

## ESTUDIO PRELIMINAR DE PESTIVIRUS BRASILEÑOS MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Eber Oliveira S. (Med. Vet., M. Sc.)<sup>1</sup>, Paulo Roche M., (Med. Vet., M. Sc.; PhD)<sup>1, 2\*</sup>,  
Rejane Schaefer R. (Med. Vet.)<sup>1</sup>, Eduardo Flores F. (Med. Vet.; PhD)<sup>3</sup>, Rubi Weiblen R. (Med. Vet., PhD)<sup>3</sup>,  
Lilian Oliveira G. (Med. Vet.)<sup>1</sup> & Steven Edwards (DVM, PhD)<sup>4</sup>

### PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF BRAZILIAN PESTIVIRUSES WITH MONOCLONAL ANTIBODIES

*Twenty seven pestiviruses, including fifteen brazilian isolates from swine (four), cattle (four), infected cell cultures (seven), three british ovine isolates and nine standard laboratory pestivirus strains had their profile of reactivity determined by immunoperoxidase staining using a panel of monoclonal antibodies (AcMs) to pestivirus antigens. "Old" brazilian Classical swine fever virus (CSFV) strains could clearly be distinguished from more recent isolates and laboratory strains of CSFV, as well as from bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and border disease virus (BDV) with basis on the AcM profile of reactivity. A wide variation on reactivity profiles was detected among brazilian isolates of BVDV.*

**Palabras claves:** pestivirus, anticuerpos monoclonales.

**Key words:** pestiviruses, monoclonal antibodies.

## INTRODUCCIÓN

El virus de la peste porcina clásica o "classical swine fever virus" (CSFV), el virus de la diarrea viral bovina o "bovine viral diarrhoea virus" (BVDV) y el virus de la enfermedad de la frontera de los ovinos o "border disease virus" (BDV) son miembros del género *Pestivirus*, familia *Flaviviridae* (Francki y col., 1991). El CSFV causa una enfermedad de gran importancia económica para la industria porcina en todo el mundo. El BVDV está asociado a varias condiciones clínicas en bovinos las cuales pueden variar desde una infección inaparente hasta una enfermedad altamente

letal (enfermedad de las mucosas). Pestivirus son también reconocidos por su habilidad de causar infecciones transplacentarias y provocar serias pérdidas reproductivas (Van Oirschot, 1983).

Otra notable característica de los pestivirus es su alto grado de variación antigénica entre los distintos aislados. Cepas de BVDV y BDV de ovinos son particularmente variables en su composición antigénica (Cay y col., 1989; Edwards y col., 1991; Paton y col., 1991; 1994).

Pestivirus han sido estudiados en varios países (Wensvoort y col., 1986, 1989; Hess y col., 1988; Cay y col., 1989; Edwards y Sands, 1990; Edwards *et. al.* 1988, 1991; Greiser-Wilke y col., 1990; Paton y col., 1994). En Brasil, CSFV todavía es encontrado en estados de donde la suinocultura está menos desarrollada; sin embargo, BVDV tiene amplia distribución en el ganado bovino. Por otro lado, BCV todavía no ha sido aislado en el país. Sin embargo, a pesar de la presencia de por lo menos estos dos pestivirus (BVDV y CSFV) poco se conoce acerca de la composición antigénica de las muestras de estos virus ahí aisladas.

<sup>1</sup>Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO)-Centro de Pesquisa Veterinária "Desidério Finamor"; Casilla Postal 2076, Porto Alegre, RS, 90 001-970.

<sup>2</sup>Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

<sup>3</sup>Centro de Ciências Rurais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

<sup>4</sup>Central Veterinary Agency, Addlestone, Weybridge, Surrey, UK.

\*Correspondencia.

