

## Estudio serológico en terneros de cría con infección natural de virus de IBR y BVD.

Travería, G.E.<sup>1</sup>; Alvarado Pinedo, M.F.<sup>1</sup>; Sanabria, R.<sup>1</sup>; Di Paolo, A.<sup>1</sup>; Suzuki, K.<sup>2</sup>; Romero, J.R.<sup>1</sup>

1. Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Plata, Salta y Alvear, Chascomús, CP 7130, Bs. As.
  2. Proyecto de Desarrollo Profesional Continuo para los Veterinarios del Sur (PROVETSUR), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 60 y 118, CP 1900, La Plata, Bs. As.
- \* Correo electrónico: traveria@fcv.unlp.edu.ar

### Palabras clave

Virus de la diarrea viral bovina, herpesvirus bovino, seroconversión, virus neutralización.

### RESUMEN

Se monitorearon los títulos serológicos y la seroconversión al virus de la diarrea viral bovina y al virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina en 44 terneros de un rodeo de cría sin vacunar. Los títulos se siguieron mensualmente desde el nacimiento hasta los 15 meses de edad con la prueba de virus neutralización. A los 8 meses de vida el 50 % de los animales seroconvirtieron para ambas enfermedades, a los 15 meses de edad el 93% seroconvirtió a herpes virus bovino y el 100% al virus de la diarrea viral bovina. En diarrea viral bovina, los terneros de 9 meses de edad presentaron la mayor seroconversión estadística ( $P < 0.0001$ ) seguida por el mes 8 ( $P < 0.0005$ ), mes 14 ( $P < 0.0034$ ) y el mes 12 ( $P < 0.0215$ ). Para el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina la mayor seroconversión se observó a los 11 meses ( $P < 0.0001$ ), seguida por el mes 13 ( $P < 0.0001$ ), mes 5 ( $P < 0.0034$ ), mes 10 ( $P < 0.0078$ ), y mes 14 ( $P < 0.0215$ ). En el transcurso del trabajo no se observaron signos clínicos o muertes compatibles con las enfermedades estudiadas.

### Keywords

Bovine viral diarrhoea virus, bovine herpesvirus, seroconversion, virus neutralization.

### SUMMARY

**Serological study of natural infection with IBR and BVD virus in beef calves.**

Serum titers and seroconversion to bovine viral diarrhoea virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in 44 calves in a non-vaccinated beef herd were monitored. Titers were followed monthly using a virus neutralization test from birth to 15 months of age. By 8 months 50% of calves had seroconverted, with 15 month seroconversion rates of 93% for infectious bovine rhinotracheitis virus and 100% for bovine viral diarrhoea virus. Calves aged 9 month had the highest statistical seroconversion for bovine viral diarrhoea virus followed by month 8 ( $P < 0.0005$ ), month 14 ( $P < 0.0034$ ) and month 12 ( $P < 0.0215$ ). For infectious bovine rhinotracheitis virus, the highest seroconversion was at 11 months ( $P < 0.0001$ ), followed by month 13 ( $P < 0.0001$ ), month 5 ( $P < 0.0034$ ), month 10 ( $P < 0.0078$ ), and month 14 ( $P < 0.0215$ ). No evidence of overt clinical signs or deaths were recorded in association with these diseases.

### Introducción

La diarrea viral bovina (BVD) y la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) son enfermedades virales económicamente importantes que limitan la producción<sup>12, 20, 26</sup>.

IBR es una enfermedad altamente contagiosa causada por el herpes virus bovino tipo 1 (BoHV-1). Los signos clínicos más comunes incluyen fiebre, disnea, anorexia y descargas ocular y nasal. Secuelas importantes del BoHV-1 en las vacas preñadas son la muerte embrionaria, el aborto y la latencia.

