

## Encuesta virológica de herpesvirus bovino-1 (HVB-1) en la Feria de Ganados de Medellín:

RESTREPO M MV., RODAS JD MV.\*MS,  
MOGOLLÓN M LIC. BIOL., ZULUAGA FN MV.MS\*, OSSA JE, MV. PHD.\*

### Resumen

*Con el objeto general de contribuir a la caracterización de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Colombia, intentamos aislar el HVB-1 a partir de 716 hisopados nasales, vaginales o prepuciales tomados de 480 bovinos, en la feria de ganados de Medellín, bajo el supuesto de que el estrés del largo viaje desde diferentes sitios geográficos del país y el ayuno al que son sometidos estos animales, favoreciera la excreción viral. Se hicieron 1044 intentos de aislamiento, 328 de ellos correspondieron a reinoculaciones o pases ciegos de las mismas muestras y en ningún caso se obtuvo evidencia de la presencia del virus.*

*Adicionalmente se tomaron 38 hisopados nasales, vaginales o prepuciales a partir de bovinos de hatos seropositivos de la costa norte de Colombia (Municipio de Magangué-Departamento de Bolívar), de haciendas con alta incidencia de aborto. En estos animales el porcentaje de seropositividad por la técnica de ELISA fue de 67%, sin embargo, tampoco en estas muestras fue posible aislar el virus; a pesar de que por técnicas de PCR, hubo evidencia de la presencia del virus en el semen de 3 toros seropositivos.*

*Es necesario continuar esta línea de trabajo para definir el verdadero impacto de esta infección en el país y muy particularmente para hacer la caracterización bioquímica de las cepas virales autóctonas y su comportamiento desde el punto de vista patológico.*

### Introducción

La Rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB) es una enfermedad producida por un virus de la familia Herpesviridae.

La sintomatología asociada con RIB es muy variada: generalmente respiratoria y genital, con rinotraqueitis, vulvovaginitis o balanopostitis, aborto y, ocasionalmente, encefalitis, nefritis, mastitis, conjuntivitis. La enfermedad fué reconocida inicialmente en Colorado, Estados Unidos, a finales de los años cuarenta y el virus fue aislado por primera vez en el año de 1956 en ese mismo país (6,12).

Hasta 1967 se pensó que Suramérica estaba libre de la enfermedad, pero debido a las importaciones de animales procedentes de países infectados, al carácter

latente de la infección y a la comercialización de vacunas a virus vivo, poco a poco el virus de la RIB se ha ido extendiendo. La presencia del virus en Suramérica se comprobó por primera vez en el Perú, mediante el aislamiento viral de bovinos procedentes de Norteamérica (7,10,14).

Las investigaciones realizadas en Colombia en relación con este agente viral han permitido su aislamiento en varias oportunidades: en 1972, el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), hizo tres aislamientos del virus en el matadero de Villavicencio (Meta), a partir de hisopados vaginales tomados de vacas con antecedentes de aborto, procedentes de los Llanos Orientales. En 1973, el mismo CIAT aisló el virus a partir de una vaca con Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (VPI) procedente de Tenjo, Cundinamarca.

\* Laboratorio de Virología, Programa de Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, AA 1226. Medellín, Colombia. Investigación financiada por Colciencias y la Universidad de Antioquia.

En esta ocasión el agente fué identificado por el Laboratorio Investigaciones Médico Veterinarias (LIMV) del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). El mismo año el ICA comprobó por serología la presencia de la infección en hatos lecheros de la sabana de Bogotá que venían presentando abortos frecuentes (4,5).

De acuerdo con la sintomatología mostrada por los animales de los cuales se aisló el virus, se pensó que en nuestro país únicamente se encontraba la forma genital de la enfermedad (Vulvovaginitis Pustular Infecciosa - Balanopostitis Pustular Infecciosa); pero desafortunadamente los virus aislados no se conservaron perdiéndose la posibilidad de caracterizar dichos agentes.