La presente investigación describe el análisis antigénico de pestivirus aislados en Brasil de ganado bovino y porcino, así como de virus aislados de cultivos celulares inadvertidamente contaminados, utilizando anticuerpos monoclonales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Células

Los cultivos celulares utilizados fueron obtenidos de diferentes orígenes. Células “porcine kidney” (PK15) y “fetal lamb kidney” (FLK) fueron gentilmente cedidas por el Laboratorio Nacional de Referencia en Brasil (LARA - Pedro Leopoldo, MG), y por la Facultad de Veterinaria de la Universidad Federal de Santa María, RS (gentilmente cedido por el Dr. R. Weiblen, CCR, UFSM). Células FLK y swine kidney (SK6) fueron donadas por el Centro Nacional de Investigaciones en Cerdos y Aves (CNPISA, EMBRAPA Concordia, SC). Células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) fueron obtenidas de los laboratorios arriba mencionados y de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Federal de Pelotas, RS. Las células fueron multiplicadas y subdivididas una o dos veces por semana siguiendo procedimientos estándar (Roehle, 1991).

### Virus

Todas las cepas “standard” de pestivirus (BVDV “Oregon” C24V, Singer y NADL; BDV “BDWeybridge” o “BDW” y “M2”, CSFV “Alfort 187” and “Glentorf”) y un aislado de BDV (BD137/4; Roehle y col., 1992) fueron obtenidas del Central Veterinary Agency, Addlestone, Surrey, UK. La muestra “Soldan” de BVDV fue aislada de un caso de un ternero con sospecha de enfermedad de las mucosas (Oliveira, 1996), así como la cepa VM96, gentilmente cedida por la Dra. Valeria Moojen, Facultad de Veterinaria de la Universidad Federal de Río Grande do Sul (Oliveira, 1996). Las muestras EVI 001 y 006 fueron aisladas de animales persistentemente infectados (Oliveira, 1996). Los aislados de BDV (BD3535, BD390) fueron gentilmente cedidos por los Drs. E. Peterhans and M. Strasser, Institute of Veterinary Virology, Berne University, Switzerland.

Las cepas de CSFV denominadas “Castro” y “Biológico” son muestras brasileñas “antiguas” (i.e. anteriores a 1960), usadas en pruebas de producción de vacunas y antisueros, y fueron obtenidas del Ministerio de Agricultura. La muestra “PS Porco” es un “antiguo” aislado de CSFV con historia de pasajes desconocida, usada en el pasado para la producción de la vacuna cristal-violeta. Como las demás cepas de

CSFV en este estudio, ésta fue multiplicada “in vitro” en células PK15.

Los “stocks” de virus fueron producidos por cinco o más pasajes en los cultivos celulares apropiados, conforme procedimientos estándar (Roehle, 1991). Pestivirus aislados de cultivos celulares fueron aislados de células obtenidas de diferentes laboratorios de virología en Brasil (Oliveira y col., 1996).

### Anticuerpos monoclonales

En la Tabla 1 se encuentran listados todos los anticuerpos monoclonales (AcMs) utilizados en el presente estudio. En total fue utilizado un panel de 25 AcMs dirigidos contra antígenos de pestivirus, producidos en el Central Veterinary Laboratory, Surrey, UK (Edwards y col., 1988; Edwards y Sands, 1990). Los AcMs fueron mantenidos congelados en medio de cultivo en glicerol a 50% -20°C hasta el momento de uso. La caracterización de la mayor parte de los AcMs utilizados y la determinación de su especificidad proteica fueron previamente descritas (Paton y col., 1991; Edwards y col., 1991; Paton y col., 1995). Los AcMs producidos contra cepas de BVDV, de número 112, 160 y 212, reconocen epitopos en la proteína p125/80; los AcMs 115, 162, 163, 165, 166, 214 y 215 y 220 son dirigidos contra epitopos en la glicoproteína gp53; el AcM 210 reconoce un epitopo en gp48. Los AcMs producidos contra cepas de CSFV de número 179 y 186 reconocen gp48. Los demás AcMs utilizados en este estudio (Tabla 1) no tuvieron su especificidad determinada.

