

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CIRCULANTES DE
COMPLEJO RESPIRATORIO BOVINO (IBR)**

POR:

MARIO ALBERTO CHÁVEZ CHÁVEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CIRCULANTES DE
COMPLEJO RESPIRATORIO BOVINO (IBR)**

T E S I S

POR:

MARIO ALBERTO CHÁVEZ CHÁVEZ

ASESOR PRINCIPAL:

MC FRANCISCO JAVIER CARRILLO MORALES

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

PRESIDENTE DEL JURADO:




MC. FRANCISCO JAVIER CARRILLO MORALES

PRIMER VOCAL:



MVZ. JORGE ITURBIDE RAMÍREZ

SEGUNDO VOCAL:



DR. CARLOS LEYVA ORASMA

VOCAL SUPLENTE:



I. Z. JORGE BORUNDA RAMOS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**

POR:

MARIO ALBERTO CHÁVEZ CHÁVEZ

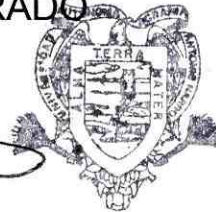
TESIS QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO
EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.

APROBADO POR:


MC FRANCISCO JAVIER CARRILLO MORALES
PRESIDENTE DEL JURADO


M.V.Z. JORGE ITURBIDE RAMIREZ
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL



Comisión de la División
Regional de Ciencia Animal

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A Dios que gracias a su ayuda he sido y seguiré siendo un hombre de bien.

Con gratitud, respeto y cariño a mi padre Anacleto Chávez Villarreal y a la memoria de mi querida madre Sra. Teresita de Jesús Chávez de Chávez que siempre me brindaron su apoyo incondicional para la culminación de mi carrera.

A mis hermanos Blanca, Irma, Marisela, Teresa, Victor y Jesús Eloy por su apoyo y que siempre confiaron en mí.

Al M.V.Z. M.C. Francisco Javier Carrillo Morales que me asesoró incondicionalmente para realizar este trabajo.

A mi novia Srita. Elva Sandra Montes Cisneros por su amor, comprensión, confianza y apoyo incondicional que le han dado un bello toque a mi vida.

A mis amigos Carlos A. Deandar Armendáriz , Luis Iram Mendoza Quintero, Mía Margarita Rascón Hernández, I.Z. Carlos Rascón Díaz, I.Z. Diana Ibeth Santillanez, Samuel Baltazar Aguirre Díaz, Norberto Herrera Aguirre, por su amistad y apoyo.

A mi Alma Terra Mater por acogerme en su seno desde mi llegada y que me brindó mi máxima preparación en mi carrera.

A todas las personas que de alguna manera u otra ayudaron a poder lograr una profesión durante mi estancia en Torreón, Coahuila, desde mis maestros, compañeros y amigos.

INDICE

Dedicatorias y agradecimientos	j
I.-Resumen	1
II.-Introducción	2
III.-Objetivos y metas	8
IV.-Antecedentes	9
V.-Materiales y métodos	19
1.1.-Localización geográfica	19
1.2.-Material de laboratorio	21
1.3.-Reactivos del kit	22
1.4.-Descripción de la técnica de ELISA	23
VI.-Resultados	27
1.1.-Tabla No. 1	27
1.2.-Gráfico 1	27
VII.-Discusión	28
VIII.-Literatura citada	30

RESUMEN

Este trabajo se realizó con el objeto de evaluar un ensayo inmunoenzimático comercial (ELISA) en la detección y valoración de anticuerpos circulantes a IBR y con la finalidad de realizar un muestreo seroepidemiológico en varios establos con antecedentes de abortos, entre los cuales es de gran importancia el virus IBR en la Comarca Lagunera y en otras partes de la República Mexicana.

En término de 6 meses se tomaron 65 muestras sanguíneas por vía venococcígea en tubos vacutainer de vacas lecheras seleccionándolas con historia de 1 a 3 abortos. El suero fue separado y conservado en viales a temperatura de congelación de -20°C hasta ser utilizadas para su valoración. El trabajo de laboratorio se realizó en la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna en el área de inmunología en donde se aplicó la técnica de ELISA (TRACHITEST, CHEKIT Laboratorios del Dr Bommeli). Los resultados dados de acuerdo a las lecturas de las densidades ópticas obtenidas y de acuerdo al procedimiento de evaluación recomendado en el kit, son los siguientes: el 20.64% de los animales dieron títulos de anticuerpos por encima del rango indicado en el kit (85%) considerados como positivos. El 38.10 % cayeron en el rango de 30-84.99% indicado en el kit como sospechosos, mientras que el 41.26% fueron catalogados como negativos con un porcentaje menor del 30%. De acuerdo a la valoración de este kit resulta ser adecuado bajo una previa estandarización del técnico que lo utlice en el diagnóstico de IBR. Y según la seroprevalencia obtenida s indicativo importante de causa d abortos en la Comarca Lagunera.

INTRODUCCIÓN

El complejo respiratorio bovino (CRB) constituye una de las causas más importantes de pérdidas económicas de los bovinos. Para que se desarrolle la enfermedad clínica, se requiere de una compleja interacción, poco entendida entre factores ambientales, agentes infecciosos (dentro de los cuales se encuentran los virus IBR, DVB, BRSV y P-I-3 y las bacterias: *Pasteurella haemolytica*, *Haemophilus somnus* y *Vibrio fetus*) y hospedero. A pesar de que existen una gran variedad de antimicrobianos para tratar este padecimiento y una amplia gama de biológicos para prevenirlo, continúa causando serios estragos en la ganadería mexicana. (Christensen 1995, Avila 1995).

Entre los factores que interaccionan con virus, y bacterias se encuentran los factores ambientales, y estresantes que son: el frío o exceso de calor, transporte y manejo del ganado, así como también los factores anatomofisiológicos de la propia especie bovina, tales como la pleura poco distensible, pulmones pequeños, ángulo tráqueo-bronquial recto, menos número de macrófagos alveolares, menor presión para el intercambio gaseoso los cuales ponen en desventaja a los bovinos con su inmunidad. (Christensen 1995).

RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA (IBR)

Es una enfermedad infecciosa que lo causa el herpes virus bovino tipo 1 y la cual tiene varias presentaciones:

Respiratoria: Se presenta con nariz roja, conjuntivitis y traqueitis y se puede asociar bacterias tales como *pasteurella* spp., *Haemophilus* spp y *mycoplasma* spp para producir neumonía (Ávila 1995). Esta forma respiratoria también se manifiesta por fiebre, disminución del apetito, respiración rápida, disnea asociado a material mucopurulento en los pasajes nasales y tráquea y se observa tumefacción de la nariz. Ocasionalmente la obstrucción de pasajes nasales resulta en respiración con boca abierta. El ganado primero presenta descarga nasal profusa, la cual es clara en los estadios primarios y después se torna mucopurulenta. A esta forma también se le ha llamado nariz roja (por la hiperemia y el enrojecimiento de los pasajes nasales). Se presentan úlceras bucales y en mucosa nasal que se cubren después con membranas diftéricas de olor fétido. La morbilidad llega hasta el 100% y la mortalidad al 10%.(Charles, et al. 1990, Jubb, et al. 1985, Stephen, et al. 1971)

Este virus replica en una variedad alta de cultivos celulares produciendo cambios patológicos distintos que sirven como base para su aislamiento, titulación y pruebas de neutralización del virus por el anticuerpo sérico. Este virus posee potencial oncógeno. (Jubb, et al. 1985, Kramps, et al. 1993). Produce lesiones necróticas en pulmón, bazo e hígado con cuerpos de inclusión intranucleares en hepatocitos.(Christensen 1995, Cruz, et al. 1995, Kahrs 1977, Larson 1996, Quintero, et al. 1995, Delgado, et al. 1995).

Se tiene reporte de que algunos animales desarrolla una infección la cual puede ser reactivada y esta infección latente no puede ser prevenida por la vacunación (Kahrs 1977, Kramps, et al. 1993).

La forma Reproductiva se manifiesta por abortos muerte embrionaria, repetición de servicios, momificaciones fetales, vaginitis y es también llamada vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV). Existen portadores de virus latentes en casi todos los hatos y si estos son sometidos a un excesivo estrés o si su sistema inmunológico se ve disminuido el virus podrá reactivarse y expandirse en el ganado susceptible(Clyde 1991 y Ávila 1995). Esta infección IPV se manifiesta por pústulas y descarga mucopurulenta por vulva ya que la mucosa vaginal y vulvar está infectada y a esta forma también se le llamaba Bläschenausschlag (en Europa por muchos años)(Pierre 1995, Kahrs 1977). La examinación interna revela pústulas o placas con material necrótico blanco en la mucosa vulvar y vaginal. El IPV es una enfermedad venérea por cruce, lamido de genitales, por semen infectado (Kahrs 1977, Tortora 1995, Stephen, et al. 1971), también se reporta un perro que en forma epizootica tenía el hábito de chupar las vulvas de las vacas cuando estas eran de transmisión. En el semental se manifiesta como una balanopostitis (Kahrs 1977).

La infección puede causar aborto hasta en un 50% de las vacas susceptibles. El tiempo mínimo para que este se presente son 3 semanas, pero las vacas pueden abortar, hasta 3 veces o más después de haber sido infectadas.

También en caso de brote epidémico de abortos debemos explicar claramente al propietario de las vacas que con la vacunación frecuentemente falla para detener los abortos por IBR.(Clyde, et al. 1991, Ávila 1995)

Los becerros abortados por IBR son retenidos en el útero de 24 a 72 horas después de muertos, así los fetos se encuentran moderada o severamente autolisados, lo cual acarrea una gran colección de fluido serosanguinolento en las cavidades de su cuerpo (Ávila 1995). Los abortos son producidos entre el 4° y 7° mes de gestación y se observan lesiones con focos necróticos en diferentes órganos del feto, principalmente en los riñones y el hígado.(Barajas 1993, Christensen 1995, Kahrs 1977, Larson 1996, Quintero, et al. 1995). La gastroenteritis se presenta en ganado adulto y cuando esta se presenta en becerros recién nacidos generalmente es fatal. (Christensen 1995, Stephen 1971). Al examinar riñón fetal congelado por inmunofluorescencia (F.A) se tiene una efectividad del 90% para el diagnóstico de la infección. Para prevenir abortos se requiere mantener altos niveles de inmunidad mediante vacunación del hato (Taliens, et al. 1989, Cortese 1994, Ávila 1995, Garza 1998).

Forma conjuntival.- Se manifiesta con inflamación de la conjuntiva y a menudo acompaña a la forma respiratoria de IBR. Ocasionalmente los signos respiratorios no son evidentes la conjuntivitis con descarga ocular (que inicialmente es clara y después se torna mucopurulenta) y la opacidad corneal aparecen como manifestaciones de IBR (Timoney 1971).

Esto puede ser mal diagnosticado como ojo rosado (pink eye) ya que en este la opacidad de la córnea ocurre en el centro de la córnea y se expande centrifugalmente y en el IBR asociado a conjuntivitis la opacidad es poca y parece iniciada en la conjunción corno-escleral. El diagnóstico de IBR asociado a conjuntivitis se confirma al descubrir pústulas o placas de debris necrótico blanco en la conjuntiva (Ávila 1995, Studdert, et al. 1964, Kahrs 1977), sin embargo estas lesiones no siempre se desarrollan. Dicha conjuntiva es frecuentemente edematosa y dolorosa, los animales rehuyen a las necesidades de las manipulaciones para la observación al ver las lesiones. (Timoney 1971).

Forma nerviosa: Se manifiesta como una encefalomiелitis ocasionalmente en ganado joven, comienza como una leptomeningitis y encefalitis no purulenta caracterizada por incoordinación circular, decaimiento, amaurosis, se van encogiendo de los flancos, coma y muerte. La razón por la que algunos animales desarrollan encefalitis no se sabe y puede involucrarse por varianza del virus (Kahrs 1977, Jones 1983, Jubb 1985).

PREVENCIÓN

Existen 4 diferentes tipos de vacunas contra IBR en el mercado:

Virus vivo modificado para administración I.M.

Virus vivo modificado para administración I.N.

Virus inactivado (muerto)

Virus vivo químicamente alterado

Cada tipo de vacuna tiene sus ventajas y desventajas y es muy importante conocer sus usos (Cortese, et al. 1994, Charles, et al. 1990, Roth 1993, Schultz 1993, Vilchis, et al. 1987). Cuando se determine un programa de vacunación para grandes hatos comerciales es muy importante recalcar con el cliente la relación costo-beneficio. Las vacunas deben ser vistas como una póliza de seguros; el no utilizar las vacunas esenciales puede llevar a cualquier finca ganadera a la quiebra. Siempre se debe realizar una segunda vacunación de 2 a 4 semanas después de la primera, sobretodo si se usa virus muerto y nunca debemos vacunar antes de los 6 meses de edad ya que de lo contrario desactivaremos la inmunidad pasiva por la vacunación y se debe hacer énfasis que al hacer una reposición de ganado se haga al llegar a los 12 ó 14 meses de edad, ya que las hembras todas estén vacunadas y revacunadas contra todo lo que pueda producir aborto. De preferencia utilizar vacunas a base de virus vivo modificado ó virus químicamente alterado ya que proporcionan una inmunidad más duradera (Charles, et al. 1990, Taliens, et al. 1989).

