

Evaluación serológica pareada por virusneutralización para IBR y BVD de bovinos de la provincia de Buenos Aires, Argentina, en el período 2000 - 2008.

Alvarado Pinedo, M. F.¹; Travería, G. E.¹; Di Paolo, A. L.¹; Romero, J. R.¹; Valera, A.²

1. Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE). FCV. UNLP. Alvear y Salta (7139), Chascomús, Buenos Aires. Argentina. * Correo electrónico: cedive@cedivechascomus.com.ar
2. Cátedra de Virología. FCV. UNLP. Buenos Aires. Argentina.

"No existe conflicto de intereses".

Palabras clave

Serología IBR BVD, seroconversión, muestras pareadas, anticuerpos virus neutralizantes.

Keywords

Serology IBR BVD, seroconversion, paired samples, virus-neutralizing antibodies.

RESUMEN

Se presentan los resultados retrospectivos de 936 sueros muestreados en forma pareada analizados con la prueba de virusneutralización para Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) y Diarrea Viral Bovina (BVD) durante el período 2000 - 2008. En el 66% de los casos no se mencionó el motivo del muestreo, en el 22% de las muestras se mencionó vacas abortadas como causa de envío, un 9% se debió a casos de otra signología asociada a estas enfermedades y un 3% a control de planes de vacunación. El 55% de los sueros pareados ingresaron con los dos muestreos juntos, mientras que el 45% restante ingresó por separado. Se comparó la presencia de seroconversión con la prueba de Chi2 en las muestras pareadas sospechosas (vacas abortadas y animales con otra signología relacionada a IBR o BVD), con los resultados de las muestras pareadas no sospechosas (controles de planes de vacunación y muestras sin indicación del motivo de envío), solo observándose diferencias significativas para BVD ($P = 0,0001$). En el caso de BVD además se comparó la presencia de seroconversión en vacas abortadas y en animales con otros signos compatibles con estas enfermedades y no se observaron diferencias significativas ($P = 0,1139$). Los títulos serológicos encontrados en las muestras con y sin seroconversión fueron variados, observándose los más elevados en el título neutralizante final para BVD. Estos hallazgos demuestran que la presencia de títulos para IBR y BVD es elevada y que el muestreo pareado, aunque no resulte una práctica frecuente, nos permite interpretar mejor la etiopatogenia de estas enfermedades y evaluar las medidas profilácticas aplicadas para su control.

SUMMARY

Serological paired evaluation using virusneutralization test for IBR and BVD of bovines from Buenos Aires, Argentina, in the period 2000 - 2008

We present retrospective results of 936 paired serum samples tested for infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and bovine viral diarrhea virus (BVDV); samples taken during the period 2000 to 2008 were analyzed by a virus neutralization test. In 66% of the cases there was no mention for the sampling purpose, in 22% of the samples, aborted cows were the cause for shipment, in 9% it was due to causes related to other clinical signs compatible with these diseases and in 3% to a vaccination control plan. In the 55% paired serum samples the acute and convalescent samplings were analysed together, while the remainder 45% acute and convalescent specimens were analysed at different times. The presence of seroconversion was compared with Chi2 test between suspicious paired samples (aborted cows and animals with other clinical signs resembling IBR or BVDV), with unsuspected paired samples (vaccination control plan and samples without indication of the motive for shipment), significant differences were only found for BVD ($P = 0.0001$). In the case of BVD the presence of seroconversion was also compared between aborted cows and animals without clinical manifestations compatible with IBR or BVD, no significant differences were observed ($P = 0,1139$). The antibody titers found were diverse between samples with and without seroconversion, the higher neutralizing antibodies were observed for BVD. These findings show a high frequency of antibodies in serum for IBR and BVDV, paired sera although not a frequent practice, allows us to explain the etiopathogeny and evaluation of the prophylactic measures used for the control of these diseases.

