

**Jornadas de Investigación – Universidad Lisandro Alvarado
Barquisimeto, Junio 2006**

**COMPLEJO RESPIRATORIO Y REPRODUCCIÓN DE LOS
BOVINOS (CRRB), ENFASIS EN LOS AGENTES VIRALES DE
MAYOR IMPACTO ECONÓMICO
EXPERIENCIAS EN GANADO CARORA.**

**César A. Obando R
IIV- CENIAP - INIA**

INTRODUCCIÓN

El ganado CARORA, al igual que el resto de la ganadería bovina en Venezuela, esta expuesta a una serie de agentes patógenos que por su contagiosidad y patogenicidad se han venido difundiendo en sus rebaños, ocasionando pérdidas a los criadores y limitando la comercialización de un material genético valioso. Las enfermedades respiratorias, entéricas y reproductivas, englobadas dentro de lo que se conoce como el complejo respiratorio y reproductivo de los bovinos (**CRRB**), constituyen las principales patologías que limitan los procesos productivos y reproductivos. Entre los agentes virales involucrados en el CRRB, a menudo se detectan el virus herpes bovino tipo 1 (VHB-1), responsable de la rinotraqueitis infecciosa bovina, el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), el virus respiratorio sincicial de los bovinos (VRSB) y el virus de parainfluenza - 3 (VPI-3). Entre ellos, el VHB-1 y el VDVB son los de mayor importancia, ya que pueden interferir de manera significativa con los procesos productivos y reproductivos, además de limitar la comercialización de bovinos y de su material genético, razón por la cual me referiré exclusivamente a estos dos agentes virales.

RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA

Historia

El primer reporte de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) lo realizó Rychner en Alemania en 1841 [63], quien describió una enfermedad venérea en un toro y en varias vacas. Esta manifestación genital era conocida con el nombre de “Exantema Vesiculosum Coitale” [36]. En 1928 Reissinger y Reinnan [57] demostraron que el agente etiológico era un virus, al lograr reproducir la enfermedad inoculando bovinos con una suspensión previamente filtrada y libre de bacterias [31]. En 1954 Schroeder y Moys [64] realizan el primer reporte de IBR, *forma respiratoria*, en el Estado de California – USA, como una enfermedad respiratoria con disminución de la producción de leche, que se transmitía en forma natural a través de tejidos y exudados de los animales infectados, la cual fue denominada “Nariz Roja” y “Rinotraqueitis Infecciosa Necrótica”. En 1955 se designa rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), en una reunión de la U.S Livestock Sanitary Association. Posteriormente, Madin et al [38], York et al [75] y Toussimis et al [69] aislaron y caracterizaron al virus herpes bovino tipo 1 (VHB-1) como el agente causal. McKercher et al [40] definen la IBR como una enfermedad contagiosa de los bovinos, que se presenta en forma aguda, con inflamación intensa de las vías respiratorias altas, acompañada de disnea, descarga nasal y desmejoramiento de las condiciones físicas del animal. McKercher [41] y McKercher y Fheilen [42] consideran que la IBR fue introducida a los Estados Unidos por medio de bovinos con infección latente de VHB-1, procedentes de Alemania, y afirman que cambios en la virulencia del agente causal conllevaron a la aparición de forma respiratoria. Estudios realizados con pruebas de inmunidad cruzada, demostraron que las formas de manifestación respiratoria y genital son ocasionadas por el VHB-1 [29, 36].

Prevalencia y distribución geográfica

Encuestas realizadas indican que la IBR tiene una distribución mundial y que su ocurrencia varía desde esporádica hasta enzoótica, en muchos países de América, Europa, Asia y Oceanía. En Sur América, la enfermedad ha sido diagnosticada en la mayoría de los países y, en Venezuela, la primera evidencia serológica de IBR se obtuvo en los estados Portuguesa y Lara, durante la década del ochenta [46, 47], realizándose en 1986 el primer aislamiento del virus en el Estado Mérida [48]. En una encuesta serológica realizada en una muestra de 9 fincas dedicadas a la cría de **ganado Carora**, 4 con y 5 sin programas de vacunación contra IBR, la mayoría ubicadas en el municipio Torres, todas resultaron con serología positiva al virus de IBR.

Etiología

El VHB-1 pertenece a la familia Herpesviridae, sub-familia Alphaherpesvirinae [13]. Este virus, así como el virus herpes bovino tipo - 2 (responsable de la mamilitis bovina), virus herpes bovino tipo - 4, virus herpes bovino tipo - 5 (recientemente relacionado con signos neurológicos) y otros alfa herpesvirus de rumiantes tienen una elevada homología genómica, lo que pudiera comprometer, en algún grado, la eficacia de los métodos de diagnóstico serológicos convencionales, por la ocurrencia de reacciones cruzadas [62]. Mainsonave [39], señala tres subtipos diferentes de VHB-1: el respiratorio (VHB-1.1), el genital (VHB-1.2) y el neuropatogenico (VHB-1.3), aunque este último actualmente está clasificado como virus herpes bovino tipo 5 (VHB-5).

Morfología. El VHB-1 mide entre 180 y 200 nm de diámetro y consta de un núcleo central de 16 nm, constituido por una doble cadena lineal de ácido desoxirribonucleico (ADN). Posee una cápside de forma icosaédrica, con un diámetro de 95 a 105 nm, la cual está formada por 162 capsómeros en forma de prismas hexagonales alargados que miden 9.5x12.5 nm. Rodeando la cápside se encuentra una zona granulosa o tegumento, compuesta de proteínas globulares. Finalmente, tiene una cubierta externa con proyecciones cortas dispuestas regularmente, la cual parece contener componentes de la célula del huésped [Ludwijn y Gregersen,1986].

Características físicas y químicas del VHB-1. El VHB-1 contiene 18 proteínas estructurales con un peso molecular entre 250.000 y 290.000 dalton. La doble cadena lineal de ADN tiene 72% de guanina y citosina, lípidos y fosfolípidos. Las glicoproteínas están divididas en tres grupos y cada uno tiene dos o tres polipéptidos que parecen ser diferentes formas de la molécula básica, es decir, monómeros, dímeros, precursores y productos finales de ellos [36]. El VHB-1 se inactiva rápidamente con disolventes lípidos, Hidróxido de Sodio al 0.5%, Bases de Amonio al 1% y Solución de Lugol al 10%. El pH es estable entre valores de 6.0 a 9.0 [16]. Puede mantenerse activo a 37°C por 10 días, pero se inactiva en 21 minutos a 56°C y se mantiene estable por años a temperatura de - 196°C.

