

# **Peste porcina clásica en Cuba: fuerzas que rigen su evolución, reclasificación y desarrollo de un ensayo isotérmico de detección**

## **Autoría principal**

**Carmen L. Perera<sup>a</sup>, Lester J. Pérez<sup>a</sup> y María T. Frías<sup>a</sup>**

## **Otros autores**

**Damarys Relova<sup>a</sup>, Ana María Acevedo<sup>a</sup>, Liani Coronado<sup>a</sup>, María I. Percedo<sup>a</sup>, Liliam Ríos<sup>a</sup>**

## **Colaboradores**

Alexander Postel<sup>b</sup>, Lillianne Ganges<sup>c</sup>, Osvaldo Fonseca<sup>a</sup>, Sara Castel<sup>a</sup>, Jose I. Núñez<sup>c</sup>, Sophia Austermann-Busch<sup>b</sup>, Stefanie Schmeiser<sup>b</sup>, Irene Greiser-Wilke<sup>b</sup>, Volker Moenig<sup>b</sup>, Paul Becher<sup>b</sup>.

## **Entidad ejecutora principal**

<sup>a</sup>Grupo de Virología Animal, Dirección de Microbiología, CENSA.

## **Entidades participantes**

<sup>b</sup>Laboratorio de referencia de la UE y la OIE para Peste Porcina Clásica, Instituto de Virología. Universidad de Medicina Veterinaria Hannover, Alemania.

<sup>c</sup>Centre de Reserca in Sanitat Animal (CReSA).

## **Autor para correspondencia**

Carmen Laura Perera.

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Carretera de Jamaica y Autopista Nacional. Apdo 10. San José de las Lajas. Mayabeque.

Correo. claura@censa.edu.cu

Teléfono 047-849133 Fax: 047-861104

## **Aporte científico de cada autor al resultado**

- ✓ **Carmen L. Perera** (20 %): Realizó el diseño experimental, el procesamiento bioinformático, el análisis e interpretación de los resultados obtenidos y preparó los manuscritos para publicación.
- ✓ **Lester Josué Pérez** (20 %): Realizó el diseño experimental, el procesamiento bioinformático, el análisis e interpretación de los resultados obtenidos y preparó los manuscritos para publicación.
- ✓ **María Teresa Frías** (20 %): Realizó el diseño experimental, el análisis e interpretación de los resultados obtenidos y preparó los manuscritos para publicación.
- ✓ **Damarys Relova** (10 %): Contribuyó en la evaluación experimental. Participó en el análisis de los resultados y conformación del documento.
- ✓ **Ana M. Acevedo** (10%): Contribuyó en la evaluación experimental y conformación del documento.
- ✓ **Lianis Coronado** (10 %): Contribuyó en la evaluación experimental. Participó en el análisis de los resultados.
- ✓ **Liliam Ríos** (5 %): Contribuyó en la en la evaluación experimental. Participó en el análisis de los resultados.
- ✓ **María Irían Percedo** (5 %): Contribuyó en la en la evaluación experimental. Participó en el análisis de los resultados.

## **RESUMEN**

El virus de la peste porcina clásica (VPPC) es endémico en Cuba luego de la gran epidemia de 1993 y hoy en día es el primer problema zoonosario de la porcicultura en el país. A pesar del programa de control para esta enfermedad, basado fundamentalmente en una política de vacunación, no se ha logrado su erradicación. Por lo tanto ante la ineffectividad del programa de control, se desconoce la diversidad genética de las cepas del virus de la peste porcina clásica que circulan en la actualidad en las granjas porcinas cubanas, así como las fuerzas que rigen su evolución. De ahí que, los objetivos del presente trabajo fueron determinar estas fuerzas, evaluar los parámetros de reclasificación de este virus a nivel mundial y por las características insulares de Cuba, desarrollar un ensayo RT-LAMP para el diagnóstico de esta entidad. La evolución del virus en el país está determinada por la presión de selección como fuerza evolutiva, que genera un efecto "cuello de botella" que facilita el escape de las cepas a la vacunación actual contra este agente, permitiendo que estas poblaciones virales se establezcan. Las mismas han evolucionado con variaciones en la virulencia aún cuando mantienen el mismo subgenotipo. Las cepas virales en Cuba a partir del presente trabajo se reclasificaron como subgenotipo 1.4, subgenotipo que integra solamente aislados cubanos lo que lo hace único en el mundo. De los marcadores filogenéticos propuestos el que permite una mejor clasificación de esta especie viral es el marcador E2 completo (1119 nt), que permitió una clasificación de los diferentes subgenotipos a partir de un punto de corte de 86% de identidad de secuencias y entre un 80-86% para los genotipos. Para el RT-LAMP se diseñó un conjunto de cebadores que mostraron una elevada estabilidad, sensibilidad y rango amplio de detección, lo cual para este tipo de ensayo resultó la primera evidencia mundial y posibilita su extensión a los laboratorios de diagnóstico territoriales en Cuba.

