



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“PREVALENCIA DE LA RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA
EN SEMENTALES Y SU RELACIÓN CON LA ELIMINACIÓN DEL
VIRUS EN EL SEMEN”**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN MÉDICA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**PRESENTA
JOSÉ ALEXIS CRUZ DÍAZ**

**DIRECTORES DE TESIS
MVZ.MC. JORGE VÍCTOR ROSETE FERNÁNDEZ
DR.ÁNGEL RÍOS UTRERA**

**ASESOR
MVZ. MC.RAYMUNDO ÁVILA BENITEZ**

TECAMACHALCO, PUEBLA.

OCTUBRE 2019

AGRADECIMIENTOS

A DIOS. Por permitirme cumplir una de mis metas y rodearme de personas buenas que siempre están conmigo apoyándome.

A mis padres. Bernabé Cruz Cabrera y Griselda Díaz Santos, que siempre han dado todo de ellos para apoyarme a cumplir mis metas y brindarme su cariño.

A mi Hermana. Por brindarme su apoyo y consejos.

Abuelos y otros Familiares. Por brindarme su apoyo, cariño y confianza en especial a mi abuelo Ricardo Díaz Murcia por inculcarme el deber de mejorar la ganadería.

Al MVZ M.C Raymundo Ávila Benítez. Por darme sus conocimientos, amistad, confianza y la oportunidad de realizar el servicio social y la tesis.

Al MVZ. M.C Jorge Víctor Rosete Fernández. Por apoyarme y asesorarme en la realización de este trabajo de tesis y darme su confianza para realizar el Servicio Social.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Benemérita Universidad Autónoma De Puebla. La cual me brindo todas las herramientas posibles durante mi formación profesional, también me dio excelentes profesores, compañeros y amigos.

A mis maestros. Por transmitirme los conocimientos de las diferentes áreas de esta noble profesión.

A los revisores de tesis. Mvz. Mc. Gabriel Gerardo Aguirre Espíndola y Mvz.MC Miguel Ángel Zambrano que han brindado parte de su tiempo en esta tesis.

A mis amigos. Los cuales estuvieron conmigo en las buenas y malas.

Al personal de la posta zotécnica y todos los elementos en los cuales obtuve grandes conocimientos.

Al Personal del Campo Experimental Las Margaritas. Por brindarme su apoyo, amistad y confianza.

A la familia García Martínez. Por brindarme un espacio en su hogar y darme su amistad.

DEDICATORIA

A mi Abuelo. José Cruz Cabrera que siempre dio lo mejor de él, inculcándome el amor por la ganadería y aunque de este mundo partió me queda cada uno de sus consejos.

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
Ag	Antígeno
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
A-T	Adenina-Timina
BEI	Betilenimina Binaria
CRB	Complejo Respiratorio Bovino
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Dntps	Desoxirribonucleótidos Trifosfatados
DVB	Diarrea Viral Bovina
E.U.A	Estados Unidos de América
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
EMIT	Técnicas de Ensayo Inmunológico por Multiplicación Enzimática
G-C	Guanina-Citosina
HVB-1	Herpesvirus Bovino Tipo 1
HVB-1.1	Herpesvirus Bovino Subtipo 1.1
HVB-1.2a	Herpesvirus Bovino Subtipo 1.2a
HVB-1.2b	Herpesvirus Bovino Subtipo 1.2b
HVB-4	Herpesvirus Bovino Tipo 4
HVB-5	Herpesvirus Bovino Tipo 5

IBR	Rinotraqueitis Infecciosa Bovina
IBRac	Anticuerpos en Sangre para Rinotraqueitis Infecciosa Bovina
IBRag	Antígenos en Semen para Rinotraqueitis Infecciosa Bovina
IC	Intervalos de Confianza
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias
IPB	Balanopostitis Pustular Infecciosa
IPV	Vulvovaginitis Pustular Infecciosa
ITF	Interferón
MDBK	The madin-darby bovine Kidney
Mg+	Ion Magnesio
MI	Mililitro
Mm	Milímetro
NK	Natural Killer
Nm	Nanómetro
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PI3	Parainfluenza Bovina Tipo 3
PMN	Polimorfonucleares Neutrófilos
RNA	Ácido Ribonucleico
Rpm	Revoluciones por Minuto
RT-PCR	Transcripción Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

TAE	Tris, Acetato y Ácido etilendiaminotetraacético
TBE	Tris, Borato y Ácido Etilendiaminotetraacético
Tm	Temperatura Melting
UV	Ultravioleta
VRSB	Virus Respiratorio Sincitial Bovino

ÍNDICE GENERAL

	Pagina
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	iii
ABREVIATURAS	iv
I.- RESUMEN	1
II.- INTRODUCCIÓN	2
III.- FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	28
IV.- JUSTIFICACIÓN	29
V.- HIPÓTESIS	29
VI.- OBJETIVOS	30
VII.- MATERIAL Y MÉTODOS.	31
VIII.- RESULTADOS	34
IX.- DISCUSIÓN	38
X.- CONCLUSIONES	43
XI.- BIBLIOGRAFÍA	44

I. RESUMEN

Se determinó la prevalencia de anticuerpos a rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) en suero sanguíneo de sementales de 13 ranchos de los estados de Puebla, Tabasco y Veracruz, así como si existe correlación entre la positividad a anticuerpos de IBR con la positividad a antígenos de IBR en semen. Se tomó una muestra de sangre a cada semental y se centrifugaron para la obtención del suero, el cual fue vertido en viales con tapón y conservado en congelación a -20°C hasta su análisis por ELISA. También se tomó una muestra de semen de cada semental, obtenido por la técnica de electroeyaculación, estas muestras fueron vertidas en viales con tapón y se conservaron en congelación -20°C , hasta su análisis por PCR. El análisis estadístico se realizó con el procedimiento GENMOD del paquete SAS. Para estos análisis los factores de riesgo fueron estados de la república, Puebla, Tabasco y Veracruz; 13 ranchos de los estados y genotipo de sementales que fueron cebú, cruzados y europeos. La prevalencia de anticuerpos en suero a IBR fue alta, siendo en promedio de 73% para los tres estados (Puebla, Tabasco y Veracruz), sin ser diferentes estadísticamente ($P>0.05$); de 71% para los 13 ranchos, sin ser diferentes estadísticamente ($P>0.05$) y de 72% para los tres genotipos, sin ser diferentes estadísticamente ($P>0.05$). El porcentaje de sementales con antígenos de IBR en semen fue de 58%, valor alto al igual que el de anticuerpos en suero; sin embargo, aunque la prevalencia de anticuerpos en suero fue alta y también la presencia de antígenos en semen, no hubo correlación entre positividad a anticuerpos con la positividad a antígenos en semen (coeficiente de correlación 0.07 y significancia $P>0.05$). La prevalencia de anticuerpos en suero sanguíneo y la prevalencia de antígenos en semen a IBR son de importancia para tomar en consideración a los sementales como indicadores de la enfermedad en el hato y siendo un factor de riesgo, pues como eliminan el virus en semen son un medio de contagio eficiente toda vez que la enfermedad también se transmite por contacto sexual; por lo tanto, para evitar problemas reproductivos en el hato, se deben incluir medidas de control y la vacunación.

Palabras claves: IBR, anticuerpos, antígeno, prevalencia.

II. INTRODUCCIÓN

La rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) es altamente contagiosa y se manifiesta clínicamente de diferentes maneras: el virus se puede transmitir por contacto directo con secreciones oculares y genitales, por vía respiratoria; así como también con semen fresco de toros infectados (Nuotio *et al.*, 2007).

Con respecto a esta enfermedad se ha hecho poco, principalmente a nivel de ranchos comerciales, pues, aunque se han reportado fallas reproductivas en las vacas, no se ha actuado para identificar algunos problemas. Sin embargo, en México, la IBR es de gran importancia pues en la mayoría de los animales la enfermedad transcurre en forma subclínica; tiene como principal característica el aborto, afectando los parámetros reproductivos y productivos e incrementando notablemente las pérdidas económicas (Bracho *et al.*, 2006).

Algunos trabajos consultados, han demostrado la presencia del virus en semen congelado y además en centros de inseminación artificial se han realizado aislamientos de este agente en toros clínicamente sanos (Martínez y Riveira, 2008), pero poco se ha hecho en la identificación de este virus en semen de toros que se destinan a la monta natural en ranchos comerciales.

En este trabajo se planteó investigar en ranchos comerciales del trópico húmedo de México, tomando como muestra representativa algunos ranchos de los estados de Puebla, Tabasco y Veracruz, con la finalidad de determinar la presencia de la rinotraqueitis infecciosa bovina y, además,

determinar si los sementales están eliminado el virus por el eyaculado. De esta forma proceder a recomendar medidas de control, que seguramente serán de gran utilidad para mejorar la eficiencia reproductiva de las vacas.

Por lo tanto, este trabajo se realizó en ranchos aledaños a los campos experimentales del INIFAP: Las Margaritas en Puebla, La Posta en Veracruz y Huimanguillo en Tabasco, por lo que se visitaron varios ranchos para la toma de muestras de sangre para el diagnóstico de la prevalencia de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina y muestras de eyaculado para el diagnóstico del virus en semen.

De esta manera fue posible llevar a cabo la toma de decisión de control en el hato.

RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA

¿Qué es?

Es una enfermedad de origen viral altamente contagiosa, identificada en 1956 como causa de enfermedades respiratorias y reproductivas, a la cual se le asocia con patologías como la Diarrea Viral Bovina (DVB), Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB) y Parainfluenza 3 (PI3), configurando el denominado “Complejo Respiratorio” (Córdova *et al.*, 2007).

Sinonimias

La Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), también conocida como Vulvovaginitis Infecciosa Bovina (IPV), Enfermedad de la Nariz Roja, Rinitis Necrótica, Rinotraqueitis Infecciosa Neurótica Bovina y Exantema Coital Bovino (Schroeder.,1999).

Etiología

Los agentes etiológicos responsables de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, tienen las características generales del grupo de los Herpes, esta clasificación se llevó a cabo en 1961 por Amstrong, Pereita y Andrewes (Amstrong *et al.*, 1961), el agente con mayor causa patogénica es el Herpes Virus Bovino Tipo 1(HVB-1), es un virus de genoma ADN que pertenece a la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae, genero Varicellovirus. Con base al análisis genómico se ha clasificado en tipo HVB-1 y 3 subtipos, HVB-1.1, HVB-1.2a, HVB-1.2b.

