



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Detección de Anticuerpos contra Laringotraqueitis  
Infecciosa mediante la Técnica de Elisa con 2  
diferentes Vías de Aplicación: Ocular y Agua  
de Bebida**

TRABAJO FINAL ESCRITO DEL  
IV SEMINARIO DE TITULACION EN EL  
AREA DE:

**PRODUCCION ANIMAL: AVES**

PRESENTADO ANTE LA  
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
POR

**JORGE ARTURO MARTINEZ FIGUEROA**

*Asesor: M. V. Z. Maria Elena Rubio Garcia*

MEXICO, D. F.

MAYO DE 1993



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**\* CONTENIDO\***

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>7</b>
<b>PROCEDIMIENTO</b>	<b>8</b>
<b>TECNICA DE ELISA</b>	<b>12</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>15</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>16</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>17</b>
<b>CUADROS</b>	<b>18</b>
<b>GRAFICAS</b>	<b>19</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>25</b>

\* RESUMEN \*

MARTINEZ FIGUEROA JORGE ARTURO. Detección de anticuerpos contra Laringotraqueitis Infecciosa mediante la técnica de ELISA con 2 diferentes vías de inmunización: ocular y agua de bebida: IV Seminario de Titulación en el área de Producción Animal: Aves. (Bajo la supervisión de: MVZ. María Elena Rubio García).

Se utilizaron 30 pollos de engorda, estirpe Arbor Acres de 15 días de edad, se dividieron en 3 grupos de 10 aves cada uno: G1 control; G2 ocular y G3 agua de bebida. Se evaluó serológicamente su estado inmunológico antes de aplicarles la vacuna de LTI. Dicho biológico de virus vivo modificado y con título de  $10^{4.08}$  se aplicó al grupo G2, y al grupo G3. Después de la vacunación se sangraron a los grupos 7 veces a intervalos de 4 días, y los sueros se analizaron con la prueba de ELISA para LTI y con un programa computalizado. Los resultados revelan que en el grupo G2 se detectaron anticuerpos a partir del día 24 con título promedio de 42 y coeficiente de variación (C.V.) de 316.2% teniendo una distribución irregular; en el día 28 el título fué de 278 y el C.V. de 143.4% teniendo mejor uniformidad con nivel más alto de anticuerpos. En el grupo G3 se determinaron anticuerpos a partir del día 20 con título de 80 y C.V. de 282.8%; al día 24 el título promedio

fué de 485 y el C.V. de 79.6% y en el día 28 el título fué de 1077 y C.V. de 56.5% obteniendo un nivel protectivo. En el grupo G1 se detectaron anticuerpos hasta el día 28 con título de 462 y C.V. de 102.8%, dichos títulos producidos por difusión del virus vacunal. Los resultados obtenidos indican que la técnica de ELISA detecta eficazmente anticuerpos de LTI en 20 días aún con niveles mínimos de estos. Los títulos más altos de anticuerpos contra LTI se obtubieron con la vacunación en agua de bebida.

\* INTRODUCCION \*

Las enfermedades de los animales afectan de una manera muy directa a la salud y la economía del país. La lucha contra estas está basada en su diagnóstico, control o erradicación (1,12).

Laringotraqueitis Infecciosa Aviar (LTI) es una enfermedad respiratoria causada por un Alfa-Herpes Virus, que afecta a la gallina doméstica, pavos y faisanes, caracterizada por causar blefaroconjuntivitis, estertores traqueales y expectoración de exudados sanguinolentos en los individuos afectados (12,13).

Se puede diagnosticar mediante hallazgos a la necropsia, lesiones histopatológicas, aislamiento del virus en embrión de pollo o en tejidos celulares. Así como con pruebas de inmunofluorescencia, inmunodifusión en agar, virus sueroneutralización, precipitación en agar y por medio de la técnica de ELISA (2,4,13,14). Esta última tiene mayor eficacia por la detección de anticuerpos monoclonales IgG, IgM e IgA, los cuales son altamente específicos (3,8,9).

La técnica inmunoenzimática de ELISA (Enzyme-Linked-Immunoabsorbent-Assay), es una prueba útil en el diagnóstico serológico debido a sus características de alta sensibilidad, especificidad, rapidez y economía, sin embargo, la mayor dificultad para el uso de esta técnica ha sido la interpretación de resultados, ya que el título a

obtener depende de varios factores como son: Edad de las aves, tipo de ave, calendario de vacunación, tipo de vacuna, vías de inoculación, inmunidad materna, etc.(10,11).

