

182  
20j



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**COMPARACION DE DOS PRUEBAS SEROLOGICAS PARA  
LA DETECCION DE ANTICUERPOS CIRCULANTES EN  
LA ANAPLASMOSIS BOVINA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A :**

**JUAN ALBERTO RAMOS ARAGON**

**ASESORES:**

**M.V.Z. JESUS ANTONIO ALVAREZ MARTINEZ  
M.V.Z. MSC. GERMINAL JORGE CANTO ALARCON**

**MEXICO, 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.

# C O N T E N I D O

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	6
RESULTADOS.....	10
DISCUSION.....	14
CONCLUSIONES.....	16
LITERATURA CITADA.....	17

## R E S U M E N

RAMOS ARAGON JUAN ALBERTO. Comparación de dos pruebas serológicas para la detección de anticuerpos circulantes en la Anaplasmosis bovina. (bajo la dirección de: Jesús Antonio Alvarez Martínez y Germinal Jorge Cantó -- Alarcón).

El presente estudio fue diseñado con objeto de conocer el grado de concordancia o similitud entre la prueba de Aglutinación en Tarjeta (PATA) y la de Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), en la detección de anticuerpos contra Anaplasma marginale. Los objetivos planteados fueron: a) Determinar el porcentaje de concordancia entre las pruebas de ELISA y PATA en sueros de bovinos adultos localizados en zonas de baja prevalencia, de alta prevalencia y libre. b) Determinar la presencia de anticuerpos anti-Anaplasma transferidos a becerros a través del calostro de vacas portadoras. c) Observar la aparición de anticuerpos anti-Anaplasma en becerros libres localizados en zona endémica. Al analizar 227 sueros por ambas pruebas, se encontró una concordancia de 91.62% siendo de 89.28% y 71.42% para las zonas de alta y baja prevalencia respectivamente. Se observó un 100% de similitud en la zona donde los animales eran negativos. ELISA pudo detectar la inmunidad pasiva transferida a través del calostro en el 60% de los animales contra el 30% de PATA. En los becerros expuestos en forma natural a la enfermedad, ELISA fue la primera en detectar anticuerpos anti-Anaplasma a partir del 2º mes de nacimiento. La concordancia general obtenida entre PATA y ELISA permiten la utilización de ambas pruebas con el mismo grado de confianza.

## I N T R O D U C C I O N

La anaplasmosis es una enfermedad hemoparasitaria - del ganado y de otros rumiantes, causada por la rickettsia - Anaplasma marginale (9, 19, 21). Las enfermedades hemoparasitarias son endémicas en la mitad de las áreas ganaderas y son uno de los mayores obstáculos de la producción; la más frecuente de estas enfermedades es la anaplasmosis, ocurre en regiones tropicales y subtropicales. Se ha estimado que es responsable de la muerte de 50,000-100,000 cabezas de ganado anualmente en los EE.UU.A. (17). En México, se ha calculado que el complejo garrapatas-anaplasmosis-piroplasmosis ocasiona -- pérdidas por más de seis mil millones de pesos anualmente.

La enfermedad originalmente fue descrita por Theiler en 1910, caracterizada por una anemia severa, con los parásitos de localización intraeritrocítica (13, 19). La transmisión -- puede efectuarse por vectores artrópodos biológicos o mecánicos con un periodo prepatente de 20-40 días, seguido por una fase aguda en la que la parasitemia se incrementa geométricamente y se presenta una anemia severa, disminución de peso, - abortos y en ocasiones la muerte (18).

Al iniciarse los estudios clásicos de babesiosis -- por Smith y Kilborne, durante muchos años A. marginale fue -- considerado similar a Babesia spp.(22). Durante las 2 últimas décadas se ha adquirido un gran número de conocimientos acerca de la biología y de las propiedades físicas del organismo, los que han justificado su clasificación dentro del orden Rickett-

siales (21).

Una variedad de anticuerpos demostrables serológicamente aparecen en el curso de la infección por Anaplasma y la detección de estos anticuerpos por varios métodos han sido importantes en el diagnóstico de campo y en el control de la Anaplasmosis (21).

Es importante el mencionar que a la fecha no existe una prueba serológica la cual sea capaz de diagnosticar infectividad con 100% de seguridad (1). Entre las principales pruebas serológicas para detectar anticuerpos contra Anaplasma marginale en el ganado, se incluyen: Fijación de Complemento (F.C.) (14, 27, 30), Aglutinación en Tubo Capilar (C.A.), (14, 20); Anticuerpos fluorescentes (I.F.A.) (11) Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) (26, 27) y la de Aglutinación en Tarjeta (P.A.T.A.) (1, 2, 3, 4, 5, 11).