Cultivo in vitro. El VHB-1 tiene la habilidad de multiplicarse en una amplia variedad de cultivos primarios de fetos bovinos, tales como riñón, cornete nasal, piel, testículos y pulmón, así como en líneas celulares estables como la Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), lo que facilita los trabajos de laboratorio con fines de diagnóstico.

Epizootiología

El virus herpes bovino tipo-1 (VHB-1), es un importante patógeno de los bovinos, aunque otras especies como: chivos, venados y cerdos también han sido infectados [36]. Los bovinos de todas las razas son susceptibles a la infección experimental, y la infección natural ocurre, por lo general, en animales mayores de seis meses de edad, posiblemente por estar más expuestos al agente viral.

Después de la infección primaria el VHB-1 tiene la capacidad de permanecer en estado de latencia en el bovino infectado, lo que le permite persistir dentro del huésped sin ocasionarle enfermedad. La respuesta del sistema inmune del animal infectado limita la infección, disminuye la sintomatología y facilita el establecimiento de la latencia, estado que se caracterizan por la ausencia de virus infeccioso y la presencia de ADN viral, acompañado de anticuerpos específicos. El virus puede ser reactivado y reexcretado durante la vida del animal, ocasionando recurrencia de la enfermedad y la subsecuente transmisión del virus a animales susceptibles [65, 1, 17]. Las infecciones recurrentes son más comunes y menos severas que las primarias y son la fuente de mantenimiento del virus en los rebaños [52].

La reactivación y excreción del VHB-1 en animales con infección latente, está asociada con la disminución de las defensas, usualmente como consecuencia de cambios de las condiciones de manejo, concentraciones altas de animales, celo, parto y movilización, lo que explicaría la aparición de la enfermedad donde la fuente de infección no es evidente.

Síntomas clínicos

La IBR se puede manifestar con varios signos clínicos de severidad variable, lo cual parece estar relacionado, en parte, con la infección simultánea de agentes inmunosupresores. Crandell [14] describe cinco formas de manifestación: respiratoria, genital, ocular, nerviosa y digestiva o forma sistémica fatal en neonatos. Sin embargo, éstas pueden ser resumidas en las formas respiratoria y genital. En la forma respiratoria, después de 5 a 7 días de ocurrida la infección, el virus afecta principalmente el tracto respiratorio superior, ocasionando conjuntivitis, rinitis, traqueitis y fiebre [41]. Estas infecciones pueden hacerse severas, incluso llegar a ocasionar neumonía, como consecuencia de coinfecciones con otros virus respiratorios o bacterias secundarias. Los animales enfermos muestran secreción nasal clara abundante, al inicio, que posteriormente se torna mucopurulenta; congestión de los ollares (nariz roja), temperaturas de 40,5 a 42,0 °C, incremento de la frecuencia respiratoria, tos, disminución del apetito y, en vacas lactando, una caída brusca en la producción de leche. Puede presentarse excesiva salivación, pero las lesiones orales no son comunes. La fase aguda de la enfermedad usualmente dura de 5 a 10 días, período después del cual la mayoría de los animales se recuperan rápidamente, aunque algunos pueden morir.

En vacas preñadas pueden presentarse reabsorciones embrionarias y abortos después de 3 a 6 semanas de iniciada la infección, ocurriendo los últimos generalmente en animales entre el 5to y 8vo mes de gestación [45, 24, 60].

En la forma genital, la infección, producto del coito de un animal susceptible al VHB - 1 con uno infectado con este virus, puede ocasionar vulvovaginitis pústular infecciosa (IPV) o balanopostitis (IPB), dentro de 1 a 3 días de la cópula [30]. El examen ocular revela

edema, enrojecimiento y pequeñas pústulas en la mucosa de la vulva o pene, acompañadas en algunos casos con secreción mucopurulenta. La fase aguda dura de 2 a 4 días y las lesiones curan en 10 a 14 días después del inicio de la enfermedad.

Otra particularidad del VHB-1 es la capacidad de ocasionar endometritis aguda o crónica, ooforitis, folículos necróticos y focos de necrosis del cuerpo lúteo, que se traducen en fallas temporales de la concepción, usualmente después de la infección primaria, cuando se inoculan cantidades de virus en el útero a través de la monta natural (toro excretando VHB-1 en el semen) o la inseminación artificial (semen contaminado con VHB-1). En caso de preñez, puede ocasionar la muerte temprana del embrión, lo cual es sospechado por la observación de ciclos estrales largos [8, 45].

Diagnóstico

El diagnóstico clínico de IBR, en un rebaño, no es sencillo debido a la existencia de otras enfermedades que cursan con signos clínicos semejantes [12]. Sin embargo, la enfermedad puede ser sospechada cuando se presenten afecciones del tracto respiratorio superior, con mediana o alta morbilidad y baja mortalidad, además, de problemas de fertilidad, reabsorciones embrionarias y abortos. Ahora bien, desde el punto de vista económico, no basta con conocer si el VHB-1 está circulando dentro de un rebaño en particular, como criterio suficiente para implementar algún método de prevención o control. Lo más importante es determinar si la actividad del VHB-1 está realmente causando pérdidas económicas de consideración, que justifiquen la incorporación de una práctica para combatirla. En muchos países de Europa hasta la década del 70, los criadores de ganado convivieron con la IBR sin vacunación, en razón a que no ocasionaba pérdidas de consideración [74].

Con esta premisa, para determinar que el VHB-1 es el responsable de la ocurrencia de pérdidas económicas importantes, producto de la observación frecuente de animales con síntomas similares a los descritos anteriormente, es necesario que se realice un diagnóstico de laboratorio preciso de los animales enfermos, lo que nos lleva a enfatizar la importancia que tiene la recolección de la (s) muestras para el diagnóstico, la naturaleza de las mismas, el momento adecuado de la recolección y la apropiada conservación para su envío al laboratorio.

En forma general, podemos decir que para un diagnóstico eficiente de IBR existen dos tipos de pruebas:

a) Pruebas directas, las cuales se basan en el aislamiento del virus (cultivo celular), detección de antígenos virales (ELISA, Inmunofluorescencia o Inmunohistoquímica) o de material genómico del mismo (PCR).