En el año de 1983 York desarrolló la prueba de ELISA para determinar anticuerpos contra el virus de Laringotraqueitis Infecciosa Aviar.

La prueba de ELISA se desarrolla en microplacas de plástico de poliestileno o polivinil transparente de 96 pozos con un antígeno específico. Las muestras de suero problema se diluyen en solución buffer (1/100 y 1/500). Estas diluciones se depositan en 90 pozos permaneciendo por un tiempo específico que generalmente es de 30 minutos. Los anticuerpos homólogos en la muestra de suero se unirán específicamente a la cepa del antígeno del pozo y no se separará durante el proceso de lavado posterior. El reactivo siguiente es un anticuerpo IgG antipollo unido a una enzima (peroxidasa, fosfatasa, etc.) ligada a anticuerpos de cabra. Este reactivo se unirá selectivamente a cualquier complejo antígeno-anticuerpo presente en el pozo. Después de un tiempo de incubación para permitir que ocurra la unión, el pozo se lava 3 ó 4 veces para eliminar el conjugado enzima antiIgG de pollo residual. Posteriormente se adiciona un sustrato cromogénico específico a la enzima que esta ligada al conjugado, la cual desencadena la reacción colorimétrica. Después de un período de incubación la reacción se detiene con la

adición de la solución detenedora. Subsecuentemente se mide la densidad óptica de la solución en los pozos utilizando un espectrofotómetro, el filtro que maneja el espectrofotómetro varía según el sustrato utilizado, así tenemos la ortofenilamida (OPD) con filtro de 492 nm; la tetrametibenzidina (TMB) con filtro de 450 nm, o el sulfonato de azina dietil-benzothizolina (ABTS) con filtro de 405 nm. La intensidad de la reacción esta directamente relacionada con la cantidad del conjugado de enzima unido a los anticuerpos específicos en la muestra de suero. Esto se cuantifica por referencia con la densidad óptica de suero de control negativo y positivo, siendo para LTI 0.06-0.08 y 0.40-0.75 respectivamente. Por último, los títulos de la muestra se acomodan en grupos denominados perfiles con los rangos obtenidos asignándoles números que van del 0 al 9 ó del 0 al 18, traspolándolos a un histograma, con lo cual se puede evaluar el estado inmune de la parvada mediante el título promedio (media), y el coeficiente de variación (CV) expresado en porcentaje, siendo sus parámetros los siguientes: 30% Excelente; 50% Bueno; 80% Regular; > a 90% Pobre. En general en una vacunación primaria el C.V. es de 60% ó menos, mientras que en una revacunación es del 45% ó menos. El título promedio protectorio para LTI esta en el perfil 2 (5,6,11).

La prueba de ELISA detecta anticuerpos después de la vacunación alcanzando los valores más altos de absorbancia a las 5 semanas postinoculación, manteniéndose



durante 17 semanas y pudiendo reconocerlos hasta las 30 semanas de edad de los pollos (7).

**\* HIPOTESIS \***

Es posible detectar anticuerpos contra LTI desde la 3ª semana postaplicación de la vacuna, dependiendo de la vía de vacunación.

**\* OBJETIVO \***

Cuantificar la respuesta inmunológica postvacunal a diferentes intervalos de tiempo mediante la técnica de ELISA con 2 vías de inmunización: ocular y agua de bebida.

\* PROCEDIMIENTO \***Material:**

El experimento se realizó en el Departamento de Producción animal: aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde se empleó:

- 1) Unidad experimental: dimensiones de 3.0 X 3.5 mts, servicio de agua potable, drenaje y electricidad.
- 2) Equipo de criadora en batería de 5 niveles tamaño estandar, conteniendo comederos, bebederos y fuente de calor mediante resistencia eléctrica y focos.
- 3) Alimento de iniciación para pollo de engorda con presentación en migaja.
- 4) 30 pollos de engorda, estirpe Arbor Acres de 15 días de edad, vacunados contra la enfermedad de Marek al día 1 de edad, y contra la enfermedad de New Castle al día 8 de edad.
- 5) Vacuna de virus vivo modificado de LTI con aplicador, laboratorios Sterwin, 1000 dosis, No. de lote 4623, título de  $10^{4.08}$ .
- 6) 30 ml de solución buferada fosfatada (PBS).
- 7) 2 g de leche en polvo.
- 8) 21 jeringas desechables de 3 ml calibre 22 D.
- 9) 30 tubos de ensayo de 10 ml.
- 10) 1 gradilla.

