"PRUEBA DE LA TURBIDEZ DEL SULFATO DE ZINC PAPA DETERMINAR INMUNOGLOBULINAS EN EL SUERO DE POTROS RECIEN NACIDOS".

RAFAEL MARTINEZ VAZQUEZ

Asesor: M.V.Z. ALEJANDRO RODRIGUEZ MONTEPDE.

México, D.F.,

1987.





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

and the second s						Pácina
RESUMEN			• • • • •	• • • • •	 	. 1
INTRODUCCIO	ON	• • • • •	• • • • •	• • • • •		. 2
MATERIAL Y	METODOS					. 6
RESULTADOS		• • • • •	• • • •			. 9
DISCUSION	• • • • • • •	••••				. 16
LITEPATURA	CITADA					. 19

RESUMEN

MARTINEZ VAZOUEZ PAFAEL. Prueba de la trubidez del sulfato de zinc para determinar inmunoglobulinas en el -- suero de potros recién nacidos (bajo la dirección de: Alejan-dro Rodríquez Monterde).

Se muestrearon 43 potros Pura Sangre Inglés a -las 24 horas de nacidos para determinar la cantidad de inmuno globulinas mediante la prueba de turbidez del sulfato de zinc, utilizando dos concentraciones diferentes, una con 205 y 1a otra con 250 mg de sulfato de zinc por litro de acua destilada. Mediante el análisis estadístico, se determinó que no hay correlación entre una solución de 205 y 250 mg de ${\rm ZnSO}_4$, sin embargo se observó que la prueba puede ser de utilidad cualitativa ya que al comparar el suero del potro con respecto al de la madre a una misma concentración de ${\tt ZnSO}_{\it A}$ fueron similares en cuanto a la turbidez que presentaron y esto puede servir para determinar si el potro mamó calostro o no. Todos los potros muestreados tuvieron niveles mayores de 800 mg/dl de inmunoglobulinas; se enfermaron 20, de los cuales 14 respon-dieron al tratamiento y 6 murieron de Salmonelosis; indicando que no solo son necesarios los buenos niveles de inmunoclobulinas sino también la especificidad de éstas en conjunción -con medidas adecuadas de manejo.

INTRODUCCION

Los potros recién nacidos, después de haberse de sarrollado en el útero que es prácticamente estéril, llegan a un ambiente en donde abundan los microgranismos patógenos. - Estos animales pueden sucumbir rápidamente ante la presencia de microorganismos que no serían problema nara el animal adulto, de ahí que necesiten ayuda inmunológica. Esta ayuda se ad quiere por medio de la inmunidad pasiva obtenida a partir de los anticuerpos (Ac) cedidos por la madre mediante el calos-tro (12).

El calostro representa las secreciones acumula—das en la glándula mamaria en las últimas semanas de gesta—ción, así como las proteínas procedentes del torrente sanguí—neo por efecto de los estrógenos y la progesterona; por lo—tanto, se trata de una solución rica en inmunoglobulinas (Ig), tales como IgG é IgA y contiene pequeñas cantidades de IgM y de IgE. La inmunoglobulina más abundante en el calostro es la IgG que representa del 65 al 90% del total. Existen diferen—tes isotipos de IgG en el caballo clasificadas con base en —sus características antigénicas y movilidad electroforéticas referidas como IgG (B) é IgG (T), las cuales también se encuen tran en el calostro (3,12).

Tizard (12) menciona que las concentraciones de inmunoglobulinas presentes en el calostro de la yegua son: de IgA entre 500 y 1500 mg/dl, de IgM entre 100 y 350 mg/dl, de IgG entre 1500 y 5000 mg/dl, de IgG (T) entre 500 y 2500

mg/dl, de IgG (B) entre 50 y 150 mg/dl.

Estas concentraciones son de gran importancia ya que los potros son hipogamaglobulinémicos al nacimiento y dependen de la absorción de estas inmunoglobulinas para adquirir resistencia a enfermedades en las primeras semanas de vida esto es debido a que en equinos no hay transferencia de — IgG en la etapa fetal (2,8,9,11).