Introducción

Entre las enfermedades virales que afectan frecuentemente a los rumiantes se encuentran la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) y la Diarrea Viral Bovina (BVD). Ambas pueden ocasionar cuadros subclínicos y clínicos con inmunodepresión que predispone a otros patógenos^{17, 19, 31}, disturbios digestivos, respiratorios, nerviosos y trastornos reproductivos como muerte embrionaria, anomalías congénitas, aborto y muerte perinatal^{15, 27}. Ambos virus se transmiten por vía aerógena, genital y en forma vertical. Estas enfermedades

suelen cursar con baja mortalidad y alta morbilidad causando pérdidas económicas^{18, 34}. Estos virus causan efecto citopatogénico en líneas celulares, aunque BVD posee biotipos citopáticos y no citopáticos^{13, 14, 21, 26}. La infección por estos agentes produce en el huésped una respuesta inmune de tipo innata y adaptativa con predominio de la actividad de linfocitos T citotóxicos y de plasmocitos productores de anticuerpos neutralizantes específicos^{16, 19, 30, 31}. El diagnóstico de ambas enfermedades se basa en la detección directa de las partículas virales o de sus componentes, como en la demostración

indirecta de infección viral a partir del análisis serológico, siendo la técnica de virus neutralización de referencia para detectar y titular anticuerpos neutralizantes específicos. Esta prueba es altamente específica y se basa en la capacidad que presentan los anticuerpos para neutralizar la citopatogenicidad de estos virus en células in vitro^{10, 23}. Para interpretar la cinética de los anticuerpos neutralizantes se recomienda realizar dos muestreos de sangre con un intervalo de 20 a 30 días (muestreo pareado) para la búsqueda de seroconversión, que es la variación de por lo menos tres títulos neutralizantes entre

los resultados de dos muestreos^{29, 35}; la seroconversión puede ser positiva cuando se produce un aumento del valor de los títulos neutralizantes entre el primer y segundo muestreo, o puede tratarse de una seroconversión negativa cuando existe un descenso del valor de los títulos neutralizantes. De acuerdo al momento del muestreo, la presencia de seroconversión en una serología pareada nos indica respuesta inmune activa (inmediata para la positiva y mediata para la negativa)^{6, 29, 35} y presenta como principal propósito detectar infecciones agudas y/o abortos producidos por estos virus, siempre y cuando se haga una toma de muestra a conciencia y se incluyan animales vecinos, o en su defecto se tenga la serología previa de la población para evaluar movimiento poblacional de anticuerpos; solo la presencia de títulos altos revela la existencia de estímulo antigénico continuo, como en el caso de animales persistentemente infectados con el virus de BVD12. El diagnóstico de estas enfermedades se dificulta por los problemas en la interpretación de los resultados; al analizar los títulos serológicos debemos tomar en cuenta la edad de los animales, el momento del muestreo, la existencia previa de signos clínicos, así como también confirmar si hubo vacunaciones previas. Todas estas situaciones cambiantes desafían constantemente la interpretación de los resultados. El objetivo de este trabajo pretende mejorar la interpretación de los resultados serológicos de muestras pareadas obtenidos con la técnica de virusneutralización para IBR y BVD y comparar la presencia de seroconversión entre las

muestras sospechosas (vacas abortadas y con otra signología de estas enfermedades) y las no sospechosas (sin indicación de motivo de envío y control de planes de vacunación). Estas muestras fueron procesadas en el CE-DIVE durante el período 2000 – 2008. Este laboratorio se encuentra en Chascomús, recibe muestras de aproximadamente 250 médicos veterinarios y su casuística corresponde principalmente a la Zona Deprimida del Salado, área de más de 7 millones de ha. en la provincia de Buenos Aires.

Materiales y métodos

Muestras procesadas:

De un total de 6.889 muestras de suero bovino analizadas 936 fueron sueros muestreados en forma pareada, es decir 468 muestras pareadas. Una muestra pareada es aquella que está integrada por dos sueros de un mismo animal muestreados con un intervalo de 20 a 30 días. En este trabajo, cada vez que se utilice el término muestra pareada se debe interpretar que está integrada por dos sueros muestreados en el intervalo de tiempo mencionado. Las muestras pareadas ingresaron en forma "completa" cuando se recibieron los dos muestreos juntos, o en forma "incompleta" cuando se indicó en el momento de envío del material que en los 30 días posteriores se mandaría el segundo muestreo, en este caso los sueros son congelados durante 30 días a la espera de completar el muestreo siendo recién en ese momento analizadas. Con el fin de inactivar las proteínas del complemento las muestras se

incubaron a 56°C por 30 minutos previo a su procesamiento.