- 11) 1 computadora IBM compatible 286, disco duro de 40 Mb., tarjeta de gráficas monocromático, 640 Kb de memoria, un puerto serial y paralelo, S.O. DOS 6 > e impresora.
- 12) Lector ELISA (Dynatech).
- 13) 1 reloj de laboratorio (Timer).
- 14) 2 placas (KPL No. de lote NG03) de 96 pozos con cepa antigénica TCO (tissue culture origin vaccine) del virus LTI.
- 15) 20 µl de suero control (estándar) positivo.
- 16) 20 µl de suero control normal (NCS).
- 17) 200 µl de solución de conjugado de inmunoglobulina (H&L) de gallina desarrollada en cabra.
- 18) 80 µl de solución amortiguadora.
- 19) 20 µl de sustrato de peróxido de hidrógeno con cromógeno ABTS.
- 20) 6 ml de solución detenedora 5x (dilución 1:5 con agua destilada).
- 21) 40 ml de solución detenedora 20x (dilución 1:20 con agua destilada).
- 22) 1 pipeta de alta precisión (1-20 µl).
- 23) pipetas de 0.2 ml, 1.0 ml y 5 ml.
- 24) 1 multipipeta de 12 canales (20-200 µl).

- 25) Puntas de pipetas (1-200  $\mu$ l).
- 26) Placas vacías de 96 pozos sin recubrimiento de baja absorción.
- 27) Agua destilada.
- 28) Papel secante.

**Método:**

Se utilizaron 30 pollos de engorda de 15 días de edad estirpe Arbor Acres, los cuales se dividieron en 3 grupos de 10 aves cada uno de la siguiente manera: Grupo Control (G1), Grupo vacuna ocular (G2) y Grupo vacuna agua de bebida (G3). Todos ellos alojados en la criadora tipo batería con temperatura ambiental de 20°C en promedio. Se suministró alimento de iniciación y agua a libre acceso durante todo el ensayo.

Después de 5 días de adaptación y a edad de 20 días, se tomaron las primeras muestras de suero de los 3 grupos mediante punción en la vena braquial de cada ave con jeringas estériles, la sangre obtenida se depositó en tubos de ensayo identificados por grupo dejándose coagular a temperatura ambiente. Después de 1-2 horas se colectó el suero con pipetas de 5 ml y se depositaron a las placas vacías libres de antígeno, dejando los pozos A1, A2, A3, H10, H11 y H12 para los sueros controles positivos y negativos de la prueba.

El mismo día se preparó e inoculó la vacuna a los grupos experimentales de la siguiente manera: Con una pipeta terminal 1:10 estéril se tomaron 30 ml de PBS en donde se diluyó la vacuna de LTI liofilizada, se homogenizó y una vez preparada se le adaptó un aplicador de gotero. Los grupos se manejaron de la siguiente manera:

Grupo G1: No se vacunó.

Grupo G2: Se vacunó vía ocular a dosis de una gota (0.03 ml) en un sólo ojo por ave.

Grupo G3: Se inoculó vía oral en el agua de bebida de la siguiente manera: En 500 ml de agua se le añadió 2 g de leche en polvo como coadyuvante y 40 gotas (1.2 ml) de la misma vacuna.

Subsecuentemente se tomaron 7 muestras de suero de los 3 grupos de la forma descrita anteriormente a intervalos de 4 días. Dichos sueros conforme se colectaban se transferían a las placas vacías manteniéndose en refrigeración a 4°C, para después realizar la técnica de ELISA.

#### \*TECNICA DE ELISA\*

Se agregaron 200 µl de la solución amortiguadora a cada uno de los pozos de una placa vacía, posteriormente se tomaron 4 µl de cada suero y se depositaron en los pozos comenzando en el A4 y terminando en el H9, produciéndose una dilución 1:50. Se dejaron reposar 5 minutos antes de transferirlos a la placa ELISA con el antígeno de LTI.

Subsecuentemente se fueron preparando las diferentes soluciones que necesita la prueba de la siguiente manera:

**Solución Enjuague:** Se usaron 380 ml de agua destilada más 20 ml de solución de enjuague por cada placa obteniéndose una dilución 1X.