### Técnica de inmunoperoxidasa

Muestras de virus fueron sembradas en microplacas de 96 orificios y coloreadas por la técnica de inmunoperoxidasa (Holm Jensen, 1981) utilizando el panel de anticuerpos monoclonales (Edwards & Sands, 1990). Después de 72-96 horas de incubación, las microplacas fueran fijadas en líquido de fijación (acetona al 20% en solución salina tamponada con fosfato (PBS); pH 7,5) por 10 minutos. El fijador fue removido y las microplacas deshidratadas por 4 horas a 37°C. A continuación, las microplacas fueren rehidratadas por 5 minutos con líquido de lavar (PBS conteniendo 0,5% de Tween 80). Después de la remoción del “wash fluid”, fue adicionada una dilución apropiada (1: 40 a 1: 320) de cada AcM en líquido de dilución (PBS más NaCl 0,35 M) y las microplacas incubadas por 15 minutos a 37°C, seguido de un ciclo de tres lavados con “líquido de lavar”. Luego se procedió a la adición de un segundo anticuerpo conjugado a la peroxidasa (conejo anti-ratón IgG/peroxidasa; Dako; 1:150 en líquido de dilución), a una

TABLA 1  
ANTICUERPOS MONOCLONALES (AcMs) UTILIZADOS  
EN EL PRESENTE ESTUDIO

AcM número	Producido contra	Especificidad proteica*
112	BVDV	125/80
115	BVDV	gp53=
160	BVDV	p125/80
162	BVDV	gp53
163	BVDV	gp53
165	BVDV	gp53
166	BVDV	gp53
174	CSFV	_*
179	CSFV	gp48
180	CSFV	-
185	CSFV	-
186	CSFV	gp48
187	CSFV	gp53
210	BVDV	gp48
212	BVDV	p125/80
214	BVDV	gp53
215	BVDV	gp53
216	CSFV	-
217	CSFV	-
220	BVDV	gp53
302	CSFV	-
304	CSFV	-
306	CSFV	-
308	CSFV	-
368	CSFV	-

\*Paton *et. al.*, (1991); Edwards *et. al.*, (1991); Paton *et. al.*, (1995).

\*\*Especificidad no determinada.

dilución apropiada (usualmente 1:150). Después de un nuevo período de incubación de 15 minutos a 37°C y nuevo ciclo de lavados, se adicionó el substrato 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma) con 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Harlow y Lane, 1988). Después de 15-50 minutos de incubación a temperatura ambiente, el revelador fue removido, la reacción detenida por la adición de líquido de lavar y las microplacas examinadas en microscopio óptico, buscándose la coloración rojocarmín característica en el citoplasma de las células infectadas. En cada microplaca fueron incluidos controles positivos y negativos.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la caracterización de todos los pestivirus examinados son presentados en la Tabla 1. Aunque todo el panel de 25 AcMs fueron usados, para mayor claridad aquéllos que no demostraron reactividad no fueron incluidos en la tabla. El ACM reconocen las glicoproteínas virales gp 53 y gp 48. Variaciones antigénicas en estas proteínas

son más frecuentes, una vez que como parte del envoltorio viral, están más sujetas a cambios en su composición de proteínas no estructurales, como es el caso de p125/80 (Collet y col., 1989). Aunque es muy probable que los virus estudiados hayan sufrido variaciones en la naturaleza, cambios en la composición antigénica pueden haber sido generados a través de pasajes *in vitro*. Las cepas originarias de cultivos celulares probablemente fueran sometidas a varios subcultivos en laboratorio, aunque no se pueda determinar con exactitud el número de pasajes, puesto que es desconocido el origen de la contaminación; durante estos pasajes, es posible que hayan sufrido alteraciones antigénicas, tal como lo indica Moennig y col. (1987).