Los animales recién nacidos que empiezan a alimentarse por medio del amamantamiento reciben el calostro y
éste llega al aparato digestivo en donde la actividad proteolítica del intestino es nula a consecuencia de la presencia
de inhibidores de la tripsina, por lo que las proteínas del
calostro no se desdoblan si no que llegan al intestino delgado en particular al ileon, donde son absorbidas por las células epiteliales mediante pinocitosis hasta llegar a los vasos
quiliferos y finalmente alcanzan la circulación general. Esto
es únicamente en las primeras 24 horas de vida del potro con
lo cual este recibe una transferencia masiva de inmunoglobuli
nas maternas (12).

Las cantidades de Ac que son absorbidas mediante pinocitosis después de las 24 horas de vida son insignificantes. Los niveles de Ac que se obtuvieron pasivamente declinaran a cero aproximadamente a los 5 meses de edad (2,7,8,10, -11).

En los potros puede existir una falla en la --transferencia pasíva por las siguientes razones:

- 1) Lactación prematura. En yeguas primerizas debido a -una lactación prematura y asociada con cambios hormonales pueden tener como consecuencia que el calostro
 no este disponible al momento del nacimiento (8).
- 2) Lactación prematura. Debido a placentitis crónica, se paración placentaria y placentitis micótica, ya que en estos casos las proteínas se reducen considerablemente en el calostro por desbalance hormonal por existir un goteo lento durante 2 0 3 días previos al parto.
- 3) Potros con accese retardado al calostro. En el caso de neonatos prematuros o septicémicos o bien cuando existe un reflejo de mamar defectuoso o retardado en el caso de potros débiles deformes o con anormalida—des de conducta, o en casos de yeguas primerizas con ubres muy tensas que rechazan al potro (8).
- 4) Por actividades de tipo estresantes en la yegua y/o el potro resultantes en altos niveles de esteroides adrenales bloqueándose la absorción de macromoléculas una mala absorción intestinal que se puede presentar en potros prematuros inmaduros o emaciados, con deficiente mucosa intestinal (2).
- 5) Potros prematuros. En estos potros no existen causas posibles para una mala absorción por parte del potro, sin embargo, la transferencia pasiva puede ser deficiente en yeguas que tengan alrededor de 320 días de gestación por no tener un adecuado estímulo hormonal

ni el tiempo suficiente para la producción de calostro rico en inmunoglobulinas para el potro; otros aspectos son las condiciones adecuadas de manejo y el medio am biente adecuado al momento de nacer para que este tome calostro y tenga un efectivo título de Ac (8).

Jeffcott (7) demuestra en un estudio realizado en la Universidad de California en Davis, la cantidad de Ig que son absorbidas por el potro durante las primeras horas de vida y cómo van disminuyendo durante las primeras semanas de de vida, esto es, que mientras la cantidad de Ig maternas, el sistema inmunocompetente del potro va madurando de aquí la im portancia de que el potro mame calostro en las primeras horas de vida.

En estudios que comparan las diferentes técnicas para cuantificar la cantidad de gamaglobulinas se concluye que potros postamamantamiento con niveles de hasta 200 mg/dl de Ig padecen de una falla total en la transferencia pasiva, los que tienen niveles de 200 a 400 mg/dl tienen una falla parcial en la transferencia y potros con niveles superiores a los 400 mg/dl tienen una transferencia pasiva normal (2,5,11).

Existen técnicas desarrolladas para valorar la transferencia de Ig al neonato, entre estos se encuentra la inmunodifusión radial, la electroforesis, la precipitación del sulfato de sodio, la medición de las proteínas por medio del refractómetro y la turbidez del sulfato de zinc (9,11).