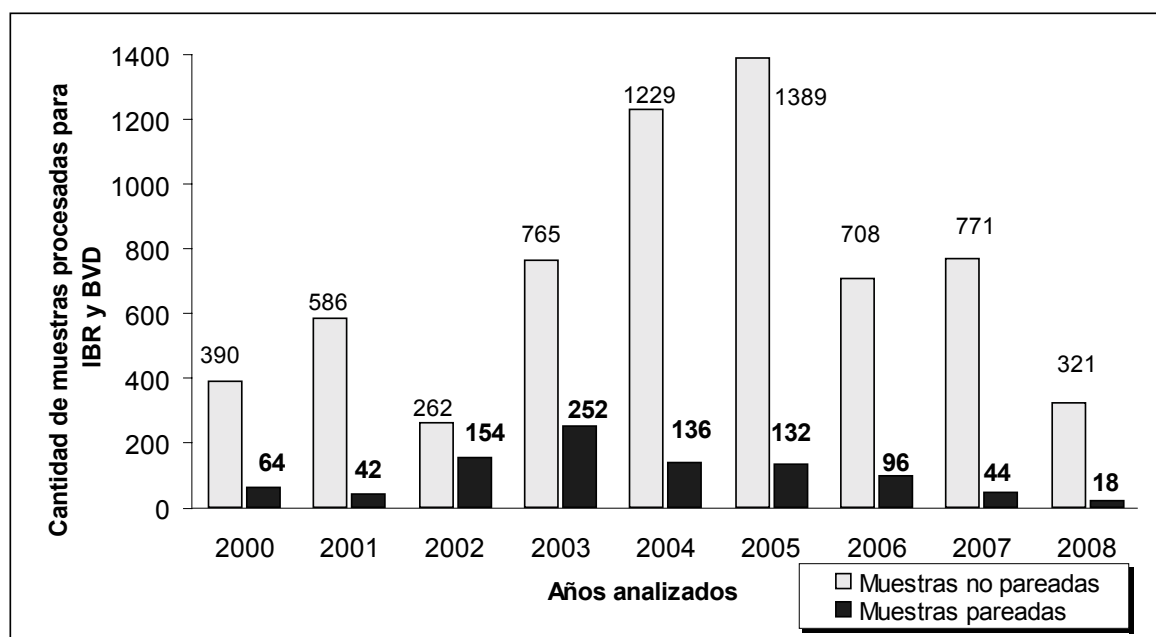
Evaluación de anticuerpos séricos:

Se utilizó la técnica de virusneutralización en microplaca mediante el método virus fijo-suero variable^{4, 9, 10, 23, 33}. Se realizó la dilución de las muestras en base dos, empezando con un título neutralizante de 1/2 hasta un título neutralizante final de 1/512 para IBR y de 1/2048 para BVD. La lectura final se realizó a las 72 hs. Se trabajó para ambos virus con una dosis infecciosa de 100 TCID₅₀, se usó la cepa Los Angeles (LA) de HVBo-1 (rango de variación: 30-300 TCID₅₀)²³ y la cepa Singer para BVD (rango de variación: 30-421 TCID₅₀)²⁴. Se utilizaron células de la línea Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), mantenidas en el medio esencial mínimo (MEM) con la adición de 10% de suero fetal bovino, e incubadas a 37°C con 5% de CO₂.

Análisis estadístico:

Se utilizó la prueba de Chi² para analizar la presencia de seroconversión en los diferentes grupos de muestras pareadas procesadas. Con este fin, los resultados se agruparon de acuerdo a la solicitud de ingreso en muestras pareadas sospechosas (vacas abortadas y animales con otra signología relacionada a IBR o BVD), y en muestras pareadas no sospechosas (controles de planes de vacunación y muestras sin indicación del motivo de envío). Se consideró que valores de P <0.05 indicaban diferencias significativas y en todos los casos se aplicó la corrección de YATES.

