

## Análisis de la asociación de Queratoconjuntivitis Bovina Infecciosa con Herpes Virus Bovino- 1, en terneros de tres meses a un año de edad en el Uruguay

Cardozo, E.<sup>1\*</sup>; Banchemo, L. A.<sup>2</sup>; Guarino, H.<sup>3</sup>; Diana, V.<sup>4</sup>; Lozano, A.<sup>5</sup>

### SUMMARY

The objective of this work was to determine the relationship between Bovine Herpesvirus- 1 (BHV-1), etiologic agent Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), and the presence of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis (IBK) in beef calves younger than one year old.

A case - control study was performed on 160 calves between the ages of three months and 1 year old, 80 cases and 80 controls. A clinical scale for IBK was used to evaluate every case and control. An indirect ELISA technique was used on all the animals for the diagnosis of specific antibodies for BHV-1 Ig G type. Also, 39 random samples of ocular swabs were taken from cases and controls for the detection of BHV-1 by PCR.

The odds ratio found was 1,0 for a significance level of 95% . With a superior confidence level of 7.2 and an inferior confidence level of 0.13 for the serological samples. On the other hand, the results of the PCR ocular secretion tests for BHV-1 detection were negative, not being able to estimate statistics.

According to the results, it is not possible to ascertain an existing relationship between the two studied variables, IBK disease and positive serology for BHV-1, corresponding to the risk factor that was considered.

**Key Words:** *Infectious Bovine Keratoconjunctivitis (IBK), Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1), Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR), calves, case -control study, IBK vaccines*

### RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar la relación entre la infección de Herpes Virus Bovino- 1 (BHV-1) agente etiológico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) y la presencia de Queratoconjuntivitis bovina infecciosa (QCIB), en terneros de razas carniceras menores de un año de edad.

Se realizó un estudio de Casos y Controles, en 160 terneros de tres meses a un año de edad, 80 casos y 80 controles. Se evaluaron a los casos y controles usando una escala clínica para QCIB. Se utilizó la técnica de ELISA indirecto en muestras pareadas para el diagnóstico de anticuerpos específicos tipo Ig G de BHV-1 en la totalidad de los animales incluidos. Además se tomaron 39 muestras de hisopados oculares aleatorias de casos y controles para la detección de BHV-1 por la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

El Odds Ratio hallado fue de 1,0 para un nivel de significación de 95%. Con un límite de confianza superior de 7,2 y un límite de confianza inferior de 0.13 para las muestras serológicas. En tanto los resultados de PCR de las secreciones oculares para la detección viral, fueron negativos en su totalidad, no siendo estimables los datos estadísticamente.

De acuerdo a los resultados no se puede afirmar que hay asociación entre las dos variables estudiadas, enfermedad QCIB y serología positiva para BHV-1 que corresponde al factor de riesgo considerado.

**Palabras claves:** *Queratoconjuntivitis bovina infecciosa (QCIB), Herpes Virus bovino 1 (BHV-1), Rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR), terneros, estudio de casos y controles, vacunas QCIB*

### INTRODUCCIÓN

En los terneros se presentan cuadros oftalmológicos, que dadas las características clínicas y epidemiológicas se diagnostican como Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QCIB). Se trata de una enfermedad infecto contagiosa producida por la *Moraxella bovis* (*M. bovis*), que puede afectar la conjuntiva, la cór-

nea y otras estructuras oculares en el caso de que existan complicaciones, produciendo la pérdida de la visión en forma transitoria o permanente, lo que determina pérdida de peso y retraso en el crecimiento. Sumado a esto se deben agregar los gastos en específicos zoterápicos, en el manejo de los animales y las horas de trabajo del personal del establecimiento. (2), (15).

Si bien la *M. bovis* es el agente etiológico primario, muchas veces es imposible su aislamiento. Por lo que el diagnóstico de la enfermedad se realiza considerando las características clínicas y epidemiológicas más que por confirmación bacteriológica.

La *M. bovis* de fimbria tipo Q produce un índice de infecciones relativamente alto, así como de QCIB. Las bacterias

<sup>1</sup>Departamento de Rumiantes y Suinos. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. Montevideo. Uruguay.