La prueba de la turbidez del sulfato de zinc es rápida y se evalúa fácilmente para determinar el estado de — los potros recién nacidos, esta prueba se puede llevar a cabo tanto en el laboratorio, como en el campo, y los resultados que se obtienen para determinar el estado inmune de los potros son comparables con las demás pruebas existentes. A nivel de campo se puede realizar obteniendo una muestra del suero del potro y se compara a través de un fondo obscuro y la precipitación que presenten los tubos deben ser similares en cuanto a la turbidez que presenten éstos, por lo tanto a este nivel será una prueba cualitativa y no cuantitativa (1).

En la literatura se citan dos concentraciones de sulfato de zinc para determinar la cantidad de inmunoglobulinas de 205 mg de sulfato de zinc por litro de agua destilada y otra de 250 mg, siendo su acción aparentemente similar por lo que se planteó en este trabajo para valorar la prueba y comparar ambas soluciones.

MATERIAL Y METODOS.

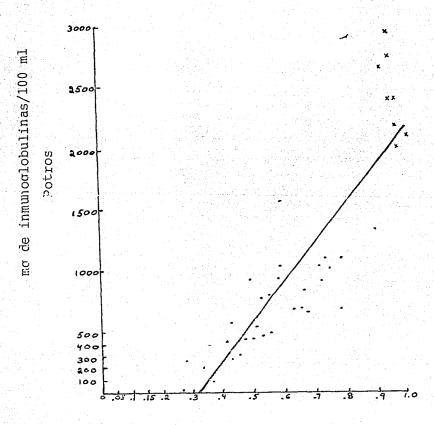
Se contó con 60 yeguas Pura Sangre, que parieron 43 potros, la muestra de sangre de los potros se obtuvo a las 24 horas de nacidos, el período en el cual se muestrearon los potros fué entre Enero y Junio de 1984, estas muestras se — obtuvieron en tubos vacutainers sin anticoagulante y en un — lapso de entre 5 y 7 horas se centrifugaron a 3000 rom durante 10 minutos para la obtención de los sueros correspondien—

tes. Posteriormente en un tubo de ensaye se depositó 0.1 ml de este suero al que se le adiciónó 5 ml de la solución de -- sulfato de zinc, se mezcló y se incubó a la temperatura am--- biente durante una hora. Con el fin de tener una estandarización, al momento de hacer la lectura ex el espectrofotómetro a una longitud de onda de 485 mm se calibró a cero con cada una de las soluciones por separado.

Se determinó primero la cantidad de Ig en los diferentes sueros con la solución de 205 mg/lt y después se realizó el mismo proceso con la solución de 250 mg/lt. Para obtener el dato máximo de la reacción se leyó a la hora de hacer la solución. La cantidad aproximada de Ig en el suero de los potros se obtuvo de acuerdo a la gráfica 1 que se tomó del -trabajo en que Rumbaugh, Et al (11) estudiaron la relación de la lectura del espectrofotómetro y la cantidad de Ig presentes en el suero de 50 potros. La gráfica se usó colocando la lectura que se hizo en el espectrofotómetro en el eje de las abscisas y buscando la cantidad de Ig en el eje de las ordena das, conforme la línea de regresión.

A los potros que murieron en los primeros cinco meses de vida se les realizó la necropsia y los estudios bacteriológicos y patológicos en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.

Para el análisis estadístico se estimó la correlación entre los resultados de las dos soluciones, y la correlación entre la lectura del potro y la yegua en cada una de las concentraciones. GRAFICA 1



Densidad Optica a 485 mm

Determinación de Ig de 50 sueros de potros neonatos medidos por la turbidez del Sulfato de Zinc y comparado con el contenido de IgG en el suero determinado por inmunodifusión radial. La línea representa la mejor línea de regresión para todos los ejemplos. Esta gráfica fué tomada del trabajo de Rumbaugh y colaboradores (11).

RESULTADOS.

Los resultados de las realizaciones obtenidas -tanto de potros y madres para las dos concentraciones se mues
tran en las gráficas 2 y 3.

En los cuadros 1 y 2 se muestran los resultados obtenidos por medio del espectrofotómetro de las concentraciones de 205 y 250 mg de ZnSO4 respectivamente, donde se compara la cantidad de Ig presentes en el potro con respecto a la concentración de Ig de la madre, cabe mencionar que en ningún caso el título de Ig de los potros fué superior al de la madre.