Figura 1.
Cantidad de muestras pareadas anuales procesadas para IBR y BVD durante el periodo 2000-2008.



Resultados

Muestras procesadas:

Los 936 sueros muestreados en forma pareada, representaron un 13,6% del total de las muestras analizadas en el área de virología en el período estudiado. El promedio anual fue de 104 muestras pareadas \pm DE 73,07, observándose en el año 2003 el pico de 252 muestras y en el año 2008 el menor número de muestras pareadas. La cantidad de este tipo de muestras procesadas por año durante este período se expone en la figura 1.

Ingresaron 266 muestras pareadas "completas" (55%), siendo 202 las muestras pareadas que ingresaron en forma "incompleta" (45%).

No se indicó el motivo de envío en el 66% de los casos (311 muestras pareadas), la indicación de diagnóstico en vacas abortadas fue del 22% (104 muestras pareadas), un 9% (40 muestras pareadas) correspondió a casos con otra signología clínica asociada a IBR o BVD, y en un 3% (13 muestras pareadas) a control de planes de vacunación de estas enfermedades.

Evaluación de anticuerpos séricos:

En el 15% de las muestras pareadas procesadas se observó seroconversión para alguna de estas enfermedades, mientras que en el 85% de las muestras pareadas no se obtuvo seroconversión. Para IBR se encontró seroconversión positiva en 13 muestras (2,7%) y seroconversión negativa en 15 muestras (3,3%), mientras que para BVD se observó seroconversión positiva y negativa en 20 muestras respectivamente (4,25% para cada uno). Al considerar la presencia de seroconversión en las muestras pareadas sospechosas (vacas aborta-

Tabla 1.
Presencia o ausencia de seroconversión en las muestras pareadas sospechosas y no sospechosas analizadas para IBR y BVD.

Presencia o ausencia de seroconversión en cada enfermedad viral analizada	Muestras pareadas sospechosas (vacas abortadas + con signos clínicos)	Muestras pareadas no sospechosas (sin indicación + planes de vacunación)	Total de muestras pareadas	Total de muestras	Porcentajes calculados sobre el total de muestras
IBR Con seroconversión	11	17	28	56	6%
IBR Sin seroconversión	133	307	440	880	94%
BVD Con seroconversión	24	16	40	80	8,5%
BVD Sin seroconversión	120	308	428	856	91,5%

Tabla 2.
Resultados observados en la prueba de virusneutralización para IBR y BVD en las muestras pareadas que no presentaron seroconversión en el total del muestreo.

Resultados IBR	Cantidad de muestras	Porcentajes (%)	Resultados BVD	Cantidad de muestras	Porcentajes (%)
Negativos	264	28	Negativos	11	1
1/2	83	9	1/2	32	3
1/4	96	10	1/4	56	6
1/8	65	7	1/8	67	7
1/16	49	5	1/16	32	3,5
1/32	71	8	1/32	112	12
1/64	98	10	1/64	57	6
1/128	119	13	1/128	223	24
1/256	23	2	1/256	17	2
1/512	12	1	1/512	29	3
1/1024	---	0	1/1024	73	8
1/2048	---	0	1/2048	147	16
Total de muestras que no presentaron seroconversión a IBR	880	94	Total de muestras que no presentaron seroconversión a BVD	856	91,5

¹ : El título neutralizante final para la prueba de virusneutralización de IBR se realizó hasta 1/512

Tabla 3.
Títulos neutralizantes observados para IBR y BVD en las muestras pareadas que presentaron seroconversión positiva y negativa.