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Preventiva. Universidad de la República. Facultad de Medicina. Montevideo. Uruguay.

<sup>3</sup>Departamento de Ciencias Microbiológicas. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. Montevideo. Uruguay.

<sup>4</sup>Laboratorio de Análisis Clínicos de la Asociación Rural de San José. Uruguay.

<sup>5</sup>Departamento de Salud Ambiental y Legislación. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. Montevideo. Uruguay.

\*Autor responsable: E. Cardozo. Tel 481 02 07 Montevideo. Uruguay. E-mail: cardozobe@hotmail.com

Recibido: mayo de 2008 Aprobado: octubre de 2008

con fimbrias tipo 1 producen una incidencia más baja y las bacterias sin fimbrias no producen infecciones (20).

La Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) es una enfermedad transmisible, de etiología viral, que se presenta en el ganado bovino, afectando los sistemas respiratorio, digestivo, genital y nervioso. El agente causal pertenece a la familia *Herpesviridae*, clasificado como Herpes Virus Bovino -1 (BHV-1) (6). Aislamientos virales a partir de animales con diferente sintomatología son desde el punto de vista antigénico, idénticos.

Sin embargo por análisis de ADN genómico se han podido distinguir 3 subtipos: subtipo 1.1, subtipo 1.2a y subtipo 1.2b, que se relacionarían con las diferentes formas de presentación clínica. (16).

La forma respiratoria se caracteriza por obstrucción de las vías aéreas superiores, con descarga nasal mucosa a mucopurulenta y conjuntivitis que puede ser unilateral o bilateral, generalmente con profuso lagrimeo. Esta conjuntivitis está asociada con la forma respiratoria pero puede presentarse en el rodeo como un único signo clínico. (6) La infección puede permanecer latente y ser reactivada en casos de stress, como por ejemplo la infección con otros virus y bacterias. (6) Debido a la característica de latencia que presentan los herpesvirus, todo animal infectado es un portador y posible diseminador de la infección al rodeo.

En ensayos experimentales la vacunación a terneros con el virus vivo modificado de BHV-1 se ha asociado con lesiones oculares más pronunciadas que las producidas por *M. bovis* en casos de QCIB (8, 9, 20, 23, 27).

A partir de esta aseveración, se ha generado el concepto de la existencia de una asociación entre QCIB y BHV-1 en condiciones naturales (4, 8) hecho que no se ha demostrado.

En estudios para la confirmación de los agentes etiológicos de QCIB, se buscó la presencia de virus BHV-1 en terneros de 5 a 6 meses con QCIB en condiciones de campo, usando para el diagnóstico cultivos celulares y serología. Los resultados fueron negativos para IBR en todos los casos (21).

También se ha buscado la presencia del HVB-1 en terneros infectados de QCIB, siendo negativo su hallazgo (7).

Paolicchi y otros, 1998, buscando los agentes etiológicos implicados en la QCIB, estudiaron la presencia de HVB-1 en secreciones oculares y la cinética de anticuerpos contra BHV-1 en animales enfermos, no encontrando BHV-1 en los hisopados ni títulos significativos de anticuerpos para BHV-1 (22).

Microorganismos como *Branhamella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Micoplasma bovoculi* y *adenovirus*, fueron aislados en brotes de campo de QCIB (27). Aunque fueron recuperados diferentes micoplasmas, rickettsias y virus, su relación con la etiopatogenia, si la hay no ha sido determinada.

La interrelación entre estas dos enfermedades las considera la industria farmacéutica, ya que existen vacunas para QCIB que tienen también antígeno BHV-1 inactivado, utilizándose las mismas en la categoría de animales estudiados.

Si bien esta interacción infecciosa es frecuentemente citada, no hemos encontrado estudios de investigación en donde se evalúe la asociación del BHV-1, agente etiológico del IBR, con la Queratoconjuntivitis Bovina Infecciosa.

De acuerdo a la bibliografía la prevalencia del virus de IBR en el Uruguay es de un 36.6% en animales de carne (12, 24), estudiada en todas las categorías, menos en terneros.

