

Caso clínico

Primer aislamiento de Herpes Virus Bovino tipo 1 en bovinos de Patagonia, Argentina

Romina Apóstolo^{1*}, Silvina Maidana^{2,3}, Juan Pablo Martínez⁴, Sonia Alejandra Romera^{2,3}, Carlos Robles⁵

¹ Estación Experimental Agroforestal Esquel, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-INTA. Chacabuco 513 (CP9200) - Esquel, Chubut, Argentina

² Instituto de Virología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-INTA.

Nicolás Repetto y de los Reseros y s/n (CP1686) - Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Godoy Cruz 2290 (CP1425) - Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

⁴ Agencia de Extensión Rural Trevelin, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-INTA.

John D. Evans 80 (CP9203) - Trevelin, Chubut, Argentina

⁵ Grupo de Salud Animal. Estación Experimental Agropecuaria Bariloche, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-INTA. Modesta Victoria 4450 (CP8400) - Bariloche, Río Negro, Argentina

e-mail: apostolo.romina@inta.gob.ar

(Recibido 19 de mayo 2017; aceptado 20 de julio 2017)

RESUMEN

Se describe un brote de IBR con aislamiento de Herpes Virus Bovino tipo 1 (BoHV1) en la Patagonia argentina. Durante los meses de junio-julio de 2013 tuvo lugar un brote de rinitis y conjuntivitis en un lote de terneros confinados en una recría a corral en el Valle 16 de Octubre, al noroeste de la provincia de Chubut. Debido a que los síntomas eran compatibles con la infección por BoHV1, se procedió a tomar muestras de secreciones oculares y nasales de 12 animales y muestras de suero de 7 animales. A partir de las muestras de secreciones se lograron aislar 10 cepas de BoHV1. Si bien el hallazgo no permite concluir sobre el rol de BoHV1 en el brote, constituye el primer reporte de aislamiento de BoHV1 y confirma los trabajos previos sobre evidencia serológica de su circulación en la Patagonia argentina.

Palabras clave: aislamiento, bovinos, herpes virus, Patagonia, rinitis

INTRODUCCIÓN

El Herpes Virus Bovino tipo 1 (BoHV1) es miembro de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus*¹. La infección por este virus es responsable de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) y de la Vulvovaginitis/Balanopostitis Pustular Infecciosa Bovina (IPV/IBP)^{2,3}. También puede generar otras manifestaciones clínicas como conjuntivitis, enteritis, encefalitis y abortos en caso de infecciones sistémicas^{4,5}. El BoHV1 puede persistir en el animal infectado a partir de la inducción de latencia en los ganglios nerviosos periféricos⁶ desde donde puede reactivarse espontáneamente o debido a eventos de estrés, generar otro período de replicación, excreción y circulación viral^{7,8}.

ABSTRACT

First isolation of Bovine Herpes Virus type 1 in cattle from Patagonia, Argentina

An outbreak of IBR with the isolation of Bovine Herpes Virus type 1 (BoHV1) in Argentinean Patagonia is described. During June-July 2013, an outbreak of rhinitis and conjunctivitis occurred in a group of calves confined to a farm in 16 de Octubre Valley, northwest of Chubut. Because the symptoms were compatible with the infection with BoHV1, samples of ocular and nasal secretions from 12 animals and serum samples from 7 animals were collected. Ten strains of BoHV1 from the secretion samples were isolated. Although the finding does not allow to conclude about the role of BoHV1 in the outbreak, it constitutes the first report of isolation of BoHV1 and confirms previous studies on serological evidence of its circulation in Argentinean Patagonia.

Keywords: isolation, bovine, herpes virus, Patagonia, rhinitis

La infección por BoHV1 es considerada una causa significativa de pérdidas en la ganadería bovina en todo el mundo^{7,9}. La distribución de la infección es mundial y en nuestro país es endémica, alcanzando prevalencias de hasta el 85 %^{10,11}, aun cuando los signos clínicos son poco frecuentes o están ausentes¹².