Este colectivo de autores en ocasiones anteriores ha recibido premios de la Academia de Ciencias de Cuba (ACC) en los años 1998, 2005, 2009 y 2010 en temas de estudios relacionados al que se propone. Sin embargo, la presente propuesta de premio no coincide con los resultados premiados anteriormente. Todos los resultados obtenidos poseen un alcance internacional y nacional, con aspectos novedosos de interés para la comunidad científica.

Premio ACC de 1998: "Bases científico-técnicas en apoyo al Programa de control de la PPC en Cuba". Se describen los métodos de diagnósticos desarrollados por el CENSA, todos los descritos según el estado del arte en esa época, en apoyo al Programa de Control de la PPC en Cuba.

Premio ACC de 2005: "Origen y Evolución de los virus que causan la Peste Porcina Clásica", se describen los primeros ensayos de filogenia molecular que se realizan en Cuba con los virus de la PPC de diferentes regiones geográficas en base al marcador filogenético de 190nt (E2).

Premio ACC de 2009: " Sistema basado en tecnologías de detección de ácidos nucleicos para el diagnóstico de enfermedades virales de importancia económica", se desarrollaron ensayos de PCR basados en gel (PCR punto final), para virus que incluyeron al virus de la peste porcina clásica, otros pestivirus, herpesvirus bovino y el virus de la encefalomiocarditis.

Premio ACC de 2010: "Desarrollo y aplicación de tecnologías de amplificación en tiempo real para la detección de virus emergentes que afectan al cerdo", se desarrollaron nuevos ensayos de PCR en tiempo real basados en formatos de SYBR-Green I con parámetros elevados de sensibilidad y especificidad para la detección en muestras clínicas de virus emergentes como el virus de la peste porcina clásica, el circovirus porcino tipo2, el virus de la enfermedad de Aujeszky, el parvovirus porcino y los recientemente clasificados torque teno sus virus 1 y 2 los cuales afectan al cerdo.

### **COMUNICACIÓN CORTA**

La peste porcina clásica (PPC) es una enfermedad viral muy contagiosa de cerdos domésticos y jabalíes (Moennig et al., 2003) la cual provoca grandes pérdidas económicas, debido a las altas tasas de mortalidad, obligatorias políticas de sacrificio sanitario y la prohibición del comercio de cerdos vivos y productos porcinos (Terpstra y de Smit, 2000) y en Cuba es el primer problema zoonosológico de la porcicultura.

El agente causal, es el virus de la peste porcina clásica (VPPC) del género Pestivirus, de la familia Flaviviridae (Thiel et al., 2005). El VPPC se divide en tres genotipos, el 1, 2 y 3. Cada genotipo comprende diferentes subgenotipos, los subgenotipos 1.1-1.3, 2.1-2.3 y 3.1-3.4 (Lowings et al., 1996; Paton et al., 2000). El genoma de virus de PPC es de simple cadena positiva de ARN que contiene un único marco de lectura abierto (ORF) flanqueada por dos regiones no traducidas (UTRs). La ORF codifica para una poliproteína de aproximadamente 3900 aminoácidos la cual es procesada posteriormente en proteínas por las proteasas celulares y virales en cuatro proteínas estructurales (C, Erns, E1, E2) y 8 proteínas no estructurales (NPRO, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Meyers y Thiel, 1996). La glicoproteína E2 expuesta en la superficie externa del virus (Weiland et al., 1999), es la más inmunogénica, responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes y de la protección contra desafío letal (Hulst et al., 1993). La E2 tiene dos unidades estructurales independientes, una que consta de los dominios B/C y la otra de los dominios A/D (van Rijn et al., 1994).