En vacas adultas que han seguido un programa de vacunación revacunar cada año. No utilizar virus modificado en las vacas gestantes, ya que puede causar aborto (Ávila 1995, Charles, et al. 1990, Roth 1993, Schultz 1993, Vilchis, et al. 1987).

OBJETIVOS Y METAS

Objetivos:

Los objetivos de nuestra investigación fueron los siguientes:

1.-Realización de un muestreo seroepidemiológico contra IBR.

2.-Diagnosticar IBR por método inmunoenzimático indirecto confirmatorio

Metas:

Diagnosticar en 65 muestras de suero sanguíneo de vacas holstein la detección de anticuerpos circulantes contra IBR.

Hipótesis

El IBR es una causa importante de abortos en establos de la Comarca Lagunera y su diagnóstico puede realizarse por la detección de los anticuerpos circulantes contra IBR mediante el kit específico por la prueba de ELISA.

ANTECEDENTES

Peter y Durham (1990) en Alberta y Saskatchewan Canadá realizaron un estudio de prevalencia de anticuerpos para IBR, PI-3, BRSV Y DVB en ganado de un total de 1745 cabezas de ganado.

El porcentaje total de prevalencia de anticuerpos a IBR fue de 37.8% de un total de 295 granjas. La técnica de ELISA utilizada fue la descrita por varios autores (Bandar, et al. 19955, Barajas, et al. 1993, Behymer, et al. 1991).

Por provincia en este mismo estudio fue distribuida la prevalencia de la siguiente manera.

En Alberta, de un total de 129 animales probados se encontró una prevalencia de anticuerpos a IBR en 20%.

En el distrito de Saskatoon y Humboldt se encontró una prevalencia de anticuerpos de 45% en 294 sueros de 68 propietarios.

En el distrito de Swift Current, Maple Creek y Assiniboia se encontró una prevalencia de 47.4% de 175 sueros probados.

En el distrito de Weyburn, Moosomin y Yorkton con una prevalencia de 64.1 % de 318 sueros probados.

Behymer y Riemann (1991) en el estado de California (USA) realizaron un estudio en masa, de sueros de ganado contra 14 agentes infecciosos por la técnica de ELISA. con la finalidad de monitorear la sanidad de un hato.

Este estudio se realizó de un total de 1953 animales, los cuales estaban distribuidos de la siguiente manera 886 de ganado lechero y 1073 de ganado de carne. Las muestras fueron obtenidas de junio de 1988 a junio de 1989. En este estudio el estado de California fue dividido en 6 distritos para el monitoreo de la salud animal y en el cual se encontró una media de prevalencia del 3%, siendo para ganado lechero un 5% y en ganado de carne un 2%. El resultado final concluye que de el total de animales muestreados 58 animales resultaron positivos a IBR.

Kramps y Quak (1993) realizaron un estudio comparativo sobre 16 ensayos de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISAS) para la detección de anticuerpos contra herpesvirus bovino tipo 1 (BHV1) de ganado. Todas las ELISAS fueron capaces de detectar la mayoría de los anticuerpos antiBHV1 en sueros negativos con una especificidad mayor del 92%. En este estudio solo un kit marcó un suero negativo como positivo en ensayos por duplicado.

3 kits dieron resultados inconsistentes con 1 de los 12 sueros negativos.

Ninguna de las pruebas detectaron anticuerpos con reacciones cruzadas para BHV4. La sensibilidad varió considerablemente en promedios de 50 y 100% (Levings et al 1984).

Una variación considerable entre las pruebas se observó cuando se probaron los sueros 9 días de la infección experimental encontrándose anticuerpos neutralizantes en bajas cantidades y solo anticuerpos prematuros de la clase IgM estuvieron presentes (Ungar-Waron y Abraham, 1991).

5 kits fueron capaces de marcar por lo menos algunos de los sueros negativos como positivos. La falla para detectar los anticuerpos IgM por algunas pruebas pueden ser explicadas en base a la aplicación de los anticuerpos monoclonales IgG específicos para detectar anticuerpos BHV1 específicos y/o por la concentración relativamente baja de anticuerpos de alta afinidad presentes en los sueros poco después de la infección (Dr. Bitsch; Ackermann et al, 1990).

Los sueros recolectados 13 días después de la infección fueron positivos en la mayoría de las pruebas, posiblemente atribuido al cambio del isotipo del anticuerpo y/o a una elevación del nivel de anticuerpos específicos..

Algunos resultados negativos fueron obtenidos en algunas ELISAS cuando se muestreó los sueros recolectados 3 semanas después de la vacunación con Tracherhine. Ya que este tipo de vacuna induce a una respuesta humoral débil, lo cual explica el resultado negativo (Zygraich et al., 1974; Lazarowicz et al., 1983).

La habilidad para detectar anticuerpos específicos difirió considerablemente entre pruebas.

En este estudio se especula sobre la respuesta baja, la cual pueda deberse a anticuerpos de reacción cruzada inducidos por la infección con virus como el herpesvirus caprino 1, herpesvirus caprino 2 y herpesvirus caprino 3 o bien que el ganado se puede infectar por medio de tracto genital, el cual puede conducir a obtener titulaciones bajas de anticuerpos o bien la respuesta de anticuerpos séricos puede ser fuertemente suprimida cuando los anticuerpos específicos de origen materno están presentes durante la infección BHV1

En conclusión las pruebas ELISA para detectar anticuerpos específicos BHV1 correctamente, son buenas pero su sensibilidad y especificidad varían considerablemente, sin embargo para los propósitos de diagnóstico de rutina, 2 o 3 de las 16 ELISAS utilizadas reconocieron satisfactoriamente la presencia de anticuerpos específicos en una sensibilidad del 70%. Los descubrimientos de este estudio indican la necesidad de un acuerdo de estandarización internacional sobre las pruebas para detectar anticuerpos séricos de BHV1 en el ganado.