Los subtipos 1.3a y 1.3b fueron posteriormente clasificados como Herpes virus Bovino Tipo 5 (HVB-5).

El Herpes virus Bovino Tipo 4(HVB-4), es un miembro del género Rhadinovirus, subfamilia Gammaherpesvirinae (Davison *et al.*, 2009).

Animales susceptibles

Los bovinos y bufalinos son las especies susceptibles a este virus (Motta *et al.*, 2013).

Estructura del virus

HVB-1 y HVB-5 comparten aspectos estructurales y antigénicos, se diferencian en la habilidad para invadir y replicarse, ambos comparten el 85% de homología de ADN, lo cual ocasiona reacciones cruzadas en pruebas que usan anticuerpos policlonales.

El Herpes Virus Bovino Tipo 4(HVB-4), es un miembro del género Rhadinovirus, subfamilia Gammaherpesvirinae. El tamaño de las partículas de este grupo de virus ha sido estimado aproximadamente en 150 nm, constituido por un núcleo central que contiene al genoma ligado a proteínas estructurales y no estructurales, además está rodeado por una cápside icosaédrica de 108 nm de diámetro, esta cápside está compuesta de 162 capsómeros con un diámetro menor a los 10 nm.

La cápside está rodeada por una envoltura compuesta de dos capas concéntricas, el tegumento y la membrana externa; la cual presenta proyecciones hacia el interior, es decir, hacia el tegumento (Roizman *et al.*, 1992).

Transmisión

La transmisión puede ser directa por medio del contacto de animales sanos con secreciones nasales, oculares o reproductivas de animales seropositivos, o indirectamente a través de fómites como agujas, vestimenta del operario, personas, equipo e instalaciones infectadas.

Sin embargo, el uso de sementales seropositivos a IBR por monta natural, semen o embriones de dudosa procedencia se convierten en factores de alto riesgo de diseminación de la enfermedad no solo en un rancho, si no a nivel regional o incluso mundial (Van Oirschot *et al.*, 1993; Bielanski y Dubuc, 1994).

El pastoreo es la forma de alimentación en el ganado de las regiones tropicales esto puede convertirse en otro medio de transmisión debido a que las pasturas pueden ser contaminadas por las secreciones oculares,

respiratorias e inclusive reproductivas de bovinos portadores; por lo tanto, al pastorear el ganado puede consumir estas pasturas contaminadas (Sharma y Yadav, 2013).

Sin embargo, el contacto directo con placentas o mortinatos, también puede ser un medio de transmisión directo de la enfermedad.

Prevalencias muy altas se deben a deficiencias en el manejo sanitario, como la introducción de hembras positivas, la falta del uso de vacunas contra esta enfermedad, así como la adquisición de sementales sin control sanitario que contribuyen a empeorar el estatus zoonosario de estos hatos, ya que uno de los medios de transmisión es la vía venérea (Abad *et al.*, 2016).

Los herpesvirus tienen la capacidad de reactivarse en vacas infectadas con anterioridad las cuales albergan la infección vírica (Gasque, 2008).

El estrés causado por transporte, parto, hacinamiento entre otros, es un factor desencadenante de la enfermedad; así como infecciones causadas por otros patógenos y el tratamiento con corticoides causan inmunosupresión al bovino haciéndolo susceptible al contagio (Córdova *et al.*, 2007)

Patogenia

El virus penetra en la célula huésped por fusión o viropexis, ya en el citoplasma sucede la descapsidación del virus, mientras que el ADN es transportado al interior del núcleo celular, posteriormente es transcrito directamente en ARN mensajero. En el caso del HVB-1 las proteínas han sido clasificadas en polipéptidos α , β y δ (Thiry y Pastoret, 1984; Kucera y

Myrvik, 1985).

La síntesis de proteínas β requiere de la presencia de las proteínas α , así como en un proceso de retroalimentación, las proteínas β bloquean la síntesis de proteínas α (Misra *et al.*, 1982).

La síntesis de proteínas δ requiere de una expresión previa de las proteínas α y de una Novo-síntesis de ADN viral, además de que bloquean la síntesis de las proteínas de las clases precedentes.

En las células infectadas se ha bloqueado a la síntesis de ADN, se observa la ausencia de varias proteínas (Roizman *et al.*, 1992).

Entre 7 y 16 horas post-penetración, el título de virus intracelular, aumenta exponencialmente y las inclusiones intranucleares crecen hasta casi ocupar el núcleo, posteriormente entre 16 y 32 horas post-penetración, el virus aumenta extracelularmente, mientras que a las 36 horas post-penetración el virus extracelular decrece (Depauli y Sabina, 1972).

En infecciones respiratorias el virus penetra por medio de la mucosa nasal, donde realiza su primer ciclo de replicación en las células epiteliales, posteriormente se extiende por medio de los conductos lagrimales hacia los tejidos oculares donde establece infección secundaria. Posteriormente se produce infección generalizada consecuencia de la viremia transitoria y diseminación neural por puentes intercelulares que permiten la llegada del virus al órgano blanco (Yates, 1982; Baugust y Clark, 1972).

Se ha comprobado que a nivel respiratorio el virus inhibe la migración de

los polimorfonucleares neutrófilos (PMN), la citotoxicidad mediada por células y la actividad de los macrófagos alveolares favoreciendo la colonización de agentes oportunistas como las bacterias (Bielefeldt y Babiuk, 1985; Winkler *et al.*, 1999).

En infecciones del tracto reproductor de machos el virus entra directamente en el órgano blanco (prepucio, pene y posiblemente en la parte distal de la uretra y se replica rápidamente en la mucosa, esto justifica la causa de la contaminación del semen (Eluzhary *et al.*, 1980, Kupferschmied *et al.*, 1986).

En el caso de la hembra es muy similar en este caso los órganos blancos son la vulva y el útero, mostrando tropismo en las células endometriales. En relación a la manifestación abortigénica, el virus llega por vía hematológica, infectándolo y produciendo su muerte (Miller *et al.*, 1991; Smith, 1997), sin embargo, algunos trabajos mencionan que el virus en la placenta puede permanecer latente hasta 90 días sin transmitirse al feto (Di Santo *et al.*, 1995), aunado a esto la lenta propagación del virus hacia los cotiledones materno fetales dificulta la ruta de acceso del virus hacia el feto, lo cual nos da como resultados diferencias temporales entre la viremia materna y la infección fetal; pero las lesiones hepáticas indican la ruta hematológica umbilical como la más frecuente, la muerte suele ocurrir 24-48 horas después de la infección fetal y la expulsión a partir del 7º día, momento en que los títulos virales en el feto decrecen (Gibbs y Rweyemamu, 1977; Kendrick, 1973; Smith, 1977).

Los HVB-1.1 y HVB-1.2 residen en los linfonódulos trigémicos y en el saco conjuntival (Motta *et al.*, 2013).

El organismo huésped responde al patógeno con 2 tipos de respuesta, la inespecífica, la cual es mediada por interferón (ITF), complemento y poblaciones celulares como los macrófagos y las células natural killer (NK), y la específica, la cual es la respuesta humoral que interviene en la prevención y recuperación de una infección, así como en la reactivación viral (Tikoo *et al.*, 1995; Babiuk *et al.*, 1996).

Estudios anteriores demuestran que las vacas con mayor número de partos tienen más probabilidades de presentar títulos elevados de respuesta inmunológica a la enfermedad (Ochoa *et al.*, 2012).

Signos clínicos

La manifestación clínica de HVB-1 se presenta en general con Rinotraqueitis, Vulvovaginitis/balanopostitis pustular infecciosa, conjuntivitis, aborto, enteritis, repetición de servicios, orquitis, epididimitis, vaginitis, infección fetal, aborto, metritis postparto, anestro, encefalitis (Duque *et al.*, 2014), además de presentar eritema en prepucio, pirexia, abundante secreción nasal, placas en la mucosa de las fosas nasales, vesículas en la vulva y meningoencefalitis (Calderón *et al.*, 1997).

Sin embargo, algunas manifestaciones son exclusivas de ciertos subtipos por ejemplo para HVB-1.1, suelen suceder abortos entre el 4° y 7° mes de gestación, como consecuencia de la muerte fetal, esto se da luego de un periodo post infección que oscila entre 3 a 6 semanas.

Los abortos suceden posteriormente de presentarse rinitis, secreciones nasales, mucosa nasal hiperemia con lesiones necróticas a

nivel de morro y narinas, conjuntivitis, así como la presentación de otros signos como inapetencia, fiebre de hasta 42°C y una disminución evidente de la producción láctea y pérdida de la condición corporal (Gibbs y Rweyemamu, 1977).

HVB-1.2 se presenta en hembras como vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), teniendo cursos de 4 días presentando fiebre, inapetencia, depresión, edematización de la vulva con presencia de vesículas, pústulas y úlceras, acompañada de descarga seropurulenta consecuencia de la infección bacteriana. Dichas lesiones desaparecen en un máximo de 10 días, mientras que la descarga vaginal puede persistir por varias semanas. Mientras que en machos se manifiesta por medio de la balanopostitis pustular infecciosa (IPB), la cual presenta inflamación del pene y prepucio, formación de pústulas y úlceras. Si continúan en función, debido a las cicatrices producidas por la recomposición de las erosiones, pueden observarse secuelas como distorsión del pene o fallas en la erección (Gibbs y Rweyemamu, 1977; Wytman, 1989).

IPV puede transmitirse al sistema respiratorio cuando las hembras en celo se huelen la región vulvar (Schoeder, 1999).

Sin embargo, frecuentemente se pueden encontrar literaturas las cuales mencionan la presencia de queratoconjuntivitis como signo clínico, por lo cual se han realizado diversos estudios para relacionar ambas patologías ya que la queratoconjuntivitis es producida por la bacteria *Morazella bovis*, dando como resultado estos estudios la seropresencia de títulos significativos para HVB-1, demostrando que no hay una asociación entre IBR y Queratoconjuntivitis infecciosa (Cardozo *et al.*, 2008).