En Cuba, la vacunación de los cerdos se realiza con una vacuna viva atenuada lapinizada (Cepa C-Labiofam, SA) que mantuvo el país con la enfermedad bajo control desde mediados de los años 70. Sin embargo, a partir de 1993 la PPC se convirtió en una enfermedad endémica con brotes cada año (Díaz de Arce et al, 1999; Díaz de Arce et al, 2005), a pesar del programa de vacunación implementado. Como se informó anteriormente (Díaz de Arce et al., 1999) el origen más probable de los brotes en 1993, fue un escape de la cepa Margarita que se aisló en Cuba en 1958, y se ha utilizado como cepa de confrontación en las pruebas de potencia de la vacuna desde 1965. Por otro lado, en estos últimos años se ha observado en los animales una tendencia hacia

formas más leves de la enfermedad, característica de las presentaciones crónicas de la misma.

En 2003 luego de 10 años de la reintroducción de la cepa Margarita (Díaz de Arce et al., 2005) se encontró una alta tasa de mutaciones no sinónimas en la secuencia del gen parcial E2, por lo que se sugirió que la evolución del virus podría estar sustentada por una presión de selección positiva ligada a programas de vacunación ineficientes, y conducir a una menor gravedad de los signos clínicos presentes (Díaz de Arce et al., 2005).

El diagnóstico primario de PPC en Cuba está basado en técnicas inmunohistoquímicas, poco sensibles y muy subjetivas. La amplificación isotérmica mediada por un lazo (LAMP) es hoy en día un método molecular sensible y específico que puede ser implementado en laboratorios básicos sin equipamiento sofisticado (Notomi et al., 2000).

### **Presión de selección positiva sobre la región del dominio B/C del gen E2 del virus de la peste porcina en zonas endémicas bajo la vacunación con la cepa-C**

En los inicios del brote de la PPC en Cuba en el año 1993, existía una pequeña diferencia en los aislados del VPPC que circulaban entre el occidente y el oriente del país, pero ya para los años 2000-2002 la población viral tenía un carácter homogéneo, lo cual mostró el carácter endémico de la PPC en el país (Díaz de Arce et al., 2005).

Desde 2009 la variabilidad genética VPPC disminuyó aún más, probablemente debido al efecto de “cuello de botella” causado por la vacuna. Por lo tanto, las cepas que circulan actualmente podrían haber sido seleccionadas positivamente por la presión de la vacuna.

Con el avance de las técnicas de secuenciación y los análisis bioinformáticos por la disponibilidad de programas cada vez más precisos y que generan nuevos estudios, se realizó la búsqueda de las causas de la evolución del VPPC en el Cuba luego de 19 años bajo un programa de control basado fundamentalmente en vacunación con el empleo de la vacuna lapinizada (Labiofam S.A).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la presión de selección positiva en gen parcial de la E2 del VPPC a partir de animales infectados con clínica moderada (no aguda, ni hemorrágica) para conocer sobre los mecanismos de virulencia y las fuerzas de la evolución del virus en la población porcina bajo programas regulares de vacunación.

La sustitución G761R observada en un sitio bajo presión de selección positiva se ha mantenido desde 2001 hasta 2011 en los aislados de VPPC cubanos lo que sugiere que la selección de esta sustitución podría estar vinculada a una posible ventaja adaptativa. El elevado número de sitios seleccionados positivamente que se encuentran en el gen parcial de la E2, que median la entrada del virus en las células diana, sugiere que estos cambios podrían estar asociados a la evasión viral de la respuesta inmune del huésped.

El ensayo de infección experimental realizado para aumentar el conocimiento sobre la virulencia de VPPC que han estado circulando en los cerdos domésticos en comparación con la cepa altamente virulenta Margarita, que fue el origen de las cepas actuales de VPPC (Díaz de Arce et al., 2005), proporciona evidencia *in vivo* de una presentación más leve de la enfermedad causada por un aislado representativo de VPPC que evolucionó con el tiempo en las poblaciones de cerdos bajo los programas regulares de vacunación.

El curso más leve de la enfermedad en el ensayo de infección experimental está de acuerdo con los altos valores de Ct, que corresponden a bajas cargas de ARN viral, obtenidos a partir del análisis del RT-PCR en tiempo real realizado para las muestras de campo. Según Weesendorp y colaboradores (2009) el VPPC altamente virulento por lo general se disemina rápidamente por todo el organismo, provocando altos títulos del virus en la mayoría de los órganos y la sangre, mientras que con las cepas moderadamente virulentas, los títulos de virus tienden a ser más bajos.