Más tarde, el virus fué nuevamente aislado por el CIAT en los Llanos Orientales, pero esta vez a partir de hisopados oculonasales de 6 animales que no mostraban ninguna sintomatología clínica (2,17).

Pasaron 20 años para que se realizara un nuevo aislamiento en el país, esta vez por el Posgrado de Reproducción animal de la Universidad Nacional de Colombia, a partir de hisopados nasales y esmegma prepucial de un toro de la raza Jersey, seropositivo y previamente inmunosuprimido con dexametasona (17,18).

A la par con los aislamientos, desde 1974 se han venido realizando múltiples estudios serológicos los cuales han sido llevados a cabo por entidades como el CIAT, el ICA y la U. de A., y muestran una amplia distribución de la infección en Colombia, con prevalencias que van desde un 13% hasta un 42% en estudios que abarcan hasta 12 departamentos del territorio nacional (2,4,17), no obstante la evidencia clínica de la enfermedad siempre ha sido escasa y muy controvertida.

En Antioquia, particularmente, a pesar de los altos índices de prevalencia observados en los escasos estudios llevados a cabo en el departamento (67% en toros reproductores de Urabá y 32% en vacas en producción del altiplano norte y el oriente del departamento) (15,18), se han realizado muy pocos intentos de aislamiento y ninguno de ellos con éxito (1).

Por todo lo anterior, se hace prioritario realizar nuevos esfuerzos de aislamiento para llevar a cabo la

caracterización virológica y patológica del virus circulante en el país. En este sentido la feria de ganados de Medellín es uno de los centros de movilización y comercialización más grandes de Colombia y por lo tanto un "*foco potencial*" de distribución y diseminación de un alto número de enfermedades infectocontagiosas, por lo que se pensó que era uno de los sitios más indicados para emprender la búsqueda del virus objeto de nuestro estudio.

Teniendo en cuenta todas las anteriores consideraciones, nos propusimos aislar el HVB-1 a partir de muestras de hisopados nasales y vaginales o prepuciales de animales destinados al sacrificio, con el fin de aprovechar las condiciones de hacinamiento y estrés que pueden favorecer la inmunosupresión e inducir la reactivación del virus en los animales infectados.

### Materiales y Métodos

**Obtención de las muestras para aislamiento:** en la feria de ganados de Medellín se tomaron 601 hisopados nasales, vaginales o prepuciales a partir de animales destinados al sacrificio en los diferentes mataderos del área metropolitana, en el transcurso de 12 semanas a razón de 50 hisopados/semanales.

Las muestras fueron transportadas a 4°C en viales con solución de Hank's al Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, donde posteriormente fueron procesadas para aislamiento viral. Los hisopos fueron descartados y el contenido de cada vial se sometió a centrifugación a 2000 rpm/10min; luego se extrajo el sobrenadante de cada tubo y se le adicionaron 100ug de streptomina y 100U.I. de penicilina/cc. Posteriormente se congelaron a -70°C hasta el momento de la siembra sobre cultivos celulares (1).

Simultáneamente con las muestras se recopilaban una serie de datos para identificarlas apropiadamente tales como: lugar de donde provenían los animales y fecha de la obtención de la muestra, el sexo y raza del animal y tipo de hisopado realizado. Así mismo, se anotaron las observaciones que en el momento de la toma pudieran asociarse con los signos descritos en la literatura tales como lesiones en mucosas, problemas

respiratorios y secreciones nasales, conjuntivales o vaginales.

Adicionalmente, durante el transcurso de la investigación sobre diagnóstico serológico para la RIB en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, se detectó un gran número de muestras con resultado positivo asociadas con un incremento en la tasa de abortos en animales del municipio de Magangué, departamento de Bolívar) por lo que se probaron 38 hisopados nasales, vaginales o prepuciales de animales de dicha zona para intentar aislamiento viral. También se obtuvieron 38 muestras de sangre para realizar elisa en suero sanguíneo y 4 muestras de líquido preseminal tomado con electroeyaculador y correspondiente a toros de reconocida seropositividad para intentar con ellas aislamiento y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (16).