Resultados para IBR de 56 muestras (6%) que presentaron seroconversión		
Títulos neutralizantes de seroconversión observados entre los dos muestreos	Cantidad de animales con esos títulos	Tipo de seroconversión: positiva (+) o negativa (-)
Negativo a 1/16	2	+
Negativo a 1/32	1	+
Negativo a 1/64	3	+
Negativo a 1/512	1	+
1/4 a 1/128	1	+
1/8 a 1/128	1	+
1/16 a 1/128	4	+
1/512 a 1/32	1	-
1/512 a 1/2	1	-
1/256 a 1/32	1	-
1/128 a 1/16	6	-
1/128 a 1/8	2	-
1/64 a 1/8	1	-
1/64 a 1/2	2	-
1/32 a 1/4	1	-
Resultados para BVD de 80 muestras (8,5%) que presentaron seroconversión		
Títulos neutralizantes de seroconversión observados entre los dos muestreos	Cantidad de animales con esos títulos	Tipo de seroconversión: positiva (+) o negativa (-)
1/4 a 1/32	1	+
1/4 a 1/128	1	+
1/8 a 1/64	1	+
1/8 a 1/128	4	+
1/16 a 1/128	8	+
1/16 a 1/256	1	+
1/32 a 1/512	4	+
1/4096 a 1/512	1	-
1/2048 a 1/256	1	-
1/1024 a 1/8	1	-
1/512 a 1/64	2	-
1/512 a 1/32	4	-
1/512 a 1/16	1	-
1/256 a 1/64	2	-
1/256 a 1/32	1	-
1/256 a 1/16	1	-
1/128 a 1/16	3	-
1/64 a 1/8	3	-
1/4096 a 1/512	1	-

das y animales con otra signología relacionada a IBR o BVD), y comparar con los resultados de las muestras pareadas no sospechosas (controles de planes de vacunación y muestras sin indicación del motivo de envío), se pudo observar diferencias significativas para BVD ($P = 0,0001$) encontrándose mayor número de seroconversión en el grupo de muestras pareadas sospechosas; mientras que para IBR no existió diferencias significativas ($P = 0,4261$). En el caso de BVD se comparó además la presencia de seroconversión en vacas abortadas y en animales con otros signos posibles de estas enfermedades y no se observó diferencias significativas

($P = 0,1139$). En la tabla 1 se muestra la presencia y ausencia de seroconversión obtenidas en cada enfermedad según los grupos de muestras pareadas sospechosas y no sospechosas.

Los títulos encontrados en los animales que presentaron seroconversión fueron variados, observándose los valores más elevados en el título neutralizante final para BVD. En los casos en donde no existió seroconversión los títulos también fueron diversos y en general se obtuvo valores altos para BVD. El resumen de estos resultados se muestran en la tabla 2 y los valores de los títulos neutralizantes observados en las muestras

pareadas en donde se pudo encontrar seroconversión se exponen en la tabla 3.

Discusión y conclusiones

Del total de muestras enviadas al laboratorio para realizar diagnóstico serológico de IBR y BVD un 13,6% ingresó como muestras pareadas. La cantidad de muestras pareadas ha mermado en los últimos años, demostrando que el uso de este tipo de muestreo está disminuyendo en la clínica de los rumiantes. El motivo principal de aplicar este muestreo fue la de diagnóstico en vaca

abortada (22%), esto seguramente se debió a que ambas enfermedades se relacionan con fallas reproductivas^{18, 20, 22, 25, 32, 38}, el 9% de los requerimientos de diagnóstico fueron casos con otra signología clínica compatible con estas enfermedades (rinitis, queratitis, neumonía, signos nerviosos, diarrea, entre otros), y un 3% ingresó como controles de planes de vacunación de estas enfermedades. En el 66% de los casos no se indicó el motivo de remisión de dichas muestras, esta carencia de datos siempre limitará la interpretación de los resultados.