El virus de la BVD (BVDV) se transmite en forma transplacentaria o a través de la inhalación o ingestión de material contaminado con secreciones contaminadas. Además de los bovinos, los ovinos, caprinos y otros ungulados pueden ser afectados<sup>15</sup>. El BVDV se puede diferenciar en dos biotipos, de acuerdo al efecto citopático que producen en las líneas celulares, en cepas citopáticas y no citopáticas<sup>20</sup>. Los signos

clínicos de la BVD son variados, entre los que se puede observar diarrea, lesiones hemorrágicas, trastornos reproductivos y, en los casos en donde la infección afecte a animales gestantes, puede causar anomalías fetales y abortos<sup>20</sup>. Se conoce que BVDV puede causar infección fetal, la cual, dependiendo del tiempo de gestación, induce una respuesta inmune adaptativa con desarrollo de inmunoglobulinas. La infección de un feto inmunocompetente con las cepas no citopáticas de BVDV (después de los días 125-150 de gestación), puede tener consecuencias variadas, desde el aborto hasta el nacimiento de un ternero normal con respuesta inmune, puesta de manifiesto por la presencia de anticuerpos precalostrales<sup>17, 19</sup>. El objetivo del presente trabajo fue determinar los títulos de neutralización viral contra BoHV-1 y BVDV en terneros sin vacunar desde el nacimiento hasta los 15 meses de edad y la relación entre los títulos de las madres y sus terneros.

### Materiales y métodos

#### **Población en estudio:**

Se sangraron 100 vacas parto de un rodeo de cría de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, localizado en la provincia de Buenos Aires. Posteriormente se extrajeron muestras de sangre de los 100 terneros de estas vacas al primer mes de vida. Seguidamente se eligieron 44 terneros al azar, los que se sangraron mensualmente hasta los 15 meses de edad. Cada ternero permaneció con su madre durante un período de 6 meses a partir del cual se destetaron. Desde el destete los terneros compartieron una pastura hasta el final del muestreo. Los animales se vacunaron contra carbunco, brucelosis, mancha y fiebre aftosa y recibieron tratamiento antiparasitario. Ninguno de los animales se vacunó contra BoHV-1 ni BVDV.

#### **Toma de muestras:**

Las muestras de sangre se tomaron

a partir de la vena yugular con agujas individuales estériles; los tubos se centrifugaron, en el laboratorio, a 2,500 g durante 15 minutos. Los sueros se fraccionaron en criotubos, se identificaron de acuerdo al número de los animales y fecha de extracción y se conservaron congelados a -20° C hasta su procesamiento.

**Procesamiento de los sueros mediante virus neutralización:**

La prueba de virus neutralización (VN) se realizó en células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) en placas de 96 pocillos. Los virus usados fueron la cepa citopática Singer correspondiente al genotipo 1a, para determinar anticuerpos contra BVDV; para detectar anticuerpos contra BoHV-1, se utilizó la cepa Los Angeles. Cada dilución de suero se

analizó por duplicado. Los muestreos mensuales seriados correspondientes a cada animal se analizaron en el mismo momento. Para todas las muestras de suero los títulos neutralizantes se determinaron mediante diluciones seriadas al doble, desde la dilución 1/2 hasta 1/128 en medio esencial mínimo (MEM). Las diluciones de los sueros se incubaron con 100 dosis infecciosas de cultivo de tejidos 50% (DICT50), con rango de variación 30-300 DICT50 para BoHV-1<sup>23</sup>, y de 30-421 DICT50 para BVDV<sup>22</sup> determinadas por el método de Reed y Muench. Transcurridas 96 horas en incubadora de CO<sub>2</sub>, los puntos finales de las concentraciones de los anticuerpos neutralizantes se determinaron por la observación microscópica del efecto citopático en las células MDBK<sup>5</sup>. La seroconversión se

definió como el incremento en tres títulos neutralizantes.

**Análisis estadístico:**

La correlación entre los títulos serológicos maternos previos al parto y sus correspondientes terneros en su primer mes de vida se analizó con el test de Spearman. La proporción de terneros que seroconvirtieron a determinado mes de vida con 30 días de intervalo se estimaron con el análisis comparativo de McNemar. Para el análisis de supervivencia correspondiente a cada mes se utilizó el test de Kaplan Meier. Para determinar la igualdad en las curvas de seroconversiones entre BoHV-1 y BVDV se usó la prueba de logaritmo del rango. Las diferencias se consideraron con una significancia de P < 0.05.

**Tabla 1.**  
Distribución proporcional de las muestras de animales adultos, según los títulos neutralizantes para IBR y BVD encontrados.