Los bovinos expuestos al HVB-4 pueden llegar a presentar sintomatología reproductiva similar a los afectados por el HVB-1 como repetición de servicios, epididimitis, orquitis, vaginitis, infección fetal, metritis postparto, anestro, además pueden presentar mastitis y lesiones asociadas a la ubre con cambios en la leche (Elhassan *et al.*, 2011, Gür y Dogan, 2010). Mientras que el HVB-5 tiene mayor afinidad por el sistema nervioso, produciendo meningoencefalitis fatal (Rissi *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2001), en el caso de la Meningoencefalitis tiende a afectar a los terneros de menos de tres meses de edad que tienen escasa protección frente al virus, aun con los anticuerpos pasivos (Gasque, 2008), los cuales manifiestan de manera alternada depresión, hiperexcitación, anorexia, bruxismo, incoordinación, ataxia, ceguera y puede llegar a ser mortal (Schoeder, 1999); además, también es responsable de enfermedad genital, abortos y hay antecedentes de que fue aislado del semen de un toro en ausencia de la enfermedad clínica (Gomes *et al.*, 2003).

En el caso de los abortos, las lesiones son enmascaradas por el estado autolítico del feto, pudiéndose observar focos blanquecinos de 3 mm de diámetro en hígado y pulmón, la vasculitis necrosante, el edema y las hemorragias suelen ser hallazgos frecuentes en las placentas (Wyttman, 1989, Lager *et al.*, 1981).

Frecuentemente la presentación de endometritis y salpingitis se presentan cuando se sirve a la hembra con material seminal contaminado a través de la inseminación artificial, el virus llega al endometrio produciendo endometritis necrótica y salpingitis, presentándose muerte del cigoto antes de su implantación, reabsorción de este y rápida luteólisis con periodos

interastrales cortos, el paso del virus por el cérvix y endometrio produce una rápida inmunidad lo que permite que tras algunas inseminaciones la hembra conciba (Schroeder, 1999).

Las muertes rara vez son consecuencia de IBR primarias o recidivantes, a no ser que exista una bronconeumonía bacteriana secundaria o una infección vírica contaminante con el Virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB) o con el Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB), esto complica el diagnóstico ya que enmascaran algunas lesiones de IBR (Gasque, 2008).

Diagnóstico

Dentro de las medidas de control que podemos utilizar de primera elección está el diagnóstico serológico que se basa en la detección de anticuerpos por medio de diferentes pruebas como ELISA indirecto y la seroneutralización, métodos directos como el aislamiento viral en cultivos celulares y por técnicas de biología molecular como PCR, estas últimas las cuales tienen mayor sensibilidad y especificidad ya que diferencian virus vacúnales de virus de campo (Repiso *et al.*, 2005).

Por medio de punción en la vena coccígea utilizando el vacutainer, se obtiene la muestra de sangre para evaluar los títulos de anticuerpos seroneutralizantes en cultivo celular.

Debido a su alta especificidad y sensibilidad el aislamiento viral en cultivo celular, es recomendado por la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) como técnica estándar para autorizar el tráfico internacional de bovinos. Posteriormente se centrifugan las muestras para obtener el suero, y se almacenan a -20 ° para su posterior uso (OIE, 2004).

En la mayoría de las investigaciones se han utilizado las células MDBK (The Madin-Darby Bovine Kidney), estas células son una línea continua obtenida por Madin y Darby en 1958, proveniente del riñón de un bovino adulto, dicha línea presenta una gran sensibilidad al virus HVB-1 su cultivo es relativamente sencillo (Duque *et al.*, 2014).

El uso de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en el diagnóstico molecular se ha incrementado hasta ser la prueba estándar de primera elección para la detección de ácidos nucleicos a partir de diferentes orígenes (Valasek y Repa, 2005), ya que permite detectar cantidades mínimas de ácidos nucleicos con el empleo de curvas de cuantificación estándar calibradas adecuadamente, debido al proceso de amplificación exponencial de la plantilla RNA/DNA y el uso de moléculas emisoras de fluorescencia, permitiendo el monitoreo de cargas virales y la cinética de la proliferación viral, convirtiéndose en un parámetro importante para el manejo, control y vigilancia en este caso de IBR, lo contrario de PCR que es una técnica cualitativa (Palma *et al.*, 2015).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa fue desarrollada por Kary Mullis, es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente.

Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. Si en la reacción usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente

hablamos de una PCR, sin embargo si usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en ingles).

Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc.

Este método fue copiado de los retro virus que usan una transcriptasa, reversa para convertir su genoma de ARN en ADN duplicarse en millones de partículas virales (Herschhom y Hizi, 2010).

El ADNc se utiliza cuando analizamos la expresión del ARNm de algún gen de interés. Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (Dntps: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos estos elementos interactúan en 3 etapas principales de las que se compone la PCR (Watson y Crick, 1953):

-Desnaturalización: En esta etapa las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por 3 enlaces, uno más que las bases de A-T, además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa se obtienen las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

-Hibridación: En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima, esta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

-Extensión: En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empiezan su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP'S complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72°C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador.

Finalizando la PCR, si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa (Lee *et al.*, 2012), la cual consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica, la separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE o TBE.

En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona carga negativa, por esta razón migran al polo positivo.

Para esto se prepara un gel diluyendo una cantidad de agarosa en el buffer, se calienta hasta que la agarosa hierva lo suficientemente y posteriormente se vacía a un recipiente que sirve de base que solidifique, otro ingrediente que se agrega al gel es el compuesto conocido como bromuro de etidio, el cual es una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena.

Cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas.

Se debe manipular con mucho cuidado este compuesto ya que es mutagénico y teratógeno.

Cuando los amplicones son corridos en el gel, estos deben ser cargados junto con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado.

El tamaño está dado por el número de pares de bases del amplicón. La visualización de los amplicones se lleva a cabo tomando una foto digital al gel de agarosa expuesto a luz UV, además un procesador de imágenes se encargará de analizar las bandas observadas.

La combinación adecuada de todos los elementos químicos mencionados hace posible la síntesis in vitro del ADN utilizando la PCR.

La técnica ha sufrido modificaciones para ofrecer una tecnología más

innovadora al estudio del ADN.

La técnica convencional da resultados cualitativos, sin embargo la modalidad de la PCR en tiempo real ofrece la gran ventaja de usar un sistema cuantitativo (Higuchi *et al.*, 1992).

Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA)

Como sus siglas lo indican utiliza una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo.

Todas las pruebas de ELISA son ensayos en fase sólida en los cuales se absorbe un antígeno o un anticuerpo sobre un soporte sólido (Hardening, 1994).

Las pruebas ELISA se basan en 4 teorías:

- 1) El antígeno y anticuerpo pueden enlazarse a una superficie portadora insoluble y retener su reactividad inmunológica.
- 2) Las enzimas tienen actividad específica alta y convierten una cantidad relativamente grande de sustrato en producto, lo que permite detectar concentraciones muy bajas del ligado.
- 3) La actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante el análisis y el almacenamiento.
- 4) Las enzimas no están presentes en el líquido biológico que se va a

analizar. (Fung, 2003)

En la actualidad existen diversos protocolos los cuales se basan en reacciones de enlace competitivo y otras en reacciones de enlace no competitivo, pero en todas las pruebas ELISA se requiere de un paso de separación para eliminar el conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado enzimático enlazado.

Para lo cual se añade sustrato enzimático y se mide la reacción catalítica entre la enzima y el sustrato.

Debido a sus características catalíticas las enzimas son marcadores muy sensibles y versátiles (Hardening, 1994).

Los anticuerpos utilizados son de origen monoclonal o policlonal que se suministran como antisuero no fraccionado o fracciones de inmunoglobulina purificada, pueden ser solubles o estar inmóviles en un soporte sólido, son empleados como conjugados no marcados o enzimáticos y por ultimo reaccionan con determinante antigénico específico de un antígeno o de un anticuerpo ligando-específico (anticuerpo-primario).

Los antígenos se producen con tecnología recombinante, siendo utilizados como conjugados marcados o enzimáticos y son inmóviles o solubles, dependiendo del protocolo de análisis.

El reactivo formado de la unión covalente entre enzima y antígeno o anticuerpo es el conjugado (Fung, 2003; Chiaroni, 1998).

Algunas de las combinaciones de enzima y sustrato que se emplean en los

diversos métodos ELISA son:

-Peroxidasa de rábano y su sustrato, peróxido de hidrogeno que en presencia de cromógeno o-fenilendiamina produce un producto color amarillo-naranja medible.

-Galactosidasa beta y su sustrato o-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido que se transforma en un producto nitrofenolado amarillento medible.

-Fosfatasa alcalina y su sustrato p-nitrofenilfosfato que también se transforma en nitrofenolato. Se utiliza ácido sulfúrico para inhibir la actividad enzimática y estabilizar el producto final de reacción que tiene color.

Ensayos de enlace competitivo. El ligando no marcado compite con un ligando conjugado con enzima por un número limitado de sitios de enlace con el anticuerpo inmovilizado, y siguiendo el protocolo se retira el ligando no reactante, para así poder relacionar inversamente la cantidad de producto que se forma con la concentración del ligando no marcado en la muestra problema.

Ensayos de enlace no competitivo. Son los métodos más utilizados para determinar antígenos que por lo menos tienen 2 determinantes antigénicos, como fase solida pueden ser utilizadas perlas de poliestireno en donde se absorbe un exceso de anticuerpos generalmente monoclonales, y se sigue el protocolo de trabajo retirando también como en los casos anteriores el exceso de antígeno presente no unido.

Técnicas de ensayo inmunológico por multiplicación enzimática (EMIT)

Son análisis sin separación en el cual se emplea una enzima conjugada al hapteno de interés como marcador en una reacción enzima-sustrato como sistema de detección.

Su principio es que se pueden determinar la cantidad de interacción entre el hapteno y el anticuerpo utilizando un marcador enzimático.

El enlace del anticuerpo al hapteno conjugado con la enzima produce inhibición de la actividad enzimática, esta inhibición se debe a que el anticuerpo interfiere estéricamente con el enlace del sustrato al sitio catalítico de la enzima o el enlace del anticuerpo transforma la configuración de la enzima.

La cantidad de hapteno de la muestra determina el número de sitios para anticuerpos disponibles para enlazar e inactivar el hapteno conjugado con la enzima (Guzmán., 2004).

Medidas de control

En algunos países como es el caso de Argentina se ha empleado la técnica ELISA por medio de muestras de leche provenientes de estanques de diferentes hatos, contando con la factibilidad del diagnóstico por medio de las inmunoglobulinas presentes en la leche, esto nos permite realizar un monitoreo constante de la prevalencia de los rebaños (Felmer *et al.*, 2009).