Se estimó la correlación existente entre los resultados en el potro y enla madre en cada una de las concentraciones, para la de 205 mg de ${\rm ZnSO}_4$ fué de 85% (r=0.85), para la concentración de 250 fué de 91% (r=0.91), que indican una correlación significativa (p<0.05) en ambos casos.

Los datos estadísticos que se obtuvieron al ha-cer la correlación relacionando los resultados en los potros de las dos concentraciones: 205 y 250 mg de ZnSO₄ fueron los siguientes:

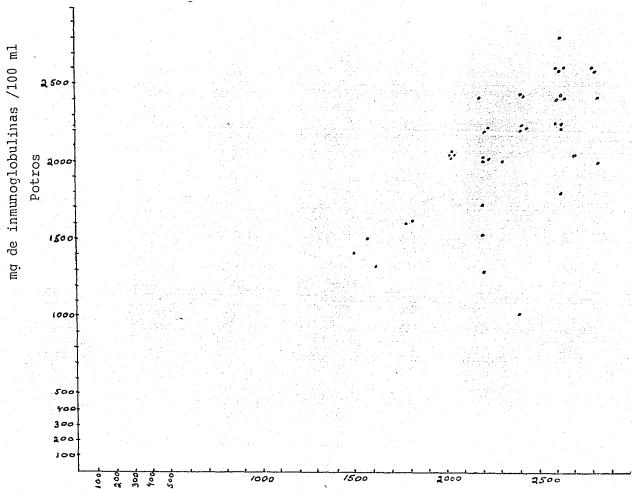
		CONCENTRACION	CONCENTRACION			
		205 mg/lt		250 mg/lt		
Rango		1020-2600		1500-7800		
X		206.84		218.41		
s		40.89	4	30.15		

La correlación entre las pruebas fué de 0.25, que no es significativo (p>0.5), indicando que no se encuentran resultados similares con una y otra concentración.

En el cuadro 3 se muestra una relación de los po tros que se enfermaron en los cinco primeros meses de vida. De los 43 potros que se muestrearon seis murieron entre los 25 y 30 días de edad, los hallazgos más sobresalientes a la ne-cropsia fueron problemas respiratorios (3 casos), bronconeumo nia abscedativa difusa (1 caso), así como poliartritis (2 casos), presencia de abundante exudado purulento v una muerte súbita. En el caso de muerte súbita, no se encontraron lesiones significativas. En dos casos, uno de bronconeumonia y otro de poliartritis, presentaron además meningitis exúdativa. En el estudio bacteriológico para el aislamiento e identificación de gérmenes aerobios y anaerobios, en los seis casos se aisló Salmonella en cultivo puro, en dos se encontró asociado con -Strptococcus Zooepidermicus y en uno con S. Zooepidermicus, Rhodococcus (Corynebactérium) equi y Bordetella bronchiséptica.

GRAFICA. 2

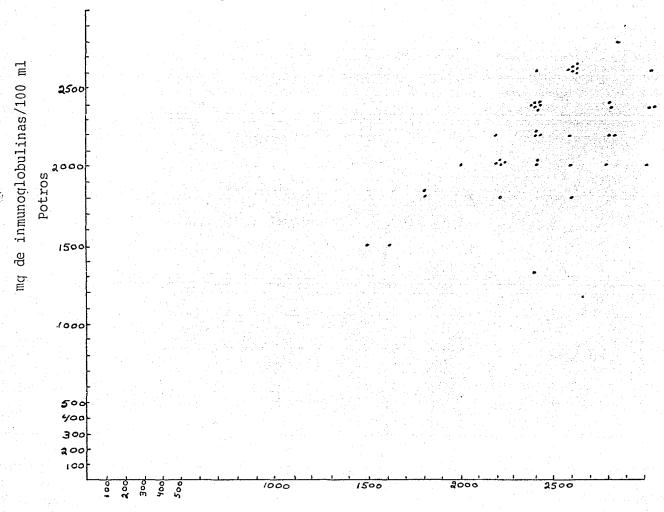
Comparación de la lectura de los 43 potros con la lectura de sus respectivas madres a una concentración de 205 mg de ZnSO₄ tomando en consideración que varios de los potros y madres tuvieron la misma concentración y que sor lo tanto se graficaron en el mismo punto.