Las muestras pareadas llegaron completas en un 55 % de los casos y separadas en un 45%, siendo frecuente el envío del segundo muestreo sin previo aviso al laboratorio o no se logra completar. Estas situaciones se deben a que los muestreos pareados suelen ser difíciles de organizar para los profesionales actuantes, resultando frustrante intentar aplicar esta modalidad de muestreo y, por lo tanto, suele no indicarse. Sin embargo, el resultado de un muestreo único no siempre suma información e incluso puede confundir más, mientras que el uso de muestras pareadas permite obtener valiosa información sobre la respuesta inmune humoral de los animales con signología compatible con estas afecciones, así como en los casos en donde se evalúa la respuesta inmune vacunal con sustratos inactivos, comparando los títulos existentes previamente a la vacunación con los títulos obtenidos al finalizar el plan indicado^{9, 11}. Además se recomienda enviar las muestras pareadas juntas

al laboratorio para disminuir el riesgo de fallas en los resultados por descongelar muchas veces los sueros, o por las variaciones intraprueba inherentes a la técnica.

El fundamento principal de trabajar con este tipo de muestreos es lograr el diagnóstico serológico a partir de la búsqueda de seroconversión, con variación en el valor de los títulos entre los dos muestreos. En este estudio en el 15% de las muestras pareadas se encontró seroconversión. La mayor frecuencia se observó para BVD en los casos de muestras pareadas con sospecha clínica (vacas abortadas y animales con otra signología relacionada a estas enfermedades); el 85% de las muestras pareadas no presentó seroconversión, pero sí títulos altos principalmente en BVD; por ejemplo se pudo relacionar la presencia de títulos elevados con cuadros de coccidiosis en terneros al pie de la madre³⁷. Este escenario indica la gran circulación de ambos virus en nuestros rodeos, correspondiéndose con lo descrito previamente con una prevalencia de un 70-100% para IBR y BVD^{1, 2, 3, 7}. La evidencia serológica en fetos abortados en nuestra región de un 4-30% para IBR y del 13-45% para BVD^{5, 28, 36} confirma la amplia difusión de estas enfermedades, coincidiendo con lo citado en otros países^{8, 25, 40}. En este estudio no se encontró seroconversión en las muestras para control de vacunas de estas enfermedades pero sí títulos variados, estos resultados se pueden deber a fallas en la aplicación, pérdida de la cadena de frío, uso de vacunas inactivas con baja concentración

antigénica, entre otras causas^{9, 39}.

Es importante muestrear animales compañeros sin signología clínica para conocer los títulos de anticuerpos en los bovinos que comparten el mismo rodeo y así considerar esos resultados al aplicar las medidas sanitarias; también lo es acompañar el envío de las muestras con la mayor cantidad de datos de la historia clínica, ya que la interpretación de los resultados puede ser confusa o inútil si no se consideran todos los factores que pueden condicionar la respuesta inmune, como el conocimiento previo de la presencia de estas enfermedades en el rodeo, la edad de los animales, la presencia de signos clínicos, el momento de muestreo y vacunaciones previas.

Al ser la virusneutralización la prueba de referencia en la detección de anticuerpos neutralizantes específicos contra IBR y BVD, en casos de animales sospechosos se sugiere el uso del muestreo pareado ya que esta modalidad es sin duda, una herramienta que facilita una mejor comprensión de la inmunopatogenia de estas enfermedades, permitiendo interpretar mejor los resultados serológicos, alcanzar un diagnóstico etiológico si se obtiene seroconversión y aún si no se observara seroconversión, este tipo de muestreo aporta información valiosa sobre la circulación de estos virus, permitiendo mejorar las medidas de control en cada situación. Por lo tanto se debería incentivar al profesional veterinario a que indique la modalidad del muestreo pareado para mejorar la eficiencia en la interpretación de los resultados.