Títulos neutralizantes	IBR (%) <sup>1</sup>	BVD (%) <sup>2</sup>
Negativos	8	0
Positivos 1/2	10	0
Positivos 1/4	19	0
Positivos 1/8	17	1
Positivos 1/16	23	8
Positivos 1/32	19	16
Positivos 1/64	4	24
Positivos 1/128	0	51

1: Rinotraqueítis infecciosa bovina.

2: Diarrea viral bovina.

**Resultados**

**Serología de las madres para BoHV-1 y BVDV:**

De las 100 madres muestreadas, la serología fue la siguiente: 92% positivos para BoHV-1 y 100% positivos para BVDV, con un rango de títulos de 1/2 a 1/64 y desde 1/8 a 1/128 respectivamente. Las frecuencias proporcionales de los diferentes títulos se pueden ver en la tabla 1, siendo 1/16 el título más frecuente para BoHV-1 (23%) y 1/128 (51%) para BVDV.

**Relación de los títulos serológicos para BoHV-1 y BVDV entre las madres antes del parto comparadas con sus correspondientes terneros:**

El análisis estadístico de la serología de 100 muestras maternas y sus correspondientes terneros al primer mes de vida, presenta una baja correlación estadística para BoHV-1 con un coeficiente de correlación de Spearman ( $P= 0,0244$ ,  $r= 0,231$ , 95% IC 0.0319-0,412). Para BVDV no se observaron correlaciones significativas ( $P= 0,2632$ ,  $r= 0,115$ , 95% IC -0,0882-0,310).

**Seroconversión y variación de los títulos neutralizantes individuales en los terneros para IBR y BVD:**

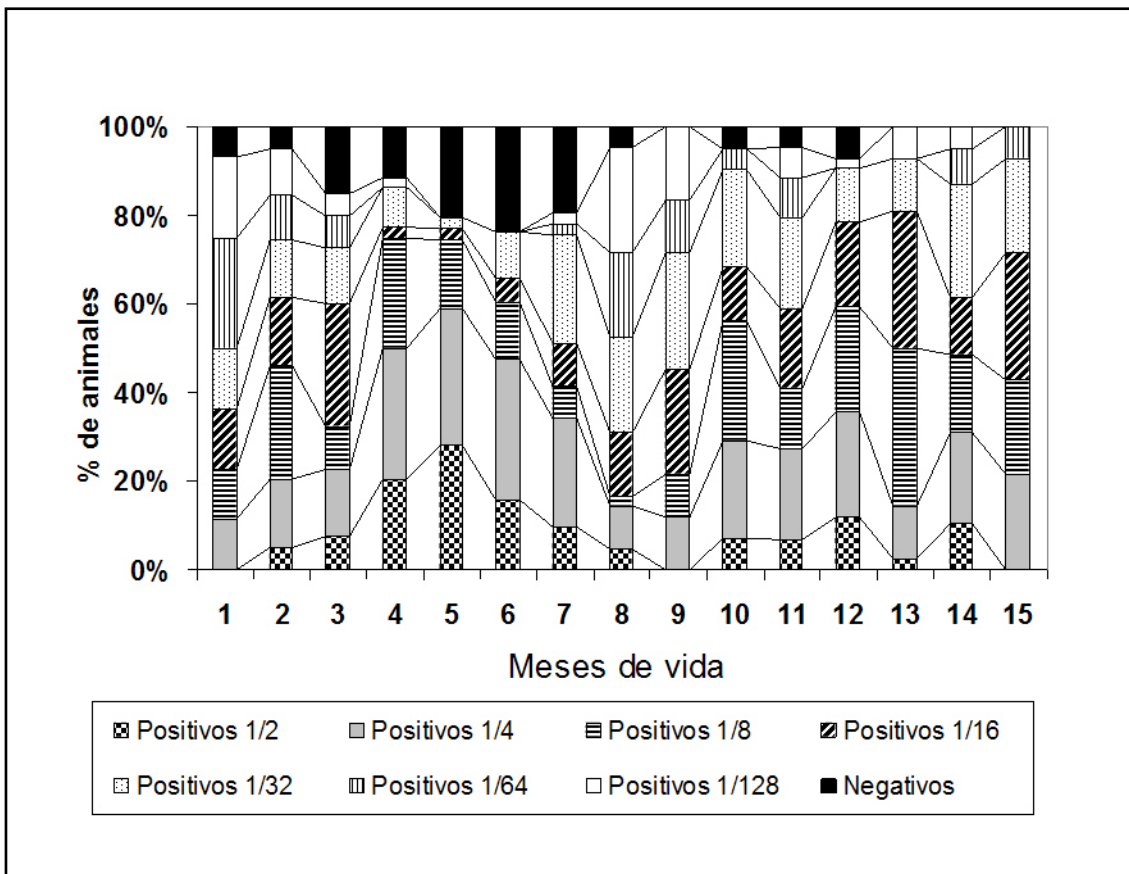
La variación por mes se muestra en la figura 1 para IBR y en la figura 2 para BVD. En IBR se observó 100% de seroconversión a los 15 meses de edad. Los meses con seroconversiones significativas de acuerdo a la prueba de