Banda, Torres y Alvarado (1995) realizaron un estudio de diagnóstico diferencial de 3 agentes causantes de problemas reproductivos en ganado lechero en una explotación del estado de México en ganado productor de leche. Para esto se tomaron muestras de sangre de 50 vacas de la raza Holstein Friesian con problemas reproductivos, de 1 a 4 partos y 10 vacas aparentemente sanas ambos lotes con su esquema de vacunación contra 3 agen-

tes infecciosos (leptospira, brucella e IBR). Y los resultados fueron los siguientes: 41 de las 50 muestras de suero (82%) resultaron positivas para IBR del primer lote y 7 de 10 del segundo lote (70%) se encontraron positivas a la misma prueba.

Se concluye en este estudio que en este hato las 3 enfermedades contribuyen a la presencia de problemas reproductivos.

Matus y Güiris (1995) realizaron un estudio serológico y epizootiológico de IBR, PI-3, BRSV en sementales bovinos del estado de Chiapas, clínicamente sanos de explotaciones extensivas e intensivas procedentes de diferentes municipios del estado de Chiapas, seleccionándose el 10% de dichos municipios mediante una tabla de números aleatorios. Colectándose 70 sueros mediante un muestreo aleatorio simple (35 extensivos y 35 intensivos) y procesándose por ELISA. Los resultados fueron los siguientes, de un total de 70 muestras séricas bovinas analizadas 54 de ellas fueron positivas lo que representa el 77% de seroprevalencia global estimada para IBR. Se concluye en este estudio que la prevalencia global estimada de anticuerpos hacia virus respiratorios es un problema fuerte, siendo PI-3 el más prevalente seguido de IBR y BRSV.

Barajas Rojas de diciembre de 1986 a diciembre de 1989 realizó un estudio seroepidemiológico en ganado bovino holstein-cebú en el trópico de México determinado por técnica inmunoenzimática contra 23 enfermedades virales, bacterianas, rickettsiales y parasitarias a nivel serológico en un estudio de cohorte o longitudinales prospectivos (de incidencia) así como de parámetros reproductivos en bovinos y por diferencias de edad y de genotipo relacionada a la respuesta inmune contra agentes infecciosos, encontrando una muy baja prevalencia de un 5.4% para el virus de la diarrea viral bovina (DVB) y de 2.5% para el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), de un total de 3847 sueros muestreados en forma bimensual de una población promedio de ganado bovino de 296 animales.

Barajas y Rodríguez (1995) realizaron un estudio seroepidemiológico de enfermedades infecciosas en ganado bovino del municipio de Tamiahua, estado de Veracruz, México en marzo de 1995 determinado por técnicas inmunoenzimáticas la seroepidemiología contra 12 agentes infecciosos bacterianos, virales y rickettsiales a nivel subclínico en estudio de cohorte y sección (prevalencia).

Para esto se procesaron 780 muestras serológicas analizadas en forma semiautomática contando con la ayuda de un lector de ELISA. La seroprevalencia general observada fue de un 16% para el virus herpes bovino tipo 1 del ganado o rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR). Lo que representa que 11 animales de las muestras obtenidas son positivas a esta enfermedad.

En este estudio se contempló la edad, sexo, el genotipo y el estado fisiológico (para hembras gestantes y no gestantes).

Quintero, Enríquez, Lastra, Esguerra (1995) realizaron un estudio de monitoreo de algunas enfermedades en vaquillas importadas a la Comarca Lagunera procedentes de Estados Unidos y Canadá. El trabajo se realizó de diciembre de 1994 a marzo de 1995. Se muestrearon 100 vaquillas con una población promedio de 7 a 8 meses, de las cuales 80 fueron procedentes de Estados Unidos y las 20 restantes de Canadá. Los métodos utilizados para la determinación de agentes causantes de enfermedad fueron: seroneutralización para el diagnóstico de IBR, DVB, LVB (virus de leucosis bovina), y paratuberculosis. Los resultados obtenidos para IBR indican que se encontró 17 animales con títulos de enfermedad, 41 con títulos vacunales y 42 con títulos de enfermedad negativos.

Delgado, Quintero y Luna De A.A.(1995), realizaron un estudio patológico, microbiológico y serológico del aborto en bovinos holstein de la Comarca Lagunera. En este estudio analizaron 30 fetos de bovinos holstein abortados con un rango de edad de entre 3 y 8 meses de gestación. Se tomaron muestras de sueros de vacas que abortaron para realizar estudio de seroneutralización para la identificación de IBR y DVB, arrojando como resultado dos casos de IBR con títulos de anticuerpo de 1:128 y 1:256. Lo que significa que en este estudio de los 30 animales muestreados hubo 2 positivos a IBR por seroneutralización y corresponde al 6% de seroprevalencia.

Velarde, Alvarado, y Mejía (1996), en un estudio de control de enfermedades infecciosas dentro de un programa de mejoramiento genético en bovinos de dos campos experimentales de la SAGDR, "La Posta" y "Playa Vicente", ubicados en el estado de Veracruz y con ganado de doble propósito, con la finalidad a la detección de por lo menos 3 agentes infecciosos que afectan la reproducción del ganado como son IBR, leptospira y brucella. Se colectaron 110 muestras sanguíneas para su análisis, en el caso de IBR de seroneutralización en placa considerando la seropositividad de 1:2 de acuerdo con lo establecido por el Code Of Federal Regulation (CFR).

Mostrando los siguientes resultados: de 104 sueros muestreados para IBR en ambos campos experimentales se obtuvo el 4.8% de casos positivos con títulos de 1:2 a 1:8 en dos bovinos de campo "La Posta" y dos bovinos con títulos de 1:2 y uno con títulos de 1:4 en el campo "Playa Vicente" representando como conclusión que solo cinco animales fueron positivos a IBR(4.8%). Se concluye en este trabajo que los resultados obtenidos brindaron la información suficiente para formar un hato libre de por lo menos esas tres enfermedades infecciosas, ya que los animales positivos fueron sacrificados y de esta manera favorecer la calidad del ganado seleccionado para establecer el programa de mejoramiento genético.

Rodríguez et al. (1998), realizaron un estudio serológico con el fin de obtener un seroperfil reproductivo (IBR, Leptospirosis y brucelosis) en hembras bovinas del municipio de Othon P. Blanco, Quintana Roo.

Las 90 hembras que se muestrearon fueron de diferentes razas, que tuviesen tres partos y antecedentes clínicos de haber padecido problemas reproductivos en los últimos cuatro meses: abortos, mortinatos, metritis, piometras y repetición de servicios. Teniendo como objetivo detectar la presencia de anticuerpos contra IBR, Leptospirosis y Brucelosis se utilizó la técnica de ELISA. La prevalencia encontrada para IBR fue del 38.88%.