**Solución Detenedora:** Se mezclaron 3 ml de la solución detenedora concentrada en 12 ml de agua destilada por placa.

**Preparación de los Controles:** Se utilizaron los sueros controles positivos y negativos que contiene el paquete de prueba. Se diluyeron 10 µl de cada uno de los sueros control en 1 ml de solución amortiguadora obteniendo una dilución de 1:100, requiriéndose aproximadamente 300 µl de cada control diluido por cada placa.

**Conjugado:** Se utilizó el conjugado H & L al 50%. Se tomaron 100 µl y se diluyeron en 10 ml de la solución amortiguadora obteniendo una dilución de 1:100.

**Solución de Sustrato:** Se requiere de 10 ml de solución de sustrato de peróxido de hidrógeno con cromógeno ABTS por placa.

Posteriormente se empezó a trabajar en la placa ELISA con el antígeno de LTI, a la cual se le agregaron 50 µl de la solución amortiguadora a cada uno de los pozos de las muestras excepto a los pozos A2, H10, H12 y A1, A3, H11 a los que se les agrego 100 µl de suero control normal y suero control positivo por pozo respectivamente.

Subsecuentemente utilizando la multipipeta de 12 canales, se transfirieron 50 µl de las muestras de suero problema previamente diluidas en una microplaca a la placa



de ELISA con el antígeno de LTI, dejándose incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.

Inmediatamente pasado el período de incubación se desalojó el líquido de cada pozo golpeando la placa contra una toalla de papel, y con la multipipeta se lavaron 3 veces cada uno de los pozos agregando 300  $\mu$ l de la solución de lavado (1X) dejando remojar 3 minutos entre cada lavado. Los productos de desecho se depositaron en la cubeta con detergente y posteriormente se eliminó su contenido.

Después con la multipipeta se agregaron 100  $\mu$ l del conjugado a todos los pozos, y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron los pozos de la manera antes mencionada, y se les agregó 100  $\mu$ l de la solución de sustrato dejándose incubar 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente con la multipipeta se agregaron 100  $\mu$ l de la solución detenedora a cada uno de los pozos, para posteriormente realizar la medicación de los mismos en el lector de ELISA (8).

\* RESULTADOS \*

Durante las primeras 4 tomas (días 0 al 16) no se detectaron anticuerpos contra LTI en los grupos G2 y G3 (Cuadros 2 y 3), no así en el grupo G1 donde se detectaron hasta los 28 días postinoculación (Cuadro 1), presentando un título promedio de 462 correspondiente al perfil 1, y C.V. de 102.8% (Gráfica 1).

En el grupo G2 se empezó a detectar anticuerpos a partir de los 24 días postinoculación, a esta edad el 10 % de las muestras estaba en el perfil 1 con un título promedio de 42, aun cuando el C.V. fué del 316.2% lo que indica una distribución muy irregular (Gráfica 2). A los 28 días postinoculación el 45% de las aves tenía títulos correspondientes al perfil 1 de 278 y el C.V. fué del 143.4% (Gráfica 3), lo que indica que el nivel de anticuerpos se iba uniformando un poco más.

Con el grupo G3 los anticuerpos empezaron a detectarse a los 20 días postinoculación, donde el 10% de las muestras se encontró con un título promedio de 80 en el perfil 1 y con un C.V. del 282.8% (Gráfica 4). A los 24 días postinoculación, en el 75% de los sueros se detectaron anticuerpos que los ubican en el perfil 1 con un título promedio de 485 y con un C.V. 79.6% (Gráfica 5). A los 28 días postinoculación, el título promedio fué de 1077 con un C.V. del 56.5% (Gráfica 6). A esta edad el 62.5% de las muestras se localizan en el perfil 1, el 25% en el perfil 2 y el 12.5% en el perfil 0.

\* DISCUSION \*

Con la técnica de ELISA la presencia de anticuerpos vacunales se empezó a detectar a los 20 días postinoculación en el grupo G3, mientras que en el grupo G2 fué hasta los 24 días. La inmunidad producida por la vacuna vía agua de bebida se desarrolló más rápido que la inducida por la vía ocular.

En el grupo G2 a los 28 días el título de anticuerpos se incremento, sin embargo, no se llegó al nivel de perfil 2 reportado como protector en una primovacunación según Kelleher (11).