**Cultivos celulares y virus de referencia:** Se usaron células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) que procedían de la American Type Culture Collection (ATCC 22) y fueron mantenidas bajo congelación en Nitrógeno líquido hasta el momento en que se utilizaron.

Las células MDBK fueron descongeladas y posteriormente cultivadas en Medio Esencial Mínimo (MEM-Sigma) (con 10% de suero fetal bovino inactivado y libre del virus de la Diarrea Viral Bovina) suplementado con aminoácidos, glutamina, vitaminas y antibióticos e incubadas en cámara húmeda a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> (1,3).

Para las pruebas de neutralización viral se utilizó un HVB-1 obtenido en el laboratorio de Ciencias Veterinarias de Universidad de Wisconsin (E.U.) (1).

Las células MDBK fueron infectadas con el virus de referencia con el fin de verificar la susceptibilidad ante las posibles cepas de campo.

**Siembra de muestras para aislamiento:** de la muestras a examinar, se inocularon 0.2 cc/pozo del sobrenadante tratado, en platos de 24 pozos (2 pozos por muestra), sobre una monocapa de células MDBK, a razón de 10<sup>5</sup> cél/pozo. En cada plato se dejaron cuatro

pozos como control de células. Se realizó la adsorción viral a las células a 37°C durante 45 minutos con movimiento del plato cada 15 minutos, luego de los cuales se descartó el exceso del sobrenadante de cada pozo y se adicionó 0.9 cc de medio esencial mínimo de mantenimiento (MEM+2% SFB).

Posteriormente se incubó a 37°C/5-6 días bajo observación diaria en el microscopio invertido de contraste de fase, con el fin de visualizar el efecto citopatogénico compatible (1), (abalonamiento celular, refringencia, sincitios y desprendimiento de la monocapa del fondo de los pozos) (1,3,11).

Cuando el pase original resultó negativo, las muestras fueron conservadas a -70°C para realizar pruebas adicionales.

De las muestras que presentasen efecto citopatogénico en los cultivos celulares, se procedería a efectuar un segundo pase sobre monocapas celulares y una nueva inoculación de la muestra original con el fin de confirmar los efectos observados en el primer aislamiento.

Paralelamente, los sueros de Magangué fueron probados por una técnica de ELISA previamente descrita y de uso rutinario para el diagnóstico en nuestro laboratorio (13).

La técnica de PCR llevada a cabo para el semen de toros seropositivos es una modificación (sin publicar) de la prueba desarrollada por Van Engelenburg (16) que a continuación se describe en forma breve. Inicialmente para la extracción del DNA viral, 100ul de cada muestra fueron tratados con 100ul de una suspensión que contenía 200ug/ml de proteina K y la mezcla se incubó por 3h/56 C. Luego de esto la mezcla fue sometida a ebullición por 10min y posteriormente centrifugada a 10.000 rpm/10min. Finalmente, la PCR se llevó a cabo con 10ul del sobrenadante obtenido.

**PCR:** En una mezcla final de 50ul de reacción se agregaron los siguientes elementos: 100mM de tris-Hcl (pH 8.3), 500mM de KCl, 0.01% de gelatina (Buffer de PCR, GIBCO BRL), 2 mM de MgCl<sub>2</sub> (GIBCO), 0.2 mM de dNTPs (PROMEGA), 0.1 uM de cada primer (p 1: CTGCTGTTTCGTAGCCCAACG y p 2: TGTGACTTGGTGCCCATGTGCGC, sintetizados

por DNAgency) correspondientes a una secuencia génica que codifica para la glicoproteína C del HVB-1 y 20 U/ml de Taq polimerasa. Adicionalmente se agregó 25 ul/mezcla de aceite mineral puro para evitar la evaporación de las muestras (16).

Las mezclas para PCR fueron sometidas inicialmente a un ciclo de 94°C por 5' para la separación de las bandas de ADN.