McNemar fueron los siguientes: mes 5 ( $P < 0.0034$ ), mes 10 ( $P < 0.0078$ ), mes 11 ( $P < 0.0001$ ), mes 13 ( $P < 0.0001$ ) y mes 14 ( $P < 0.0215$ ).

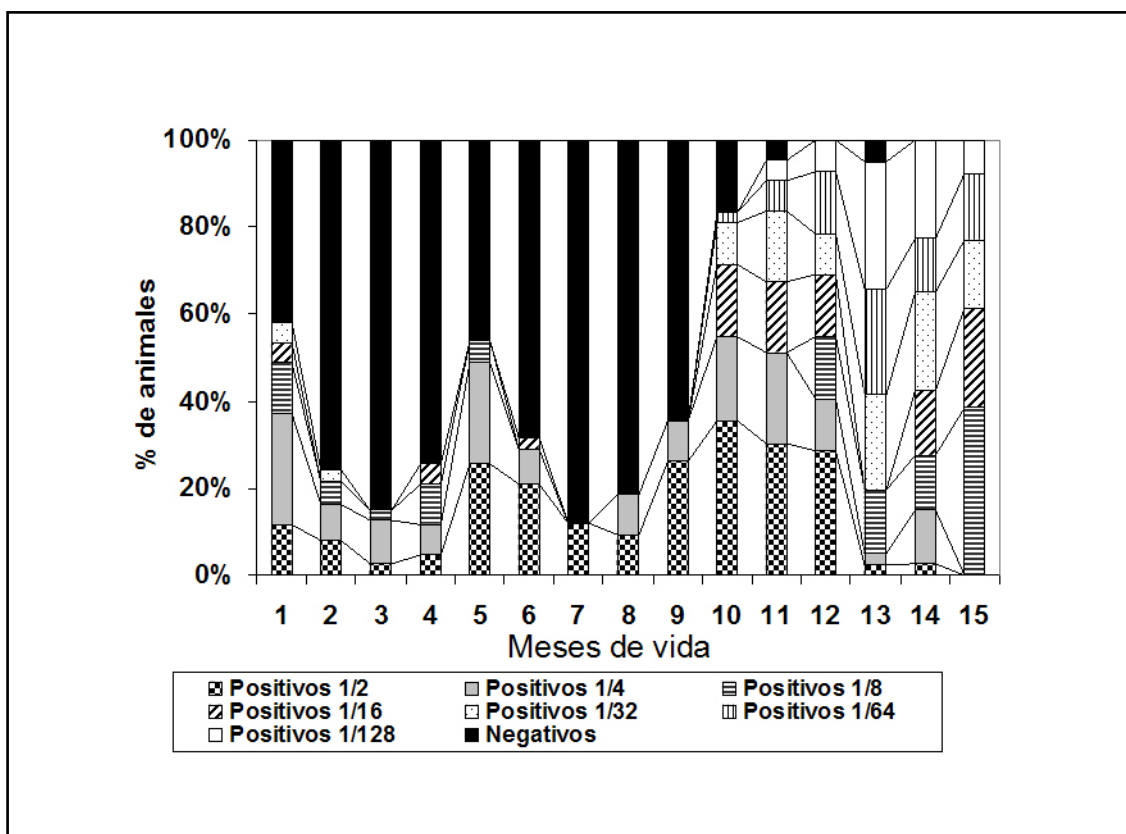
Para BVD seroconvirtieron 41 animales (93%), los meses que presentaron seroconversiones significativas con la prueba de McNemar fueron los siguientes: mes 8 ( $P < 0.0005$ ), mes 9 ( $P < 0.0001$ ), mes 12 ( $P < 0.0215$ ) y mes 14 ( $P < 0.0034$ ).