En general podemos utilizar muestras de sangre, hisopados de exudado nasal, vaginal o prepucial, semen o muestras de leche para su posterior análisis serológico y diagnóstico de IBR.

El virus es muy sensible a los efectos del medio exterior, en instalaciones libres de animales el virus no es viable por más de 72 horas, además es muy sensible al benzaldehído, a las soluciones alcalinas de hidróxido de sodio y a sus soluciones de hipoclorito de sodio (Duque *et al.*, 2014).

La compra de animales ya sea de sementales y/o vientres con certificación y documentación sanitaria, así como las respectivas pruebas serológicas, disminuyen el riesgo de infección y propagación (Peña *et al.*, 2011).

Sin embargo el uso de vacunas son una gran alternativa para su prevención y control, existen vacunas comerciales contra el HVB-1, en su mayoría vienen en combinación con otros virus del complejo respiratorio, las vacunas de virus vivo modificado tienen una multiplicación limitada en el organismo, pero suficiente para generar una respuesta inmune, la protección se establece en unas 2 a 3 semanas, con lo cual se obtiene protección sistémica y en las respectivas mucosas, a pesar de poseer una protección eficiente, posee desventajas como la imposibilidad de ser aplicadas en animales gestantes, riesgo de reversión de virulencia, además puede inducir latencia, pudiéndose reactivar luego de una inmunosupresión con corticoides, generando así reinfecciones con dicha cepa vacunal (Miller *et al.*, 1991, Van Drunen *et al.*, 1993), además en pruebas experimentales la vacunación en terneros con el virus vivo modificado de HVB-1 se ha asociado con lesiones oculares más pronunciadas que las producidas por *M. bovis* en casos de queratoconjuntivitis infecciosa bovina (George *et al.*, 1988), mientras que un estudio realizado durante un programa de vacunación con HVB-1, demostró poder aislar el virus por medio de muestras de eyaculados y lavados prepuciales, recolectados 3 meses postvacunación, utilizando el análisis de restricción de ADN, se identificaron

estos aislamientos los cuales eran idénticos al de la capa de virus de vacunación, demostrando la excreción del agente vacunal en el eyaculado (Gregersen *et al.*, 1985). Vacunas con virus inactivado, las cuales son desarrolladas a partir del virus completo pero inactivado por algún método físico o químico, uno de los agentes de mayor uso en la actualidad es la betilenimina binaria (BEI), un inactivante de primer orden, debido a que el agente se presenta inactivado, presenta riesgo biológico y se pueden aplicar en hembras gestantes. Permite la fabricación de vacunas multivalentes, pues no hay interferencia con la producción de anticuerpos contra otro antígeno inactivado.

Las glicoproteínas virales son altamente inmunogénicas, estas proteínas son las encargadas de la interacción con las células blanco y con el sistema inmune, aquí se incluye las vacunas recombinantes las cuales son replicativas (marcadoras, virus vivo, etc.) y las no replicativas donde se encuentran las de subunidades proteicas y las subunidades génicas (Van Drunen *et al.*, 1990, Van Drunen *et al.*, 1993).

La inmunidad derivada de la infección natural o de la vacunación tiene corta duración que probablemente no excede de 6 a 12 meses (Gasque, 2008). En la actualidad, no está generalizada el uso de vacunas marcadoras, y se utilizan en su mayoría vacunas inactivadas que interfieren con los resultados de las pruebas serológicas (Posado *et al.*, 2013).

Se recomienda implementar el diagnostico de gestación en los ranchos antes de iniciar con un programa de vacunación, para así utilizar de forma eficiente la vacuna de virus vivo modificado para vaquillas antes de su primer servicio y para vacas en el postparto, y la vacuna virus vivo

modificado atenuado o inactivado para vacas gestantes. Sin embargo, tenemos que tomar en cuenta otros factores para el uso de las vacunas como la prevalencia en la zona, prevalencia por época del año, entre los más importantes (Abad *et al.*, 2016).

Impacto económico

El Complejo Respiratorio Bovino (CRB), causa elevadas pérdidas económicas, reportes en E.U.A indican que los costos asociados a CRB con prevención, tratamiento, morbilidad y mortalidad se han estimado en 13.90 a 15.57 dólares por cabeza (Snowder *et al.*, 2007).

Situación Mundial

En 1972 fue aislado por primera vez en Colombia el HVB-1, la prevalencia en Colombia varía de 3.7 a 16% (Griffiths *et al.*, 1982; Arboleda *et al.*, 1993), en el año 2006 se reportó una prevalencia de 74% en fincas de montería (Betancur y González, 2006), estudios en el Magdalena medio en ganaderías de cría y ceba reportan el 59 % de positivos y en ganado doble propósito 46% de prevalencia (Piedrahita *et al.*, 2010), mientras que en Antioquia y en el Valle del Cauca encontraron un 100% de prevalencia serológica por hato y una prevalencia general por individuos del 75.63%(Ruiz *et al.*, 2010).

En Colombia se han desarrollado múltiples modelos de evaluación de riesgo epidemiológico y de las consecuencias económicas de los sistemas de prevención, control y erradicación, los resultados descartan iniciar programas de erradicación (Boelaert *et al.*, 2005), ya que estos funcionan en áreas con prevalencias serológicamente bajas (<10%) (Ackermann y Engels, 2006), esto da como resultado el cuestionar los sistemas de

prevención y control, y encaminarlos a disminuir la prevalencia por región y establecer puntos y momentos críticos adecuados de vacunación para mantener un buen estatus inmune (Ruiz *et al.*, 2010), además la legislación prohíbe el uso de semen de toros infectados en programas de inseminación artificial (Van Oirschot *et al.*, 1993).

Mientras que en España la prevalencia se establece a nivel de rebaño en el 60% e intra-rebaño del 25-40% (Fernández., 2007).

En Uruguay se encuentra ampliamente distribuida, un muestreo aleatorio encontró que 99.1% de los establecimientos ganaderos posee por lo menos un animal positivo y la prevalencia serológica fue estimada en 36.6 % (Repiso *et al.*, 2005).

Países como Turquía el cual no tiene antecedentes de vacunaciones reporta seropositividades de 19.5% y 46.3% (Tolga *et al.*, 2006).

Chile es un país reconocido por sus altos niveles sanitarios, estando oficialmente libre de las principales enfermedades de la lista OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal), más sin embargo cuenta con prevalencias altas de enfermedades que causan impacto directo en la producción ganadera (Felmer *et al.*, 2009), la prevalencia de IBR en Chile se da por regiones, en la parte sur 95% (Hochstein *et al.*, 1986) y central 86% (Celedón *et al.*, 1996), en Chile se ha implementado la detección de anticuerpos en leche de los tanques de enfriamiento del establo, el sistema ELISA ha demostrado tener mayor especificidad y sensibilidad, autorizando su uso a bajo costo para vigilar y dar un seguimiento a los rebaños (Felmer *et al.*, 2009).

Mientras que en Brasil se estima que el HVB-1 tiene una prevalencia de entre el 50-90% de la población bovina nacional (Cerqueira *et al.*, 2000, Barbosa *et al.*, 2005), en el estado de Paraná se reporta una prevalencia aparente de rebaños (71.3%) y animales (59.0%) respectivamente (Dias *et al.*, 2013), mientras en el estado de Maranhao el 100% de los rebaños resultaron seropositivos (Bezerra *et al.*, 2012), sin embargo, en Brasil antes de aplicar las biotecnologías reproductivas es primordial la vacunación contra el complejo reproductivo (Sá Filho *et al.*, 2013).

Situación en México

La Rinotraqueitis Infecciosa Bovina es una enfermedad distribuida en diversas regiones de México, pues un estudio realizado en Yucatán en ganado bovino criado en zonas sin antecedentes de vacunación notifico seroprevalencias 54.4% (Solis *et al.*, 2003), estudios previos reportan prevalencias de 76.32% en la zona centro de Veracruz (Abad *et al.*, 2016). Se han encontrado anticuerpos neutralizantes contra IBR, en bovinos de los estados de México, Puebla y Yucatán, a partir de bovinos con signos respiratorios que hacían sospechar de la presencia de IBR (Correa, 1988). En el caso de la región Costa de Oaxaca se reportan prevalencias de 27.87% y en la región Istmo 31.85% (Hernández *et al.*, 2013), en Tizimín, Yucatán se reportó una seropositividad del 5.33% (Calderón *et al.*, 1997), en el estado de Durango un 20% de reactores positivos.

Por otro lado, en los sistemas de producción intensiva los resultados varían considerablemente, ya que en la comarca lagunera se encontró un 84% de reactores positivos y en Tulancingo, Hidalgo un 19% de reactores positivos (Vilchis *et al.*, 1985).

En base a registros del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la SAGARPA, hasta el año 2013 la población de bovinos para carne es de 29,992,172 y de bovinos para leche de 2,410,289, obteniéndose un total de 32,402,461 a nivel nacional, siendo la segunda especie más importante del país (Palma *et al.*, 2015).

El ganado doble propósito aporta el 20% de leche y 44% de carne que se consume (Rojo *et al.*, 2009).

Aunque no están registrados los costos por pérdidas causados por la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, se puede mencionar que es una enfermedad la cual afecta directamente la producción de los ranchos causando problemas reproductivos, lo cual se traduce en menor producción de becerros para abasto y menor producción de hembras de reemplazos. Esto nos indica la importancia de mantener medidas adecuadas de medicina preventiva, nutricionales, bioseguridad y sanitarias enfocadas a disminuir pérdidas económicas por presencia de IBR y/o otras enfermedades, aunado a un diagnóstico específico de ciertas enfermedades (Palma *et al.*, 2015).

Importancia en sementales

Estudios reportan que los sementales infectados son un gran factor de transmisión, ya que el Herpes virus se puede transmitir por vía venérea (Ruiz *et al.*, 2010), tras coitos la enfermedad puede reactivarse especialmente en toros, lo cual explica los altos títulos encontrados en algunas investigaciones en machos (Schroeder, 1999), la adquisición de sementales sin control sanitario contribuye a empeorar la situación de IBR

en los hatos, en 2012 Romero Salas encontró prevalencias de 74% para IBR en unidades de producción con monta natural (Romero,2012), los toros infectados tienden a ser portadores y eliminar el virus por más de un año a pesar de que las pruebas serológicas resulten negativas (Schroeder, 1999). Un estudio realizado en la Sierra Oriente de Puebla mostro que la fertilidad de los sementales no se afectó por ninguna de las enfermedades estudiadas, incluyendo IBR, esto nos da a entender que los sementales no pueden manifestar signos clínicos, ni tan poco ser afectados en su fertilidad, sin embargo, ser animales portadores de IBR (Soto *et al.*, 2014).