mg de inmunoglobulinas /100 ml
Madres

GPAFICA 3

Comparación de la lectura de los 43 potros con la lectura de sus respectivas madres a una concentración de 250 mg de ${\rm ZnSO}_4$, tomando en consideración que varios de los potros y madres tu vieron la misma concentración y que por lo tanto se graficaron en el mismo punto.



mg de inmunoglobulinas/100 ml

Madres

CUADRO "1"

Lectura de la turbidez del ${\rm ZnSO}_4$ a una concentración de 205 mg de ${\rm ZnSO}_4$ por medio del espectrofotometro en donde se muestra la cantidad de inmunoglobulinas en el suero que presenta tanto el potro como la madre.

SOLUCION DE 205 mg/ZnSO4

N° POTRO		MADRE		N o	POTRO		MADRE		
	LECTURA	Ig/dl	LECTURA.	Iq/dl		LECTURA	Ig/dl	LECTURA	Ig/dl
1	. 75	1500	. 78	1560	23	1 , 2	2400	1.3	2600
2	1.0	2000	1.0	2000	24	1.2	2400	1.4	2800
3	1.0	2000	1.0	2000	25	1.3	2600	1.4	2800
4	.66	1300	.68	1580	26	1.0	2000	1.2	2400
5	.91	1800	1.1	2200	27	1.1	2200	1.3	2600
6	.73	1420	.77	1560	28	1.2	2400	1.4	2800
7	.83	1600	.93	1840	29	.9	1800	1.3	2600
8	.53	1020	1.2	2400	30	1.3	2800	1.3	2600
9	1.0	2000	1.1	2200	31	1.1	2200	1.3	2600
10	.78	1540	1.1	2200	32	1.2	2400	1.2	2400
1.1	1.0	2000	1.0	2000	33	1.1	2200	1.2	2400
12	.83	1600	.93	1840	34	1.2	2400	1.3	2600
1.3	.87	1760	1.1	2200	35	1.3	2600	1.4	2800
14	1.1	2200	1.2.	2400	36	1.0	2 0 00	1.1	2200
15	1.3	2600	1.3	2600	37	1.2	2400	1.3,	2600
16	1.1	2200	1.1	2200	38	1.0	2000	1.1	2 0 00
17	1.2	2400	1.2	2400	39	.9	1800	1.5	3000
18	1.2	2400	1.1	2200	40	1.0	2000	1.4	2800
19	1.1	2200	1.2	2400	41	1.3	2600	1.3	2600
20	1.3	2600	1.3	2600	42	1.1	2200	1.2	2200
21	1.1	2200	1.3	2600	43	1.0	2000	1.3	2600
22	1.0	2000	1 4	2800				•	

Lectura de la turbidez del ZnSO₄ a una concentración de 250 mg ZnSO₄ por medio del espectrofotometro en donde se muestra la cantidad de inmunoglobulinas en el suero que presenta tanto el potro como la madre.