Güiris et al. (1998), realizaron un estudio epizootológico en el municipio de Villaflores Chiapas en 90 animales bovinos con problemas reproductivos, abortos, mortinatos, metritis, piometras y repetición de servicios. Con la técnica de ELISA para IBR resultando seropositivos 55 animales dando una seroprevalencia de 61.11%. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se puede observar que es similar a lo obtenido y reportado en otros estudios, como el realizado en México por Sierra et al., (1993) quienes reportaron una seroprevalencia del 67% al analizar 50 sueros bovinos procedentes de diferentes estados de la República, mientras que Cerny and Schuller, (1988) encontraron seropositividad a partir de 122 muestras séricas del 72% en un estudio realizado en Suiza.

AÑO	AUTOR(ES)	No. ANIMALES MUESTREADOS	TÉCNICA UTILIZADA	% DE PREVALENCIA A IBR.
1990	Peter J. K. y Burham	1745	ELISA	37.8
1991	Behymer y Riemann	1953	ELISA	3
1993	Kramps et al	41	ELISA	¿
1995	Banda R., Torres A., Alvarado	50	ELISA	82
1995	Matus P., Güiris A.	70	ELISA	77
1987	Barajas Rojas	296	ELISA	2.5
1995	Barajas R.J. Rodríguez R.D.	780	ELISA	16
1995	Quintero C.J., Enríquez, O.I.	100	Seroneutralización	17
1995	Delgado, G.R. et al.	30	ELISA	6
1996	Velarde O.C. et al	104	ELISA	4.8
1998	Rodríguez, A.F., et al	90	ELISA	38.88
1998	Güiris, et al.	90	ELISA	61.11

MATERIALES Y MÉTODOS

DESCRIPCIÓN DEL SITIO EXPERIMENTAL

La Comarca Lagunera,

La Comarca Lagunera está localizada en la región semidesértica del norte de México y comprende las porciones suroeste del estado de Coahuila y Noroeste del estado de Durango. Está limitada por los meridianos $101^{\circ}49'$ y $106^{\circ}23'$, comprende una superficie de 5'250,000 hectáreas aproximadamente (28). Es una planicie cuya altitud es de 1140 MSNM aproximadamente, existiendo algunas sierras que no son de mucha importancia en cuanto a su elevación entre las que se encuentran. Al oriente las de Balcuco, al poniente las de Tlahualilo, las Campanas, San Carlos, España, Noas y Mapimí; al Noroeste las de Gavia, Bermejillo y Santiago, al centro Norte las de san Lázaro y al Sur de Jimulco (26). El clima de acuerdo a Thormthwaite en 1948 y Contreras en 1946, lo clasifican como árido con deficiente precipitación pluvial en todas las estaciones (24). En cuanto a la T° en la región, hay dos períodos bien marcados; el primero (7 meses) que comprende desde abril hasta octubre en los que la T° media mensual está por encima de los 20°C y el segundo (5 meses) que comprende de noviembre a marzo en los que la T° media mensual varía entre 13.6°C (16).

El lapso comprendido entre mayo y agosto es el más caluroso del año y el de los meses de diciembre y enero los más fríos. La precipitación pluvial conforme a los datos obtenidos el promedio anual es de 225.2 mm, teniendo una máxima anual de 443.0 mm, y una mínima de 96.3 mm.

El principal período de lluvias se presenta generalmente a fines del verano alcanzando las máximas precipitaciones en el mes de septiembre. La humedad relativa en la Comarca Lagunera se considera como sigue: marzo, abril y mayo de 3.3%; verano: junio, julio y agosto de 46.2%; otoño: septiembre, octubre y noviembre de 52.9%; invierno: Diciembre, enero y febrero de 43.3%. La dirección del viento dominante es de NE con una velocidad promedio de 1.4 m/seg.

La vegetación nativa propia de los climas semidesérticos es la que presenta una dominancia de el chaparral de gobernadora (*lanaea tridentata*), huizache (*acacia farneciana*), lechuguilla (*agave canescens*), bisnagas (*mamilarias spp* y (*chinocactus spp*), mezquites (*pirosopis juliflora*).

En la Comarca Lagunera existe un total de 165,221 cabezas de ganado BPL, con una producción total de 1'236,512.5 litros, cuyo valor económico representa \$2'534,850.7 miles de pesos (El Siglo de Torreón, 1 de enero de 1997).

La ubicación exacta del sitio experimental es en el establo La Unión ubicado en carretera La Unión, km 2, propiedad del Lic. Raúl Villarreal González.

En el cual se tenía antecedentes de la enfermedad y se procedió a la recolección de muestras de sangre para ser transportadas al Laboratorio de Inmunología de la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. En el Laboratorio se procedió a la centrifugación de sueros, enumerándolos y refrigerándolos a -20 C hasta su uso para las pruebas de ELISA.

MATERIAL DE LABORATORIO

- 1.-1 caja de tubos de vacutainer con 100.
- 2.-1 caja de agujas de vacutainer con 100.
- 3.-1 bolsa de viales de 1 ml.
- 4.-1 bolsa de puntas de pipetas de precisión.
- 5.-1 bolsa de algodón.
- 6.- bolsa de guantes.
- 7.-1 frasco de alcohol.
- 8.-1 pipeta de precisión para dispensar 20,180,200,300 μl .
- 9.-Vaso de precipitado graduado de 1000 ml para solución de lavado.
- 10.-Lector individual.
- 11.-1 rollo de papel absorbente.
- 12.-Agua destilada o desionizada.
- 13.-Estufa con control de temperatura para incubar a 38 c.
- 14.-Un kit inmunoenzimático (ELISA) para IBR.

REACTIVOS DEL KIT.

5 placas microtituladoras sensibilizadas con BHV1.

Conjugado antirumiante IgG-PO o anticuerpo monoclonal con peroxidasa de rábano.

Suero control negativo con azida de sodio al 0.1% como preservativo.

Suero control positivo, con azida de sodio al 0.1% como conservador.

Solución diluyente concentrada

Solución cromógeno,

Solución de paro

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISA

Procedimiento.

A) Preparación de reactivos.

- 1.-Dejar todos los reactivos a equilibrio para la temperatura de incubación requerida.
- 2.-Si únicamente una porción de la microplaca es requerida, es posible cortar papel aluminio sellando las placas y retirar la cantidad necesaria.
- 3.-Determinar la cantidad de solución de lavado necesaria para el lavado de las placas de microtitulación diluyendo las muestras y el control. Diluya la solución concentrado 1:10 con agua (una parte de concentrado con nueve partes de agua). Esta solución de lavado debe ser preparada naturalmente en una base diaria y debe tener un pH de entre 5.5 y 6.0.