En el municipio de Tonalá, Chiapas un estudio reporta una tasa de seroprevalencia en machos de 69.5%, indicándose que el 50% de los seropositivos provenían fuera del municipio de Tonalá (De los Santos *et al.*, 2013).

Un estudio en Uruguay muestra el caso de un toro Limousine el cual fue infectado naturalmente con dos subtipos de HVB-1 en un periodo de 5 años (Alonzo *et al.*, 2011).

El HVB-5 puede causar infecciones latentes en los ganglios trigeminales y paravertebrales (Davies y Duncan, 1974; Ackermann y Wyler, 1984), desde donde se reactivan, pudiendo producirse la propagación viral y provocar la contaminación del semen (Engels y Ackermann, 1996).

El virus de IBR se encuentra adosado en el capuchón cefálico del espermatozoide (Schroeder, 1999), estudios dieron como resultados el aislamiento de HVB-1 Y HVB-5 de dosis de semen de toros de casas nacionales (Argentina), así como de toros de compañías internacionales

provenientes de E.U.A, es posible que los toros de alto valor sean positivos y aun así se utilicen para I.A, ya que se manifiesta de forma subclínica, esto nos da como resultado que existe el riesgo de transmitir el virus a través del semen.

Estos resultados sugieren el realizar pruebas a los lotes de semen, así como de sementales en pie para detectar la presencia de los diferentes tipos y subtipos de HVB (Morán *et al.*, 2013).

La muestra de semen presenta algunos factores particularmente citotóxicos que impiden, en muchas ocasiones verificar la presencia del agente (Howell *et al.*, 1986).

La prueba de PCR para la detección del HVB-1 podría tener un mayor impacto en el control de calidad de programas de congelación de semen, inseminación artificial y transferencia de embriones (Rodas *et al.*, 1996).

III. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La presencia de IBR puede provocar fallas reproductivas en el ganado bovino sobre todo en el uso de sementales que pueden presentar esta enfermedad, lo que nos obliga a establecer medidas de control y vacunación de esta enfermedad.

IV. JUSTIFICACIÓN

En el presente trabajo se busca detectar la prevalencia de anticuerpos en suero sanguíneo de la rinotraqueitis infecciosa bovina y el virus en semen de los toros que se usan para la reproducción, ya que son una pieza importante y también un factor de la diseminación de la IBR, debido a que se ha recibido información por parte de los productores, de la presencia de problemas reproductivos, frecuentemente no detectados, siendo el más destacado las fallas a la concepción y vacas repetidoras que retrasan la concepción.

V. HIPÓTESIS

La prevalencia serológica a rinotraqueitis infecciosa bovina en toros sementales de ranchos comerciales de las zonas de influencia de los campos experimentales Las Margaritas, La Posta y Huimanguillo, es superior al 50%, por lo que representa un riesgo sanitario y reproductivo.

La prevalencia del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina en el eyaculado de toros sementales, es superior al 15% y representa un riesgo sanitario de transmisión por la monta natural.

En toros sementales, la relación de la prevalencia serológica a rinotraqueitis infecciosa bovina con la eliminación del virus en el eyaculado es positiva, por lo que es útil como indicador de la infección en el hato y representa un riesgo de transmisión.

VI. OBJETIVOS

VI.I. Objetivo general.

Determinar en toros sementales la prevalencia a Rinotraqueitis Infecciosa Bovina y su posible relación con la eliminación del virus en el eyaculado.

VI.II. Objetivos específicos.

Determinar la prevalencia serológica a Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en toros sementales de ranchos comerciales de las zonas de influencia de los campos experimentales Las Margaritas, la Posta y Huimanguillo.

Determinar la prevalencia de la eliminación del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en el eyaculado de toros sementales.

Determinar en toros sementales la relación de la prevalencia serológica a Rinotraqueitis Infecciosa Bovina con la eliminación del virus en el eyaculado, como indicador de la infección en el hato y como riesgo de transmisión.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

VII.I. Lugar de realización del estudio.

El trabajo se realizó en ranchos de bovinos ubicados en el trópico húmedo de Puebla, Veracruz y Tabasco, como muestra representativa de los bovinos de la región tropical. Los ranchos están ubicados en el área de influencia de los campos experimentales del INIFAP: Las Margaritas en Puebla, La Posta en Veracruz y Huimanguillo en Tabasco. En cada rancho a todos los sementales se les tomo una muestra de sangre y de semen. A las muestras de sangre se obtuvo el suero para determinar anticuerpos contra el virus de la IBR. A las muestras de semen se les determino la presencia del virus de la IBR.

VII.II. Captura de datos.

La captura de datos se hará en libretas de campo y libros electrónicos para registrar la información para su conservación y su análisis.

VII.III. Obtención y análisis de las muestras de semen

A cada semental de cada rancho se les tomo una muestra de semen (3 ml) del eyaculado que se obtuvo por el método de electroeyaculación, estas muestras se mantuvieron en frío en una hielera con congelantes a una temperatura entre 4°C y 6°C. Al llegar al laboratorio, las muestras de semen se almacenaron en viales de 6 ml con tapón y se conservaron en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis en laboratorio. Las muestras de semen fueron analizadas por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para detectar antígenos del virus de la IBR.

VII.IV. Obtención y análisis de las muestras de suero sanguíneo

A cada semental de cada rancho se les tomo una muestra de sangre para la obtención de suero. Las muestras de sangre se tomaron de la vena coccígea y se conservaron en frío en una hielera con congelantes de 4°C a 6°C hasta llegar al laboratorio, donde fueron centrifugadas a 3000 rpm en 10 min y obtener el suero (3 ml) que se conservó en viales de 6 ml con tapón en congelación a -20°C hasta el momento de su análisis en laboratorio. Las muestras de suero fueron analizadas por la técnica de ELISA para detectar anticuerpos contra el virus de la IBR.

VII.V. Análisis estadístico

Las prevalencias de anticuerpos en sangre para rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) se consideraron como características binarias (0, 1), por lo que se registraron como 1 cuando el semental resultó seropositivo a la prueba de ELISA; en caso contrario, se registraron como 0. EL modelo estadístico para analizar las prevalencias de anticuerpos en sangre, incluyó los factores de riesgo estado, rancho anidado en estado y genotipo del semental. Los análisis de regresión logística se realizaron por característica, con el procedimiento GENMOD (PROC GENMOD) del paquete computacional SAS (2013), asumiendo una función liga logit para la distribución binomial. El criterio de convergencia aplicado durante el análisis estadístico fue 10-8.

El grado de asociación entre la presencia de anticuerpos en sangre y de antígenos en semen, para rinotraqueitis infecciosa bovina, fue determinado con el coeficiente de correlación de Pearson. En el caso de variables binarias, dicho coeficiente es equivalente al coeficiente phi, también llamado coeficiente de correlación de Mathews, el cual se calcula para tablas de contingencia 2x2. Los coeficientes de correlación de Pearson, así

como la significancia estadística de los mismos para determinar si eran diferentes de cero, se calcularon utilizando el procedimiento CORR (PROC CORR) del paquete computacional SAS (2013).

VIII. RESULTADOS

Los factores de riesgo para estado, rancho anidado en estado y genotipo del toro no afectaron las prevalencias de anticuerpos en suero para Rinotraqueitis Infecciosa Bovina ($P > 0.05$; Cuadro 1).

Cuadro 1. Significancia estadística de los factores de riesgo incluidos en el modelo para analizar Rinotraqueitis Infecciosa Bovina.

Factor de riesgo	Grados de libertad	Chi-cuadrada	Significancia
Estado	2	1.80	0.4064
Rancho(Estado)	12	8.17	0.6124
Genotipo	2	3.18	0.2038

En el Cuadro 2, se presentan las medias de cuadrados mínimos y sus errores estándar para prevalencia de anticuerpos en suero de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, por estado de la república. Las prevalencias fueron: 0.83 ± 0.07 , 0.66 ± 0.18 , y 0.70 ± 0.10 para los estados de Puebla, Tabasco y Veracruz, respectivamente, sin ser diferentes estadísticamente ($P < 0.05$).

Cuadro 2. Medias de cuadrados mínimos y sus errores estándar e intervalos de confianza al 95% (IC 95%) para prevalencia de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, por estado.

Estado	No. de toros	Media \pm error estándar	IC 95%
Puebla	34	0.83 ± 0.07^a	0.63 - 0.93
Tabasco	11	0.66 ± 0.18^a	0.29 - 0.90
Veracruz	29	0.70 ± 0.10^a	0.47 - 0.86

^a Las medias no son estadísticamente diferentes ($P > 0.05$).

Las medias de cuadrados mínimos y sus errores estándar para prevalencia de anticuerpos en suero de rinotraqueitis infecciosa bovina, por rancho, se

presentan en el Cuadro 3. El intervalo de prevalencias fue de 0.28 (Rancho 3) a 0.90 (Ranchos 4, 5 y 7); con prevalencias intermedias de 0.46 (Rancho 8) y 0.58 (Rancho 9). Las prevalencias por rancho no fueron diferentes estadísticamente ($P>0.05$).

Cuadro 3. Medias de cuadrados mínimos y sus errores estándar e intervalos de confianza al 95% (IC 95%) para prevalencia de rinotraqueitis infecciosa bovina, por rancho.

Rancho	No. de toros	Media \pm error estándar	IC 95%
1 ^b	2	0.71 \pm 0.31 ^a	0.11 - 0.98
2 ^b	6	0.88 \pm 0.12 ^a	0.43 - 0.99
3 ^b	3	0.28 \pm 0.27 ^a	0.03 - 0.84
4 ^c	6	0.90 \pm 0.11 ^a	0.47 - 0.99
5 ^c	6	0.90 \pm 0.11 ^a	0.47 - 0.99
6 ^c	7	0.82 \pm 0.18 ^a	0.30 - 0.98
7 ^c	7	0.90 \pm 0.10 ^a	0.48 - 0.99
8 ^c	8	0.46 \pm 0.20 ^a	0.15 - 0.80
9 ^d	12	0.58 \pm 0.17 ^a	0.27 - 0.84
10 ^d	4	0.72 \pm 0.25 ^a	0.18 - 0.97
11 ^d	3	0.76 \pm 0.24 ^a	0.19 - 0.98
12 ^d	3	0.58 \pm 0.31 ^a	0.10 - 0.94
13 ^d	7	0.81 \pm 0.14 ^a	0.40 - 0.97

^a Las medias no son estadísticamente diferentes ($P>0.05$).
Ranchos del estado de Tabasco ^b, Puebla^c y Veracruz ^d, respectivamente.