La distribución de las seroconversiones para las dos enfermedades se pueden observar en la figura 3. A los 8 meses del muestreo seroconvirtió el 50% de los animales para IBR y para BVD. Con la prueba de logaritmo del rango no se observaron diferencias entre las curvas de seroconversiones de IBR y BVD,  $P < 0.9$ .

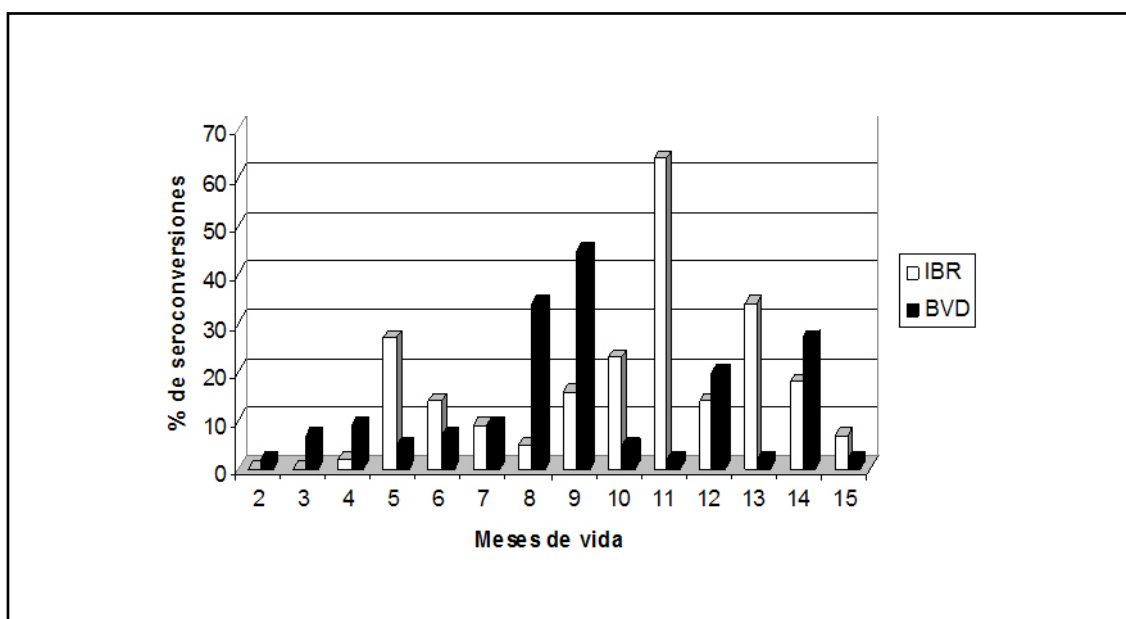
**Figura 1.**  
**Variación mensual de los títulos neutralizantes para IBR.**



**Figura 2.**  
Variación mensual de los títulos neutralizantes para BVD.



**Figura 3.**  
Distribución mensual de las seroconversiones para IBR y BVD.



## Discusión y conclusiones

En este trabajo se determinaron los títulos de anticuerpos neutralizantes y las seroconversiones para BVDV y BoHV-1 en un rodeo de cría utilizando la prueba de VN por un período de 15 meses a partir del primer mes de vida. La prueba de VN es una prueba serológica de referencia que se utiliza comúnmente para detectar la exposición a los virus de BoHV-1 y BVDV<sup>26</sup>. Se encontró una seropositividad en los animales adultos de 100% para BVDV y de 92% para BoHV-1; en los animales muestreados mensualmente se observó seropositividad del 100% para ambos virus a los 15 meses de edad. Los títulos serológicos encontrados pertenecen a animales que no estaban vacunados contra estos virus, por lo tanto, estos resultados son indicativos de exposición a cepas de campo como consecuencia de infecciones endémicas concurrentes<sup>6</sup>. En los animales adultos, los títulos neutralizantes observados fueron más variados y elevados en BVDV que en BoHV-1. Esto puede deberse a la diversidad antigénica que se observa en BVD, y a la probable presencia de animales persistentemente infectados o con infecciones transitorias<sup>8, 10, 11</sup>.