La amplificación fue llevada a cabo mediante 38 ciclos sucesivos en el siguiente orden: 15 ciclos de 95°C/1', 60°C/1' y 72°C/1', seguidos de 23 ciclos de 95°C/1', 60°C/1' y 72°C/1' más un segmento de autoextensión de 4". Adicionalmente se montó un control positivo con HVB-1 sin diluir tratado en la misma forma que las muestras y un control de reactivos. Luego las muestras obtenidas del PCR se almacenaron a 4°C. hasta su análisis.

Finalmente, el producto amplificado se visualizó por electroforesis en geles de agarosa al 2% bajo fluorescencia con bromuro de etidio. Se empleó como marcador de peso molecular un plásmido el cual

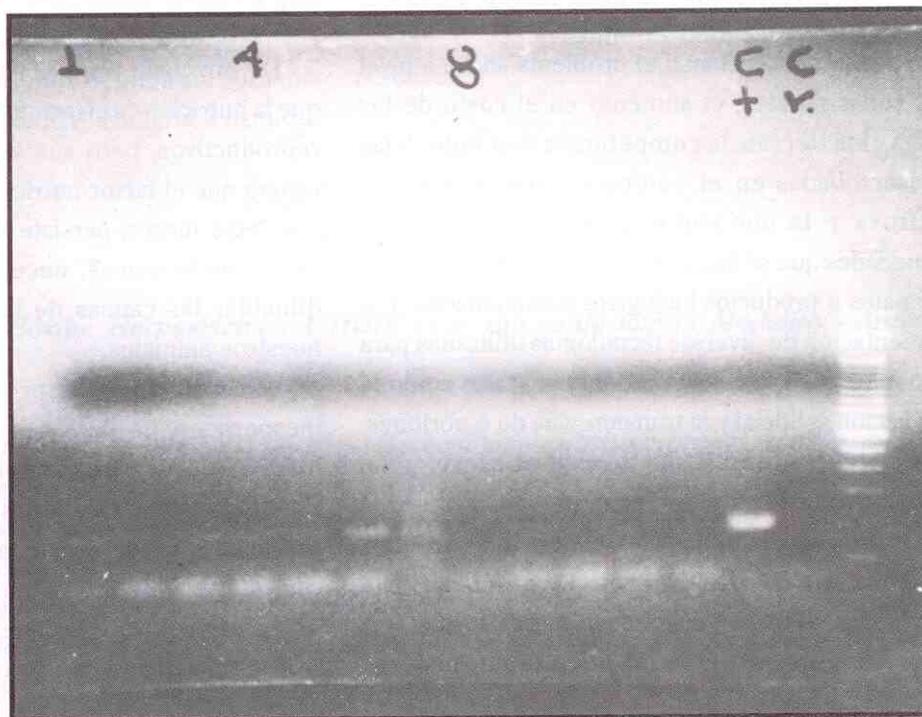
contenía una serie de 15 fragmentos de polinucleótidos con tamaños crecientes de 100 en 100 hasta 1500 pares de bases (pb) (Gibco) para verificar el tamaño del segmento amplificado. La banda buscada debe poseer un peso molecular de 173 pares de bases (10) y corresponde a la amplificación de un segmento que codifica para la gp C (16).

## Resultados

**Aislamiento viral:** no se logró el aislamiento viral de ninguna de las 716 muestras obtenidas en la feria de ganados de Medellín, ni de las 38 obtenidas en ganaderías de Magangué.

Tampoco fué posible aislar el virus de las muestras de semen obtenidas a partir toros previamente seropositivos.

La distribución de las mismas de acuerdo al tipo de hisopado fué: 410 h. nasales, 188 h. vaginales y 118 h. prepuciales. Así mismo de las 716 muestras obtenidas, 391 correspondieron a machos y 325 a hembras.



**Figura 1**

Prueba de muestras de campo (semen fresco y congelado)

Los pozos 1-4 contienen muestras de semen tratado con proteinasa K por 6h/56 C, de toros seropositivos para RIB.