Para que estas pruebas tengan éxito es necesario recolectar, mediante hisopos estériles, preferiblemente durante los primeros tres días de iniciado los síntomas clínicos (fase aguda), muestras de secreciones nasales y / o oculares de animales que presenten enfermedad respiratoria, y secreciones vaginales, cuando se sospecha de la forma genital. Las muestras deben ser introducidas en tubos estériles herméticamente cerrados, contentivos de 2 ml de solución salina buferada pH 7, adicionada de penicilina (100 unids / ml), estreptomycin (100 µg / ml) y anfotericina – B (2,5 µg / ml). De no ser posible conseguir el medio anteriormente descrito, utilizar solución fisiológica estéril. Es importante que las muestras sean conservadas en una cava con hielo y remitidas al laboratorio de inmediato, anexando toda la información referente a la finca (nombre,

ubicación, propietario, teléfono), población y número de animales enfermos, síntomas observados, identificación de los bovinos muestreados, señalando fecha de inicio de la enfermedad y tipo de muestras.

En caso de abortos, trozos de hígado, bazo, riñón y pulmón son de gran utilidad para el diagnóstico, así como de placenta. Estos tejidos deben ser recolectados en bolsitas plásticas o frascos herméticamente cerrados, lo más estérilmente posible y enviados al laboratorio, tal como fue descrito para las secreciones.

b) Pruebas indirectas, las cuales tienen como fundamento la detección de anticuerpos específicos contra el VHB - 1, usualmente mediante la Seroneutralización (SN), prueba de referencia internacional, o el ELISA, ambas de alta sensibilidad y especificidad, por lo que son las más utilizadas en los laboratorios de diagnóstico.

Estas pruebas pueden ser utilizadas con tres objetivos diferentes: 1) Cuando se quiere determinar si el VHB-1 está circulando en un rebaño. Para ello, es necesario recolectar una muestra de sangre (sin anticoagulante) de un número representativo de mautas (es) que no hayan sido vacunados contra este virus (**Prueba puntual**), es decir, entre 7 y 12 meses de edad, para determinar la presencia de anticuerpos específicos. La detección de ellos será confirmativa de infección natural por VHB-1, en razón de que los anticuerpos calostrales desaparecen a los seis meses de edad. 2) Como herramienta para el diagnóstico confirmativo de IBR en animales con signos clínicos compatibles con esta enfermedad. Con este objetivo hay que procesar muestras pareadas de suero, es decir, una recolectada preferiblemente durante los primeros tres días de haber enfermado el animal y otra con tres o cuatro semanas de intervalo. La ocurrencia de seroconversión, en otras palabras, la detección de anticuerpos en la segunda muestra de un animal que resultó negativo a la primera, o el incremento en cuatro veces de los niveles de anticuerpos en la segunda muestra con relación a la primera, constituirá un diagnóstico inequívoco de que el VHB-1 es responsable de la enfermedad en curso. Igualmente, podría ser de utilidad la detección de seroconversión para diagnóstico de aborto por VHB-1, analizando muestras de suero recolectadas al momento del aborto y cuatro semanas después. 3) Cuando se desea averiguar cuan difundido está el VHB-1 en una población bovina no vacunada, para lo cual se determina la proporción de bovinos seropositivos de una muestra aleatoria y representativa de dicha población, usualmente, alrededor del 10%.

Prevención y control

Cuando nos referimos a la prevención y control de IBR, debemos tener presente que la ocurrencia de infección por el VHB-1 no necesariamente está asociada con enfermedad y pérdidas económicas de consideración, aunque podría ser así. De igual forma, no existe un patrón de conducta igual para todos los rebaños, en caso de tener que combatirla, sino que depende fundamentalmente de la naturaleza epidémica de la misma.

En fincas con rebaños libres de IBR.

Una vez confirmado, mediante encuesta serológica, que un rebaño se encuentra libre del VHB-1, es necesario extremar las medidas para evitar la introducción del virus en el mismo, o sea: 1) Comprar e introducir animales al rebaño con certificación de seronegativos a IBR, expedida por un laboratorio de prestigio, ya que la incorporación de animales con infección latente es la forma más común de introducir el virus en un rebaño. 2) Poner en cuarentena los animales que hayan participado en ferias o exposiciones, además

de someterlos a las pruebas indirectas de laboratorio. 3) Por último, utilizar semen con certificación libre de IBR.

En fincas con rebaños infectados con VHB-1

a) Rebaños no vacunados con una pequeña proporción de seropositivos.

Analizar la posibilidad de eliminar todos los animales seropositivos y reemplazarlos por animales libres de VHB - 1, y realizar una **Prueba puntual**, una o dos veces al año, para confirmar la condición de libre de virus, tal como fue descrito en las pruebas indirectas para diagnóstico.

b) Rebaños vacunados o no, con proporción considerable de seropositivos, pérdidas significativas y con condiciones para manejar dos rebaños separados.

Bajo estas condiciones, estudiar la posibilidad de separar el rebaño en dos grupos, animales seropositivos y seronegativos, los cuales deben ser manejados en áreas completamente separadas e implementar la eliminación gradual de los seropositivos. Para esto, los becerros que nazcan en este rebaño seropositivo deben ser levantados, desde los tres días de edad, después de la ingestión de calostro, en instalaciones aisladas, haciéndoles monitoreos serológicos periódicos hasta que desaparezcan los anticuerpos calostrales (máximo seis meses), lo cual es indicativo de libres del VHB-1 y de estar en condiciones de ingresar al rebaño seronegativo. Por el contrario, la persistencia de niveles de anticuerpos será indicativo de infección, por lo cual deberán ser eliminados de la finca. En forma adicional, es necesario realizar pruebas puntuales del grupo seronegativo, con cierta periodicidad, para confirmar la ausencia de animales infectados.

c) Rebaños vacunados o no, con proporción considerable de seropositivos, pérdidas significativas y sin condiciones para manejar dos rebaños separados.

En estos casos, el procedimiento más usado para la prevención y control de la IBR es mediante la aplicación de vacunas anualmente, que si bien es cierto no son suficientemente eficientes, contribuyen a reducir las pérdidas económicas ocasionadas por este virus. En la actualidad, existen vacunas comerciales inactivadas y a virus vivo modificado, usualmente en combinación con otros virus. Estas vacunas son bastante costosas, por lo que se recomienda hacer un estudio de costo – beneficio, una vez implementadas, en relación con su efecto sobre los parámetros productivos y reproductivos, para verificar su utilidad y justificación.