Bibliografía

1. Alvarado Pinedo MF, Travería GE, Di Paolo LA, Sanabria R, Romero JR. Relación de los títulos serológicos de IBR y BVD en vacas preñadas con los títulos de sus hijos y cinética de esos anticuerpos, utilizando la prueba de virus neutralización. V Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica, 2007a, CD de Trabajos Libres, Área de grandes animales páginas 1-6. Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina.
2. Alvarado Pinedo MF, Di Paolo LA, Travería GE, Ancinas D, Romero JR. Estudio de la variación individual de los títulos serológicos de IBR y BVD en terneros de cría, utilizando la prueba de virus neutralización. V Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica, 2007b, CD de Trabajos Libres, Área de grandes animales páginas 1-9. Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina.
3. Alvarado Pinedo MF, Travería GE, Romero JR. Epidemiología de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Diarrea Viral Bovina. VI Reunión Argentina de Patología Veterinaria. II Seminario Argentino De La Fundación Charles Louis Davis, 2008, Libro de Resúmenes página 116. FCV. UNNE. Corrientes. Argentina.
4. Bitsch V. The P37/24 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus serum neutralization test. Acta Vet Scand 1978; 19: 497-505.
5. Campero CM, Moore DP, Odeón AC, Cipolla AL, Odriozola E. Aetiology of bovine abortion in Argentina. Vet Res Commun 2003; 27 (5): 359-69.
6. Cortese VS. Bovine virus diarrhoea virus and mucosal disease. En: Howard JL, Smith RA, editors. Current veterinary therapy 4: food animal practice. Philadelphia: WB Saunders Co, 1999, p. 289.
7. Costa EF, Fazio LE, Travería GE, Sanchez RO, Alvarado Pinedo MF, Mattioli GA, et al. Causas de mortalidad y aborto en bovinos. Informe de 1163 casos entre 1986 y 2001 en la provincia de Buenos Aires. Rev Med Vet. 2004; 85 (1): 16-22.
8. Ellsworth MA, Fairbanks KK, Behan S, Jackson JA, Goodyear M, Oien NL, et al. Fetal protection following exposure to calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus type 2 sixteen months after primary vaccination of the dams. Vet Ther 2006; 7 (3): 295-304.
9. Fulton RW, Confer AW, Burge LJ, Perino LJ, d'Offay JM, Payton, ME, et al. Antibody responses by cattle after vaccination with commercial viral vaccines containing bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhoea virus, parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus immunogens and subsequent revaccination at day 140. Vaccine 1995; 13: 725-733.