En IBR se encontró una escasa correlación positiva entre los títulos neutralizantes de las madres y sus hijos. En BVDV no se encontró correlación entre los títulos neutralizantes de las madres con sus respectivos hijos, probablemente ocasionado por la mayor diversidad de valores encontrados en los adultos al compararlos con los observados en BoHV-1. Esta falta de correlación es similar a la mencionada por Fulton y col.<sup>7</sup> quienes describen un rango de variación amplio en los anticuerpos calostrales en estas y otras enfermedades. En este estudio los terneros presentaron disminución en los títulos de los anticuerpos neutralizantes contra ambos virus. Este descenso en los valores de los títulos es esperable en los anticuerpos calostrales, con la consecuente disminución en la protección, seguida de incrementos en la seroconversión<sup>18, 24</sup>.

En IBR se observaron seroconversiones significativas en los meses 5, 10, 11, 13 y 14; en BVDV los meses con seroconversiones significativas se dieron en los meses 8, 9, 12 y 14. Estas seroconversiones y la alta cantidad de animales seropositivos, se debieron probablemente a infecciones subclínicas dado que, durante el período en el que se desarrolló el trabajo, no se observaron signos clínicos aparentes compatibles con enfermedades asociadas a estos virus. Los terneros

con anticuerpos neutralizantes en disminución se infectarían al exponerse a los virus diseminados por animales con infecciones transitorias o persistentemente infectados en BVD<sup>8, 10, 11</sup>, y por activación de la latencia en IBR<sup>26</sup>. De igual manera, la transmisión de BVDV puede producirse por períodos prolongados en ausencia de animales persistentemente infectados<sup>16</sup>.

Para BVDV no se encontraron terneros que permanecieran seronegativos. El tiempo necesario para que los anticuerpos calostrales no se puedan detectar en el suero es de aproximadamente cinco meses para BVDV<sup>20</sup>. Las primeras seroconversiones en BVDV se observaron a partir del segundo mes de vida. Una explicación para la aparición temprana de estas seroconversiones es la existencia precalostrales de inmunoglobulinas anti-BVDV. Los resultados encontrados por otros autores sugieren que un porcentaje significativo de terneros, presentan anticuerpos al momento de nacer, previamente a la ingestión de calostro, con porcentajes de anticuerpos anti-BVDV que varían desde 6,8% a 10,7%<sup>1, 2, 4, 18, 27</sup>. La seroconversión encontrada para BVDV de 93% es similar al 90% descrita en otras publicaciones con seroconversiones significativas en los meses 7 y 8 en terneros sin vacunar después de exponerse a terneros persistentemente infectados<sup>8</sup>. En este rodeo no se utilizaron pruebas diagnósticas para identificar animales persistentemente infectados, sin embargo se puede sugerir su presencia por la elevada cantidad de animales jóvenes serológicamente positivos y la alta proporción de seroconversiones<sup>11, 25</sup>. Los animales que seroconvierten son una fuente de infección importante, cuando se encuentran presentes animales sin inmunidad adaptativa inducida ya sea en forma natural o artificial<sup>13</sup>. Después de seroconvertir se observaron animales que siguieron incrementando sus títulos serológicos para ambos virus, demostrando que cuando los anticuerpos decaen por debajo de ciertos niveles de protección, el virus vuelve a replicarse<sup>3</sup>, induciendo una respuesta inmune de memoria representada por un nuevo incremento en el título de anticuerpos. En los primeros meses del muestreo se encontró un 6.82% de terneros con serología negativa, que en los subsecuentes muestreos pasaron a ser seropositivos. Algunos de ellos podrían representar animales que no recibieron niveles adecuados de anticuerpos calostrales, o animales persistentemente infectados con anticuerpos calostrales, cuya persistencia es menor por la presencia de partículas virales, y que posteriormente respondieron a otras variantes virales presentes

en el rodeo. La presencia de animales persistentemente infectados en los bovinos de carne se ha estimado en un rango de variación del 0.13% al 2%<sup>30</sup>. Estos animales adquieren una tolerancia inmune específica a las infecciones virales congénitas y, por lo tanto, no responden a estas cepas virales homólogas; pero sí pueden responder a otras cepas virales heterólogas que se encuentren circulando entre sus compañeros<sup>10</sup>. En la prueba de VN para BVDV se usó la cepa Singer (genotipo 1a) como virus indicador, que si bien es el genotipo más común no es el único hallado en Argentina, por lo que podrían encontrarse otros genotipos actuando en el rodeo<sup>14, 21</sup>. De haberse utilizado virus indicadores representativos de otros genotipos se podría haber encontrado títulos neutralizantes variados por las diferencias antigénicas que se presentan entre los genotipos, debido a que el mayor título neutralizante se logra cuando el virus indicador es genotípica y antigénicamente idéntico al que se encuentra en el rodeo.