Este trabajo se plantea como objetivo comprobar la existencia de una asociación entre QCIB y el virus BHV-1, y de

existir esta, determinar la magnitud de la misma.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó en 6 establecimientos ganaderos distribuidos en el Uruguay, durante los años 2005 y 2006.

Se realizó un estudio observacional analítico de tipo caso/control (CC).

La población de estudio fueron terneros de producción carnífera de 3 a 12 meses de edad, por ser los más frecuentemente afectados de QCIB (4).

Se definieron como **casos** aquellos terneros que presentaron signos (cuadro 1) y síntomas clínicos de QCIB, que no estaban inmunizados para IBR y que no mostraron otro tipo de patología infecciosa.

Se consideraron **controles** aquellos terneros que no presentaron signos ni síntomas clínicos de QCIB, que no estaban inmunizados para IBR y que no mostraron otro tipo de patología infecciosa.

La selección de los casos se realizó a través de la comunicación personal de los Productores a la Facultad de Veterinaria de Montevideo, Uruguay (Departamento de Rumiantes) que declararon tener terneros enfermos de QCIB.

Para la selección de los mismos se realizó un muestreo de tipo no probabilístico consecutivo.

Se seleccionaron los controles (uno por cada caso), de los mismos establecimientos que declararon tener terneros con QCIB de acuerdo a un muestreo aleatorio.

**Cuadro 1.** Escala clínica para la realización del diagnóstico de QCIB (E. Cardozo).

Grado	Lesiones
1	Conjuntivitis o conjuntivitis + leve queratitis (edema de córnea)
2	Queratitis ulcerativa, queratitis abscedativa, Descemetocel (acompañados de uveítis)
3	Sinequias de 360°, Prolapso de iris en úlceras perforadas (Estafilomas), úlceras perforadas, Panoftalmitis, Luxación de cristalino, Ptisis bulbis, Simblefarones./ Miasis
4	Cicatrización corneal

Se calculó el número de casos necesarios para estudiar el factor de exposición, asumiendo además que se trabajó con una hipótesis bilateral, un nivel de significación del 95%, y una magnitud mínima del OR de 1.3 considerado con relevancia clínica.

Se tomó como número de casos necesarios el mayor valor hallado.

En función de las consideraciones ya hechas, y asumiendo una prevalencia de exposición a IBR de 36,6% (0.36), el número de casos a estudiar correspondería a 60. Para este estudio se consideró un número superior al estimado, 80 casos, 80 controles como margen de seguridad.

Tanto a casos como a controles se les realizó búsqueda de anticuerpos específicos del tipo IgG, para el virus de Rino-traquitis Infecciosa Bovina en suero, a través de la técnica de ELISA, inmunoen-sayo indirecto (CIVTEST bovis IBR). Utilizándose muestras pareadas extraídas con 20 días de diferencia entre una y otra. El título de Acs que se consideró positivo fue de 1/100.

Se tomaron 39 muestras aleatorias de casos y controles (hisopados oculares) para la detección de BHV-1 por una técnica molecular de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Las condiciones de amplificación por PCR fueron realizadas utilizando la cepa de referencia, estableciéndose los parámetros de concentración óptima del  $Cl_2Mg$  en 1.5  $\mu M$  y de primers de 0,1  $\mu M$  de cada uno.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se trabajó con 160 muestras pareadas serológicas, correspondientes: 80 a enfermos de QCIB (casos) y 80 sanos (controles). Superando el tamaño muestra calculado.

Una vez procesados los datos con el Programa Epi Info 6.0 se halló como resultado OR de 1.0, con un límite de confianza superior de 7,2 y un límite de confianza inferior de 0.13.