A la fecha se han realizado estudios de diversas partes del mundo con objeto de conocer el porcentaje de concordancia entre las diversas pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti-Anaplasma, observando que las pruebas que han tenido una mayor similitud en relación a su sensibilidad y especificidad han sido la de F.C.; IFA y PATA (10, 11, 26) -- siendo esta última la más sencilla y rápida de realizar (1, 2, 3).

La prueba de ELISA es un procedimiento relativamente reciente que ha permitido la detección tanto de antígenos como de anticuerpos (7, 23, 24, 27); con la base inmunológica de la

presencia de anticuerpos específicos presentes en los fluidos corporales, ha sido posible la detección de una gran variedad de agentes infecciosos tales como virus, bacterias y parásitos además de fármacos y hormonas tanto en humanos como en animales (6, 7, 27, 29). Esta técnica ha mostrado una sensibilidad similar al radioinmunoensayo (12, 28, 29).

Pocas son las experiencias a nivel mundial del comportamiento de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra A. marginale; sin embargo, se ha podido observar que tiene una confiabilidad similar a la de F.C. (26). Estudios como los mencionados anteriormente pueden permitir la selección de la prueba más apropiada para realizar estudios de escrutinio; o bien, para el diagnóstico de animales portadores de A. marginale.

Por lo antes señalado, el presente trabajo fue diseñado con el objeto de conocer el grado de concordancia entre las pruebas de ELISA y la de PATA, ya que a la fecha y debido a que la primera es de reciente uso, no se ha estudiado su similitud.

#### HIPOTESIS

Existe un grado de concordancia superior al 90% entre las pruebas de ELISA y PATA para el escrutinio de Anaplasmosis en el ganado bovino.

#### OBJETIVOS

1) Determinar el grado de concordancia entre las pruebas de -

ELISA y PATA en sueros de bovinos localizados en zonas libre, con alta y con baja prevalencia de anaplasmosis.

- 2) Detectar la aparición de anticuerpos anti-Anaplasma en becerros libres localizados en una zona endémica.
- 3) Detectar la presencia de anticuerpos anti-Anaplasma transferidos a becerros a través del calostro.



## M A T E R I A L Y M E T O D O S

### I.- Material Biológico

Para la realización del presente estudio, se obtuvieron muestras sanguíneas de bovinos localizados en 3 zonas geográficas con diferente porcentaje de animales seropositivos a A. marginale; siendo 84 del Campo Experimental "La Posta" en Veracruz, Ver., la cual y de acuerdo a un estudio reciente, es considerada como una zona de alta prevalencia con un 81.0% de animales positivos a anaplasmosis. Se muestrearon 35 bovinos localizados en el rancho G.B. en Amascala, Qro., zona en la que en raras ocasiones se han presentado casos clínicos de la enfermedad y por último 108 muestras de suero de una explotación ganadera de engorda localizada en Chihuahua en la que la anaplasmosis es una enfermedad exótica.

Para determinar la inmunidad pasiva, se obtuvieron calostros de vacas portadoras de la enfermedad, a las que previamente se les realizaron las pruebas serológicas de F.C., ELISA y PATA con objeto de observar la presencia de anticuerpos anti-Anaplasma. Diez becerros recién nacidos provenientes de una zona libre de la enfermedad y cuyas madres fueron negativas a la presencia de anticuerpos anti-Anaplasma, recibieron 250 ml/animal de una mezcla de los calostros previamente obtenidos, obteniendo suero a las 24 hs postoma para analizarse por las pruebas de ELISA y PATA.

Con objeto de observar la presencia temprana de anticuerpos, 7 becerros recién nacidos recibieron calostro de vacas

libres de anaplasmosis y fueron llevados al Campo Experimental "La Posta", donde se expusieron naturalmente a la enfermedad y se les tomaron muestras mensuales de suero.

## II.- Reactivos

### A) Prueba de PATA

- a) \*Antígeno corpuscular.
- b) Factor Sérico Bovino (F.S.B.)

### B) Prueba de ELISA

- a) \*Antígeno corpuscular.
- b) Albúmina Sérica bovina (albumin, bovine, Sigma Chemical Company St. Louis Mo. USA).
- c) Conjugado: Anti IgG bovina con peroxidasa de rábano pican te (Cappel Lab. Cochranville, P.A. USA).
- d) Sustrato: O. phenylenediamine dihydrochloride (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. USA).
- e) Peróxido de hidrógeno al 30% (Perhydrol 30% E Merck 5-6100 Darmstadt, F.R. Germany).