En el Cuadro 4, se presentan las medias de cuadrados mínimos y sus errores estándar para prevalencia de anticuerpos en suero de rinotraqueitis infecciosa bovina, por genotipo del toro. Las prevalencias fueron: 0.79 \pm 0.10, 0.54 \pm 0.13 y 0.84 \pm 0.12 para los genotipos Cebú, Cruza y Europeo, respectivamente y no fueron diferentes estadísticamente ($P>0.05$).

Cuadro 4. Medias de cuadrados mínimos y sus errores estándar e intervalos de confianza al 95% (IC 95%) para prevalencia de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, por genotipo.

Genotipo	No de toros	Media \pm error estándar	IC 95%
Cebú	33	0.79 \pm 0.10 ^a	0.52 - 0.92
Cruza	29	0.54 \pm 0.13 ^a	0.30 - 0.76
Europeo	12	0.84 \pm 0.12 ^a	0.46 - 0.97

^a Las medias no son estadísticamente diferentes (P>0.05).

En el cuadro 5, se muestra el coeficiente de correlación de Pearson y su significancia estadística para anticuerpos en suero y antígenos en semen para la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBRac-IBRag). Los resultados indican que no hubo correlación entre positividad a anticuerpos en suero con la positividad a antígenos en semen (coeficiente de correlación 0.07 y significancia P>0.05).

Cuadro 5. Coeficiente de correlación de Pearson y su significancia estadística para anticuerpos en sangre y antígenos en semen para Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBRac-IBRag).

	IBRac-IBRag
Coeficiente	0.07
Significancia	P>0.05

Finalmente, en el cuadro 6, se muestra el promedio de la prevalencia a antígenos en semen de sementales evaluados en Puebla, Tabasco y Veracruz, siendo de 0.70 para Puebla, de 0.35 para Tabasco y 0.54 para Veracruz; sin embargo, las cuales son considerablemente altas para no

existir correlación entre positividad a anticuerpos en suero con la positividad a antígenos en semen para la IBR (coeficiente de correlación 0.07 y significancia $P>0.05$).

Cuadro 6. Promedio de la prevalencia a antígenos en semen de sementales evaluados en Puebla, Tabasco y Veracruz.

Estado	No. de toros	Prevalencia promedio
Puebla	34	0.70
Tabasco	11	0.35
Veracruz	29	0.54
Total	74	0.58

IX.- DISCUSIÓN

Las enfermedades reproductivas virales como la IBR se encuentran ampliamente distribuidas por todo el mundo. Desde tiempo atrás, diversos estudios lo han manifestado (Motta *et al.*, 2013). En Europa, desde la década de los 60's se han reportado casos de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) en diversos países, principalmente en Alemania (Gibbs y Rweyemamu, 1977).

Los resultados de esta tesis en cuanto a la prevalencia de anticuerpos a IBR en toros (73%), son mayores al 69.5% documentado en ganado doble propósito en ranchos ubicados en Tonalá, Chiapas (De Los Santos *et al.*, 2013); sin embargo, son menores al 75.97% obtenido de sementales de ranchos ubicados en la Sierra Oriente de Puebla (Soto *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos de las prevalencias por estados: Puebla (83%), Tabasco (66%) y Veracruz (70%), son mayores al 54.4% reportado en Yucatán (Solis *et al.*, 2003) y a los reportados en las regiones Istmo (31.58%) y Costa (27.87%) del estado de Oaxaca (Hernández *et al.*, 2012); sin embargo, nuestros resultados por estado son menores al 85.51% reportado en el departamento de Antioquia, Colombia (Ruiz *et al.*, 2010).

Las prevalencias en los 13 ranchos muestreados nos muestran la prevalencia más baja de 28% para el rancho 3 en Tabasco y las más altas de 90% en los ranchos 4, 5 y 7 en el estado de Puebla, son mayores al rango de 4.71 a 66.66% en 8 ranchos muestreados en la Sierra Oriente de Puebla (Soto *et al.*, 2014) y al rango de 10.81 a 15% en 4 ranchos muestreados en el estado de Campeche (Córdova *et al.*, 2007). Es de

importancia señalar que en estos estudios el número de ranchos fue menor al de esta tesis y que se evaluaron más genotipos de sementales.

Los resultados promedio en cada uno de los cuadros que abordan la seropositividad de anticuerpos fue: 73% por estado, 71% por número de toros por ranchos y 72% por genotipo.

En nuestro estudio se analizaron 74 toros, cantidad similar a los 76 toros utilizados en trabajos de otros países como en Brasil (Oliveira *et al.*, 2011), en México solo De los Santos *et al.* (2012) y Soto *et al.* (2014) reportan 23 y 37 sementales respectivamente.

Estudios realizados en sementales utilizados para monta natural en Colombia dieron resultados similares a los obtenidos en este trabajo, ya que se reportaron prevalencias de 67.6% en toros del municipio de Urabá y en 9 municipios del Valle del Cauca se realizaron 2 muestreos con 2 meses de tiempo entre muestreos donde se obtuvieron resultados de 73.43% y 75%, respectivamente, para cada muestreo (Peña *et al.*, 2011). Abad *et al.* (2016) en su trabajo hacen mención al manejo sanitario, introducción de hembras positivas, la nula utilización de vacunas contra esta enfermedad, mal manejo de residuos como placentas, falta de limpieza en las instalaciones, la adquisición de sementales sin control sanitario, como puntos que contribuyen a la presencia de esta enfermedad.

Sharma y Yadav. (2013) abordaron que las pasturas donde se tienen estos animales es un factor clave en estos resultados ya que es la forma de alimentación en el ganado de las regiones donde se realizaron los respectivos estudios, esto puede convertirse en otro medio de transmisión

debido a que las pasturas pueden ser contaminadas por las secreciones oculares, respiratorias e inclusive reproductivas de bovinos portadores; por lo tanto, al pastorear el ganado puede consumir estas pasturas contaminadas.

En esta tesis, el genotipo europeo fue el de mayor prevalencia con un 84%, en comparación con el cebú con 79% y las cruzas con 54%, esto puede explicarse por los resultados de esta tesis, que ponen de manifiesto que el genotipo europeo presenta menos adaptación y más sensibilidad a la IBR, mientras que las cruzas al tener sangre cebú demostraron tener mayor tolerancia.

Sin embargo, al ser una enfermedad de transmisión venérea, en este estudio se planteó obtener una relación entre los anticuerpos presentes en suero y la eliminación del virus en el semen, estudios anteriores comprueban que es posible identificar la presencia del virus tanto de sementales de centros de inseminación de diferentes países, como de sementales los cuales son utilizados para monta natural (Oliveira *et al.*, 2011); de tal manera que, en Argentina se lograron aislar diversos tipos de BHV, en dosis de semen de casas comerciales nacionales y extranjeras (Moran *et al.*, 2013).

Los resultados del análisis por PCR nos dieron un 58% de muestras positivas a virus de IBR en el semen, estos resultados son menores al 100% de 76 muestras de semen de toros de los estados de Rio Grande Do Sul y Goiás (Oliveira *et al.*, 2011).

El resultado arrojado por el coeficiente de correlación de Pearson 0.07 y su significancia estadística ($P > 0.05$) para anticuerpos en sangre y antígenos en semen para la rinotraqueitis infecciosa bovina, nos demostró una correlación baja entre la relación antígeno-anticuerpo, resultando en que no siempre que el semental demuestre tener anticuerpos en sangre, eliminará el virus en el semen.

Sin embargo, esto puede explicarse ya que muchos factores pueden intervenir para la excreción o reactivación del virus, un factor es el estrés por malos manejos, estrés calórico, entre otros, la inmunosupresión debida a tratamientos con corticoides, el tiempo y tipo de infección ya que en el caso de infecciones respiratorias el virus de IBR se replica en las células epiteliales, para después trasladarse a los tejidos oculares, pudiendo esto explicarse en que la infección generalizada no llega a los órganos reproductores. Por otro lado, en la vacunación con virus vivo modificado también se ha reportado la excreción del virus en el semen, así como un buen estado inmunológico del semental puede disminuir la replicación del virus y por lo tanto que en el momento de la formación del semen no sea contaminado, otra posible causa podría ser el manejo del ternero, en contacto con animales positivos y su posible infección a esta enfermedad (Duque *et al.*, 2014; Gregersen *et al.*, 2012; Alonzo *et al.*, 2011).

Debido a estas altas prevalencias y a que la IBR puede ser transmitida por vía venérea y causan problemas reproductivos como abortos o vacas repetidoras, es importante generar una campaña de control para IBR a nivel nacional.

Otra alternativa es mejorar el manejo sanitario, calendarizando los programas de vacunación en los hatos, principalmente antes de introducir tecnologías reproductivas, como en Brasil, donde antes de aplicar las biotecnologías reproductivas fue primordial la vacunación contra el complejo reproductivo (Sá Filho *et al.*, 2013).

Finalmente, en este trabajo se demostró la presencia de anticuerpos en sangre para IBR y eliminación del virus de IBR en el semen de toros utilizados para monta natural en ranchos de la zona de influencia de los campos experimentales las Margaritas en Puebla, Huimanguillo en Tabasco y La Posta en Veracruz. Por lo tanto, se considera que estos resultados serán de gran utilidad para que cuando el productor adquiera un semental, cuente con un certificado negativo a IBR, de tal manera que no se introduzcan sementales persistentemente infectados a los hatos, ya que se fomentarían los problemas reproductivos mencionados por los productores cooperantes de este estudio.

X.-CONCLUSIONES

La prevalencia de anticuerpos contra IBR en suero sanguíneo fue mayor a 50%, considerando los 3 factores de riesgo rancho, rancho anidado por estado y genotipo, comprobándose la primera hipótesis.