Las cepas de BDV, aunque poco numerosas en este estudio, también presentarán perfiles de reactividad variables frente a los Acms empleados. La cepa "BDW" de BDV en este trabajo no se distinguió de otras 4 cepas de BVDV (MBDK 156 y 146, EVI 001 y 006). La cepa "BDW" fue estudiada por otros autores y se presentó muy semejante antigénicamente a muestras de BVDV, por lo que fue denominada "BVDV-like" (Paton y col., 1994; Tijssen y col., 1996). Por lo tanto, la misma no debe ser tomada como referencia para buscar una distinción entre BVDV y BDV. En los perfiles obtenidos con las demás cepas de BDV, los AcMs utilizados no fueron capaces de proporcionar una clara distinción entre muestras de los pestivirus de rumiantes. Las cepas de BVDV "SOLDAN" y "VM/96" presentaron un perfil de reactividad semejante a los perfiles de las cepas de BDV, especialmente "BD137/4" y "BD390". Además, sus perfiles de reactividad fueron distintos de la cepa "BVDV-like" BDW. Sin embargo, y respetado el limitado propósito del presente estudio, las cepas "SOLDAN" y "VM/96" parecen tratarse de virus más semejantes al BDV que al BVDV. Interesantemente, estas dos cepas fueron aisladas de casos clínicos agudos y fatales de una enfermedad que se creía se trataba de la enfermedad de las mucosas en terneros. Sin embargo, el análisis filogenético de la cepa "SOLDAN" reveló por secuenciamiento de la porción no traducida 5' de su genoma parece tratarse de una cepa perteneciente al "tipo II" (Canal y col., 1998). Aunque no hubo comunicaciones de infecciones sintomáticas asociadas a cepas de BVDV tipo II en Brasil, en el mismo simposio fue presentada una comunicación acerca de otra cepa del tipo II aislada en el país (Gil y col., 1998). Así que es probable que los AcMs utilizados sí sean capaces de diferenciar cepas del tipo I de aquellas del tipo II, en base a su perfil de reactividad por inmunoperoxidasa. Claro es que son necesarios más datos para definir con mayor

exactitud las características antigénicas de estas cepas. Estudios futuros serán realizados para permitir una mayor profundidad en el análisis de la biología de las mismas. Mientras más informaciones sean obtenidas la descripción de la ocurrencia de cepas de BVDV con perfil antigénico similar a cepas de BDV, y con características de BVDV del tipo II, queda aquí registrada.

Las cepas de CSFV presentaron una mayor homogeneidad en sus perfiles de reactividad, considerado como el grupo más estable (Wensvoort y col., 1986; Edwards y col., 1991). No obstante, las cepas de CSFV demostraron dos distintos modelos de reactividad antigénica, evidenciando la variación en los perfiles de las cepas de CSFV recientemente aisladas en Brasil (EVI 100, EVI 136 e EVI 192 aisladas en 1987). Esta estrecha variación antigénica también fue encontrada por Edwards y Sands (1990) y Lowings y col. (1996).

AcM 112 fue el más panreactivo de todos los AcMs evaluados, una vez que reconoció antígenos en 24 de las 27 cepas testadas en este estudio. Entretanto, las cepas "antiguas" de CSFV no fueron reconocidas por el mismo.

Hubo una clara distinción entre los perfiles de reactividad obtenidos con las cepas de pestivirus de rumiantes (BVDV y BDV) y cepas de CSFV. Cepas de BVDV y BDV fueron básicamente reconocidas por los AcMs producidos contra pestivirus de rumiantes. De la misma forma, cepas de CSFV fueron principalmente reconocidas por AcMs producidos contra pestivirus de suinos. El AcM 112 reconoció todas las 19 cepas de pestivirus de rumiantes, y ninguna de CSFV. Por otro lado, el AcM 306 reconoció todas las cepas de CSFV y ninguna de pestivirus de rumiantes. Solamente un aislado brasileño de BVDV (cepa SOLDAN), además de tres cepas "standard" de este virus (C24V, Singer y NADL) y una cepa de BDV (137/4) fueron reconocidas por AcMs producidos contra cepas de CSFV.

Una gran heterogeneidad fue observada entre los perfiles de reactividad obtenidos con las cepas de pestivirus de rumiantes. Sin embargo, en la Tabla 1 las cepas fueron agrupadas de acuerdo con los perfiles de reactividad obtenidos. Los nueve primeros aislados de BVDV listados en la tabla 1 (MDBK 411, 211, 69, 137 y 129) presentaron un perfil de reactividad uniforme frente a los AcMs que reconocen p125/80 (AcMs 112, 160 y 212). Como variabilidad en los AcMs dirigidos contra gp48 y gp53 (Tabla 1). Las cepas SOLDAN y VM/96 presentaron un perfil de reactividad totalmente diferente de las demás cepas de BVDV y muy similares a aquéllos detectados con las cepas de BDV. Las tres cepas "clásicas" de BVDV

(NADL, C24V y Singer) fueron reconocidas por la mayoría de los AcMs producidos contra BVDV en Tabla 1.