En la región Patagónica argentina, un estudio realizado en el ganado de 47 crianceros de la comunidad Millaín Currical, en la provincia de Neuquén, reveló una seroprevalencia para BoHV1 del 53,4%¹³. En la zona noroeste de la provincia de Chubut, a partir de un muestreo realizado en 84 rodeos de cría, se detectó un 50% de los establecimientos positivos a BoHV1 con una seroprevalencia individual del 52,3%¹⁴. Debido a que en ambas zonas no se utilizan vacunas que contengan este virus, los trabajos demuestran evidencia

serológica de exposición a BoHV1 en esta región.

La ganadería bovina en la provincia de Chubut, se divide a nivel productivo en dos sistemas en función de las condiciones agroecológicas de los ambientes. En las zonas de bosques y de estepas, donde predominan los pastizales naturales, se desarrolla la actividad de cría extensiva mientras que en la zona de valles, por la posibilidad de producir forraje, la actividad se ha orientado a la recría y terminación de los terneros producidos en las áreas de cría¹⁵. Dentro de esta última zona se sitúa el Valle 16 de Octubre, ubicado al noroeste de la provincia de Chubut. Las internadas comienzan durante los meses de abril y mayo cuando ingresan al valle terneros de destete de razas británicas, de aproximadamente 7 a 8 meses de edad y con 160-250 kg, provenientes de las zonas de cría de la región¹⁵.

A partir de la ocurrencia de eventos que afectan la salud de los bovinos en las internadas del Valle 16 de Octubre que podrían corresponderse con cuadros producidos por el BoHV1, se llevó a cabo un estudio en terneros alojados en una recría a corral durante el invierno de 2013 a fin de intentar confirmar la presencia de BoHV1.

PRESENTACIÓN DEL CASO

Se trabajó en un establecimiento de ciclo completo (43° 07' S; 71° 33' O) con un lote de 88 terneros de raza Hereford, Aberdeen Angus y sus cruza. En mayo de 2013 los terneros fueron destetados, con aproximadamente 6 meses de edad, e ingresaron a una recría a corral. En ese momento se tomaron muestras de suero de todos los terneros como así también de secreciones nasales y/o oculares en el marco de un trabajo de investigación de tipo exploratorio. En cuanto al manejo sanitario, en ese momento, se los desparasitó con ivermectina, para control de parásitos internos y externos, y con triclabendazole para control de *Fasciola hepática*. Se les aplicó la primera dosis de una vacuna anticlostridial cuádruple y todas las terneras fueron vacunadas contra Brucelosis.

A mediados de junio se detectó 1 ternero con queratoconjuntivitis y 2 terneros con epifora bilateral. Se tomaron muestras de secreciones oculares y de sangre de los 3 animales.

A comienzos de julio, se detectaron otros 27 terneros con rinitis y/o conjuntivitis. De estos, 5 presentaban rinitis serosa, 17 conjuntivitis serosa y/o purulenta y 5 presentaban simultáneamente cuadros de rinitis serosa y conjuntivitis. En este momento se tomaron 11 muestras de secreciones oculares y nasales correspondientes a 9 animales y 4 muestras de sangre. Todos los terneros con los síntomas descritos fueron tratados con tilmicosina a razón de 10 mg/Kg peso vivo vía intramuscular única dosis, para tratar de disminuir la intensidad de los síntomas.

Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena yugular (8 ml) utilizando tubos vacutainer sin aditivos y agujas 20Gx1,5". Los sueros obtenidos se conservaron en tubos eppendorff de 1,5 ml, a -20°C hasta su procesamiento¹⁶. El total de anticuerpos en suero contra BoHV1 se determinó a través de un ELISA indirecto¹⁷. Los sueros se clasificaron en función del punto de corte establecido previamente en el 40% de la Densidad Óptica (DO) ajustada del control positivo (A_{405} BoHV1 + MDBK – A_{405} MDBK). Los sueros con una DO mayor al punto de corte fueron clasificados como positivos, mientras que aquellos que presentaron una DO menor fueron clasificados como negativos¹⁸.