B) Disolución, distribución e incubación de muestras y controles.

- 1.-Se Reparte 180 μ l de solución de lavado en cada uno de los pozos de la placa de microtitulación.
- 2.-Repartir 20 μ l de las muestras puras y controles dentro del pocillo apropiado de la placa de microtitulación. Dilución final 1:10.
- 3.-Mezclar el contenido totalmente dentro de cada uno para agitar suavemente la microplaca.

4.-Cubrir la microplaca con papel contac e incubar por 90 minutos a temperatura ambiente o en una cámara húmeda. Una incubación a temperatura ambiente va a requerir mayor tiempo de incubación.

C) Lavado de las microplacas.

Después de la incubación se lava la placa de microtitulación. Agitar a fondo vaciándolas totalmente y llenar cada uno con menos de 300 μ l de solución de lavado, evitando la formación de burbujas de aire. Repetir este paso dos veces. Agitar la placa de microtitulación minuciosamente para vaciarla totalmente, dando unas palmadas firmemente sobre papel absorbente.

D) Dilución, distribución e incubación del conjugado.

1.-Se diluye el conjugado anti IgG de rumiante con solución de lavado en una dilución 1:100 respectivamente.

2.-Distribuir 200 μ l de esta dilución dentro de cada uno de los pocillos e incubar la placa de microtitulación por 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

E) Lavado de la placa de microtitulación.

Se lava la placa de microtitulación de la misma forma que el paso C).

F) Adición de el cromógeno.

Distribuir 200 μ l de cromógeno precalentado a 25 °C dentro de cada suero.

G) Lectura de resultados.

Los resultados se leen con el fotómetro en una longitud de onda de 405 nm (referencia de longitud de onda 492 nm). Al mismo tiempo con la red de extinción (NE por sus siglas en inglés) del control positivo es >0.4 (normalmente debe ocurrir dentro de los 10 a 30 minutos después de la adición del cromógeno. La reacción puede ser detenida añadiendo 50 μl de solución de arresto previamente calentado a temperatura ambiente. La solución de arresto debe ser distribuida en el mismo orden y con la misma rapidez con que fue empleado con el cromógeno.

H) Interpretación de resultados.

Se determina la red de extinción (NE) de controles y muestras para obtener la correspondiente DO (densidad óptica) obtenida en cada uno de los pozos con $-\text{Ag}$ (Antígeno negativo) de los valores obtenidos en cada uno de los pozos de $+\text{Ag}$ (Antígeno positivo).

$$\text{NE} = (\text{OD} + \text{Ag}) - (\text{OD} - \text{Ag})$$

La NE de los duplicados debe ser promediado. La NE de el control positivo (NE pos) así como la NE de las muestras (EN muestra) deben estar disponibles para obtener la NE de el control negativo (NEneg):

Control positivo $\text{NE}_{\text{pos}} - \text{NE}_{\text{neg}}$

Control negativo $\text{NE}_{\text{muestra}} - \text{NE}_{\text{neg}}$

Analizar las muestras en relación con el negativo y el control positivo con la fórmula:

NEmuestra - NEneg

Valor (%) = ----- X 100 %

NEpos - NEneg

Valor	< 30%	30-85%	>85%
Interpretación	negativo	ambiguos	positivo

En caso de que alguna muestra reste sospechosa o ambigua después de una segunda corrida de esta prueba, una nueva muestra del mismo animal debe ser colectada y analizada por segunda vez. En caso de que la segunda muestra sea otra vez sospechosa, la situación epidemiológica debe estar considerada para ser reanalizada con un método diferente en caso de estar disponible.

Para utilización de este kit se tuvieron las precauciones mencionadas por el fabricante.

RESULTADOS:

TABLA No 1.

Porcentaje de animales positivos, ambiguos y negativos a anticuerpos de IBR de un total de 63 animales.

TITULOS	No.	%
POSITIVOS	13	20.64
AMBIGUOS	24	38.10
NEGATIVOS	26	41.26
TOTAL	63	100.00

GRAFICO 1



Como puede observarse en la tabla No. 1, 13 animales que corresponden al 20.64% dieron títulos a anticuerpos positivos contra IBR. 24 animales fueron sospechosos o ambiguos que corresponde a 34.92% y 26 animales resultaron negativos con 41.26%. Las densidades ópticas observadas variaron de acuerdo al lector utilizado con valores de 2.634 para positivos hasta .337 para negativos.

DISCUSIÓN

Los valores obtenidos en las densidades ópticas para la detección de anticuerpos contra IBR en el número de vacas muestreadas variaron de acuerdo a los criterios de evaluación determinados en el kit, los cuales pudieran ser considerados como valores normales y su variación atribuible a las diferencias individuales en respuesta a la sensibilidad e interacción de los múltiples factores que intervienen en el Complejo Respiratorio Bovino (CRB).

Los resultados obtenidos son inferiores a los obtenidos por Peter y Burham, 1990; Banda, et al. 1995; Matus y Güiris, 1995; Rodríguez, et al. 1998; Güiris, et al. 1998, y superiores a los obtenidos por Delgado(1995), Velarde (1996), Barajas (1990) y Behymer y Riemann (1991), y coincidentes con los encontrados por Quintero y Enríquez (1995) y Barajas y Rodríguez (1995), sin embargo los resultados obtenidos por varios investigadores en México (Barajas, et al. 1993, Matus, et al. 1995, Rodríguez, et al. 1998) han variado demasiado. A este respecto podemos argumentar que todas las seroprevalencia varían debido a factores medioambientales (clima) y del manejo del hato (utilización de vacunas, estrés, etc), ya que el virus puede encontrarse en varios animales en periodo de latencia y si hay alguna predisposición a estrés se manifiesta en esos animales y se disemina rápidamente ya que su ciclo de replicación es relativamente corto con pro genie completa en 12 horas (Kahrs 1977).

Kramps (1993) cita que la respuesta baja de anticuerpos detectados en varios animales pudiera deberse a anticuerpos de reacción cruzada inducidos por la infección con virus como el herpesvirus caprino 1, herpesvirus caprino 2 y herpesvirus caprino 3 o bien que el ganado se puede infectar por medio del tracto genital, el cual puede inducir a obtener titulaciones bajas de anticuerpos.