Las cepas de CSFV presentaron una menor variación en sus perfiles antigénicos, siendo reconocidas esencialmente por un grupo de seis AcMs (112, 304, 187, 306, 302 y 220). Las cepas "antiguas" de Brasil (PS Porco, Biológico y Castro) demostraron un padrón de reactividad similar al presentado por las cepas Alfort y Glentorf, y distinto del presentado por las cepas locales de CSFV aisladas más recientemente (EVI 100, 136 y 192).

## DISCUSIÓN

En este estudio se buscó la determinación de los perfiles de reactividad obtenidos con cepas brasileñas de pestivirus y su confrontación con los perfiles presentados por cepas "standard". Con excepción de los tres aislados brasileños de CSFV examinados anteriormente por Edwards y Sands (1990) y Lowings y col. (1996), que son del conocimiento de los autores, hasta el presente estudios sobre la caracterización antigénica de pestivirus brasileños o de otros países latinoamericanos con anticuerpos monoclonales no han sido reportados.

Los resultados obtenidos revelaron una gran heterogeneidad entre los perfiles de reactividad observados con los aislados de BVDV. Las cepas de BVDV aisladas de cultivos celulares presentaron variaciones principalmente frente a los AcMs.

Debido al programa brasileño para la erradicación de la peste porcina clásica, una de las importantes aplicaciones prácticas del presente trabajo fue determinar si cepas locales de CSFV podrían ser diferenciadas de pestivirus de rumiantes aislados localmente. Los resultados obtenidos evidencian que esta diferenciación fue claramente obtenida con los AcMs empleados. Además, dada la posibilidad de transmisión de pestivirus interespecies (Wensvoort & Terpstra, 1988; Paton y col., 1994; Edwards y col., 1995; Paton y col., 1997), se requiere una caracterización más profunda de los virus aislados.

Los resultados obtenidos en Tablas 1 y 2 confirman la importancia del uso de los AcMs para diferenciación de CSFV de los otros pestivirus. En adición, el análisis con paneles de AcMs establece perfiles de reactividad los cuales pueden ser usados como marcadores epidemiológicos, importantes para el estudio de la biología de infecciones causadas por pestivirus. Este estudio deberá ser ampliado en busca del análisis de un mayor número de cepas de pestivirus brasileñas y de otros países de América del Sur.

**TABLA 2**

PERFIL DE REACTIVIDAD DE CEPAS DE PESTIVIRUS FRENTE A UN PANEL DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (AcMs) EN PRUEBAS DE INMUNOPEOXIDASA (IPX) SOBRE CULTIVOS CELULARES

	Especificidad de los AcMs																	
	p125/80				gp48				gp53				indeterminada					
	112	160	212	210	166	214	215	162	115	163	220	216	217	174	304	187	306	302
CEPAS DE BVDV*																		
MDBK 411	•		•															
MDBK 211	•		•	•														
MDBK 69	•		•	•														
MDBK 137	•		•	•	•													
FLK 129	•		•	•	•													
MDBK 156	•		•	•	•		•											
MDBK 146	•		•	•	•		•											
EVI 001	•		•	•	•		•											
EVI 006	•		•	•	•		•											
C24V	•		•	•	•		•				•							
SINGER	•		•	•	•		•				•							
NADL	•		•	•	•		•				•							
SOLDAN	•		•	•	•		•				•							
VM96	•		•	•	•		•				•							
CEPAS DE BDV**																		
BD W	•		•	•	•		•											
BD M2	•		•	•	•		•											
BD 3535	•		•	•	•		•											
BD 137/4	•		•	•	•		•							•				
BD 390	•		•	•	•		•											
CEPAS DE CSFV***																		
EVI 100																•		
EVI 136															•			
EVI 192															•			
PS PORCO	•														•			
BIOLOGICO	•														•			
CASTRO	•														•			
ALFORT	•														•			
GLENTORF	•														•			

#Números de acuerdo con la tabla 1.