Las muestras de secreciones se tomaron utilizando hisopos de dracón estériles¹⁶ de 15 cm de largo que se colocaron en tubos conteniendo medio de cultivo mínimo esencial con sales de Eagle (MEM-E) como medio de transporte, suplementado con penicilina 5000 UI/ml, estreptomina

2500 µg/ml y anfotericina B 10 µg/ml^{17,19} y se conservaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. Las muestras (50 µl de sobrenadante) fueron inoculadas sobre monocapas de células de riñón bovino Madin Darby (MDBK) desarrolladas en medio MEM-E suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB)¹⁸. Las monocapas de células inoculadas se mantuvieron en medio MEM-E suplementado con 2% de SFB en estufa a 37°C y fueron observadas diariamente durante 72 horas para determinar la aparición de efecto citopático¹⁹. Las muestras negativas fueron sometidas a tres pasajes ciegos. A partir de sobrenadante de cultivo de las monocapas que presentaron efecto citopático compatible con BoHV1 se realizó la extracción de ADN viral mediante el uso de un kit comercial siguiendo las recomendaciones del fabricante (High pure PCR template preparation Kit, Roche). Luego se realizó una PCR multiplex diferencial entre BoHV tipo 1 y tipo 5 para confirmar y tipificar los aislamientos²⁰. La PCR multiplex fue preparada en un volumen de reacción final de 12,5 µl conteniendo 50 ng de ADN total extraído, 0,4 pmol de cada cebador (B1, B5, and Bcon); 1,5 mMol dNTPs (Invitrogen TM Life Technologies, USA); 2,5 unidades de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen TM Life Technologies, USA); buffer de PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl); 1,5 mM MgCl₂ y agua ultra pura hasta llegar al volumen final. La reacción de amplificación fue realizada en un termociclador Biometra TRIO – Thermoblock bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 10 min a 96 °C seguido por 25 ciclos de 1 min a 96 °C; 1 min a 58 °C; 1 min a 72 °C y un ciclo final de extensión de 10 min a 72 °C. Finalmente los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (1%), teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) en buffer TBE pH 8,4 (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) y visualizado bajo luz UV.

RESULTADOS

Del sangrado realizado al ingresar los animales a la recría a corral en el mes de mayo se obtuvo una seroprevalencia de 27,4% contra BoHV1 y no se lograron aislamientos de las 88 muestras de secreciones nasales y/o oculares.

De las muestras de secreciones oculares de los 3 animales con síntomas tomadas al inicio del brote en el mes de junio, se aisló un BoHV1 y no se detectaron anticuerpos específicos contra este virus.

De los 9 animales muestreados en julio en pleno brote, en 8 de ellos se aislaron 4 cepas de BoHV1 de secreciones oculares y 5 cepas de secreciones nasales. De los oculares 2 correspondieron a casos clínicos de conjuntivitis y 2 a casos de rinitis y conjuntivitis. De los nasales uno corresponde a un caso de rinitis y 4 a casos de rinitis y conjuntivitis. En cuanto a la serología específica contra BoHV1, todas las muestras resultaron negativas (Tabla 1).

DISCUSIÓN

En la Patagonia argentina si bien se cuenta con trabajos que evidencian, a partir de datos de serología, la circulación de BoHV1^{13,14}, no se han llevado a cabo trabajos tendientes a confirmar la presencia del virus mediante su aislamiento.

Las manifestaciones clínicas observadas en la recría a corral en la que se trabajó, concuerdan con la sintomatología y epidemiología descrita para IBR teniendo en cuenta la aparición aguda del brote, la ocurrencia simultánea de rinitis y conjuntivitis⁴ y el aislamiento de 10 cepas de BoHV1 de animales con signos clínicos²¹.

Al momento del destete se detectó una prevalencia de 27,4% de terneros con anticuerpos contra BoHV1. Ello podría deberse a la permanencia de anticuerpos calostrales²² o a

Tabla 1 - Comparación de los resultados serológicos y aislamientos de BoHV1 obtenidos de 12 terneros al momento del destete (mayo) y al momento de presentación de los signos clínicos (junio-julio) de 2013 en una recría