SOLUCION DE 250 mg/ZnSO4

No	род в	20	MAD	RE			POT	RO	. M.A. I	RE
	LECTURA	Ig/dl	LECTURA	Ig/dl	I.	l°	LECTURA	Ig/dl	LECTURA	Ig/dl
1	.75	1500	. 78	1560		23	1.3	2600	1.3	2600
2	1.0	2000	1.0	2000		24	1.4	2800	1.4	2800
3	1.1	2200	1.3	2600	2	5	1.3	2600	1.5	3000
4	. 75	1500	.8	1600		6	1.1	2200	1.2	2800
5	1.2	2400	1.2	2400	2	7	1.1	2200	1.2	2800
6	1.0	2000	1.1	2200		8	1.2	2400	1.5	3000
7	.9	1800	.9	1800	2	9	1.0	2000	1.2	2400
8	.68	1300	1.2	2400		30	1.2	2400	1.4	2800 ⊨
9	1.2	2400	1.2	2400		31	1.1	2200	1.2	2400 4
10	. 9	1800	1.1	2200		32	1.0	2000	1.2	2200
11	1.1	2200	1.1	2200	3	33	1.0	2000	1.1	2200
12	.9	1800	91.000.700.00	1800		34	1.2	2400	1.5	3000
13	1.0	2000	1.1	2200		35	1.2	2400	1.3	2600
14	1.1	2200	1.2	2400		36	1.0	2000	1.2	2400
15	1.3	2600	1,3	2600		37	1.3	2600	. 1.3	2600
16	1.0	2000	1.2	2400		88	1.1	2200	1.2	2400
17	1,3	2600	1.3	2600		39	.9	1800	1.3	2600
18	1.2	2400	1.2	2400		10	1,0	2000	1.3	2600
19	1.2	2400	1.2	2400	4	11	1.3	2600	1.3	2600
20	1.3	2600	1.3	2600	4	12	1.2	2400	1.2	2400
21	1.2	2400	1.4	2800	a in the second	13	1.0	2000	1.4	2800
22	1.0	2000	1.5	3000						

Potros que presentaron problemas en los 5 primeros meses de vida.

CONCENTRACTON

Títulos encontrados con la solución de 205*.	Títulos encontrados con la solución de 250*.	Edad a la que presentó el problema.
1600	1720	4 meses de edad. Ligera reacción en ganglios submaxilares, secreción en ambos ollares.
2400	2400	1 mes de edad. Estertores húmedos en tráquea, secreción nasal.
2000	2200	2 meses de edad. Reacción en ganglios.
2600	2600	1 mes de edad. Ligera reacción en ganglios.
2200	2000	4 meses de edad. Secreción en ollares, reacción en ganglios.
440	1500	3 meses de edad. Reacción en ganglios.
2200	2400	1 1/2 mes de edad. Reacción en ganglios.
1300	1500	3 meses de edad. Reacción en ganglios.
2200	2200	16 días de edad. Ligera reacción en ganglios submaxilares.

mg ${
m ZnSO}_4$ / litro de agua destilada.

DISCUSION.

En el presente trabajo se observó que todos los potros presentaron niveles mayores de 800 mg/dl, considerados por varios autores (1,2,6,9,10,11) como suficientes para considerar a los potros con buenos niveles de Ig, sin embargo, aún así se enfermaron 20 en los primeros cinco meses de vida de los cuales 14 respondieron al tratamiento, aunque hay que hacer notar que estos tuvieron signos muy ligeros de enfermedad.

Por otro lado los 6 potros que murieron entre los 25 y 30 dias de edad presentaron signos de enfermedad sistémica y/o neumónica, estos potros tuvieron niveles adecuados de Ig que pudieron no ser específicas para los agentes etiológicos causantes de la muerte, ahora bien la mayoría de los autores mencionan que los potros con niveles menores de 400 mg/dl de Ig estan predispuestos a adquirir enfermedades; sin embargo, Kotelba y Brewer (6), encontraron que los potros con un rango de 400-800 mg/dl también tienen un alto riesgo de adquirir severas infecciones aunque enfatizan que no todos los potros con niveles de Ig menores de 400 mg/dl adquieren infecciones, sobre todo cuando existe un buen manejo del cria dero y el vigor general del potro es bueno.

Estadísticamente se demostró que entre las dos soluciones no hay correlación significativa y que por lo tanto el valor de esta prueba es cualitativa y no cuantitativa. Al obtener el suero del potro y el de la yegua, previo centrifugado o sedimentado, sólo debe compararse el grado de turbi-

dez que presenten ambos, es decir, la turbidez que presenta la prueba realizada con el suero del potro deberá ser similar con la turbidez que presente el tubo que contença el suero de la - yegua para determinar si el potro mamó calostro, pero no será útil para estimar la cantidad de Ig que el potro pueda tener ya que esto requiere pruebas más específicas para la determina ción de las inmunoglobulinas.