En el presente estudio se ha logrado establecer la variabilidad del gen parcial de la E2 de los aislados cubanos de VPPC en piaras de cerdos vacunados. El análisis filogenético mostró que todos los virus de PPC cubanos pertenecían al genotipo 1.2 y se agruparon con la cepa Margarita. El análisis de la presión de selección estimó seis nuevos sitios bajo selección positiva en el gen parcial E2 analizado. Además, las manifestaciones clínicas de PPC se relacionaron mayormente con un curso leve de la enfermedad. El elevado número de sitios seleccionados positivamente sugiere que estos cambios podrían estar asociados a la evasión viral de la respuesta inmune del huésped. Estas observaciones ponen de manifiesto una posible asociación entre el escape de las variantes virales y las alteraciones observadas en la virulencia del virus. Por lo tanto, si bien los programas de vacunación no han dado lugar a un cambio de genotipo, si sugieren que hayan provocados alteraciones en la virulencia.

#### **Aislados del virus de la Peste porcina clásica de Cuba forman un nuevo subgenotipo 1.4**

Los marcadores filogenéticos de las secuencias de nucleótidos (150 nt) de la región 5' no traducida (5'NTR) y de un fragmento de la E2 (190 nt) son los más utilizados en PPC (Paton et al., 2000;). Recientemente, se ha sugerido reemplazar la estrategia anterior por análisis filogenético de secuencias de la E2 completa (1119 nt) para proporcionar una información más detallada sobre brotes de PPC y la relación epidemiológica de los aislados de este virus (Postel et al., 2012).

El presente estudio tuvo por objetivo obtener las secuencias completas de la E2 de cuatro aislados cubanos recientes del VPPC y un aislado de Guatemala para tener una información más detallada en cuanto a las relaciones evolutivas de los aislados de VPPC que están circulando en Cuba y sus relaciones genéticas con otros aislados del genotipo 1.

El árbol filogenético basado en las secuencias completas de la E2 muestra que los aislados cubanos no se encuentran en el mismo *cluster* que los aislados del subgenotipo 1.2, ni en ningún otro de los subgenotipos establecidos, sino que forman un grupo separado dentro del genotipo 1. La segregación de los aislados cubanos en el análisis filogenético fue también confirmada por análisis de máxima verosimilitud. La segregación de los aislados del genotipo 1 en los subgenotipos individuales 1.1, 1.2, 1.3 y el grupo de aislados cubanos fue soportado por los altos valores de *bootstrap* (88.7–100%) indicando una alta significación estadística.

Como se reportó en un estudio reciente, la filogenia basada en secuencias codificadoras de la E2 completa está acorde con el análisis basado en las tres secuencias más largas de la 5'NTR-E2 y permite una segregación confiable en subgenotipos (Postel et al., 2012). El análisis filogenético de las secuencias de la 5'NTR-E2 confirmó la segregación de los aislados de VPPC de Cuba en un *clade* separado.

Todos los aislados cubanos caracterizados a nivel molecular hasta el momento están filogenéticamente relacionados con la cepa "Margarita". Probablemente debido a la condición insular de Cuba, no ha habido introducción de VPPC 1.1 o 1.3 a partir de los países vecinos. De este mismo modo ninguno de los aislados de VPPC similares a los cubanos han sido encontrados en otras partes de América Central y del Sur. De acuerdo con esto, los aislados de VPPC que están circulando en Cuba pertenecen a un subgenotipo único solamente presente en el archipiélago cubano.

Los resultados de nuestro análisis basado en las secuencias de la E2 completa y las secuencias de la región 5'NTR-E2 demostró que los aislados de VPPC de Cuba no pueden ser asignados al genotipo 1.2 sino que forman un nuevo subtipo que se propone sea designado como subgenotipo 1.4.

### **Capacidades y limitaciones en su aplicación diagnóstica de un nuevo LAMP específico para VPPC**

Un punto crucial en la amplificación isotérmica mediada por un lazo es que se requiere de cuatro a seis cebadores, reconociendo seis u ocho regiones altamente conservadas en el genoma. La alta variabilidad de los virus ARN, como el VPPC, es un obstáculo para encontrar adecuados cebadores para el LAMP con características apropiadas que permitan una adecuada sensibilidad con diversos aislados de PPC de diferentes genotipos y subgenotipos.