\*BVDV = virus de la diarrea vírica de los bovinos.

\*\*BDV = virus de la enfermedad de la frontera.

\*\*\*CSFV = virus de la peste porcina clásica.

Obs: Puntos negros indican reacciones positivas a la IPX; espacios en blanco indican reacciones negativas. Para descripción de la origen de las cepas referirse al texto en material y métodos.

## RESUMEN

Veinte y siete cepas de pestivirus, incluyendo quince aislados brasileños de origen porcino (cuatro), bovino (cuatro) y de cultivos celulares infectados (siete), tres aislados ovinos y nueve cepas de laboratorio, tuvieron su perfil de reactividad frente a un panel de anticuerpos monoclonales (AcMs) determinado por coloración de inmunoperoxidasa sobre cultivos celulares infectados. Los pestivirus de rumiantes fueron claramente distinguidos de cepas del virus de la peste porcina clásica con base del perfil de reactividad de los AcMs. Sin embargo, una gran variación entre los perfiles de reactividad presentados por cepas de pestivirus de rumiantes fue detectada.

## AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado principalmente por la International Foundation for Science (IFS), otorgado por el CNPq y FAPERGS. Los autores agradecen a todos los colegas por el envío de muestras de células y virus, especialmente a la Dra. J. Bersano por el envío de muestras de CSFV.

## REFERENCIAS

- CAY, B.; CHAPPUIS, G.; COULIBALY, C.; DINTER, Z.; EDWARDS, S.; GREISER-WILKE, L.; GUNN, M.; HAVE, P.; HESS, G.; JUNTTI, N.; LIESS, B.; MATEO, A.; MCHUGH, P.; MOENNIG, V.; NETTLETON, P.; WENSVOORT, G. 1989. Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestiviruses: report of an international workshop. *Vet. Microb.* 20: 123-129.
- CANAL, C.W.; STRASSER, M.; HERTIG, C., MASUDA, A. PETERHANS, E. 1998. Detection of antibody to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of BVDV genomes from Brazil. In: Simposio Internacional sobre Herpesvirus Bovino (tipo 1 e 5) e Virus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). 22-24 abril, Santa Maria, RS, Brasil. p. 173.
- COLLET, M.S.; MOENNIG, W.; HORZINEK, M. 1989. Recent advances in pestivirus research. *J. Gen Virol.* 70: 253-266.
- EDWARDS, S.; SANDS, J.J. 1990. Antigenic comparisons of hog cholera virus isolates from Europe, America and Asia using monoclonal antibodies. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 97: 79-81.
- EDWARDS, S.; SANDS, J.J.; HARKNESS, J.W. 1988. The application of monoclonal antibody panels to characterize pestivirus isolates from ruminants in Great Britain. *Arch. Virol.* 102: 197-206.
- EDWARDS, S.; MOENNIG, V.; WENSVOORT, G. 1991. The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses. *Vet. Microb.* 26: 101-108.
- EDWARDS, S.; ROEHE, P.M.; IBATA, G. 1995. Comparative studies of Border Disease and closely related virus infections in experimental pigs and sheep. *B. Vet. J.* 151: 181-187.
- FRANCKI, R.; FAUQUET, C.; KNUDSON, D.; BROWN, F. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, *Arch. Virol. (Suppl.)* 2: 223-233.
- GIL, L.H.V.G.; BOTTON, S.A.; ODEON, A.; WEBER, L.; KREUTZ, L.C.; WEIBLEN, R.; RIDPATH, J. 1998. Genotypic analysis of south american isolates of bovine viral diarrhoea virus. In: Simpósio Internacional sobre Herpesvirus Bovino (tipo 1 e 5) e Virus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). 22-24 abril, Santa Maria, RS, Brasil. p. 171.
- GREISER-WILKE, I.; MOENNING, V.; COULIBALY, C.O.Z.; DAHLE, J.; LEDER, L.; LIESS, B. 1990. Identification of conserved epitopes on a hog cholera virus protein. *Arch. Virol.* 11: 213-225.
- HARLOW, E.; LANE, D. 1988. *Antibodies: A laboratory Manual.* Cold Spring Harbour, USA.
- HESS, R.G.; COULIBALY, C.O.Z.; GREISER-WILKE, I.; MOENNIG, V.; & LIESS, B. 1988. Identification of hog cholera viral isolates by use of monoclonal antibodies to pestiviruses. *Vet. Microb.* 16: 315-321.
- HOLM JENSEN, M. 1981. Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhoea virus in porcine serum. *Acta Vet. Scand.* 22: 85-98.
- LOWINGS, P.; IBATA, G.; NEEDHAM, J.; PATON, D. 1996. Classical swine fever virus diversity and evolution. *J. Gen. Virol.* 77: 1311-1321.
- MAARA (Ministério da Agricultura, Abastecimento de Reforma Agrária-Secretaria de Defesa Agropecuária-Departamento de Defesa Sanitária Animal) (1992) Manual de procedimentos. Programa de Controle e Erradicação da Peste Suína Clássica. Brasília, DF.
- MOENNIG, V.; BOLIN, S.R.; COULIBALY, C.O.Z.; KELSOGOURLEY, N.E.; LIESS, B.; MATEO, A.; PETERS, W.; GREISER-WILKE, I. 1987. Studies into the antigenic structure of pestiviruses using monoclonal antibodies. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 94: 572-576.
- OLIVEIRA, L.G.; OLIVEIRA, E.A.S.; SILVA LVA, L.H.T.; VIEIRA, L.A.; HOFFMANN, V.L.; FERNANDES, G.V.; SILVA, T.C.; CALDAS, A.P.F.; ROEHE, P.M. 1996. Presença de pestivirus e anticorpos contra pestivirus em soros e cultivos celulares Arq. Bras. Med. Vet. e Zoo., 48(5): 513-521.