N° Animal	Cuadro Clínico	Secreción	Destete		Brote	
			Mayo 2013		Junio – Julio 2013	
			Serología	Aislamiento	Serología	Aislamiento
362	Epifora Bilateral	O	Neg	Neg	Neg	Neg
376	Queratoconjuntivitis	O	Neg	Neg	Neg	Neg
407	Epifora Bilateral	O	Neg	Neg	Neg	Pos (O)
353	Rinitis	N	Neg	Neg	Neg	Pos (N)
363	Rinitis	N	Neg	Neg	Neg	Neg
381	Rinitis + Conjuntivitis	N	Neg	Neg	SM	Pos (N)
384	Conjuntivitis	O	Neg	Neg	SM	Pos (O)
391	Rinitis + Conjuntivitis	O - N	Neg	Neg	SM	Pos (O)
412	Conjuntivitis	O	Neg	Neg	SM	Pos (O)
423	Rinitis + Conjuntivitis	N	Pos	Neg	Neg	Pos (N)
429	Rinitis + Conjuntivitis	O - N	Neg	Neg	SM	Pos (O-N)
444	Rinitis + Conjuntivitis	N	Neg	Neg	Neg	Pos (N)

SM: Sin muestra, Neg: Negativo, Pos: Positivo, O: Ocular y N: Nasal

una infección activa²¹.

Con respecto a la primera posibilidad, si bien no se cuenta con serología de las madres de ese campo, se presume que el establecimiento no debería diferir de los datos obtenidos por Perez Aguirreburualde (2014)¹⁴, quien halló una prevalencia serológica del 52,3% de BoHV1 en los rodeos de cría de la zona. A ello se suma el hecho de que de los 7 terneros a los que se les tomaron muestras pareadas de sangre al destete y durante el brote, 6 resultaron seronegativos a BoHV1 en ambos momentos y el ternero caravana 423 dio un resultado positivo en la primera instancia y luego negativo en el muestreo durante el brote. En este último caso, si se tiene en cuenta la vida media de los anticuerpos calostrales (180-240 días)²² y la serología negativa al momento de iniciado el brote, explicaría que los anticuerpos hallados al momento del destete serían calostrales²³.

La segunda posibilidad plantea que la serología positiva encontrada al destete puede deberse a una infección activa, donde la aparición de la respuesta humoral se hace detectable cuando se elimina la infección viral, lo cual explica la ausencia de aislamientos en ese momento^{8,9}. Sin embargo, Kaashoek y col.²¹ demostraron que los anticuerpos por infección natural activa pueden detectarse hasta 3 años post infección. En este caso el ternero 423, seropositivo al destete, resultó negativo posteriormente durante el brote, lo que reforzaría la hipótesis de que los anticuerpos serían calostrales.

Al momento de la obtención de los aislamientos y con presencia de casos clínicos, los animales fueron seronegativos para BoHV1. Esta situación refleja el período

post infección inmediato, en el que los animales no tienen anticuerpos y excretan altos títulos de virus en los exudados nasales, conjuntivales y genitales favoreciendo el inicio de la circulación viral⁷. Si bien no es frecuente la presencia de signos clínicos, cuando estos ocurren pueden atribuirse a la destrucción de las células infectadas debido a la replicación viral¹². Posterior a ello, se genera la respuesta inmune de tipo humoral y celular y la recuperación clínica del animal dentro de 1 a 2 semanas¹². Sin embargo los animales son incapaces de eliminar por completo el BoHV1 ya que el mismo ha desarrollado estrategias de difusión local para permanecer en latencia en neuronas ganglionares del sistema nervioso periférico durante toda la vida del animal infectado⁷. A partir de allí y bajo condiciones de estrés natural el virus puede reactivarse, replicar y difundir hacia animales susceptibles generando la recurrencia de la enfermedad o bien cursar de manera subclínica^{7,12}.

En relación a las posibles causas de reactivación, al inicio del brote los animales se encontraban en la recría a corral desde aproximadamente 45 días previos. Esto se contradice con la bibliografía que plantea que la mayor cantidad de casos clínicos se observan durante los primeros 45 días post arribo a las invernadas^{24,25}. Los factores identificados como estresores como son la adquisición de animales en remates o ferias, el transporte y la mezcla de animales de diferentes orígenes con condiciones sanitarias desconocidas²⁵ no sucedieron en este caso ya que los animales provenían de un mismo campo de cría y la recría se hizo en el mismo establecimiento. Otros factores descritos como estresores como el destete, castración, desparasitación y vacunación²⁶

se hicieron en el mes de mayo, lo que los descarta como desencadenantes del brote.