Las primeras seroconversiones para IBR se observaron en el cuarto mes, seguido por seroconversiones significativas en el quinto mes ( $P < 0.0034$ ) indicando el momento en el cual los animales comienzan a infectarse. En estos terneros el virus comienza a replicarse en forma intensiva, exponiendo grandes cantidades de partículas virales en los exudados, siendo altamente contagiosos para los demás animales<sup>29</sup>. En IBR en el mes 11 se observó el mayor número de seroconversiones probablemente a consecuencia de la presencia de animales recientemente infectados diseminadores de virus que, en contacto con animales susceptibles por la ausencia de anticuerpos maternos y la falta de experiencia inmune previa, ocasionan infecciones evidenciadas por las seroconversiones observadas. A los ocho meses de edad el 50% de los animales presentó seroconversión en BVDV y BoHV-1. Estadísticamente no se observaron diferencias significativas entre las seroconversiones de ambas enfermedades. En el mes 15, el número de seroconversiones disminuyó, probablemente por la presencia de una mayor cantidad de animales con títulos de anticuerpos y el desarrollo de inmunidad adaptativa celular, capaces de limitar la replicación viral. En trabajos previos se encontró una mayor presencia de seroconversiones en animales jóvenes<sup>28</sup>. Entre los factores que facilitan la diseminación de estas enfermedades se menciona el estrés y las coinfecciones con otros patógenos como el virus de la inmunodeficiencia bovina<sup>9</sup> o el efecto sinérgico que podría tener la presencia simultánea en

el mismo rodeo de BVDV y BoHV-1, tal como se presenta en la población en estudio, considerando el potencial efecto inmunosupresor transitorio de los agentes implicados.

Usando la prueba de VN con un intervalo mensual, se demostró la presencia elevada de anticuerpos neutralizantes anti-BVDV y anti-BoHV-1 en animales no vacunados contra éstas

enfermedades en un rodeo de cría, con seroconversión desde los dos meses hasta los 15 meses de edad sin signos clínicos aparentes.