En el grupo G3 los niveles de anticuerpos fueron incrementándose, a los 24 días se encontraban en perfil 1 y a los 28 días en perfil 2 de protección, este último demostró una distribución más uniforme, ya que se obtuvo un C.V. del 56.4% el cual cae dentro del C.V. aceptado en una primovacunación ( $\leq$  a 60%).

La vacuna de LTI vía oral presentó una mejor distribución vacunal y los anticuerpos se detectaron más tempranamente, esto concuerda con lo reportado por Torres quien menciona que la aplicación oral es la mejor ruta ya que dá una mejor distribución del virus a la población, además de no provocar una reacción postvacunal severa (13).

En el 60% del grupo G1 se detectaron anticuerpos a los 28 días postinoculación, estos quizá, fueron producidos por difusión del virus vacunal.

En ninguno de los 3 grupos se presentó influencia por inmunidad pasiva materna, ya que en la 1ª toma de muestras antes de aplicar la vacuna, todos los títulos fueron negativos.

\* CONCLUSION \*

La técnica de ELISA es rápida y eficaz para el diagnóstico temprano de anticuerpos vacunales de LTI, siendo capaz de determinarlos aún con niveles mínimos de estos.

Una mayor y mejor protección contra esta enfermedad se logró con la inmunización oral en el agua de bebida.

18  
CUADRO 1

TITULOS DE ANTICUERPOS CONTRA LTI OBTENIDOS CON LA TECNICA DE ELISA EN EL GRUPO G1							
NUMERO DE TOMA	1	2	3	4	5	6	7
DIAS DE LA TOMA	4	8	12	16	20	24	28
NUMERO DE SUEROS	8	8	8	8	7	7	5
TITULO PROMEDIO	0	0	0	0	0	0	482
COEFICIENTE DE VARIACION %	0	0	0	0	0	0	102.8

CUADRO 2

TITULOS DE ANTICUERPOS CONTRA LTI OBTENIDOS CON LA TECNICA DE ELISA EN EL GRUPO G2							
NUMERO DE TOMA	1	2	3	4	5	6	7
DIAS DE LA TOMA	4	8	12	16	20	24	28
NUMERO DE SUEROS	10	10	10	10	10	10	9
TITULO PROMEDIO	0	0	0	0	0	42	278
COEFICIENTE DE VARIACION %	0	0	0	0	0	316.2	143.4

CUADRO 3

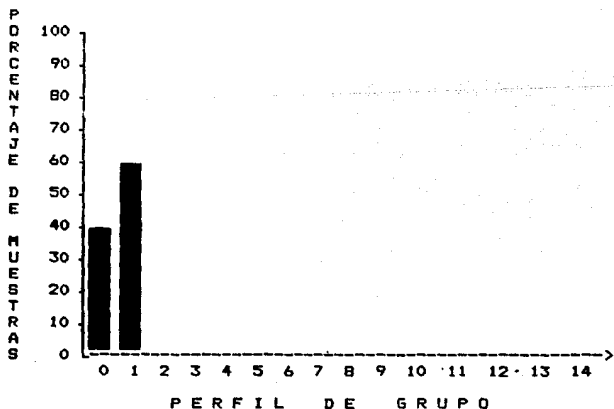
TITULOS DE ANTICUERPOS CONTRA LTI OBTENIDOS CON LA TECNICA DE ELISA EN EL GRUPO G3							
NUMERO DE TOMA	1	2	3	4	5	6	7
DIAS DE LA TOMA	4	8	12	16	20	24	28
NUMERO DE SUEROS	9	8	8	8	8	8	8
TITULO PROMEDIO	0	0	0	0	80	485	1077
COEFICIENTE DE VARIACION %	0	0	0	0	282.8	79.6	56.5

GRAFICA 1

PORCENTAJE DE MUESTRAS UBICADAS EN LOS PERFILES DE GRUPO

GRUPO G1 - TOMA 7

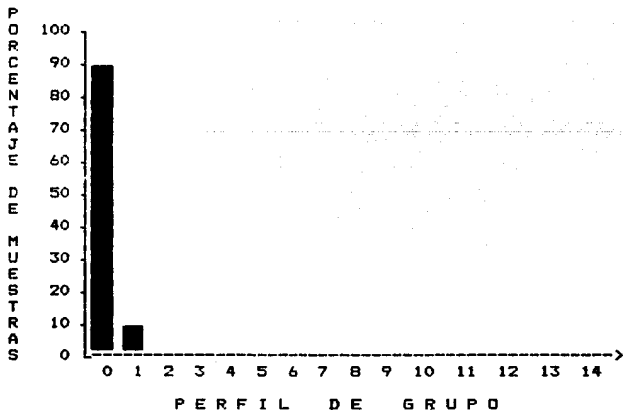
SUEROS	TITULO	TITULO PROMEDIO:	462
1	733	COEFICIENTE DE VARIACION (%):	102.8
2	1096	TITULO MINIMO:	0
3	482	TITULO MAXIMO:	1096
4	0	CANTIDAD DE SUEROS:	5
5	0		