DIARREA VIRAL BOVINA

Historia

La diarrea viral bovina (DVB) fue descrita por primera vez como una enfermedad aguda, epizootica, caracterizada por gastroenteritis aguda, lesiones erosivas del tracto digestivo y mortalidad alrededor de 4 – 8 % [50]. Su agente etiológico ha sido denominado como el virus de la diarrea viral bovina (VDVB). Ramsey y Chivers [56] reportaron una enfermedad con síntomas similares a los de la DVB, pero con una morbilidad entre 5 - 20 % y una mortalidad superior al 90 %, a la cual denominaron Enfermedad Mucosal (EM). Investigaciones posteriores permitieron conocer que tanto la DVB como la EM son diferentes manifestaciones ocasionadas por el VDVB [21]. Más recientemente, se conoció que la EM sólo ocurre en bovinos persistentemente infectados (PI) con este virus [9], y que

la condición de PI resulta de la infección de los fetos con el VDVB, antes de que éstos adquieran la capacidad de responder inmunológicamente contra el virus [37].

Prevalencia y distribución geográfica

Las infecciones por VDVB tienen una amplia distribución en el mundo, aunque el grado de difusión varía entre regiones y países. La prevalencia de bovinos seropositivos varía entre 50 y 90 % [2, 5]. Los resultados de una encuesta serológica realizada en 8 fincas dedicadas a la cría de **ganado Carora**, 4 con y 4 sin programas de vacunación contra DVB, la mayoría ubicadas en el municipio Torres, resultó en una seropositividad de 93% y 31%, respectivamente. De igual forma, 2 de las 4 que no vacunan resultaron estar libres del VDVB, a pesar de que en una de ellas se encontraron animales con anticuerpos contra el virus. Además, los parámetros productivos y reproductivos en ellas estaban mucho mejores en comparación con las fincas infectadas. En general, los títulos de anticuerpos generados por los bovinos, una vez que han sido infectados naturalmente, disminuyen lentamente y por lo general permanecen durante toda la vida del animal.

Etiología

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es el prototipo representativo del género pestivirus y pertenece a la familia Flaviviridae [72]. Es un virus con envoltura que mide entre 40 y 50 nm y su genoma (12,5 Kb) está compuesto por una sola cadena de ARN de polaridad positiva [18]. Horzinek [25] describe la existencia de dos biotipos de VDVB, basado en el efecto de ellas sobre los cultivos celulares: citopatogénico (CP) y no citopatogénico (NCP), y existe una correlación entre la citopatogenicidad de la cepa de VDVB y la aparición de la proteína no estructural NS3 (p 80). Es aceptado que el 90 % de las infecciones por VDVB en los bovinos se deben a cepas NCP, por lo que este biotipo es considerado como la cepa estándar.

Más recientemente, con el avance de la biología molecular, las cepas de VDVB se dividen en dos genotipos, VDVB I y VDVB II, basado en el análisis filogenético de la región más conservada del genoma [53, 59]. En forma adicional, existe también una amplia diversidad antigénica entre virus de DVD, en epítopes asociados con neutralización, aunque los títulos de anticuerpos heterólogos no son suficientemente divergente para alcanzar la clasificación de serotipos [25].

Cultivo in vitro

El VDVB, al igual que el VHB-1 se multiplica en una amplia variedad de cultivos primarios de fetos bovino, tales como riñón, cornete nasal, piel, testículos y pulmón, así como en líneas celulares estables como la Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), por lo que pueden ser utilizados con fines de diagnóstico. Sin embargo, por ser el VDVB - NCP un contaminante frecuente del suero fetal bovino, comúnmente utilizado como suplemento del medio de crecimiento para los cultivos celulares, el diagnóstico por aislamiento pudiera verse interferido [34].

Epizootiología

El virus de la DVB, aunque más comúnmente infecta los bovinos, especie para la cual representa uno de los patógenos más importantes [27], también puede ser encontrado

en ovejas, cabras y rumiantes salvajes, por lo que estas últimas especies pudieran actuar como reservorios del virus.

La infección transplacentaria de los fetos con VDVB, en vacas preñadas, es un fenómeno muy común [61], resultando en animales inmunotolerantes y persistentemente infectados (PI) con el virus, cuando la infección del feto ocurre en etapa temprana de la gestación. Estos PI son la fuente más importante de transmisión del virus a los bovinos susceptibles [4]. Como consecuencia de la infección fetal, el VDVB es un contaminante frecuente del suero fetal bovino, componente esencial para la elaboración de cultivos celulares destinados, entre otras cosas, a la elaboración de biológicos, por lo que éstos han jugado un papel en la difusión de la enfermedad [34]. Por otro lado, la inhalación e ingestión de saliva, secreciones nasales, orina y heces contaminadas con VDVB, constituyen las rutas más frecuentes de infección [19], así como, el semen, secreciones uterinas, líquido amniótico o placenta contaminada [66].

Síntomas clínicos

Las infecciones con VDVB pueden resultar en diversas formas de manifestación que van desde las infecciones subclínicas hasta lo que se conoce como enfermedad mucosal (EM), dependiendo de factores del huésped, cepa viral y condición ambiental. Con relación al huésped, dependerá de su estado inmunitario, condición de preñez, edad del feto, estrés ambiental y si el animal es inmunocompetente o inmunotolerante al VDVB. En relación al virus, recordemos que hay diferencias antigénicas y de virulencia entre cepas de VDVB [53].

Infección primaria. Este término se refiere a la primera vez en que un bovino inmunocompetente contra el VDVB, es decir, que su sistema inmunológico tiene capacidad de responder generando anticuerpos y activando la inmunidad celular, experimenta una infección natural con este virus. Por lo general, estos animales no presentan anticuerpos contra el VDVB, al menos que persistan en él anticuerpos adquiridos por el calostro. Usualmente, estas infecciones pasan desapercibidas en un 70 a 90 % [3], los animales experimentan fiebre moderada, disminución en el número de glóbulos blancos y desarrollan anticuerpos específicos, los cuales son detectados tres o cuatro semanas después de la infección y probablemente persisten por muchos años [19].

En un menor porcentaje, 10 a 30 %, los animales infectados pueden mostrar depresión, inapetencia, descarga ocular y nasal, lesiones ulcerativas y erosivas en boca, diarrea laminitis y disminución en la producción de leche en vacas lactando [54]. La viremia ocurre por 4 o 5 días, puede persistir hasta por 15 días y resultar en inmunosupresión [6, 55], ocasionando un incremento de la susceptibilidad del animal infectado a otros patógenos respiratorios y entéricos [73]. En consecuencia, es común observar en fincas infectadas una elevada mortalidad de becerros, con enfermedades del tracto respiratorio, diarreas, lesiones erosivas en boca y lesiones hemorrágicas en la base de los dientes. La infección en fetos, al final de la gestación, y de becerros, inmediatamente después del parto, puede ocasionar severas enteritis usualmente fatales [3].