- PATON, D.J.; SANDS, J.; ROEHE, P.M. 1991. BDV monoclonal antibodies: relationship between viral protein specificity and viral strain specificity by peroxidase linked assay. *Arch. Virol.* [Suppl 3]: 47-54.
- PATON, D.J.; SANDS, J.J.; EDWARDS, S. 1994. Border disease virus: delination by monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 135: 241-252.
- PATON, D.J.; SANDS, J.J.; LOWINGS, J.P.; SMITH, J.E.; IBATA, G.; EDWARDS, S. 1995. A proposed division of the pestivirus genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralization and nucleotide sequencing. *Vet. Res.* 26: 92-109.
- PATON, D.; GUNN, M.; SANDS, J.J.; YAPP, F.; DREW, T.; VILCEK, S.; EDWARDS, S. 1997. Establishment of serial persistent infections with bovine viral diarrhoea virus in cattle and sheep and changes in epitope expression related to host species. *Arch. Virol.* 142: 929-938.
- ROEHE, P.M. 1991. Studies on the comparative virology of pestiviruses. Ph.D. thesis. University of Surrey, UK.
- ROEHE, P.M.; WOODWARD, M.J.; EDWARDS, S. 1992. Characterisation of p20 gene sequences from a border disease-like pestivirus isolated from pigs. *Vet. Microbiol.* 33: 231-238.
- TISSEN, P.; PELLERIN, C.; LECOMTE, J.; VAN DEN HURK, J. 1996. Immunodominant E2 (gp53) sequences of highly virulent bovine viral diarrhoea group II viruses indicate a close resemblance to a subgroup of Border Disease Viruses. *Virology* 217: 356-361.
- VAN OIRSCHOT, J.T. 1983. Congenital infections with nonarbo togaviruses. *Vet. Microbiol.* 8: 321-361.
- WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.; BOONNSTRAN, J.; BLOEMRAAD, M.; VAN ZAANED. 1986. Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. *Vet. Microbiol.* 12: 101-108.
- WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.; DE KLUYVER, E.P.; KRAGTEN, C.; WARNAAR, J.C. 1989. Antigenic differentiation of pestivirus strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus. *Vet. Microbiol.* 21: 9-20.