## GRAFICA 2

PORCENTAJE DE MUESTRAS UBICADAS EN LOS PERFILES DE GRUPOGRUPO G2 - TOMA 6

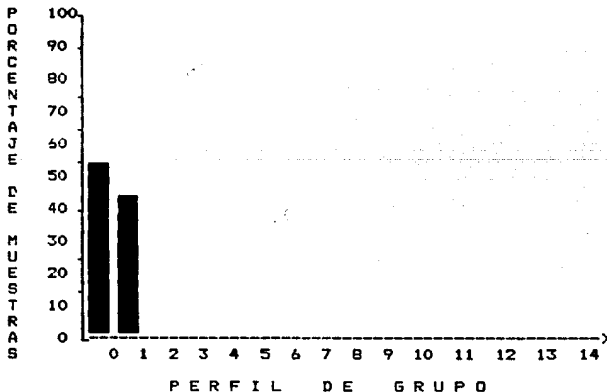
SUEROS	TITULO	TITULO PROMEDIO:	42
1	0	COEFICIENTE DE VARIACION (%):	316.2
2	0	TITULO MINIMO:	0
3	0	TITULO MAXIMO:	420
4	0	CANTIDAD DE SUEROS:	10
5	0		
6	0		
7	0		
8	0		
9	0		
10	420		



## GRAFICA 3

PORCENTAJE DE MUESTRAS UBICADAS EN LOS PERFILES DE GRUPOGRUPO G2 - TOMA 7

SUEROS	TITULO	TITULO PROMEDIO:	278
1	536	COEFICIENTE DE VARIACION (%):	143.4
2	0	TITULO MINIMO:	0
3	409	TITULO MAXIMO:	1165
4	0	CANTIDAD DE SUEROS:	9
5	0		
6	0		
7	389		
8	0		
9	1165		

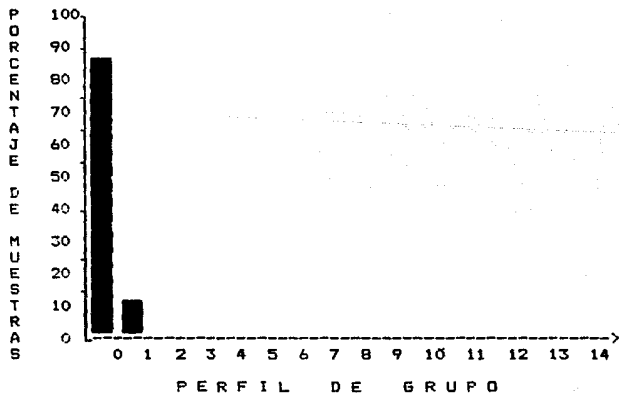




## GRAFICA 4

PORCENTAJE DE MUESTRAS UBICADAS EN LOS PERFILES DE GRUPOGRUPO G3 - TOMA 5

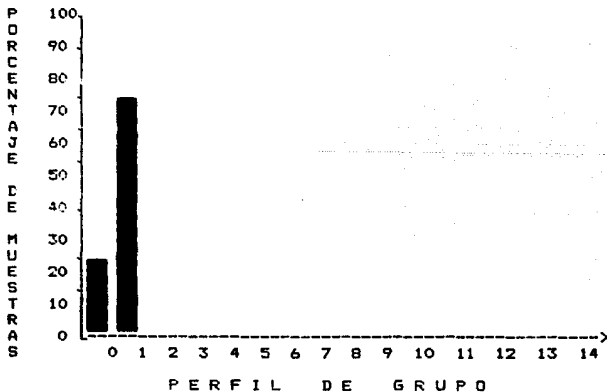
SUEROS	TITULO	TITULO PROMEDIO:	80
1	638	COEFICIENTE DE VARIACION (%):	282.8
2	0	TITULO MINIMO:	0
3	0	TITULO MAXIMO:	638
4	0	CANTIDAD DE SUEROS:	8
5	0		
6	0		
7	0		
8	0		