Barajas y Riemann (1995) citan que la técnica de ELISA aplicada en forma masiva en las poblaciones ayuda a detectar la realidad epidemiológica de las enfermedades y que con estudios complementarios se puede confirmar el diagnóstico por aislamiento del agente etiológico concentrando los esfuerzos de diagnóstico en los animales detectados previamente por serología ahorrando material y tiempo y garantizando una mayor certeza en el diagnóstico definitivo. El éxito del estudio epidemiológico no radica exclusivamente en la realización de la prueba diagnóstica (ELISA) si no en la estandarización de la técnica de I antígeno, la calidad del conjugado, la calidad de los sueros control positivo y negativo a utilizar, interpretación correcta de los resultados y en la evaluación epidemiológica independientemente de la certeza, confiabilidad y repetibilidad de los resultados en los que intervienen el técnico y equipo utilizado.

LITERATURA CITADA

- Ackermann, V., Belak, S., Bitsch, V., Edwards, S., Moussa, A., Rockborn, G. and Thiry, E., (1990). Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control. *Vet. Microbiol.*, 23:361-363.
- Ávila G. (1995). Abortos, causas y prevención. Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatría . Torreón, Coah., México.
- Baker, J.A., Mc Entee, K., and Gillespie, J.H.(1960): Effects of Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR-IPV) virus on Newborn calves. *Cornell Vet.*, 50, (April,). 156-170.
- Bandar R.V., Torres A,F. Cano C,P., Alvarado I,A (1995). Diagnòstico diferencial de 3 agentes causantes de problemas reproductivos en ganado lechero. *Cenid Microbiologia INIFAP-SAGDR. FMVZ-UNAM. Reuniòn Nacional de Investigaciòn Pecuaria.*
- Barajas R, J.A., Riemann and Frantii C.E (1993). Application of enzyme-linked immunosorbent assay for epidemiological studies of diseases of livestock in tropic of México. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 12(3), 717-732.
- Barajas R J.A.; Riemann (1995). Seroepidemiología de enfermedades infecciosas en el trópico de México. Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatría, Torreón Coah, México.
- Barajas R. J.A. y Rodríguez R.D (1996). Seroepidemiología de enfermedades infecciosas en ganado bovino del municipio de Tamiahua, estado de Veracruz, México. Memorias del XX Congreso Nacional de Buiatría, Acapulco, Gro., México.

- Barajas R J.A., Riemann H.P. and Franti C.E (1990). Application of Enzyme-Linked immunosorbent Assay (ELISA) for epidemiological studies of diseases of livestock in the tropic of México. *Rev. Sci. Tech Off. Int., Epiz.* 12:717-732.
- Barajas R. J.A., Riemann H.P. and Franti, C.E (1993). Serological screening for infectious cattle diseases. I. Impact of reproductive status. *Ciencia Rural* 23:69-72.
- Barajas R. J.A., Riemann H.P. and Franti C.E (1993). Serological screening for infectious cattle diseases.//Association between prevalence of positive test and level of ELISA response. *Ciencia Rural.* 23: 193-196.
- Barajas R. J.A., Riemann H.P.,and Franti C.E (1993). Serological screening for infectious cattle diseases///. Choice of Sentinel animals. *Ciencia Rural.* 23: 197-201.
- Barajas R. J.A., Riemann H.P. and Franti C.E (1993). Notes about determining the cut-off value in enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Letter to the editor. *Journal of Preventive Veterinary Medicine* 15:231-233.
- Barajas R. J.A., Riemann H.P. and Franti C.E (1993). A study of association between ELISA response to infectious disease agents and calving interval in the cattle in the tropics of Mexico. *Ciencia Rural.* 23:329-332.
- Barajas R. J.A., Riemann H.P. and franti C.E. (1993). Markov Chain modeling of endemic cattle diseases in the tropics of Mexico. *Ciencia Rural* 23:325-328.
- Barajas R J.A., Bermudez, Orozco, T.R (1987). Prevalencia de anticuerpos contra diarrea viral bovina y Rinotraqueitis infecciosa bovina en ganado holstein-cebú en el trópico de México. *Reunión de investigación pecuaria en México 1987* p.61-62.

- Behymer D.E., H.P. Riemann, W. Utterback, C.E. Franti, (1991). Mass screening of cattle sera against 14 infectious diseases agents, using an ELISA system for monitoring health in livestock. *Am J Vet Res*, Vol. 52, No. 10, oct
- Bitsch, V. (1984). On the latency of infectious bovine rhinotracheitis virus infection and its significance, especially with regard to the possibility of controlling infection. In G. Wittmann, R. Gaskell and H.J. Rziha (Editors), *Latent herpes virus infections in veterinary medicine*. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, pp. 163-170.
- Cano, S. (1977). "Evaluación de sementales Holstein Nacionales y Extranjeros en la Comarca Lagunera". Tesis de maestría en ciencias.. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coah, México.
- Carbrey, E.A., et al:(1972). Recommended Standard Laboratory Techniques for diagnosing infectious bovine rhinotracheitis, bovine virus diarrhea and shipping fever(parainfluenza-3). In proceedings. 75th Ann Meeting, US Anim Health Assoc, pp. 629-648.
- Cerny, S. And Schuller, W.:(1988). An ELISA for diagnosing IBR/IPV, compared with the results of the serum neutralization test. *Wiener-Tierarztliche-Monattsschift*. Switzerland. 75, 12. 504-507.
- Charles, A., Hjerpe, (1990). Bovine vaccines and herd vaccination programs. *Veterinary clinic of Nort America Food Animal Practice* Vol. 6, No. 1.
- Christensen C.R. (1995). Complejo respiratorio bovino (CRB). *Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatría*. Torreón Coah, México.
- Clyde, A., Kirkbride, (1991). Causes and prevention of bovine abortion. *Bovine Proceedings*. Jan 75-80
- Cortese Vic. (1994). Guía de vacunación. *Lechero Latino*, junio/julio/94, Pag. 40-45.