## Bibliografía

- Bolin SR, Matthews PJ, Ridpath JF.** Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest* 1991; 3:199-203.
- Bolin SR, Ridpath, JF.** Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10:135-139.
- Brock KV, Grooms DL, Ridpath J, Bolin SR.** Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10:22-26.
- Chigerwe M, Tyler JW, Nagy DW, Middleton JR.** Frequency of detectable serum IgG concentrations in precolostral calves. *Am J Vet Res* 2008; 69:791-795.
- Dinter Z.** A review of methods at the National Veterinary Institute. In *Diagnostic Virology*. Eds J. Moreno.Lopez, Uppsala Sweden, Sveriges Lantbruksuniv Publishers, 1989, pp 125.
- Fulton RW, Saliki JT, Confer AW, Burge LJ, d'Offay JM, Helman RG, et al.** Bovine viral diarrhoea virus cytopathic and noncytopathic biotypes and type 1 and 2 genotypes in diagnostic laboratory accessions: clinical and necropsy samples from cattle. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12:33-38
- Fulton RW, Briggs RE, Payton ME, Confer AW, Saliki JT, Ridpath JF, et al.** Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1a, BVDV 1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine* 2004; 22:643:649.
- Fulton RW, Briggs RE, Ridpath JF, Saliki JT, Confer AW, Payton ME, et al.** Transmission of Bovine viral diarrhoea virus 1b to susceptible and vaccinated calves by exposure to persistently infected calves. *Can J Vet Res* 2005; 69:161-169.
- Fulton RW.** Bovine respiratory disease research (1983-2009). *Anim Health Res Rev* 2009; 10:131-139.
- Fulton RW, Whitley EM, Johnson BJ, Ridpath JF, Kapil S, Burge LJ, et al.** Prevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. *Can J Vet Res* 2009; 73:283-291.
- Houe H, Baker JC, Maes RK, Ruegg PL, Lloyd JW.** Application of antibody titers against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) as a measure to test herds with cattle persistently infected with BVDV. *J Vet Diagn Invest* 1995; 7:327-332.
- Houe H.** Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* 2003; 31:137-143.
- Innocent G, Morrison I, Brownlie J, Gettinby G A.** A Computer simulation of the transmission dynamics and the effects of duration of immunity and survival of persistently infected animals on the spread of bovine viral diarrhoea virus in dairy cattle. *Epidemiol Infect* 1997; 119:91-100.
- Jones LR, Zandomeni R, Weber EL.** Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Vet Microbiol* 2001; 81:367-375.
- Loken T.** Ruminant Pestivirus Infections in Animals Other Than Cattle and Sheep. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1995; 11:597-614.
- Moen A, Sol J, Sampimon O.** Indication of transmission of BVDV in the absence of persistently infected (PI) animals. *Prev Vet Med* 2005; 72:93-98.
- Müller-Doblies D, Arquint A, Schaller P, Heegaard PM, Hilbe M, Albini S, et al.** Innate Immune Responses of Calves During Transient Infection with a Noncytopathic Strain of Bovine Viral Diarrhoea Virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 302-312
- Muñoz-Zanzi CA, Thurmond MC, Johnson WO, Hietala SA.** Predicted ages of dairy calves when colostrum-derived bovine viral diarrhoea virus antibodies would no longer offer protection against disease or interfere with vaccination. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 221:678-685.
- Muñoz-Zanzi CA, Hietala SK, Thurmond MC, Johnson WO.** Quantification, risk factors, and health impact of natural congenital infection with bovine viral diarrhoea virus in dairy calves. *Am J Vet Res* 2003; 64:358-365.
- Nettleton, PF, Entrigan G.** Ruminant Pestiviruses. *Br Vet J* 1995; 151: 615-642.
- Odeón AC, Risatti G, Kaiser GG.** Bovine viral diarrhoea virus genomic associations in mucosal disease, enteritis and generalized dermatitis outbreaks in Argentina. *Vet Microbiol* 2003; 96:133-144.
- Office International des Epizooties.** Bovine viral diarrhoea. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Chapter 2.4.8.; p. 698-711. 2008 Disponible en [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.08\\_BVD.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.08_BVD.pdf)
- Office International des Epizooties.** Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Chapter 2.4.13.; p. 752-767. 2008 Disponible en [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.13\\_IBR\\_IPV.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.13_IBR_IPV.pdf)
- Palfi V, Houe H, Philipsen J.** Studies on the Decline of Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV) Maternal Antibodies and Detectability of BVDV in Persistently Infected Calves. *Acta Vet Scan* 1993; 34:105-107.

- 25. Pillars R, Grooms D.** Serological evaluation of five unvaccinated heifers to detect herds that have cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res* 2002; 63:499–505.
- 26. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW.** Diarrea viral bovina, Rinotraqueitis infecciosa bovina. En *Medicina Veterinaria*, ed: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. Madrid Spain, 9th ed., 2002 pp. 1285-1309, 1390-1403. Harcourt Publishers Ltd.
- 27. Schefers J, Muñoz-Zanzi C, Collins JE, Goyal SM, Ames TR.** Serological evaluation of precalostrual serum samples to detect bovine viral diarrhoea virus infections in large commercial dairy herds. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20:625–628.
- 28. Segura-Correa JC, Solorio-Rivera JL, Sánchez-Gil LG.** Sero-conversion to bovine viral diarrhoea virus and infectious bovine rhinotracheitis virus in dairy herds of Michoacan, Mexico. *Trop Anim Health and Prod* 2010; 42:233-238.
- 29. Turin L, Russo S, Poli G.** BHV-1: new molecular approaches to control a common and widespread infection. *Mol Med* 1999; 5:261-84.
- 30. Wittum TE, Grotelueschen DM, Brock KV, Kvasnicka WG, Floyd JG, Kelling CL, et al.** Persistent bovine viral diarrhoea virus infection in US beef herds. *Prev Vet Med* 2001; 49:83-94.