Infección venérea. Muchos toros persistentemente infectados (PI) son estériles o producen semen de mala calidad, mientras en otros la calidad seminal es aceptable [33], pero en cualquier caso el semen contiene altos títulos de VDVB [32]. El servicio de vacas susceptibles con semen de toros PI, por inseminación, o por monta natural, resulta en infección transitoria, caracterizada por bajo porcentaje de preñez y elevado número de

servicios por concepción, hasta que el animal haya desarrollado su respuesta inmune al virus [58, 33].

Infeción transplacentaria. Uno de las características importantes del VDVB es su habilidad para alcanzar el feto una vez que ocurre la infección en vacas preñadas susceptibles [37, 19]. Cuando las infecciones ocurren entre el inicio de la etapa embrionaria y la mitad del período fetal, pueden resultar en incremento de la mortalidad embrionaria, momificación fetal, abortos, parto prematuro, natimortos, malformaciones congénitas y nacimiento de becerros con problemas neurológicos (ataxia cerebelar), débiles y de poca talla. Además, reviste particular atención el nacimiento de becerros inmunotolerantes a la cepa infectante y PI, los cuales, por lo general, no tienen anticuerpos o tienen sólo bajos niveles de ellos contra la cepa viral involucrada y excretan virus permanentemente [11]. Estos animales al ingerir calostro pueden absorber anticuerpos y resultar seropositivos en una prueba serológica, pero sus niveles de anticuerpos desaparecen más rápido que en los becerros inmunocompetentes. La prevalencia de bovinos PI en Inglaterra, Dinamarca, Suecia y Estado Unidos varía entre 0,4 % y 1,7 % [2, 28, 26], no existiendo en Venezuela estadísticas al respecto.

Enfermedad mucosal. Con este nombre se describe la forma fatal de DVB que se observa exclusivamente en animales inmunotolerantes y PI, usualmente entre 6 meses y 2 años de edad [19], y que se caracteriza, al inicio, por decaimiento, inapetencia, fiebre y diarrea acuosa, en la cual a menudo se puede observar moco y sangre. Se puede observar frecuentemente la mucosa sangrante alrededor del cuello de los dientes y erosiones de la mucosa oral y nasal, lengua e incluso en el paladar duro. Laminitis y resistencia para moverse han sido reportadas, como consecuencia de lesiones erosivas y necrosis de piel en el espacio interdental [10]. Esta forma de enfermedad puede cursar aguda o crónica, pero siempre es fatal [15].

Observaciones

Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo de la DVB en un rebaño puede ser sospechado con base a la observación de animales con los síntomas clínicos descritos anteriormente. Sin embargo, es necesario que se realice un diagnóstico definitivo, para lo cual deben realizarse exámenes de laboratorio a los animales enfermos. En general, las recomendaciones dadas para el diagnóstico de IBR son aplicables para esta enfermedad, aunque con algunas diferencias.

En general existen dos tipos de pruebas: *a) Pruebas directas*, entre éstas las señaladas para IBR son de utilidad para el diagnóstico de DVB y el fundamento es el mismo. Sin embargo, las muestras ideales a recolectar de animales enfermos, preferiblemente durante los primeros tres días de ser observados los síntomas clínicos, son sangre con y sin anticoagulante. Las primeras, tienen como objetivo utilizar los glóbulos blancos para aislamiento viral, detección de antígeno o de genoma viral, en razón a que el VDVB tiene una fuerte afinidad por ellos. Las muestras de sangre, sin anticoagulante, son destinadas a la obtención de sueros, los cuales son de utilidad tanto para aislamiento viral como para diagnóstico por seroconversión. Estas muestras deben ser conservadas en una cava con hielo y remitidas al laboratorio lo antes posible, con toda la información que fue señalada para la enfermedad anterior.

En caso de abortos, trozos de hígado, bazo, riñón y pulmón de los fetos abortados, así como de placenta, deben ser recolectados en bolsitas plásticas o frascos estériles, herméticamente cerrados, y remitidas al laboratorio de inmediato.

b) Pruebas indirectas, tienen como fundamento la detección de anticuerpos específicos contra el VDVB, siendo la Seroneutralización (SN) y la prueba de ELISA las más utilizadas en los laboratorios de diagnóstico.

Estas pruebas igualmente tienen tres aplicaciones: 1) Cuando se desea conocer si el VDVB esta circulando en un rebaño. Para ello, es necesario recolectar una muestra de sangre (sin anticoagulante) de un número representativo de mautas (es) que no hayan sido vacunados contra este virus (**Prueba puntual**), es decir entre 7 y 12 meses de edad, y determinar la presencia de anticuerpos específicos contra el virus. La seropositividad será indicativa de infección natural por VDVB, en razón a que los anticuerpos calostrales desaparecen a los seis meses de edad. 2) Como diagnóstico confirmativo de DVB en animales con signos clínicos compatibles con esta enfermedad. Para ello, se deben recolectar dos muestras pareadas de suero, una durante los primeros tres días de haber enfermado el animal y otra tres o cuatro semanas después, y determinar la presencia y niveles de anticuerpos en cada una de ellas. La ocurrencia de seroconversión, es decir, la detección de anticuerpos en la segunda muestra de un animal que resultó negativo a la primera, o el incremento en cuatro veces de los niveles de anticuerpos en la segunda muestra con relación a la primera, serán indicativos de que los signos clínicos observados obedecen a una infección con el VDVB. De igual forma sería útil, para realizar un diagnóstico de aborto por este virus, recolectar sangre sin anticoagulante, al momento del aborto y cuatro semanas después, para estudios de seroconversión. 3) Cuando se desea averiguar cuan difundido esta el VDVB en una población bovina no vacunada, para lo cual se determina la proporción de bovinos seropositivos de una muestra aleatoria y representativa de dicha población, usualmente alrededor del 10%.

Prevención y control

Desde los primeros reportes de la DVB en el mundo, la vacunación ha sido la herramienta utilizada para tratar de combatir las infecciones por este virus. La principal limitante que han encontrado los laboratorios fabricantes de inmunobilógicos, para obtener una vacuna efectiva en el control de las infecciones con VDVB, ha sido la variabilidad entre sus cepas. Desde que las primeras vacunas comerciales estuvieron disponibles, a mediados de los sesenta, su aplicación ha sido en forma estratégica, de modo que, inicialmente, se utilizó con la finalidad de reducir la severidad de los signos clínicos y las pérdidas económicas ocasionadas por cuadros severos de diarrea. Con el transcurso de los años, las infecciones post-natales se tornaron de curso moderado, y con el conocimiento del papel que juegan los animales PI, en la epidemiología de la enfermedad, el objetivo fundamental de las vacunaciones se enfocó, a mediados de los años ochenta, a prevenir la infección de los fetos, y por ende, la generación de nuevos animales PI.

