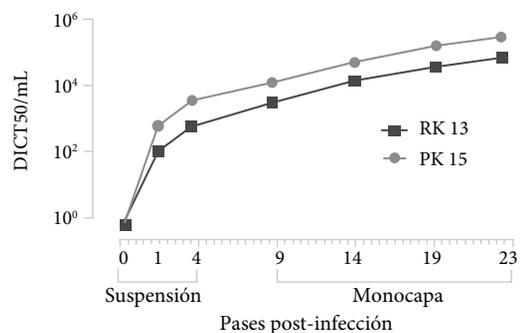


Figura 3. Dinámica de replicación viral de la cepa C en las líneas celulares RK-13 y PK-15 por tipo de crecimiento.

Pase 0: inicio de la infección experimental.

Fuente: elaboración propia

La adaptación viral exitosa *in vitro* en el caso de la RK-13 pudiera explicarse en principio, por la cercanía genética entre el conejo y el nuevo sustrato utilizado [5], aunque el riñón no es el órgano de mayor tropismo. Resultados publicados por Rivero *et al.* [35] señalan, además, que esta línea celular es menos susceptible a infecciones del virus PPC y VDVb cuando se compara con MPK y PK-15 respectivamente [36]. Este último resultado es de gran importancia tecnológica pues al ser la RK-13 más resistente al VDVb, existe menos posibilidades de contaminación con este virus durante la fabricación, aunque puede comprometer los rendimientos productivos [37].

En el caso de la PK-15, existen varios reportes sobre su susceptibilidad a infecciones tanto con cepas vacunales lapinizadas (IVRI y Assam) [31], como recombinantes [32] y cepas salvajes circulantes [38]. Los títulos infectivos obtenidos en el pase 23 ($10^{5.8}$ DICT₅₀/mL) fueron superiores a lo reportado por Tong *et al.*, en el pase 40 ($10^{4.0}$ DICT₅₀/mL) y similares al obtenido en el pase 80 ($10^{6.0}$ DICT₅₀/mL) con la cepa C recombinante [32]. En comparación con la cepa Assam, los resultados de este estudio estuvieron en correspondencia con los obtenidos en el pase 15, con títulos de $10^{6.0}$ DICT₅₀/mL [31].

Es importante tener en cuenta que durante el proceso de adaptación *in vitro* del virus al nuevo sustrato, pudieron ocurrir cambios en su genoma [31], [39]-[41]. En ese sentido, se requiere profundizar tanto en su estructura genética como en su comportamiento inmunogénico, y de esta forma establecer las consecuencias biológicas asociadas a las posibles mutaciones en las proteínas estructurales y no estructurales (E, p7, ns4B, entre otras), [38], [39], [42], [43] que pudieron ocurrir en este periodo.

Este estudio es de gran importancia ya que constituye un avance en la adaptación de la cepa C en cultivos celulares, lo que podría ser una herramienta útil para la obtención de una vacuna contra el virus de la PPC, sustituyendo la vacuna que actualmente se emplea para el control de la enfermedad, y eliminar el uso de animales para su elaboración.

Conclusiones

Las líneas celulares RK-13 y PK-15 son susceptibles a la infección de la cepa C del virus de la PPC, siendo esta última la de mayores valores de replicación

viral y, por tanto, la de mayor potencialidad para su empleo en la industria biofarmacéutica veterinaria.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ph.D Eloy Díaz Fernández perteneciente a los laboratorios Chemical Ibérica Productos Veterinarios S.L. Salamanca, España por el asesoramiento científico de la investigación.

Referencias

- [1] Blome S, Staubach C, Henke J, Carlson J, Beer M. Classical Swine Fever-an updated review. *Viruses*. 2017; 9(4):86-111. DOI: 10.3390/v9040086.
- [2] Singh VK, Rajak K, Kumar A, Yadav SK. Classical swine fever in India: status and future perspective. *Trop Anim Health Prod*. 2018; 50(6):1181-1191. DOI: 10.1007/s11250-018-1608-5.
- [3] Moennig V, Becher P, Beer M. Classical swine fever. *Dev Biol (Basel)*. 2013; 135:167-74. doi: 10.1159/000178522.
- [4] Rios L, Núñez JI, Díaz de Arce H, Ganges L, Pérez LJ. Revisiting the genetic diversity of classical swine fever virus: A proposal for new genotyping and sub-genotyping schemes of classification. *Transbound Emerg Dis*. 2018; 65(4):963-971. DOI: 10.1111/tbed.12909.
- [5] Luo Y, Li S, Sun Y, Qiu HJ. Classical swine fever in China: a minireview. *Vet Microbiol*. 2014; 172(1-2):1-6. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.04.004.
- [6] Ferrer E, Fonseca O, Percedo MI, Abeledo MA. La peste porcina clásica en las Américas y el Caribe: actualidad y perspectivas de control y erradicación. *Rev Salud Anim*. 2010; 32(1):11-21. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0253-570X2010000100002
- [7] Postel A, Moennig V, Becher P. Classical swine fever in Europe: the current situation. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2013; 126(11-12):468-75.
- [8] Schulz K, Staubach C, Blome S. African and classical swine fever: similarities, differences and epidemiological consequences. *Vet Res*. 2017; 48(84). DOI: 10.1186/s13567-017-0490-x
- [9] Van Oirschot JT. Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet Microbiol*. 2003; 96:367-384. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.09.008
- [10] Moennig V, Becher P. Pestivirus control programs: how far have we come and where are we going? *Anim Health Res Reviews*. 2015; 16(1): 83-87. DOI: 10.1017/S1466252315000092.