Los resultados de la serología de BHV-1 de los casos y controles se resumen en el cuadro 2, hallándose 4 animales positivos (2 casos y 2 controles). Se consideraron animales positivos aquellos que en al menos 1 de las muestras se detectaron

**Cuadro 2.** Distribución de casos y controles según Serología de HVB - 1 Uruguay 2007.

		QCBI		Total
		Si	No	
Factor de riesgo Serología HVB-1	Si	2	2	4
	No	78	78	156
	Total	80	80	160

Significación: 95%  
Potencia: 80%  
OR: = 1,0  
LCs: = 7,2  
LCi: = 0,13

anticuerpos (Acs) anti-BHV-1. En dos animales (un caso y un control) se mantuvieron los títulos de Acs en ambas muestras. Otro animal dio positivo en la primera muestra y negativo en la segunda, posiblemente los anticuerpos detectados en la primera muestra puedan ser Acs calostrales (14).

En el cuarto animal (control) hubo seroconversión (1ª muestra negativa y 2ª positiva), sugiriendo que fue el único animal que se infectó durante el periodo del estudio.

Los resultados del análisis de PCR en casos y controles se resume en el cuadro 3.

No se observó ningún producto de amplificación en los controles negativos.

Con respecto a la determinación de la sensibilidad de la prueba se estimó en aproximadamente 2.5 TCID50. En las condiciones mencionadas en M&M se obtuvieron productos de amplificación del tamaño esperado.

Del análisis de las muestras extraídas en forma aleatoria se procesó el total de las

mismas, 39, con resultado negativo. No se observaron amplificaciones en ninguna de las muestras analizadas.

Uno de los animales, correspondiente al grupo caso que resultó positivo en ambas muestras serológicas, tuvo PCR negativo, demostrando la ausencia del virus en las secreciones oculares del hisopado analizado.

Las cifras obtenidas de los estudios de PCR al ser analizadas en la tabla tetracórica para encontrar el valor del Odds Ratio mostraron que no se podía obtener valores estimables, dado la nulidad de test positivos.

Al no poder afirmarse la asociación entre estas dos enfermedades, no resulta posible realizar el análisis cotejándolo con las lesiones clínicas.

### CONSIDERACIONES

El diagnóstico de QCIB se realizó teniendo en cuenta los aspectos clínicos y epidemiológicos de la enfermedad en los seis establecimientos en que se llevó a cabo el estudio.

**Cuadro 3.** Distribución de casos y controles según PCR de HVB - 1 Uruguay 2007.

		Si	No	Total
		Factor de riesgo PCR HVB-1	0	0
	No	21	18	39
	Total	21	18	39

OR: no estimable

Se consideró no relevante a los efectos de este trabajo de investigación el aislamiento del agente etiológico, dado que la *M. bovis* no se aísla en el 100% de los ojos afectados. Según Reinaldo, 1993 (21), se encontró en 30 de 45 animales enfermos, o sea fue aislada en un 67% de los casos, por lo que no podemos afirmar que la no presencia en las secreciones oculares no signifique enfermedad.

Este mismo autor encontró: diferencias significativas entre los grupos I, II, III, IV (grados clínicos), en relación al aislamiento del microorganismo que «pudiera ser explicado porque a medida que avanza el cuadro clínico el nivel de deterioro ocular es mayor y el aflujo de microorganismos es más evidente, los que pudieran desplazar en importancia a *M. bovis*».

Para la extracción de las muestras serológicas, a los efectos de buscar anticuerpos de BHV-1 se consideró la sintomatología clínica de QCIB.

Como en este caso el objetivo de la técnica inmuno enzimática ELISA indirecto no es la confirmación de la enfermedad de Rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), sino la detección de anticuerpos BHV-1 en animales enfermos de QCIB y en controles sanos, el concepto de seropositividad se estimó al tener al menos una muestra positiva.

El cálculo del tamaño muestral que consideramos se basó en la seroprevalencia del virus en el territorio nacional (36,6%). De acuerdo a los resultados obtenidos un OR de 1 con un rango muy elevado entre el límite de confianza superior y el inferior no nos permite afirmar que las variables estudiadas (QCIB y serología para BHV-1) estén asociadas.

Al ser la población estudiada animales menores de 1 año de edad, seguramente estamos registrando primo-infecciones y no podemos descartar los anticuerpos maternos transferidos con el calostro, a pesar de ello, se observa un número muy bajo de animales seropositivos, distribuidos homogéneamente entre enfermos y controles.