Los pozos 5, 6 y 7 corresponden a muestras de semen de toros seronegativos contaminadas artificialmente con IDICC50, diluidas 1:400, congeladas y empacadas en pajillas por métodos convencionales. La muestra del pozo 8 pertenece a una pajilla de semen de un toro seronegativo. Pozos 9 a 12 corresponden a las muestras 5 a 8 pero diluidas 1:600. Los pozos 13 y 14 contienen DNA viral (control positivo) y control de reactivos respectivamente y el pozo 15 contiene el marcador de peso molecular. Obsérvese la banda correspondiente a 173 pb en los pozos 1 a 4 y 5 a 7.

Se realizaron ensayos de reinoculación con 328 muestras, las cuales tampoco mostraron ningún indicio de efecto citopático compatible con la presencia de un agente viral en las células MDBK.

Todos los ensayos de susceptibilidad de la línea celular MDBK al virus de referencia resultaron positivos.

**Serología:** 24 de las 38 muestras de suero sanguíneo correspondientes a un 63.23%, resultaron positivas por la prueba de elisa; entre ellas 4 correspondieron a los toros de los cuales se había tomado también muestra de líquido preseminal.

**PCR:** 3 de las muestras de semen tomadas de toros seropositivos resultaron positivas por una PCR modificada realizada en el laboratorio de virología (ver figura 1).

### Discusión

En los últimos veinte años la industria ganadera nacional se ha visto enfrentada a una gran cantidad de situaciones que afectan su capacidad de producción entre las que podemos mencionar: el problema social a nivel de las zonas rurales, el aumento en el costo de los insumos y las tierras, la competencia con industrias tan desarrolladas en el campo pecuario como la avicultura y la porcicultura, la gran cantidad de enfermedades que se han introducido en el país a través de animales o productos biológicos contaminados, y la implementación de diversas tecnologías utilizadas para incrementar el desarrollo reproductivo, tales como la inseminación artificial y la transferencia de embriones.

Debido en parte a la falta de control oportuno, el ganado bovino de nuestro país padece de nuevas infecciones de etiología viral tales como la Rinotraqueitis Infecciosa (RIB), la Diarrea Viral (DVB), la Parainfluenza (PI3), el Virus Respiratorio Sincitial y la Lengua Azul; esto sin mencionar las producidas por agentes bacterianos (5,8,9).

Varias de estas infecciones contribuyen al deterioro gradual de la salud de los hatos, por problemas reproductivos tales como abortos y retenciones placentarias; respiratorios como disnea y neumonías;

y otros, por ser inmunodepresores, a disminuyen la respuesta inmune contra otros agentes silvestres o vacunales, lo que lleva finalmente a pérdidas económicas importantes.

Para solucionar estos problemas se requiere de un adecuado diagnóstico y de estudios básicos sobre los agentes y las enfermedades que producen. De esta podríamos determinar, de un lado, el impacto que sobre la economía pecuaria tiene cada una de estas patologías y de otro, proponer las medidas más apropiadas de control y de vigilancia epidemiológica o, de ser posible, de erradicación de la infección.

El problema mayor con RIB ha sido la falta de concordancia entre la evidencia clínica de la enfermedad y la evidencia serológica de la infección. Mientras desconozcamos la distribución geográfica de los problemas reproductivos y el papel que juegan otras infecciones presentes en nuestro medio, el esclarecimiento del problema representa un nivel de complejidad mucho mayor. El papel que juegan todas estas entidades infecciosas no se podrá conocer hasta cuando exista un servicio de diagnóstico permanente y sistemático.

De otro lado, tradicionalmente se ha considerado que la nutrición es el factor principal en los bajos índices reproductivos, pero aún en aquellos hatos donde se espera que el factor nutricional haya dejado de ser un problema mayor, persiste la baja en la reproducción. Tenemos entonces, necesariamente, que tratar de dilucidar las causas de las fallas reproductivas de nuestros animales.