Estudios realizados en explotaciones ganaderas con vacunaciones sistemáticas por 7 años, contra el VDVB (vacuna inactivada elaborada con cepa de VDVB - CP), indicaron que la mayoría de los animales se habían infectados con una cepa antigénicamente distinta a la vacunal, e incluso detectaron animales PI [7]. Desde hace cierto tiempo, las vacunas convencionales se elaboran con los biotipos CP y NCP, en la búsqueda de una mayor efectividad, pero sin mejoras significativas, debido en parte, a la corta duración de la

inmunidad conferida por las vacunas inactivadas contra el VDVB, usualmente no mayor de cuatro meses.

Recientemente, producto de la división de las cepas del VDVB en dos genotipos [59], y del conocimiento de que el **genotipo I**, comprende la mayoría de las cepas caracterizadas hasta el presente, mientras que el **genotipo II** incluye cepas más virulentas, relacionadas con los síndromes hemorrágicos detectados en América del Norte y Canadá [59], surgió de nuevo el interés de proteger a los bovinos de las infecciones post-natales. Así, nuevamente, en la búsqueda de una vacuna más eficaz, la mayoría de los laboratorios productores incluyen ambos genotipos en la elaboración de vacunas contra este virus.

Sin embargo, independientemente de los biotipos y genotipos de VDVB, la amplia variación antigénica entre las diferentes cepas de VDVB [25], limita que un grupo de cepas pueda brindar protección post-vacunal adecuada contra otro grupo.

Las vacunas a virus vivo modificado contra el VDVB, desde el inicio de su comercialización, han estado asociadas con efectos indeseables. Los virus vacunales pueden atravesar la placenta en cualquier etapa de la gestación y ocasionar en el feto signos clínicos más o menos severos [51, 35]. Su efecto inmunosupresor es otro de los factores que preocupan [68]. Más recientemente, se ha comprobado que las cepas de las vacunas contra la DVB, a virus vivo modificado, alcanzan los ovarios después de la vacunación, al igual que ha sido evidenciado con cepas de campo después de infecciones agudas, ocasionando ooforitis crónica, disfunción ovárica y reducción de la fertilidad [23, 22]. Hoy en día, es difícil conocer si las cepas modificadas vacunales están realmente atenuadas, debido a que no han sido reportados estudios adecuados donde se compare la virulencia de las cepas madres con las incorporadas en las vacunas, como tampoco se ha clarificado las bases moleculares de esa atenuación [70].

Tomando en consideración lo antes señalado, las vacunas inactivadas contra el VDVB son de elección en el control de esta enfermedad y deben utilizarse, en forma estratégica en rebaños infectados, a saber: 1) Si la problemática observada es la mortalidad elevada de becerros, sería recomendable vacunar las vacas a final de la gestación, para mejorar la inmunidad conferida por el calostro. 2) Las novillas deberían ser vacunadas y revacunadas un mes antes de ser sometidas a servicio, lo que contribuiría a mejorar su comportamiento reproductivo y a disminuir el riesgo de que nazcan nuevos animales PI. 3) Las vacas paridas deberían revacunarse cuando estén próximas a un nuevo servicio, siguiendo el criterio señalado para las novillas.

Producto de las limitantes que tiene el uso de vacunas para el control efectivo de la DVB, se han desarrollado programas sistemáticos para la erradicación del VDVB, sin vacunación. Estos programas se fundamentan en: 1) La identificación y separación de los rebaños infectados y de los no infectados 2) El monitoreo y certificación de los rebaños no infectados y 3) La eliminación del VDVB de los rebaños infectados, lo cual se basa en la identificación y remoción de los bovinos PI. Estos programas se han venido implementando en los países escandinavos, así, Suecia y Noruega comenzaron sus esfuerzos de erradicación en 1993, seguidos por Finlandia y Dinamarca en 1994 [29, 49, 2, 71]. En algunos países, el virus ha sido completamente erradicado [67], y en general los resultados han sido bastante exitosos, lo que ha servido de ejemplo para que otros países de Europa, como: Austria, Alemania, Italia y Holanda, hayan implementado programas de control / erradicación.

Finalmente, con base en las experiencias antes señaladas y tomando en consideración los mecanismos de difusión del VDVB, la erradicación de este virus podría

ser una alternativa factible para algunas fincas, con rebaños infectados y pérdidas de consideración, con la expectativa de que los beneficios posteriores compensarán los costos de su implementación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- [1] Ackermann, M., Wyjler, R. 1984. The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 sacra ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet. Microbiol.* 9: 53 – 63.
- [2] Alenius, S., Jacobsson, S. O. and Cafaro, E. 1986. Frequency of bovine viral diarrhoea virus infections in Sweden among heifers selected for artificial insemination. In: *Proceeding of 14th World Congress on Diseases of Cattle*. Hartigan, P. J. and Monaghan, M. L. (eds.). World Association for Buiatrics. August 26 – 29. pp 204 – 207.
- [3] Ames, T. R. 1986. The causative agent of BVD: Its epidemiology and pathogenesis. *Vet. Med.* 81: 848 – 869.
- [4] Barber, D. M. L., Nettleton, P. F. and Herring, J. A. 1985. Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 117: 459 – 464.
- [5] Bitsch V., House H., Ronsholt L., Farso M. J., Valbak J., Toug N. H and Eckhardt, C.H. 1994. Towards control and eradication of BVD, (in Danish). *Dansk Vet. Tidsskrift.* 77: 445-450.
- [6] Bolin, S. R., McClurkin, A. W. and Coria, M. F. 1985. Effects of bovine viral diarrhoea virus on the percentages and absolute numbers of circulating B and T lymphocytes in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 46: 884 – 886.
- [7] Bolin, S. R., Littledike, E. T. and Ridpath, J. F. 1991. Serologic detection and practical consequences of antigenic diversity among bovine viral diarrhoea virus in vaccinated herd. *Am J Vet Res.* 52: 1033-1037.
- [8] Bowen, R.A., Elsdon, R.P., Seidel, G.E. 1985. Infection of early bovine embryos with bovine herpesvirus – 1. *Am. J. Vet. Res.* 46 (5): 1095 – 1097.
- [9] Brownlie, J., Clarke, M. C. and Howard, C.J. 1984. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet. Rec.* 7: 195 – 202.
- [10] Brownlie, J. 1985. Clinical aspects of the bovine virus diarrhoea/mucosal disease complex in cattle. In: *Pract.* 7: 195-202.
- [11] Brownlie, J., Clarke, M. C., Howard, D. J. and Pocock, D. H. 1987. Pathogenesis and epidemiology of bovine viral diarrhoea virus infection of cattle. *Annls Rech vét.* 18: 157-166