De acuerdo a la literatura revisada, no hay investigación que demuestre la asociación de QCIB y BHV-1, por lo tanto el presente estudio es el único diseñado para este objetivo.

Afirmar que existe una asociación entre QCIB y BHV-1 no sería correcto dada la falta de evidencia.

Planteándose otros objetivos en sus trabajos de investigación autores como Reinaldo 1993, Paolicchi 1998 y Fiorentino 2001 buscan la presencia del

BHV-1 en secreciones oculares y anticuerpos anti-BHV-1 en suero de animales enfermos de QCIB. Estos autores no encontraron evidencia de la infección de BHV-1 en enfermos de QCIB, lo que coincide con nuestros resultados.

Por lo tanto, no estaría demostrado científicamente el mayor beneficio de la utilización de vacunas contra la QCIB combinada con el antígeno viral (BHV-1), para la prevención de la QCIB en esta categoría de animales.

Es necesario conocer la prevalencia del BHV-1 en la población de estudio (terneros menores de 1 año), que posiblemente sea diferente a la de otras categorías.

#### Agradecimientos

A los ayudantes del Proyecto: Dr. Gonzalo Bono, Dra. María del Mar Gallinal, Br. Danilo González, Dr. Christian Hernández.

A los productores rurales que nos permitieron el ingreso a sus establecimientos con la finalidad de realizar docencia e investigación.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica, quien aprobó académicamente el proyecto y lo financió.

Al Laboratorio HIPRA S.A quien aportó los Kit para la serología.

#### Referencias bibliográficas

- 1) Aikman, J.G.; Allan, E.M.; Selman, I. E. (1985). Experimental production of infectious bovine keratoconjunctivitis. Vet Rec. 117: 234- 239.
- 2) Brugere Picoux, J. (1979). La keratoconjunctivite infectieuse des bovins. Red Méd Vet. 155: 201-209.
- 3) Cardozo, E.; Lozano, A. (2002). Implementación de la vía subconjuntival para el tratamiento de la Queratoconjunctivitis Bovina Infecciosa. Jornadas de Buiatría Paysandú. Uruguay 2002. 1: 289. Jornadas Técnicas de Facultad de Veterinaria (2003). XI Congreso Latinoamericano V Congreso Brasileiro, II Congreso Nordeste Bahia (2003) 11: 34-35.
- 4) Cesar D. (1999) «Principales problemas sanitarios desde el nacimiento al destete». Foro organización de la cría vacuna. San Gregorio de Polanco. Tacuarembó. Uruguay. p 83-97.
- 5) Deja, O.; Muller, W.; Bocklisch, H.; Stief, E.; Heinrich Lange, S. (1987). Control of infectious bovine keratoconjunctivitis in a young cattle rearing unit by means of a herd-specific Moraxella bovis vaccine. Monatshefte - für Veterinarmedizin. 42: 501-505.
- 6) Fenner, F.; Gibbs, E. P.; Murphy, F. A.; Rott, R.; Studdert, M. (1993) Veterinary Virology. Ch: Herpesviridae. 2<sup>nd</sup>. Ed. Academic Press, p. 337- 368.
- 7) Fiorentino, A.; Peralta, M.; Odeon, A.; Malena, R.; Bowden, R.; Paolicchi, F. (2001). Lesiones oculares en terneros con Queratoconjunctivitis bovina infecciosa infectados experimentalmente y en forma natural con *M. bovis*. Rev Med. Vet. 82: 166- 170.
- 8) George, L. W. (1984). Clinical Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. The Compendium Con. Educ. Prac. Vet. 6: S712- S724.
- 9) George, L. W.; Ardans, A.; Mihalyi, J.; Reina, M. (1988). Enhancement of infectious bovine keratoconjunctivitis by modified -live infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine. Am. J. Vet. Res. 49: 1800-1806.
- 10) Gingeras, T. R.; Richman, D.D.; Kwoh, D.Y.; Guatelli, J.C. (1990). Methodologies for *in vitro* nucleic acid amplification and their applications. Vet Microbiol. 24: 235-251.