Los resultados del presente trabajo, si bien son inesperados, no deberían ser sorprendentes por la historia de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Colombia, que ha sido más una historia de encuestas serológicas que de aislamientos virales y de descripción clínica de la enfermedad en el campo.

La susceptibilidad de las células al virus de referencia probado durante este estudio es una demostración clara de que no haber hallado el virus, no significa falta de susceptibilidad de las células utilizadas, ni deficiencias técnicas en el proceso de aislamiento.

Este estudio es la mayor encuesta virológica

realizada para el virus de la RIB en Antioquia. Estos resultados nos hacen volver a viejas conclusiones de los investigadores en esta área (14,15) que, en resumen, cuestionan el resultado de una prevalencia serológica tan amplia y la ausencia de enfermedad. El caso de la hacienda en Magangué es un reflejo fiel de la condición antes enunciada y podría especularse que probablemente el virus circulante en nuestro país produce una infección insidiosa que puede presentar una forma benigna en el adulto inmunocompetente.

En nuestro grupo de trabajo del Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, estamos empeñados precisamente en tratar de resolver este enigma, y para el efecto es necesario continuar la búsqueda del virus a fin de caracterizarlo bioquímica y patológicamente.

Una posible explicación para la imposibilidad de aislar dicho virus, la encontramos con el virus de la Diarrea Viral Bovina, del cual se conocen dos biotipos, uno citopático y otro no citopático, este último más asociado a problemas de aborto pero difícil de detectar por aislamiento sobre cultivos celulares debido a que no produce un daño celular típico visible; probablemente una condición semejante aún no descubierta para el virus de la RIB ayudaría a explicar

un evento semejante.

De paso vale la pena resaltar como la PCR (aún en fase de estandarización en nuestro laboratorio) permitió detectar el genoma viral aunque el virus no haya sido aislado, probablemente debido a la baja concentración de viriones o a la inactivación del agente durante el traslado de la muestra al laboratorio o porque la toxicidad de la muestra impidió ver el efecto citopático. De cualquier forma, este hallazgo reivindica la validez de la PCR por su funcionalidad en los casos donde el aislamiento no ha sido posible, aún cuando la cantidad de virus en la muestra pueda ser suficiente para infectar in vivo.

Se recomienda continuar con los intentos de aislamiento y realizar muestreos repetidos en granjas con alta seroprevalencia y particularmente en aquellos casos donde haya signos clínicos de asociación como el aborto o los largos periodos interparto.

Finalmente, dado que el virus tiene como característica el desarrollar latencia en los ganglios nerviosos sensoriales adyacentes al sitio de la infección, (6,16) se deben realizar intentos de aislamiento posmortem, así como el estudio histopatológico respectivo.

## Summary

### *Virological survey of Bovine Herpesvirus - 1 (BHV-1) at the cattle fair in Medellín - Antioquia, Colombia.*

*In order to contribute to the characterization of Infectious Bovine Rhinotracheitis virus in Colombia, an attempt was made to isolate BHV-1 from 716 nasal, vaginal or preputial swabs taken during a period of six months, from 480 animals transported from long distance to the cattle fair in Medellín. Samples were inoculated on MDBK cell monolayer.*

*It was supposed that long distance transportation would induce stress with the consequence of viral reactivation and shedding. A total of 1044 attempts were made to isolate the virus including 328 reinoculations. No virus could be isolated from the inoculated samples.*

*In addition nasal, vaginal or preputial samples were tested from 38 animals from a herd with a mark of abortion located in Magangué (Bolívar), at the north coast of Colombia among the tested there were 25 seropositives, but again there were no isolations. However 3 semen samples out of 4 taken from bulls in this herd were positives by PCR.*

*Further research is needed to define the real effect of BHV-1 infection in Colombia and particularly to characterize the biochemical pattern of local strains and its pathogenic behavior.*