- [12] Callis, J. J., Dardiri, A. H., Ferris, D. G., Gay, J., Wilder, F. W. and Masson, J. 1982. Manual ilustrado para el reconocimiento y diagnóstico de ciertas enfermedades de los animales. Comisión México Americana para la prevención de la fiebre Aftosa. pp 13-38.
- [13] Carbrey, E. A., Brown, L. N., Chow, T. L., Kahrs, R. F., Mc.Kercher, D.G., Smithies, L. K. and Tamoglia, T.W. 1971. Recommended standard laboratory techniques for diagnosing infectious bovine rhinotracheitis, bovine virus diarrhea and shipping fever (Parainfluenza-3). Proc. Annu. Meet. U.S. Anim. Health Assoc.75: 629-648.
- [14] Crandell, R.A. 1981. In current Veterinary therapy: Food Animal Practice. W. B. Saunders Company, London pp 543-546.
- [15] David, G. P., Grawhaw, T. R., Gunning, R. F., Hibberd, R.C., Lloyd, G. M. and Marsh, P. R. 1994. Severe disease in adult dairy cattle in three UK dairy herds associated with DBV virus infection. Vet. Rec. 134: 468 – 472.
- [16] Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H. and Ginsberg, H. 1978. Virología en: Tratado de Microbiología (2da ed.) p.p. 430-450.
- [17] de Wit, J. J., Hage, J. J., Brinkhof, J. and Westenbrik, F.A. 1998. A comparative study of serological test for use in the bovine herpesvirus 1 eradication programme in the Netherlands. Vet. Microbiol. 61: 153 – 163.
- [18] Deng, R. And Brock, K. V. 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhea virus strain SD-1. Virology. 191: 867 – 879.
- [19] Duffel, S. J. and Harkness, J. W. 1985. Bovine virus diarrhea - mucosal disease infection in cattle. Vet. Rec. 117: 240-245.
- [20] Gillespie, J. H., Lee, M. and Baker, J. B. 1957. Infectious bovine rhinotracheitis. Am. J. Vet. Res. 18: 530-535.
- [21] Gillespie, J. H., Coggins, L., Thompson, J. And Baker, J. A. 1961. Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhea and mucosal disease. Cornell Vet. 51: 155 – 159.
- [22] Grooms, D. L., Brock, K. V. and Ward, L. A. 1998. Detection of bovine viral diarrhea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhea virus. J Vet Diagn. Invest. 10: 125-129.

- [23] Grooms, D. L., Brock, K.V. and Ward, L. A. 1998. Detection of cytopathic bovine viral diarrhoea virus in the ovaries of cattle following immunization with a modified live bovine viral diarrhoea virus vaccine. *J Vet Diagn Invest*; 10: 130-134.
- [24] Hage, J. J., Schukken, Y. H., Dijkstrat, T., Barkena, H. W., van Valkengoed, P. H., Wentink., G. H. 1998. Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on dairy farm. *Prev. Vet. Med.* 34: 97-106. 1998.
- [25] Horzinek, M. C. 1981. Non-arthropod-borne Togavirus. Academic Press, London; p.p. 1-200.
- [26] Houe, H. and Meyling, A. 1991. Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Prev. vet. Med.* 11 (3):9 – 16.
- [27] Houe, H. 1995. Epidemiology of bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Clin. North. Am: Food Animal Practice.* 11 (3): 521 – 547.
- [28] Howard, C. J., Brownlie, J. and Thomas, L. H. 1986. Prevalence of bovine virus diarrhoea virus viraemia in cattle in UK. *Vet. Rec.* 119: 628 – 629.
- [29] Husu, J. and Kulkas, L. 1993. The control programme against contagious leukosis and BVDV (in Finnish). *Suom Elainlaakaril.* 99: 482-483.
- [30] Kahrs, R. F. 1981. Infectious bovine rhinotracheitis. In *Viral Diseases of Cattle.* The Iowa State University Press, Ames, Iowa, p.p. 135-156.
- [31] Kendrick, J., Gillespie, J. and McEntee, K. 1958. Infectious Pustular Vulvovaginitis of Cattle. *The Cornell Veterinarian* 48 (4): 459-495.
- [32] Kirkland, P. D., Richards, S. G., Rothwell, J. T. and Stanley, D. F. 1991. Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. *Vet. Rec.* 128: 587 – 590.
- [33] Kirkland, P. D., Mackintosh, S. H. and Moyle, A. 1994. The outcome of widespread use of semen from bull persistently infected with pestivirus. *Vet. Rec.* 135: 527 – 529.
- [34] Levings, R. L. and Wessman, S. J. 1991. Bovine viral diarrhoea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines. *Dev. Biol. Stand* 75: 177 – 181.

- [35] Liess, B., Orban, S., Frey, H., Trautwein, G., Wiefel, W. and Blindow, H. 1984. Studies on transplacental transmissibility of bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus in cattle. *Zbl Vet Med B.* 31: 669-681.
- [36] Ludwig, H. y Gregersen, J. P. 1986. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina: Vulvovaginitis Pustular Infecciosa: infecciones provocadas por VHB-1. *Rev. Sci. Tech. off int. Epiz.* 5 (4): 887-895.
- [37] McClurkin, A. W., Littledike, E. T., Cutlip, R. C., Frank, G. H., Coria, M. F. And Bolin, S. R. 1984. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. *Can. J. Comp. Med.* 48: 156 – 161.
- [38] Madin, S.H., York, C. J. and McKercher, D. G. 1956. Isolation of the IBR Virus *Science* 124: 721-722.
- [39] Mainsonnave, J. 2000. Características del Herpes virus Bovino en: Asociación Uruguaya de M.V.; Especialistas en Bovino. IX Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. Punta del este. Uruguay. pp 2-4.
- [40] McKercher, D. G., Moulton, J. E., Madin, S. H. and Kendrick, J. W. 1957. Infectious Bovine Rhinotracheitis. A newly recognized virus disease of cattle. *Am. J. Vet. Res.* 18: 246-256.
- [41] McKercher, D. G. 1963. Studies of the etiologic agents of infectious bovine rhinotracheitis and Blaschenausschlag. (Coital Exantema Vesicular). *Am. J. Vet. Res.* 24: 508-510.
- [42] McKercher, D. G. and Fheilen, G. H. 1963. New manifestations of disease associated with the virus, which causes Blaschenausschlag. *Proc. XVII World Vet. Congress.* 1: 625-630.
- [43] McKercher, D. G. 1973. The viruses of other vertebrates in: *The Herpes Viruses.* Ed. A.S., Kaplan, pp 427-493. Academic Press, New York.
- [44] Miller, J. .M. and Van der Maaten, M. .J. 1986. Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: Effect on the bovine corpus luteum and conceptus. *Am. J. Vet. Res.* 47 (2): 223 – 228.
- [45] Miller, J. M., Whetstone, C. A., Van der Maaten, M. J. 1991. Abortifacient potential of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.* 52: 458 – 461.