- 10. Fulton RW, Saliki JT, Burge LJ, d'Offay JM, Bolin SR, Maes, et al.** Neutralizing antibodies to type 1 and 2 bovine viral diarrhoea viruses: detection by inhibition of viral cytopathology and infectivity by immunoperoxidase assay. *Clin Diagn Immunol* 1997; 4: 380-383.
- 11. Fulton RW, Saliki JT, Burge LJ, Payton ME.** Humoral Immune Response and Assessment of Vaccines Virus Shedding in Calves Receiving Modified Live Virus Vaccines Containing Bovine Herpesvirus -1 and Bovine Viral Diarrhoea Virus 1a. *J. Vet Med B* 2003; 50: 31 – 37.
- 12. 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.
- 13. Gibbs EPJ, Rweyemam MM.** Bovine herpesvirus 1. *Vet Bull* 1977; 47: 317-343.
- 14. Gillespie J, Baker J, McEntee K.** A cytopathogenic strains of virus diarrhoea virus. *Cornell Vet* 1960; 50: 73–79.
- 15. Grooms DL.** Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2004; 20 (1): 5-19.
- 16. Grubor-Bauk B, Arthur JL, and Mayrhofer G.** Importance of NKT Cells in Resistance to Herpes Simplex Virus, Fate of Virus-Infected Neurons, and Level of Latency in Mice. *J Virol* 2008; 82 (22): 11073–11083.
- 17. Hodgson PD, Aich A, Manuja A, Hokamp H, Roche FM, Brinkman FSL, et al.** Effect of stress on viral–bacterial synergy in bovine respiratory disease: novel mechanisms to regulate inflammation. *Comp Funct Genomics* 2005; 6: 244–250.
- 18. Houe H.** Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol* 1999; 64 (2-3): 89-107.
- 19. Howard CJ.** Immunological responses to bovine virus diarrhoea virus infections. *Rev Sci Tech* 1990; 9 (1): 95-103.
- 20. Kahrs RF.** Infectious bovine rhinotracheitis; In: *Viral diseases of cattle*. 2nd ed. Iowa state University 2001, p. 159-170.
- 21. Lee KM, Gillespie JH.** Propagation of virus diarrhoea virus of cattle in tissue culture. *Am J Vet Res* 1957; 18: 952–953.
- 22. Lindberg AL.** Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. A review. *Vet Q* 2003; 25 (1): 1-16.
- 23. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009.** Chapter 2.4.13. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis 2008; p. 752-767. Disponible en http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.13_IBR_IPV.pdf
- 24. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009.** Chapter 2.4.8 Bovine viral diarrhoea 2008; p. 698-711. Disponible en http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.08_BVD.pdf
- 25. Mineo TWP, Alenius S.** Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in Brazilian dairy herds with reproductive disorder. *Rev Bras Parasitol Vet* 2006; 15 (4): 188-192.
- 26. Moenning V.** Pestiviruses: a review. *Vet Microbiol* 1990; 23: 35–54.
- 27. Moerman A, Straver PJ, de Jong MC, et al.** Clinical consequences of a bovine virus diarrhoea virus infection in a dairy herd: a longitudinal study. *Vet Q* 1994; 16 (2): 115–119.
- 28. Moore DP, Campero CM, Odeón AC, Bardón JC, Silva-Paulo P, Paolicchi FA, et al.** Humoral immune response to infectious agents in aborted bovine fetuses in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2003; 35 (3): 143-8.
- 29. Nahmias, A.J., Whitley, R.J., Visintine, A.N., Takei, Y., Alford, C.A.Jr.** Herpes simplex virus encephalitis: laboratory evaluations and their diagnostic significance. *J Infect Dis* 1982; 145 (6): 829-36.
- 30. Nandakumar S, Woolard SN, Yuan D, Rouse BT, and Kumarguru U.** Natural Killer Cells as Novel Helpers in Anti-Herpes Simplex Virus Immune Response. *J Virol* 2008; 28 (21): 10820–10831.
- 31. Nandi S, Kumar M, Manohar M, Chauhan RS.** Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim Health Res Rev* 2009; 10(1): 85–98
- 32. Nettleton PF, Entrican G.** Ruminant pestiviruses. *Br Vet J* 1995; 151 (6): 615-642.
- 33. Perrin B, Bitsch V, Cordioli P, Edwards S, Eloit M, Guerin B, et al.** A European comparative study of serological methods for the diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis. *Rev Sci Tech Off int Epiz* 1993; 12: 969-984.
- 34. Radostitis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW.** *Medicina Veterinaria Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*, Vol II, Novena edición, Ed: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U, 2002, p 1285 – 1309.
- 35. Rush DM, Thurmond MC, Muñoz-Zanzi CA, Hietala SK.** Descriptive epidemiology of postnatal bovine viral diarrhoea virus infection in intensively managed dairy heifers. *JAVMA* 2001; 219 (10): 1426-1432.
- 36. Sanabria R, Alvarado Pinedo MF, Travería GE, Di Paolo A, Romero JR.** Estudio de la respuesta serológica contra la *Neospora Caninum* y virus de la DVB en fetos Abortados de rodeos de cría de la provincia de Buenos Aires. *Rev Med Vet* 2007; 88 (3): 93-96.
- 37. Sanchez RO, Alvarado Pinedo MF, Di Paolo A, Ancinas MD, Rinaudo A, Romero J R.** Brote de coccidiosis bovina al pie de la madre asociada a pasaje viral de DVB. XVII Congreso Latinoamericano de Parasitología. Mar del Plata, 2005, Libro de Resúmenes página 171. Buenos Aires. Argentina.
- 38. Straub OC.** Advances in BHV1 (IBR) research. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2001; 108 (10): 419-422.
- 39. Valera AR, Alvarado Pinedo MF, Armendáriz M, Galosi CM.** Vacunación intensiva utilizando una vacuna comercial contra IBR/ DVB: evaluación de la respuesta inmune. *Revista del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires* 2003; 8 (27): 50-51.
- 40. Waldner CL.** Serological status for *N. caninum*, bovine viral diarrhoea virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus at pregnancy testing and reproductive performance in beef herds. *Anim Reprod Sci* 2005; 90 (3-4): 219-42.