Para algunos autores el rol del clima es un factor de riesgo^{27,28} sin embargo Taylor y col.²⁶, cuestionan la relación entre las variables climáticas y la ocurrencia de casos clínicos por BoHV1. Los animales sanos pueden termorregular en la medida que reciban cantidades adecuadas de energía, tengan reparo y se mantengan secos²⁸. La temperatura crítica inferior (TCI) en esta categoría de animales se ubica entre los 6-10°C²⁷. Para la zona del trabajo la temperatura media en el mes de junio es de 3,9°C y en julio de 3,4°C²⁹. A esto se le suma que hacia fin de otoño y comienzo del invierno en la zona donde se llevó a cabo este trabajo se producen las mayores precipitaciones³⁰. Por ello se presume que la temperatura ambiente inferior a la TCI, sumado a las lluvias y la falta de reparo en el corral accionaron como factores de estrés.

CONCLUSIONES

A partir de lo dicho anteriormente se puede concluir que:

- Los casos de rinitis y conjuntivitis que tuvieron lugar en una recría de terneros en confinamiento, en el Valle 16 de

Octubre durante el invierno 2013, corresponden a un brote de IBR.

- Durante el mismo se aislaron 10 cepas de BoHV1, lo que constituye el primer aislamiento de este virus en la Patagonia argentina.

- La ocurrencia de este brote de IBR estuvo condicionado por factores climáticos como generadores de estrés.

Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo con fondos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria a través de sus proyectos PATSU 1291205 y PNSA 1115054. Se agradece al señor Julio Mellado por su colaboración en todas las tareas realizadas a campo.

Presentaciones en Congresos:

Primer aislamiento de Herpes Virus Bovino tipo 1 en Patagonia argentina. R Apóstolo, S Maidana, J Mellado, JP Martínez, M Raso, SA Romera, C Robles. XI Congreso Argentino de Virología, II Congreso Latinoamericano de Virología, IV Simposio de Virología Clínica y II Simposio de Virología Veterinaria "Dr. José L. La Torre" – Buenos Aires, del 23 al 26 de junio de 2015.

Conflictos de interés

Ninguno para declarar.