- [11] Tavira C, Ortega GA, Dávila GI, Estrada MS, Meneeses AA. Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. *Rev Mex Cien Farm.* 2009; 40(4):35-46. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57912962006.pdf>.
- [12] Fernanda ML, Ramírez G, Jaime CJ, Vera AV. Cultivos celulares como alternativa para el aislamiento y la producción de biológicos contra el Virus de Influenza. *Nova* 2011; 9(15): 83-93. DOI: <https://doi.org/10.22490/24629448.491>
- [13] Leiva PO, Lorenzo RF, Calderón GR. Producción del antígeno viral para la vacuna de la Encefalomiocarditis Porcina en un cultivo en suspensión de la línea BHK21 C13. *REDVET* 2013; 14(2).
- [14] Dill V, Hoffmann B, Zimmer A, Beer M, Eschbauer M. Influence of cell type and cell culture media on the propagation of foot-and-mouth disease virus with regard to vaccine quality. *Virology* 2018; 15(46). DOI: 10.1186/s12985-018-0956-0.
- [15] Faburay B, Desiree A, Scott DM, Wilson W, Richt JA. Current status of Rift Valley fever vaccine development. *Vaccines (Basel)*. 2017; 5(3): 29. DOI: 10.3390/vaccines5030029.
- [16] Matthew R. Sandbulte, Anna R. Spickler, Pamela K. Zaabel, James A. Roth. Optimal use of vaccines for control of influenza A virus in swine. *Vaccines (Basel)*. 2015; 3(1): 22-73. DOI: 10.3390/vaccines3010022.
- [17] Sakyi LB, Palomar AM, Bradford EL, Shkap V. Propagation of the israeli vaccine strain of *Anaplasma centrale* in tick cell lines. *Vet Microbiol.* 2015; 179(3-4):270-276. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.07.008.
- [18] Pardo G, Almora E, Fidalgo O. Ensayo in vitro para detectar la presencia de agentes adventicios en un banco de células de trabajo. *VacciMonitor*. 2001; 1:17-21. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.07.008.
- [19] CENPALAB. Código Práctico del Uso de los Animales de Laboratorio del CENPALAB. La Habana, Cuba. 1992.
- [20] Riera L, Lugo S, Sosa I, Entrena A, Acevedo MC, Tabares T, et al. Programas de aseguramiento de la calidad en la producción de animales de laboratorio. *Rev Salud Anim.* 2008; 30(1):12-6. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v30n1/rsa02108.pdf>.
- [21] European Commission Guidance Document. 2010. National Competent Authorities for the implementation of Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. A working document on the development of a common education and training framework to fulfill the requirements under the Directive. Bruselas. Disponible en: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/guidance/education_training/en.pdf
- [22] Guillen J. FELASA Guidelines and Recommendations. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.* 2012; 51(3): 311-321. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22776188>.
- [23] AVMA. American Veterinary Medical Association Guidelines on Euthanasia: 2013 Edition. [Internet]. Illinois, Estados Unidos: AVMA; 2013.
- [24] Chiok KL, Manchego SA, Rivera G H, Sandoval CN, Ramírez VM. Standardization and validation of qualitative real time RT-PCR for detection of Classical Swine Fever virus. *Rev. Inv. Vet Perú.* 2011; 22(4):377-387.
- [25] Sullivan DG, Akkina RK. A nested PR assay for differentiation of Pestiviruses. *Virus Res* 1995; 38: 231-239. DOI: 10.1016/0168-1702(95)00065-x.
- [26] Mather J, Roberts P. Introduction to cell and tissue culture: theory and technique. genentechinc. South San Francisco, California; 2002. p.1-3.
- [27] Reed L, Muench H. A simple, method of estimating 50 percent end point. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1938; 27: 493-497.
- [28] Gladue DP, Holinka LG, Largo E, Fernández SI, Carrillo C, O'Donnell V, Baker BR, et al. Classical swine fever virus p7 protein is a viroporin involved in virulence in swine. *J Virol.* 2012; 86(12):6778-6791. DOI: 10.1128/JVI.00560-12.
- [29] Grummer B, Fischer S, Depner K, Riebe R, Blome S, Greiser WI. Replication of classical swine fever virus strains and GJ, Hoper D, et al. Rescue of the highly virulent classical swine fever virus strain "Koslov" from cloned cDNA and first insights into genome variations relevant for virulence. *Virology.* 2014; 468-470C: 379-387.
- [42] Tamura T, Sakoda Y, Yoshino F, Nomura T, Yamamoto N, Sato Y, et al. Selection of classical swine fever virus with enhanced pathogenicity reveals synergistic virulence determinants in E2 and NS4B. *J Virol.* 2012; 86(16):8602-8613.
- [43] Cheng Z, Xiaofang S, Rui W, Ling L, Zishu P. Classical swine fever virus nonstructural protein p7 modulates infectious virus production. *Scientific Reports.* 2017; 7(12995). doi: 10.1038/s41598-017-13352-w.