- 11) **Guarino, H.; Maisonnave, J.; Capano, F.; Pereira, J.** (1981) Primer aislamiento e identificación del virus de la Rinotraqueítis Infecciosa bovina en Uruguay. *Vet* 78: 131-134.
- 12) **Guarino, H.; Núñez, A.** (2001) Enfermedades Virales de la Reproducción .XXIX Jornadas Uruguayas Buiatria. 1: 72-75
- 13) **Hughes, J. K.; Plander, H.J.; Wada, M.** (1964). Keratoconjunctivitis and of infectious bovine rhinotracheitis (IBR). *Am. J. Vet. M. A.* 145: 32-39.
- 14) **Lemaire, M.; Weynants, V.; Godfroid, J.; Schynts, F.; Meyer, G.; Letesson, J. J.; Thiry, E.** (2000b). Effects of Bovine Herpesvirus Type 1 Infection in Calves with Maternal Antibodies on Immune Response and Virus Latency. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1885-1894.
- 15) **Miller, R. B.; Falles, W. H.** (1984). Puntualización sobre la Queratoconjuntivitis Bovina Infecciosa. *Vet Clinics North Am. Large Anim.* 6: 597-609.
- 16) **Miller, J. M.; Whetstone, C. A.; Van Der Maaten, J. M.** (1991) Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease. *Am J Vet Res.* 52: 458-461.
- 17) **Nagy, A.; Vandersmissen, E.; Kapp, P.** (1989) Further data to the aetiology, pathogenesis and therapy of infectious bovine keratoconjunctivitis . *Comp Inn. Microbiología. Infect. Dis.* 12: 115-127.
- 18) **Noda, J.; Núñez, A.; García, J.** (1984). Aislamiento del virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina en terneros con queratoconjuntivitis. *Rev Salud-Animal.* 6: 651-653.
- 19) **Quiñones, C. A.; Rivas, L.A.; Ramos, T. y colaboradores** (1977). Queratoconjuntivitis infecciosa bovina causada por *Moraxella bovis*. Primera comprobación en el Uruguay. *Anales de la Fac Vet.* 14: 77-90.
- 20) **Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Blood, D.C.** (2002). Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino, y equino. 9ª Ed. Madrid: Mc Graw- Hill- Inter- Americana. 1: 1054-1055 .
- 21) **Reinaldo, L.; González, E.; Bentancourt, X., Gómez, L.** (1993). Aislamiento de *Moraxella bovis* en terneros afectados de QCBI. *Vet Trop.* 18: 39-44.
- 22) **Paolicchi, F.; Casaro, A.; Odeon, A.** (1998). Evolución de las lesiones oculares en bovinos infectados con *M. bovis* . *Rev. Med.Vet.* 79: 410-416.
- 23) **Pugh, G. W.; Hughes, D. E.; Packer, R. A.** (1970). Bovine infectious keratoconjunctivitis interactions fo *Moraxella bovis* and Infectious Bovine Rhinotracheitis virus. *AM. J. Vet. Res.* 31: 653-662.
- 24) **Repiso, M.V.; Gil, A.; Bañales, 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 en el Uruguay. *Vet. (Montevideo).* 40: 12-16.
- 25) **Saizar J.** (1997) Determinación de la prevalencia de la Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) en rodeos de leche y carne en Uruguay . *Vet. (Montevideo).* 33:133-136.
- 26) **Santurde, G.; Da Silva, N. et al.** (1996). Rapid and high sensity test for the detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Vet. Microbiol.* 49: 81-92.
- 27) **Slatter, D.** (2004). Fundamentos de Oftalmología Veterinaria. 3ª ed. Buenos Aires: Inter- Médica. 702p . 28) **Vilcek S.** (1993). Detection of bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) genome by PCR. *J. Virol. Meth.* 41: 245-248.
- 29) **Williams, L.W.; Gelatt, K.N.** (1991). *Food Animal Ophthalmology* . p 611-648. En *Veterinary Ophthalmology*. Gelatt K. 2ª ed. Philadelphia: Lea & Febiger.