## Referencias

1. ARBOLEDA J, BEDOYA D, RODAS J. Estudio sobre la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en un hato lechero del Valle del Aburrá. Trabajo de Grado. Fac de Med. Vet. y de Zoot. U. de A, Medellín, 1991.
2. AYCARDI, E., SANCLEMENTE, V. Y CORTES J. Prevalencia de anticuerpos para el virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en ganado de carne en Colombia y aislamiento del virus en casos clínicos. Rev. Fac. Med. Vet. Zoot. (Bogotá). No.30. 1978. p 14-19
3. BLEW, H.C., LYERDA, H.C., FORRESTER, F.T. Laboratory Methods for diagnosing Herpesvirus Infections. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Atlanta (USA). Public Health Service. 1979, p 67-119.
4. CIAT. Informes anuales. Salud animal. 1972,1973,1974,1975.
5. ESTUPIÑAN, J. RUIZ, A., JIMENEZ, J. y cols. División de Sanidad Animal. Colombia: Sanidad Animal. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Subgerencia de Producción Pecuaria. División de Salud Animal. Marzo 1978. p. 31
6. FENNER F, BACHMAN P, GIBBS E, et al. Veterinary Virology Orlando: Academic Press, 1987. 660p.
7. FERNANDEZ L, NARVAEZ C, TERRY T. Rinotraqueitis infecciosa de los bovinos. Informe de los primeros casos detectados en el Perú. Revista Centro Nacional de Patología Animal. 1976 No 7: 39-50.
8. GONGORA, A., VILLAMIL, LC., VERA VJ. y cols. Diagnóstico de las principales enfermedades reproductivas en toros de la Sabana de Bogotá. Énfasis en Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB). Rev. Med. Vet. y Zoot. Vol 43 No. 1. Junio 1995. p. 37-42
9. GONGORA, A., VILLAMIL, LC., VERA VJ. y cols. Aislamiento de un herpes virus bovino tipo 1 (HVB-1) de secreción nasal y esmegma prepucial en un toro reproductor. Rev. Med. Vet. y Zoot. Vol 43 No. 1. Junio 1995. p. 43-47.
10. KAHRS R. Situación actual de la rinotraqueitis infecciosa bovina en las Américas. Control de enfermedades de los animales en las Américas 1977. Washington D.C. OPS. Publicación Científica 358: 121-126.
11. MARINO, O.C. VILLATE, JE., RUEDA, OE. y cols. Preparación de antígenos para diagnóstico de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina por Inmunodifusión. Informe preliminar. En Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 2, No. 4, sept. 1980. p. 241-248.
12. MOHANTY SB, DUTA SK. (1983). Virología Veterinaria. México: Interamericana 412p.
13. RODAS, JD., ZULUAGA, FN., OSSA JE. y cols. Estandarización de una técnica de ELISA para Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB) y encuesta serológica universal del hato BON de Antioquia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias Vol 8 Suplemento II Encuentro Nacional de Investigadores en Ciencias Pecuarias (ENICIP), 1993.
14. RODRIGUEZ L, FERNANDEZ S. Aislamiento del virus Herpes Bovino 1 asociado a casos de vulvovaginitis, conjuntivitis y rinitis en hatos lecheros de Costa Rica.
15. SOSSA C, FLOREZ L, ARANGO H. (1982). Estudio serológico para la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) en hatos lecheros del altiplano norte y del oriente de Antioquia. Trabajo de grado (Médico Veterinario). Universidad de Antioquia. Facultad de Med. Vet. y Zoot. Medellín, 46p.
16. VAN ENGELENBURG F, MAES R, VAN OIRSHOF J and RIJSEWIJK F. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine Herpesvirus type 1 in semen bovine. J Clin Microbiol 1993; Vol 31 No.12: 3129-3135.
17. ZULUAGA, FN. Implicaciones epidemiológicas de la RIB en Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol 2 No. 1, 1978. p. 45-48.
18. ZUÑIGA I, OSSA J y O. HINCAPIE. (1978). Prevalencia de IBR en reproductores del Urabá Antioqueño para 1977. Rev. Colomb. Cienc. Pec. 1:135-148.