- Cruz R.j.; Güiris A, Sánchez M,J.B.(1995). Estudio serológico y epizootiológico de IBR, leptospirosis y brucelosis en vacas con problemas reproductivos. Universidad Autónoma de Chiapas. Esc. De Med. Vet. Y Zoot. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria
- Delgado, G.R.; Quintero C.J. (1995). Estudio Patológico, Microbiológico y Serológico del aborto en bovinos Holstein de la Comarca Lagunera. XIX Congreso Nacional de Buiatría Torreón Coah, México.
- De los Santos, V.S. 1973 Climatología General de la Región Lagunera. Boletín Agrícola Lagunero S.R.H.
- Durham P.J.K.; Lori E. Hassard. (1990). Prevalence of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza-3, bovine respiratory syncytial and bovine viral diarrhoea viruses in cattle in Saskatchewan and Canada. Can Vet Vol. 31 december
- Fondo de garantía y fomento para agricultura, ganadería y avicultura (1980).
- Garza C F. (1998).. Manejo de la salud del ganado al arribo. Memorias IV curso de actualización sobre producción de ganado bovino en corral. FMVZUANL Marzo 25 del 98.
- Geymonat, F.Ó.R. (1973). Estudio de algunos aspectos de las explotaciones lecheras en la Comarca Lagunera p.z. Residencia, Torreón, Coah.
- Güiris, A. D.M.* Milu, A. R; Cruz, R. J., Vázquez, C.F. y Samayoa, O.Y. (1998). Estudio epizootiológico de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), Leptospirosis y brucelosis en vacas con problemas reproductivos del municipio de Villaflores, Chiapas. Congreso Nacional de Buiatría Acapulco, Guerrero, México.
- Jones T.C. and Hunt R.D. (1983). Veterinary Pathology Sth rd Lea and Febiger, Philadelphia, U.S.A.
- Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. and Palmer, N. (1985).: Pathology of domestic Animals 3rd. Ed. Academy Press, New York U.S.A.

- Kahrs R.F. (1977). Infectious Bovine Rhinotracheitis: A Review and Update
 Journal of the American Veterinary Medical Association pag. 1055-1062.
- Kramps, J.A. Quak S., Weerdmeester K. (1993) Comparative study in sixteen
 for detection antibodies against bovine herpesvirus 1 in cattle. *Vet.
 Microbiol.* 35(1-2):11-21.
- Larson, Bob, L. PhD (1996). Diagnosing The cause of bovine abortions and
 other perinatal deaths. *Veterinary Medicine.* pp 478-486.
- Lazarowicz, M., Steck, F., Ackermann, M. and Kihm, U. (1983) Prufung von
 zwei Impfstoffen gegen die Infectiose Bovine Rhinotracheitis Schweeiz.
Arch. Tierheilk., 125: 797-808.
- Levings, R.L., Kaeberle, M.L. and Reed, D.E.(1984). Cross reactions of bovine
 herpesvirus 1 antigens with those of other cattle herpesviruses. *Vet.
 Microbiol.,* 9:329-344.
- Marroquib J.S., Borja Gustavo, Velázquez Robertino y De la Cruz José A.
 (1964). Estudio leológico dasonómico de las zonas áridas del norte de
 México. *Publicación especial No. 2 I.N.I.F.A.P.* pp. 46-82
- Matus P. G.M.; Güiris A, D.M.; Orea M, R.I.(1995). Estudio serológico y
 epizootológico de IBR PI-3, BRSV, en sementales bovinos del estado
 de Chiapas Universidad Autónoma del Estado de Chiapas, Esc. De
 Medicina Veterinaria y Zootécnia. Reunión Nacional de Investigación
 Pecuaria.
- Montenegro, S.J., Guillen A.T., Tapang P., Abdel –Gawad A. , toro m. And
 Ristic M. (1990). Use of the dot enzyme-linked immunosorbent assay
 with solated *Anaplasma marginale* initial bodies for serodiagnosis of
 anaplasmosis in cattle. *Am. J. Vet. Res* 51: 1518-1621.
- Pierre L, (1995). Bovine Respiratory Disease complex An. European
 Perspective, F.M.V.Z. University of Liége. Liége, Brussels, Belgium.
 Septiembre 1995. P. 71-74.

- Quintero, C.J. Enríquez, O.J., Lastra, D.G.; Esguerra, D.J. ; Luna, De A.A.; Delgado, G.R. y Peña A.G.(1995). Monitoreo de algunas enfermedades en vaquillas importadas a la Comarca Lagunera procedentes de Estados Unidos y Canadá. Memorias del XIX congreso nacional de Buiatría Torreón, coah. México pp. 70-73.
- Rodríguez A.f.; Güiris, A.D.; Milo, A.R.(1998). Seroperfil reproductivo (IBR, Leptospirosis y Brucelosis) en hembras bovinas del municipio de Othon P. Blanco, Quintana Roo. Esc. De Med. Vet. Y Zoot. UNACH. Congreso Nacional de Buiatría. Acapulco, Gro. México.
- Roth J, A. (1993). The Immunologic Basis for Effective Vaccines 26th Annual convention proceedings of American Association of bovine Practitioners. Septiembre 16-19. 1993
- Schultz R.(1993) Certain Factores to considers When Designing a Bovine vaccination program 26th annual convention proceedings of American Assoc. Of bovine practitioners. Septiembre 16-19. 1993.
- Sierra, R.N., Alvarado, V.M., Bojorquez, N.L.(1993). Aplicación de ELISA para el diagnóstico de algunas enfermedades virales de repercusión reproductiva en bovinos. XVIII Congreso Nacional de Buiatría p. 20,
- Studdert, M.J., Barker, C.A.V., and Savan, M.(1964). Infectious Pustular vulvovaginitis virus infection in Bulls Am. J. Vet. Res, 25,: 303-314.
- Taliens, L.T., Beckenhauer, W.H. Thurben, E.T. et al. (1989). Efficacy of viral components of a nonabortigen combination vaccine for prevention of respiratory and reproductive system diseases in cattle. J.A. V.M.A. 194: 1273-1280.
- Timoney, P.J.(1971). An Outbreak of the conjunctival form of infectious bovine rhinotracheitis virus infection. Vet. Rec. 89, 370.

- Tortora P.J.L.(1995). Pérdidas Prenatales y síndrome de abortos en bovinos. Sexto Curso Internacional de Reproducción Bovina. Academia de investigación en biología de la reproducción. Pp. 98-106.
- Ungar-Waron, H. and Abraham, A.(1991). Immunoglobulin M (IgM) indirect enzyme-linked immunosorbent assay and the involvement of IgM-rheumatoid factor in the serodiagnosis of BHV1 infection. *Vet. Microbiol.* 26:53-63.
- Velarde, O.C., Alvarado, I.A., Mejía, S.P.(1996). Control de enfermedades infecciosas dentro de un programa de mejoramiento genético de bovinos. Memorias del XX Congreso nacional de Buiatría Acapulco, Guerrero, México.
- Vilchis, M.C., Alvarado y Aguilar.(1987). Estudio serológico de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) en ganado bovino. Reunión de investigación pecuaria en México, pp 64-65 .
- Zygraichm, N., Lobmann, M., Vascoboinic, E., Berge, E., and Huygelen C.(1974). In vivo and in vitro properties of a temperature sensitive mutant of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Res. Vet. Sci.* 16: 328-335.