Como se observa en los cuadros 1 y 2 donde se com para la cantidad de Ig que presenta el potro con respecto al de la madre en ningún caso y en ninguna concentración el resultado del suero de los potros fué mayor al suero de sus respectivas madres, por lo que al compararlos entre sí se puede detectar de manera cualitativa una falla parcial o total en la transferencia pasiva de Ig.

Los problemas de transferencia pasiva en el potro deben ser reconocidos rápidamente por que pueden predisponer a infecciones en el neonato, necesitando la rápida identifica--- ción del potro afectado para suplementar oportunamente esta deficiencia con una donadora de calostro o con plasma.

Cuando estas Ig se administraran oralmente median te plasma o suero la cantidad debe ser mucho mayor porque ambos presentan una menor concentración de anticuerpos particularmente IgG presentando también la ausencia de factores de la absorción que normalmente estan presente en el calostro.

Por último, mencionaremos que la ventaja princi-pal de la prueba de la turbidez del sulfato de zinc radica en
que esta se realiza relativamente rápido (1 hora) y los resul-

tados cualitativos que se obtienen pueden ser usados con razonable seguridad a nivel de campo. La mayor desventaja de este método de diagnóstico es una posible descomposición de la solución, ya que es afectada por temperaturas extremas, modificándose ya que es afectada por temperaturas extremas, modificándose la precipitación de las proteínas del suero. El resultado también esta influído por la hemoglobina que se libera como consecuencia de la hemolisis de los eritrocitos.

LITERATURA CITADA

- 1. Ardans, A.A.: Inmune response and management, A seminar at 28th Annual Convention, University of California Pavis, California 1982. 1-11 American Association of Equine Practitioners (1982).
- 2. Beckmann, B.A. and Dann, B.: Inmunological problems in neonatal foal. Equine profesional topics, 2:2-7 (1979).
- 3. Breazile, J.E.: Textbook of Veterinary Physiology, Edited by Lea and Febiger, Philadelphia, 1971.
- 4. Coffman, J.: Inmunity Autoinmunity and inmunodeficiency in the foal. VM/SAC., 74:1430-1440 (1979).
- 5. Crawford, T.B. and Parryman, L.E.: Diagnosis and treatment of failure of passive transfer in the foal. Equine Pract. 2 (1):17-23 (1980).
- 6. Jill, Beech., Neonatal Equine Disease. The Veterinary Clinics of North America Equine Practice; 1: (1) 41-51 (1985).
- 7. Jeffcott, L.B.: Clinical aspectos of passive inmunity in the foal. JL S. Afr. Vet. Ass., 16 (1):57 (abstract) (1975).
- 8. Jeffcott, L.B.: Some practical aspects of the transfer of passive inmunity to newborn foals. Equine Vet. J., 6: 109-115 (1974).
- 9. Mcquire, C.T., Crawford, B.T., Hallowell, A.L. and Fverett, Macaber, L.: Failure of colostral inmunoclobulin transfer as an explanación for most infectiosn and deaths of neonatal foals. J. Am. vet. med. Ass., 170 (11):1302-1304 (1977).
- 10. Rumbaugh, G.E.: Identification and treatment of calostrum deficient foals. J. Am. vet. med. Ass., 174 273-276 (1979).
- 11. Rumbaugh, G.E., Ardans, A.A., Ginne, D. and Trommershausen Smith, A.: Measurement of neonatal equine inmunoglobulins for assessment of colostral inmunoglobulin transfer, comparation fo single radial inmunodifusion with the Zinc Sulfate turbidity test, serum electrophoresis, refractometry for tatal serum protein, and the Sodium Sulfitr presipitation test. J. Am. vet. med. Ass., 172 (3): 321-325 (1978).
- 12. Tizard, I.R.: Inmunología Veterinaria, <u>Nueva Edición Inter</u> americana. México, D.F., 1979.