Varios LAMP específicos para VPPC han sido desarrollados difiriendo en términos del diseño (Chen et al., 2009; Chen et al., 2010; Chowdry et al., 2014; Yin et al., 2010; Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2010), sin embargo, ninguno de los ensayos LAMP desarrollados han tenido un buen desempeño en condiciones de campo. La especial situación epidemiológica de Cuba, principalmente por la baja diversidad de los aislados cubanos puede ser considerada como favorable para el desarrollo de un ensayo basado en LAMP y su aplicación como primera línea de diagnóstico de PPC en Cuba.

Se evaluaron varias parejas de cebadores los que se diseñaron para la región NS5B (sets 1-3) y la 5'NTR (sets 7-9), de ellas el set-3 mostró el mejor rango diagnóstico el cual reveló una amplia detección de aislados del genotipo 1. En contraste, aislados del genotipo 2 y 3 no fueron detectados por este RT-LAMP. Los resultados demuestran que el nuevo ensayo RT-LAMP desarrollado es capaz de detectar otros aislados del subgenotipo 1, sin embargo para alguno de estos con una sensibilidad menor.

El ensayo de RT-LAMP recientemente desarrollado demostró la detección específica de todos los aislados cubanos de VPPC disponibles, independiente del año o región. La amplia reactividad dentro del genotipo 1 mostró que este ensayo de RT-LAMP es suficientemente robusto para tolerar un cierto grado de mutaciones en la región diana (NS5B). El límite de detección promedio fue de 100 a 1000 copias por reacción, de manera que se puede concluir que un RT-LAMP promedio es aproximadamente 10-100 vez menos sensible que el RT-PCR en tiempo real aplicado en el Laboratorio de Referencia UE y OIE para PPC.

La situación especial de Cuba con respecto a PPC, la baja diversidad de los aislados cubanos en combinación con un bajo riesgo para la introducción de nuevas cepas, refuerza las oportunidades para una aplicación exitosa de esta herramienta en el diagnóstico primario, la que proporcionará una información rápida y precisa en caso de sospecha de un brote a nivel de los Laboratorios Territoriales del Instituto de Medicina Veterinaria encargados del diagnóstico de esta entidad.

## Referencias

- [1] Chen HT, Zhang J, Ma LN, Ma YP, Ding YZ, Liu XT, Chen L, Ma LQ, Zhang YG, Liu YS (2009): Rapid pre-clinical detection of classical swine fever by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Mol Cell Probes* 23: 71-74.
- [2] Chen L, Fan XZ, Wang Q, Xu L, Zhao QZ, Zhou YC, Liu J, Tang B, Zou XQ (2010): A novel RT-LAMP assay for rapid and simple detection of classical swine fever virus. *Viol Sin* 25: 59-64.
- [3] Chowdry VK, Luo Y, Widen F, Qiu HJ, Shan H, Belak S, Liu L (2014): Development of a loop-mediated isothermal amplification assay combined with a lateral flow dipstick for rapid and simple detection of classical swine fever virus in the field. *J Virol Methods* 197: 14-18.
- [4] Díaz de Arce, H., Ganges, L., Barrera, M., Naranjo, D., Sobrino, F., Frías, M.T., Núñez, J.I., 2005. Origin and evolution of viruses causing classical swine fever in Cuba. *Virus Res.* 112, 123–131.
- [5] Díaz de Arce, H., Núñez, J.I., Ganges, L., Barrera, M., Frías, M.T., Sobrino, F., 1999. Molecular epidemiology of classical swine fever in Cuba. *Virus Res.* 64, 61–67.
- [6] Hulst, M.M., Westra, D.F., Wensvoort, G., Moormann, R.J., 1993. Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J.Virol.* 67, 5435–5442.