## GRAFICA 5

PORCENTAJE DE MUESTRAS UBICADAS EN LOS PERFILES DE GRUPOGRUPO G3 - TOMA 6

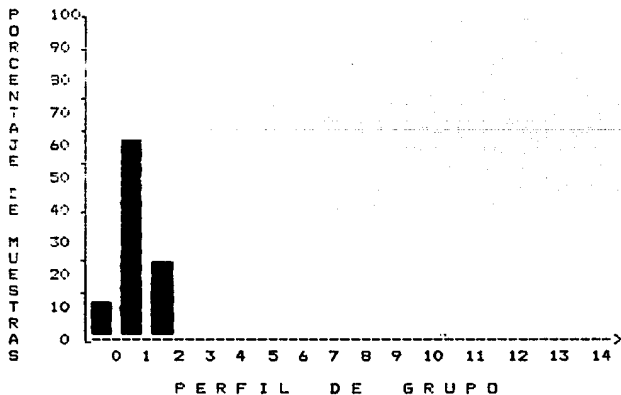
SUEROS	TITULO	TITULO PROMEDIO:	485
1	1165	COEFICIENTE DE VARIACION (%):	79.6
2	482	TITULO MINIMO:	0
3	409	TITULO MAXIMO:	1165
4	525	CANTIDAD DE SUEROS:	8
5	0		
6	0		
7	807		
8	493		



## GRAFICA 6

PORCENTAJE DE MUESTRAS UBICADAS EN LOS PERFILES DE GRUPOGRUPO G3 - TOMA 7

SUEROS	TITULO	TITULO PROMEDIO:	1077
1	1096	COEFICIENTE DE VARIACION (%):	56.5
2	832	TITULO MINIMO:	0
3	0	TITULO MAXIMO:	1877
4	1577	CANTIDAD DE SUEROS:	8
5	514		
6	1381		
7	1337		
8	1877		



## \* LITERATURA CITADA \*

1. Blackburn B.O. y Swanson M.R.: Pruebas automatizadas de la fijación del complemento (FC) y la dosificación inmunoenzimática (ELISA) para el diagnóstico de enfermedades animales. 6ª Conferencia de la Comisión Regional O.I.E. para las Américas. O.I.E. 55-68 México (1983).
2. Calnek, B.W.: Diseases of poultry. 9ª Ed. Iowa State University Press, U.S.A., 1991.
3. Glisson, J. R.: Programa de vacunación para pollos parrileros y pollos parrilleros de cría. Ind. Avi., 36: 22-24 (1989).
4. Heiduk C. and Heider G.: The ELISA diagnostic technique for detection of antibodies to avian laryngotracheitis virus. Monatshefte für Veterinärmedizin, 44: 648-650 (1989).
5. Kelleher PhD. y Rubio G.: Curso: Interpretación de resultados obtenidos mediante la técnica de ELISA en el diagnóstico aviar. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1993).

6. León, E.: Desarrollo y descripción de la técnica de ELISA en el diagnóstico avícola. III jornada Médico Avícola. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1992).
7. Ohkubo Y., Shibata K., Mimura T. and Takashima I.: Labeled Avidin-Biotin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Antibody to Infectious Laryngotracheitis Virus in Chickens. Avian Dis., 32: 24-31 (1988).
8. Proflok ELISA test kits and profile software. 25 National Meeting on Poultry Health and Condemnation Ocean City. Kirkegaard and Perry Laboratories, MD, October (1991).
9. Rubio, G.: ELISA en el diagnóstico de enfermedades aviares. II Jornada Médico Avícola. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1991).
10. Rubio, G. M.: Consideraciones en la selección de técnicas serológicas como apoyo en el diagnóstico aviar. Memorias "Actualización sobre la técnica ELISA en el diagnóstico avícola. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1992).

11. Rubio G.: Interpretación de los resultados obtenidos con la técnica de ELISA. III Jornada Médico Avícola. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1992).
12. Sanchez Viscaino y Cambra Alvarez.: Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en patología animal y vegetal. 2ª Ed. O.I.E., Paris, 1987.
13. Torres, I.J.: Laringotraqueitis infecciosa de las aves. II Jornada Médico Avícola. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1991).
14. York J.J. and Fahey K.J.: Diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody ELISA. Avian Path., 17: 173-182 (1988).