REFERENCIAS

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). En: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, consultado el 13/7/2017
2. Ackerman M, Engels M. Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol* 2006; 113:293–302.
3. Fulton R, d'Offay J, Eberle J, Moeller R, Van Campen H, O'Toole D y col. Bovine herpesvirus-1: Evaluation of genetic diversity of subtypes derived from field strains of varied clinical syndromes and their relationship to vaccine strains. *Vaccine* 2015; 33:549–558.
4. Pastoret P, Thiry E. Diagnosis bovine and prophylaxis of infectious rhinotracheitis: the role of virus latency. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1985; 8:35-47.
5. Ostertag-Hill C, Fang L, Izume S, Lee M, Reed A, Jin L. Differentiation of BHV-1 isolates from vaccine virus by high-resolution melting analysis. *Virus Res* 2015; 198:1–8.
6. Jones C, Geiser V, Henderson G, Jiang Y, Meyer F, Perez S y col. Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. *Vet Microbiol* 2006; 113:199–210.
7. Hage J, Schukken Y, Barkerna H, Benedictus G, Rijsewijk F, Wentink G. Population dynamics of bovine herpesvirus 1 infection in a dairy herd. *Vet Microbiol* 1996; 53:169-180.
8. Koeijer A, Diekmann O, Jong M. Calculating the time to extinction of a reactivating virus, in particular bovine herpes virus. *Math Biosci* 2008; 212:111–131.
9. Babiuk L, Van Drunen Littel-van den Hurk S, Tikoo S. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol* 1996; 53:31-42.
10. Pinto G, Hawkes P, Zabal O. Viral antibodies in bovine fetuses in Argentina. *Res Vet Sci* 1993; 55:385-388.
11. Odeón A, Späth EJ, Paloma E, Leunda MR, Fernandez Sainz I, Perez S y col. Seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina, Herpesvirus Bovino y Virus Sincicial Respiratorio en Argentina. *Rev Med Vet* 2001; 82:216–20.
12. Engels M, Ackermann M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol* 1996; 53:2-15.
13. Robles C, Fernandez C, Parreño V, Scodellari G, Echaalde I, Cabrera R. Relevamiento sanitario de bovinos de una comunidad indígena de la provincia del Neuquén, Argentina. *Vet Arg* 2015; 32:1-11.
14. Perez Aguirreburualde S. Estudio epidemiológico en explotaciones ganaderas de la provincia de Chubut - Desarrollo de estrategias para el control del Virus de la Diarrea Viral Bovina [Tesis doctoral]. Buenos Aires, Argentina: Facultad de Ciencias Veterinarias UBA; 2014.
15. Guitart Fité E. Caracterización de la Ganadería Bovina en Patagonia Sur. Carpeta Técnica EEA INTA Esquel 2008; Economía N° 9.
16. Zbrun MV, Zielinski GC, Piscitelli HC, Descarga C, Urbani LA. Dynamics of *Moraxella bovis* infection and humoral immune response to bovine herpes virus type 1 during a natural outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis in beef calves. *J Vet Sci* 2011; 12:347-352
17. Romera SA, Hilgers LA, Puntel M, Zamorano PZ, Alcon VL, Dus Santos MJ y col. Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalane-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle. *Vaccine* 2001; 19:132-141.
18. Romera SA, Puntel M, Quattrocchi V, Del Médico Zajac P, Zamorano P, Blanco Viera J y col. . Protection induced by a glycoprotein E-deleted bovine herpesvirus type 1 marker strain used either as an inactivated or live attenuated vaccine in cattle. *BMC Vet Res* 2014; 10:8
19. Del Médico Zajac MP, Puntel M, Zamorano PI, Romera SA, Sadir AM. BHV-1 vaccine induces protection against BHV-5 disease in cattle. *Res Vet Sci* 2006; 81:327-34.
20. Claus M, Fernandes Alfieri A, Valadares Folgueras-Flatschart A, Rezler Wosiacki S, Médici K, Alfieri A. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J Virol Methods* 2005; 128:183–188.
21. Kaashoek M, Rijsewijk F, Van Oirschot J. Persistence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two to three years after infection. *Vet Microbiol* 1996; 53:103-110.
22. Fulton RW, Briggs RE, Payton ME, Confer AW, Saliki JT,

- Ridpath JF y col.. Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine* 2004; 22:643-649.
23. Kahrs R. Infectious bovine rhinotracheitis pustular vulvovaginitis. En: Idem (editor). *Viral Disease of Cattle*. 2nd ed. Iowa State University Press, Ames 2001, pg.159-170.
 24. Smith R. Impact of disease on feedlot performance: A review. *J Anim Sci* 1998; 76:272-274
 25. Babcock AH, White BJ, Dritz SS, Thomson DU, Renter DG. Feedlot health and performance effects associated with the timing of respiratory disease treatment. *J Anim Sci* 2009; 87:314-327.
 26. Taylor JD, Fulton RW, Lehenbauer TW, Step DL, Confer AW. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? *Can Vet J* 2010; 51:1095-1102.
 27. Odeón A. 2008. Enfermedad Respiratoria Bovina ¿Qué es posible hacer? Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Grupo de Sanidad Animal. En: http://inta.gov.ar/sites/default/files/script-tmp_inta_enfermedad_respiratoria_bovina.pdf, consultado el 17/5/2017
 28. Lorenz I, Earley B, Gilmore J, Hogan I, Kennedy E, More S. Calf health from birth to weaning. III. Housing and management of calf pneumonia. *Ir Vet J* 2011; 64:14
 29. INTA Datos meteorológicos de EEA Esquel. En: <http://inta.gov.ar/documentos/datos-meteorologicos-de-eea-esquel>, consultado el 17/5/2017.
 30. Colombani E, Arbuniés R. Distribución de las precipitaciones en la provincial del Chubut. Reunión Argentina de Agrometeorología, 2008, p.9, Jujuy, Argentina.