Los resultados no mostraron un coeficiente de correlación de anticuerpos en suero con antígenos en semen (IBRac-IBRag), probablemente causado por la especificidad y sensibilidad de los ensayos, lo que quiere decir que la presencia del virus en el semen, no se correlaciona con la prevalencia de anticuerpos en suero sanguíneo.

La eliminación del virus en el semen nos demostró la presencia de sementales en el hato, como factor importante para diseminar esta enfermedad.

Dado los problemas reproductivos reportados por los ganaderos, así como los efectos negativos en la fertilidad de las hembras, resulta de gran importancia, identificar el virus en semen de los sementales y proponer en el hato un control y vacunación.

En la actualidad los movimientos migratorios de animales y personas han permitido eliminar barreras, lo que ha fomentado la diseminación de estos virus y de otras enfermedades; así como también la introducción indiscriminada de animales y de semen de otros países poniendo en riesgo la salud animal de este país.

XI.- BIBLIOGRAFÍA

- Abad J, Ríos A, Rosete JV, García A, Zárate JP. 2016. Prevalencia de Rinotraqueitis infecciosa bovina y diarrea viral bovina en hembras en tres épocas del año en la Zona Centro de Veracruz. Revista Electrónica Nova Scientia. 8(16):213-227.
- Ackermann M, Engels M. 2006. Pro and contra IBR-eradication. Vet Microbiol. 113(3-4):293-302.
- Ackermann M, Wyler R. 1984. The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after introvaginal infection. Vet Microbiol. 9(1):53-63.
- Alonzo P, Puentes R, Benavides U, Esteves PA, Silva AD, Roehe PM, Maisonnave J. 2011. Infección natural de un toro con dos subtipos diferentes de Herpesvirus bovino tipo 1. Veterinaria (Montevideo), Uruguay. 48(184):5-10.
- Amstrong JA, Pereita HG, Andrewers CH. 1961. Observations on the virus of infectus bovine rhinotracheitis and its affinity with the herpesvirus. Virology. 14: 276-285.
- Arboleda J, Bedoya J, Rodas J, Acevedo J, Ossa J. 1993. Estudio virológico y epidemiológico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en un hato lechero en Antioquia. Acovez. 34-35.

- Babiuk LA, Van Drunen Littlel-Van den Hurk S, Tikoo SK. 1996. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet. Microbiol.* 53(1-2):31-42.
- Barbosa ACVC, Brito WMED, Alfalfa BT. 2005. Soroprevalencia e factores de risco para a infeccao pelo herpesvírus bovino tipo 1(BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. *Ciencia Rural.* 35(6): 1368-1373.
- Bracho CA, Jaramillo ACJ, Martínez, MJJ, Montañó HJA, Olguín BA. 2006. Comparación de tres pruebas diagnósticas para el aborto por rinotraqueitis infecciosa bovina en hatos lecheros. *Veterinaria México.* 37: 151-163.
- Baugust TJ, Clark L. 1972. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J. Comp. Pathol.* 82(4): 375-382.
- Betancur B, González RL. 2006. Seroepidemiología de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en el Municipio de Montería, Colombia. *Rev MVZ Córdoba.* 11(2):830-836.
- Bezerra DC, Chaves NP, Sousa VE, Santos HP, Pereira HM. 2012. Fatores de risco asociados a infeccao pelo Herpesvírus Bovino Tipo 1 em rebanhos bovinos leiteiros da regio amazónica maranhense. *Arq Inst Biol.* 79(1):107-111.
- Bielanski A, Dubuc C. 1994. In vitro fertilization and culture of ova from heifers infected with bovine herpesvirus-1(BHV-1). *Theriogenology.* 41(6):1211-1217.

- Bielefeldt OH, Babiuk LA. 1985. Viral bacterial pneumonia in calves: effect of bovine herpesvirus-1 on immunological functions. *J. Infect. Dis.* 151(5):937-947.
- Boelaert F, Speybroeck N, de Kruif A, Aerts M, Burzykowski T, Molenberghs G, Berkvens DL. 2005. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. *Prev Vet Med.* 69(3-4):285-302.
- Calderón VG, Alvarado IA, Vilchis MC, Aguilar SA, Batalla CD. 1997. Detección de seropositividad al virus de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) en ganado del Municipio de Tizimín, Yucatán, México. *Tec Pec Méx.* 35(3):161-164.
- Cardozo E, Banchemo LA, Guarino H, Diana V, Lozano A. 2008. Análisis de la asociación de Queratoconjuntivitis Bovina Infecciosa con Herpes Virus-1, en terneros de tres meses a un año de edad en el Uruguay. *Veterinaria.* 44(172):17-21.
- Celedón MO, Vargas C, Salinas A, Casanova A, Ibarra L, Berríos P. 1996. Prevalencias serológicas para el virus de la diarrea viral bovina y de la rinotraqueitis infecciosa bovina en predios lecheros de la Región Metropolitana de Chile. *Av Cs Vet.* 11(2):75-80.
- Cerqueira RB, Carminati R, Silva JM, Soares GC, Meyer R, Sardi S. 2000. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 37(6):1-6.

Chiaroni J. 1998. Terminologie numérique des antigens de groupes sanguins érythrocytaires. *Transfusion Clinique et Biologique*. 5(5):366-371.

Córdova A, Córdova CA, Córdova MS, Saltijeral JA, Ruiz CG, Xolalpa VM, Cortés S, Guerra JE. 2007. Seroprevalencia de enfermedades causantes de aborto bovino en el trópico húmedo mexicano. *Rev. Vet.* 18(2):139-142.

Correa, G. 1988. Complejo Reproductivo Bovino. Pp. 45-90. En Correa, G. *Enfermedades Virales de los Animales Domésticos Poligástricos*. 5ª. Ed. Paradigmas. D.F, México.

Davies DH, Duncan JR. 1974. The pathogenesis of recurrent infections with infectious bovine rhinotracheitis virus induced in calves by treatment with corticosteroids. *Cornell Vet.* 64(3):340-366.

Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC. 2009. The order Herpesvirales. *Arch Virol.* 154(1): 171-177.

De los santos MC, Orantes MA, Sánchez B, Manzur A, Cruz JL, Ruiz JL, Purroy R. 2013. Determinación de anticuerpos de IBR mediante la técnica de ELISA en la zona Paredón- Boca del Cielo, Tonalá, Chiapas. *Que hacer Científico en Chiapas*. 8(1):31-34.

- Depauli FJ, Sabina LR. 1972. Studies of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Archiv. F. Ges. Virus forschung. Archiv für die gesamte Virusforschung.* 36(3-4):380-390.
- Di Santo MI, Jorge MC, Catena MC, Estela ES, Ardo DA. 1995. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina. *Therios.* 24(123):143-166.
- Dias JA, Alfieri AA, Ferreira-Neto JS, Goncalves VSP, Muller EE. 2013. Seroprevalence and Risk Factors of Bovine Herpes Virus 1 infection in Cattle Herds in the State of Paraná, Brazil. *Transboundary and Emerging Dis.* 60(1): 39-47.
- Duque D, Estévez JNR, Abreu AM, Moncada M, Durango J, Molina D. 2014. Aspectos sobre Rinotraqueitis Infecciosa Bovina. *Journal of Agriculture and Animal Sciences.* 3(1):58-71.
- Elhassan AM, Fadol MA, El-Hussein AM. 2011. Seroprevalence of Bovine Herpes Virus-1, Bovine Herpes Virus-4 and Bovine Viral Diarrhea Virus in Dairy Cattle in Sudan. *Pak Vet J.* 31(4):317-320.
- Eluzhary MA, Lamothe P, Silim A, Roy RS. 1980. Bovine Herpesvirus Type 1 in the Sperm of a Bull From a Herd With Fertility Problems. *Can. Vet. J.* 21(12):336-339.
- Engels M, Ackermann M. 1996. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol.* 53(1-2): 53-63.

- Felmer R, Zúñiga J, López A, Miranda, H. 2009. Prevalencia y distribución espacial de Brucelosis, Leucosis Bovina, Diarrea Viral Bovina y Rinotraqueitis infecciosa bovina a partir del análisis ELISA de estanques prediales en lecherías de la IX Región, Chile. Arch Med Vet. 41:17-26.
- Fernández, FM. 2007. Programa sanitario de ADSG en Cantabria. Control de IBR. Conferencia en las I Jornadas sobre control y erradicación de IBR. Lugo. España.
- Fung, M.K. 2003. Technical Manual. Detección de antígenos y anticuerpos. Pp.350-357. En Fung, M.K. Technical Manual. 14th. Ed. AABB. Bethesda, Maryland.
- Gasque, G.R.2008. Rinotraqueitis infecciosa bovina.pp.216-218. En Gasque, G.R. Enciclopedia Bovina. 1ª. Ed. UNAM. D.F, México.
- George LW, Ardans A, Mihalyi J, Guerra MR. 1988. Enhancement of infectious bovine keratoconjunctivitis by modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine. Am. J. Vet. Res. 49(11): 1800-1806.
- Gregersen JP, Wagner K. 1985. Persistent infection of the Genital Tract and Excretion of the vaccine Strain after Live Virus Immunization with Bovine Herpesvirus 1 (IBR/IPV virus). Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B.32:1-10.
- Gibbs EPJ, Rweyemamu MM. 1977. Bovine Herpesviruses. Vet Bulletin. 47(1):317-332.

- Gomes LI, Rocha MA, Souza JG, Costa EA, Barbosa-Stancioli EF. 2003. Bovine Herpesvirus 5(BoHV-5) in bull semen: amplification and sequence analysis of the us4 gene. *Vet Res Commun.* 27(6):495-504.
- Griffiths, I.B; Gallego, M.I; Villamil, L.C. 1982. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina.pp.168. En Griffiths, I.B; Gallego, M.I; Villamil, L.C. Factores de infertilidad y pérdidas económicas en Ganado de leche en Colombia.1ª.Ed.Publicaciones ICA, Bogotá, Colombia.
- Guzmán VE. 2004. Las pruebas de Elisa. *Gaceta Médica de México.* 140(3):48-49.
- Gür S, Dogan N. 2010. The possible role of bovine herpesvirus type-4 infection in cow infertility. *Animal Sci J.* 81(3):304-308.
- Hardening, M.D. 1994. Compatibility testing. Pp.256-275. En Hardening, M.D. Modern blood banking and transfusion practices. 6ª. Ed. F.A. Davies Company. Filadelfia, Pensilvania, E.U.A.
- Hernández BEG, Gutiérrez HJL, Herrera LE, Palomares R.E.G & Díaz A.E. 2013. Frecuencia de Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Leptospirosis y Brucelosis, en las 2 regiones ganaderas más importantes de Oaxaca. XXXIX Congreso Nacional de Buiatría. pp. 87-92.
- Herschhom A, Hizi A. 2010. Retroviral reverse transcriptases. *Cell Mol Life Sci.* 67(16):2717-2747.

- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 10(4): 413-417.
- Hochstein-Mintzel V, Reinhardt G, Riedemann S, Niedda M. 1986. Serología de rinotraqueitis Infecciosa bovina (IBR) en 21 predios de la Décima Región de Chile. *Arch Med Vet*. 18: 53-56.
- Howell CL, Miller MJ, Bruckner DA. 1986. Elimination of toxicity and enhanced cytomegalovirus detection cell cultures inoculated with semen from patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*. 24(4): 657-660.
- Kendrick WK. 1973. Effects of the infectious bovine Rhinotracheitis virus on the fetus. *J. Amer. Vet. Med. Ass*. 163:852-854.
- Kupferschmied HU, Kihm U, Bachman P, Muller KH, Ackerman M. 1986. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report. *Theriogenology*. 25(3):439-443.
- Kucera LS, Myrvik QN. 1985. Chapter 3.pp.27-49. En Kucera LS, Myrvik QN. *Fundamentals of medical virology*. 2^a. Ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Lager IA, Fondevila N, Sadir AM, Fernández F, Schudel AA. 1981. Rinotraqueitis infecciosa bovina (HVB-1) I: Aislamiento y

caracterización biológica del agente etiológico (L-114). Rev. Med. Vet. 62: 404-410.

Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. J Vis Exp. 20(62):3923.

Martínez CPJ, Riveira SIM. 2008. Antecedentes, generalidades y actualización en aspectos de patogénesis, diagnóstico y control de la diarrea viral bovina (DVB) y rinotraqueitis infecciosa bovina. Tesis Licenciatura en Microbiología Agrícola y Veterinaria. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá D.C. Colombia.

Meyer G, Lemaire M, Ros C, Belak K, Gabriel A, Cassart D, Coignoul F, Belak S, Thiry E. 2001. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpes virus type 1 and 5. Arch Virol. 146(4):633-652.

Miller JM, Whetstone CA, Bello LJ, Lawrence WC. 1991. Determination of ability of a thymidine kinase-negative deletion mutante of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. Am. J. Vet. Res. 52(7):1038-1043.

Misra V, Gilchrist JE, Weinmaster G, Qualtiere I, Van Den Hurk S, Babiuk LA. 1982. Herpesvirus induced "early" glycoprotein: characterization and possible role in immune cytolysis. J. Virol. 43(3):1046-1054.

- Morán PE, Favier PA, Lomónaco M, Catena MC, Chiapparrone ML, Odeón AC, Verna AE, Pérez SE. 2013. Search for the genome of bovine herpesvirus types 1, 4 and 5 in bovine semen. *Open Veterinary Journal*. 3(2):126-130.
- Motta JL, Waltero I, Abeledo MA, Fernández O. 2013. Prevalencia de anticuerpos al virus de la diarrea viral bovina, Herpesvirus bovino 1 y Herpesvirus bovino 4 en bovinos y búfalos en el Departamento de Caquetá, Colombia. *Rev. Salud Anim*. 35(3):174-181.
- Nuotio L, Neuvonen E, Hyytiäinen M. 2007. Epidemiology and eradication of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 49 (3): 1-6.
- Ochoa X, Orbegozo M, Manrique F, Pulido M, Ospina J. 2012. Seroprevalencia de Rinotraqueitis infecciosa bovina en hatos lecheros de Toca – Boyacá. *Rev. MVZ Córdoba*. 17(2):2974-2982.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2004. 5ª. Ed. OIE, Paris. 1178 p.
- Palma, Z.M., López, P.T.J., Martínez, N.J.C., Juárez, R.S., Posadas, M. E & Sarmiento, S.R.E. 2015. Importancia de la estandarización de una técnica de PCR Tiempo Real para la identificación y cuantificación de los virus bovinos DVB, HVB-1, PIB-3, RSB y LVB. XXXIX Congreso Nacional de Buiatría. pp. 122-127.

- Peña MA, Góngora A, Jiménez C. 2011. Infectious agents affecting fertility of bulls, and transmission risk through semen. Retrospective analysis of their sanitary status in Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 24:634-646.
- Piedrahita LE, Montoya LM, Pedraza FJ. 2010. Herpes Virus Bovino tipo 1 (BoHV-1) como posible causa de encefalitis en bovinos de la región del Magdalena Medio Colombiano. Estudio serológico y análisis epidemiológico. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 23:191-198.
- Posado R, Bartolomé D, San Miguel JM, García JJ. 2013. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina y Virus Respiratorio Sincitial Bovino en ganado de lidia en Salamanca. España. *Arch. Zootec.* 62(238):181-190.
- Repiso MV, Gil A, Báñales P, D'Anatro N, Fernández L, Guarino H, Herrera B, Núñez A, Olivera M, Osawa T, Silva M. 2005. Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria.* 40(157):5-28.
- Rissi DR, Rench RR, Flores EF, Kohmers GD, Barros CS. 2007. Meningoencefalitis por herpes virus bovino 5. *Pesq. Vet. Bras.* 27:251-260.
- Rodas JD, Zuluaga FN, Ossa JE. 1996. Estandarización de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del herpesvirus bovino-1(HVB-1) en semen. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 9(2):44-52.

- Roizman B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. 1992. The family Herpesviridae: an update. Arch. Virol. 123(3-4): 425-449.
- Rojo RR, Vazquez JF, Perez HP, Mendoza MGD, Salem MAZ, Albarrán PB, González RA, Hernández MJ, Rebollar RS, Cardoso JD, Dorantes CEJ, Gutiérrez CJG. 2009. Dual purpose cattle production in Mexico. Trop Anim Health Prod. 41: 715-721.
- Romero-Salas, D. 2012. Enfermedades que causan abortos en la ganadería bovina. Folleto Técnico No.1. Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Veracruz, Ver. 44 p.
- Ruiz J, Jaime J, Vera VJ. 2010. Prevalencia serológica y aislamiento del Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) en hatos ganaderos de Antioquia y del valle del Cauca. Rev. Colomb Cienc Pecu. 23:299-307.
- Sá Filho MFL, L. Vieira CM, Martins CA, Rodriguez PS. 2013. New approaches in superovulation programs and embryo transfer in Brazil. Curso Internacional de Biotecnologías Reproductivas en Ganadería Tropical. pp. 1-9.
- Schroeder, W.H. 1999. IBR-IPV y Reproducción. pp. 825-833. En Schroeder, W.H. Fisiopatología Reproductiva de la vaca. 1ª. Ed. Celsus. Bogotá, Colombia.

- Smith KC. 1997. Herpesviral abortion in domestic animals. *Veterinary Journal*. 153(3):253-268.
- Snowder GD, Van Vleck LP, Cundiff LV, Bennett GL, Koohmaraie M, Dikeman ME. 2007. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Phenotypic, environmental, and genetic correlations with growth, carcass, and longissimus muscle palatability traits. *Journal of animal science*. 85(8): 1885-1892.
- Solis-Calderón JJ, Segura VM, Segura JC, Alvarado IA. 2003. Seroprevalence of and risk factors for Infection Bovine Rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. *Prev Med Vet*. 57(4):199-208.
- Soller EL, Esterday BC. 1968. Growth of infectious bovine rhinotracheitis virus in organ cultures. *American journal of veterinary research*. 29(7):1355-1362.
- Soto J., R. 2014. Prevalencia de anticuerpos a IBR, BVD, Leptospirosis y Neosporosis y su relación con la fertilidad en sementales bovinos productores de carne del subtrópico húmedo de Puebla. Tesis de Licenciatura. Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Tecamachalco, Puebla, Mexico.90 p.
- Tamay dDL, Ibarra C, Velasquillo C.2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. 2(2):70-78.

- Thiry E, Pastoret PP. 1984. Le virus de la rhinotracheite infectieuse bovine (bovine herpesvirus 1): Aspects Biochimiques. *Am. Reck. Vit.* 15(4):455-465.
- Tolga TM, Yacup Y, Nural E, Burak GE. 2006. The seroprevalence of Bovine Herpesvirus type 1(BHV-1) and Bovine Leukemia Virus (BLV) in selected dairy cattle herds in Aydin province, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.* 30: 353-357.
- Valasek M.A, Repa, JJ. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in physiology education.* 29(3):151-159.
- Van Drunen Little-Van Den Hurks, Gifford GA, Babiuk LA. 1990. Epitope specificity of the protective immune response induced by individual bovine herpesvirus-1 glycoproteins. *Vaccine.* 8(4):358-368.
- Van Drunen Little-Van Den Hurks, Tikoo SK, Liang X, Babiuk LA. 1993. Bovine herpesvirus-1 vaccines. *Immunol Cell Biol.* 71:405-420.
- Van Oirschot JT, Straver PJ, Van Lieshout JA, Quak J, Westenbrink F, Van Exsel AC. 1993. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *The Veterinary Record.* 132(2):32-35.
- Vilchis MC, Susana MV, Rosales BC, Aguilar SA, Vargas LJ, Peña ML. 1985. Estudio epizootologico de la rinotraqueitis infecciosa bovina en Ganado productor de leche y productor de carne. *Téc. Pec. Méx.* 49:106-115.

Watson JD, Crick FH. 1953. A structure for desoxyribose nucleic acid. Nature. 2(3):1-7.

Winkler MTC, Doster A, Jones C. 1999. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4 (+) T lymphocytes and induced programmed cell death during acute infection of cattle. J Virol. 73(10):8657-8668.

Wyler, R; Engels, M; Schwyzer, M. 1989. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis BHV-1. Pp. 1-72. En Wyler, R; Engels, M; Schwyzer, M.

Wyttman, G. 1989. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis BHV-1. pp.1-72. En Wyttman, G. Herpesvirus disease of cattle, horses and pig. 1^a. Ed. Kluwer Academics Publisher. Boston, Massachusetts, E.UA.

Yates WDG. 1982. A review of infectious Bovine Rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. Can. J. Comp. Med. 46(3):225-263.