- [7] Meyers, G., Thiel, H.J., 1996. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus. Res.* 47, 53–118.
- [8] Moennig, V., Floegel-Niesmann, G., Greiser-Wilke, I., 2003. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Vet. J.* 165, 11–20.
- [9] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000): 419 Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: E63.
- [10] Paton, D.J., McGoldrick, A., Greiser-Wilke, I., Parchariyanon, S., Song, J.-Y., Liou, P.P., Stadejek, T., Lowings, J.P., Björklund, H., Belak, S., 2000. Genetic typing of classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.* 73, 137–157.
- [11] Postel, A., Schmeiser, S., Bernau, J., Meindl-Boehmer, A., Pridotkas, G., Dirbakova, Z., Mojzis, M., Becher, P., 2012. Improved strategy for phylogenetic analysis of classical swine fever virus based on fulllength E2 encoding sequences. *Vet. Res.* 43, 50.
- [12] Terpstra, C., de Smit, A.J., 2000. The 1997/1998 epizootic of swine fever in the Netherlands: control strategies under a non-vaccination regimen. *Vet. Microbiol.* 77, 3–14. Thiel, H.J., Collett, M.S., Gould, E.A., Heinz, F.X., Houghton, M., Meyers, G., Purcell, R.H., Rice, C.M., 2005. Family Flaviviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, pp. 979–996.
- [13] van Rijn, P.A., Miedema, G.K.W., Wensvoort, G., van Gennip, H.G.P., Moormann, R.J.M., 1994. Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus. *J. Virol.* 68, 3934–3942.
- [14] Weesendorp, E., Stegeman, A., Loeffen, W., 2009. Dynamics of virus excretion via different routes in pigs experimentally infected with classical swine fever virus strains of high, moderate or low virulence. *Vet. Microbiol.* 133, 9–22.
- [15] Weiland, F., Weiland, E., Unger, G., Saalmüller, A., Thiel, H.-J., 1999. Localization of pestiviral envelope proteins Erns and E2 at the cell surface and on isolated particles. *J. Gen. Virol.* 80, 1157–1165.
- [16] Yin S, Shang Y, Zhou G, Tian H, Liu Y, Cai X, Liu X (2010): Development and evaluation of rapid detection of classical swine fever virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Biotechnol* 146: 147-150.
- [17] Zhang XJ, Han QY, Sun Y, Belak S, Liu L, Qiu HJ (2011): Development of a loop-mediated isothermal amplification for visual detection of the HCLV vaccine against classical swine fever in China. *J Virol Methods* 171: 200-205.
- [18] Zhang XJ, Sun Y, Liu L, Belak S, Qiu HJ (2010): Validation of a loop-mediated isothermal amplification assay for visualised detection of wild-type classical swine fever virus. *J Virol Methods* 167: 74-78.

## **La novedad e impacto científico de los resultados**

1. Se demuestra la presión de selección como fuerza evolutiva en los virus de peste porcina clásica en Cuba que facilita el escape de las cepas circulantes a la vacunación contra este virus.
2. Las relaciones filogenéticas, basadas en el gen completo de la proteína E2 permitió revelar que los aislamientos cubanos son más divergentes del resto de los virus de PPC del subgenotipo 1 a nivel mundial, los cuales forman un nuevo subgenotipo que se denominó subgenotipo 1.4.
3. Se desarrolló, optimizó y evaluó un ensayo de RT-LAMP de un solo paso para la detección específica de los virus endémicos cubanos de PPC. Ensayo diagnóstico que puede ser extendido a la Red Nacional de Laboratorios del IMV.

## **Publicaciones**

- ✓ Classical swine fever virus isolates from Cuba form a new subgenotype 1.4. 2013. *Veterinary Microbiology* 161(3-4), 2013:334-338. Alexander Postel, Stefanie Schmeiser, Carmen Laura Perera, Lester Josue Pérez Rodríguez, Maria Teresa Frias-Lepoureau, Paul Becher. Factor de impacto 3.3.
- ✓ Positive selection pressure on the B/C domains of the E2-gene of classical swine fever virus in endemic areas under C-strain vaccination. 2012. *Infection, Genetics and Evolution* 12 (2012) 1405–1412. Lester Josué Pérez, Heidy Díaz de Arce, Carmen Laura Perera, Rosa Rosell, Maria T. Frías, Maria I. Percedo, Joan Tarradas, Patricia Dominguez, Jose I. Núñez, Lillianne Ganges. Factor de impacto 3.2.
- ✓ Capacities and limitations of a new CSFV-specific LAMP in diagnostic application. 2014. Alexander Postel, Lester Josué Pérez Rodríguez, Carmen Laura Perera, Stefanie Schmeiser, Sophia Austermann-Busch, Maria Teresa Frias-Lepoureau, Liliam Rios and Paul Becher. Enviado a *Veterinary Microbiology*. Factor de impacto 3.3.