- [46] Obando, C., Pedrique, C. e Hidalgo, M. Estudio serológico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Venezuela. *Revista Veterinaria Tropical*. 8: 5-20, 1983.
- [47] Obando, R. C., Vegas, R. y Marin, C. 1984. Reporte preliminar de la presencia del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Venezuela. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela*. 31 (1-4) : 85 – 90.
- [48] Obando, R. C., Blanco, N. Y., Pedrique, C. 1986. Primer aislamiento de virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Venezuela. *Revista Facultad de Veterinaria, UCV*. 33. (1- 4): 49 – 57.
- [49] Oirschot, J. T., Kaashoek, M. J. and Rijsewijk, F. A. M. 1996. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Vet Microbiol*. 53: 43-54.
- [50] Olafson, P., MacCallum, A. D., Fox, F. H. 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Vet*. 36: 205 – 213.
- [51] Orban, S., Liess, B., Hafez, S. M., Frey, H., Blindow, H. and Sasse-Patzer, B. 1983. Studies on transplacental transmissibility of a bovine virus diarrhoea (BVD) vaccine virus. *Zbl Vet Med B*. 30: 619-634.
- [52] Overall, J. C. 1984. *Dermatologic viral diseases in: Antiviral agents and viral diseases of man 2nd Ed.* Galasso, Merigan, Buchanan. pp 247-317. Raven Press, New York.
- [53] Pellerin, C., van der Hurk, J., Lecomte, J. and Tussen, P. 1994. Identification of a new group of bovine virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* : 203: 260-268.
- [54] Perdrizet, J. A., Rebhun, W. C., Dubovi, E. J. and Donis, R. O. 1987. Bovine virus diarrhoea: Clinical syndromes in dairy herds. *Cornell. Vet*. 77: 46 – 74.
- [55] Potgieter, L. N. D. 1988. Immunosuppression[25] in cattle as a result of bovine viral diarrhoea virus infection. *Agri. Pract*. 9: 7 – 14.
- [56] Ramsey, F. K. and Chivers, W. H. 1953. Mucosal disease of cattle. *North. Am. Vet*. 34: 629 – 633.
- [57] Reisinger, L. and Reimann, H. 1928. *Wien. Tierarztl. Monatsschr*. 15: 249-261.

- [58] Revel, S. G., Chasey, D., Drew, T. W. and Edwards, S. 1988. Some observations on the semen bulls persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 123: 122 – 125.
- [59] Ridpath, J. F., Bolin, S. R. and Dubovi, E. J. 1994. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* 205: 66-74.
- [60] Rocha, M. A., Barbosa, E. F., Guedes, R. M., Lage, A. P., Leity, R. C., Gouvea, A. M. 1999. Detection of BHV-1 in naturally infected bovine fetus by nested PCR assay. *Vet. Res. Commun.* 23: 133 - 141.
- [61] Roeder, P. L. and Harkness, J. W. 1986. DVB virus infection: Prospects for control. *Vet. Rec.* 118: 143 – 147.
- [62] Ros, C. Bélak, S. 1999. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *Journal of Clinical Microbiology.* 37 (5): 1 – 7.
- [63] Rychner, J. J. 1841. In: *Bujatrik oder systematisches Handbuch der ausserlichen und innerlichen Krankheiten des Rindviehs*, 2. Aufl. Chr. Fischer Verlag, Bern. pp. 514 – 517.
- [64] Schroeder, R. J. and Moys, D. 1954. An acute upper respiratory infection of dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 125: 473-473.
- [65] Stevens, J. G. 1980. Herpetic latency and reactivation in: *Oncogenic viruses*, Vol. II (Ed Rapp). c. r. c. Press, Boca Raton. pp. 1-11.
- [66] Stober, M. 1984. Current knowledge of the BDV syndrome of cattle: agent, immune response, course and spread, control. *Bovine Pract.* 19: 49 – 60.
- [67] Synge, B. A., Clark, A. M., Moar, J. A. E., Nicolson, J. T., Nettleton, P. F. and Herring, J. A. 1999. The control of bovine virus diarrhoea virus in Shetland. *Vet Microbiol.* 64: 221-227.
- [68] Thoen, C. O. and Waite, K. J. 1982. Experience with early vaccination of fattening calves against infectious bovine rhinotracheitis, bovine virus diarrhoea and parainfluenza type 3. *Proc XIIth Buiatrics Congress, Amsterdam.* pp 177-181.
- [69] Toussimis, A. J., Howelis, W. V., Griffin, T. P., Porter, R. P., Cheatham, W. J. and Maurer, F. D. 1958. Biophysical characterization of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 99: 614-617.

- [70] Van Oirschot, J. T., Brusckhe, C. J. Mand van Rijn, P. A. 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea. *Vet Microbiol.* 64: 169-183.
- [71] Waage, S., Krogsrud, J. and Nyberg, O. 1994. The Norwegian programme for eradication of bovine viral diarrhoea/mucosal disease, In: Proc 18th World Buiatrics Congress: 26th Congress of the Italian Association of Buiatrics, Bologna, Italy, 29 August-2 September. pp 773-776.
- [72] Wengler, G., Bradley, D. W., Collet, M. S., Heinz, F. X., Schlesinger, R. W. and Strauss, J. H. 1995. In: *Virus taxonomy. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses.* Arch of Virol. 45: 165-170.
- [73] Wray, C. and Roeder, P. L. 1987. Effect of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus infection on salmonella infection in calves. *Res. Vet. Sci.* 42: 213 – 218.
- [74] Wyler, R., Engels, M., Schwyzer, M. 1989. Infectious bovine rhinotracheitis / vulvovaginitis (BHV-1). In: Wittmann, G. (Ed). *Development in Veterinary Virology. Herpesvirus diseases of cattle horse and pigs.* Kluwer Academic. Publisher, London. pp. 1-57.
- [75] York, G.J., Schwarz, J. F. and Estela, L. A. 1957. Isolation and identification of infectious bovine rhinotracheitis virus in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94: 740-744.