## III.- Desarrollo de las Pruebas

### a) ELISA

Se realizó el procedimiento modificado de atuerac a Tello et al. (27) previamente descrito por Saunders (24).

- 1) Antígeno (Ag): Dilución del antígeno (1:400), en solución de Carbonatos (pH 9.6) adsorción del antígeno en placas -

\* Proporcionado por el Dr. G. Brown del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica, Ames, Iowa.

NUNC de polivinil (Intermed, Denmark). Esto se realiza -  
manteniendo la placa con el antígeno (100 µl cada pozo) du-  
rante 24 horas a 4°C.

- 2) Lavado: Se efectúan 3 lavados con PBS-Tween (pH 7.4) para eliminar el Ag excedente.
- 3) Albúmina: A cada pozo se agregan 100 µl de albúmina bovina al 4% diluida en PBS-Tween e incubar a 37°C 15 minutos, re-  
petir el lavado.
- 4) Sueros: Cada suero en estudio fue trabajado en una dilu-  
ción de 1:80. Se diluye con PBS-Tween colocando 100 µl en  
cada pozo y se incuba a 37°C 15 minutos, repetir paso # 2.
- 5) Conjugado: Se diluye 1:1500 con PBS-Tween y se agregan --  
100 µl a cada pozo incubándose a 37°C, 15 minutos. Se rea-  
lizan 5 lavados.
- 6) Sustrato: Se agregan 100 µl de sustrato a cada pozo y se -  
incuba durante 10 minutos a 37°C.
- 7) Paro de reacción: Se efectúa agregando 100 µl a cada pozo  
de una solución de ácido hidrofúrico a 1.5 M con EDTA -  
al 38.8%.
- 8) Lectura: Se empleó un lector específico para la prueba --  
(FISHER ELISA READER) a una densidad óptica de 405 nm.
- 9) Para la interpretación de la prueba se obtuvieron las ---  
medias de los valores de absorvancia de los controles posi-  
tivos y negativos, delimitando a partir de la media y dos  
desviaciones estandar los resultados.

b) Aglutinación en Tarjeta

La prueba se desarrolló realizando modificaciones a la técnica original descrita por Amerault en 1968 (2) y modificada por el mismo autor 1972 (4).

En una placa de vidrio perfectamente limpio se colocan 20  $\mu$ l de suero problema, 20  $\mu$ l de antígeno y 20  $\mu$ l de factor sérico bovino (F.S.B.). Posteriormente se homogeniza con un paliillo de madera describiendo un círculo no mayor de 2 cm de diámetro. Rotar la placa suavemente durante un periodo no mayor de 8 minutos a una temperatura no menor de 19°C ni mayor de 30°C y finalmente se realiza la lectura comparando los sueros controles positivos y negativos, considerando como positivos a la aparición de agregados característicos dentro del periodo de tiempo mencionado y negativo a la ausencia de los mismos.

## R E S U L T A D O S

Al efectuar las pruebas de ELISA y PATA se encontró una concordancia general del 91.62% (Cuadro N° 1).

Se observó que en los sueros procedentes de la zona de alta prevalencia que el porcentaje de concordancia fue del 89.28%, es decir que 75 de los 84 sueros analizados presentaron resultados similares. Con respecto a la zona de baja prevalencia, se obtuvo la menor concordancia, reaccionando 25 de 35 sueros en la misma forma y para la zona libre todos los -- animales resultaron negativos observando un 100% de concordancia (Cuadro N° 1). La prevalencia de animales seropositivos a A. marginale en la zona de alta prevalencia fue del 86.90% para ELISA y del 83.30% para PATA.

En relación a la detección de anticuerpos anti-Anaplasma infectados en forma natural se observó la seronegatividad de los animales aún después de haber permanecido durante 20 días en zona endémica. La prueba de ELISA logró detectar un animal positivo a partir del 2° mes mientras que para PATA no fue sino hasta el 3° mes en el que se presentaron 2 reactores positivos. Es importante el señalar que mediante la prueba de ELISA, se pudo detectar que el total de animales fueron positivos al 4° mes en contraste con PATA en la que durante - los 6 meses un animal permaneció negativo (Cuadro N° 2). Du- rante la realización de esta parte del estudio, 1 animal murió al 4° mes de edad, con un evidente cuadro neumónico.

En cuanto a la detección de la inmunidad pasiva --

transferida a través del calostro, se observó que mediante la prueba de ELISA, 6 de los 10 animales mostraron anticuerpos específicos contra A. marginale 24 horas después de la ingestión de calostro mientras que para PATA, solo fue posible detectar 3 animales seropositivos.

Cuadro N° 1

PORCENTAJE DE CONCORDANCIA ENTRE LAS PRUEBAS DE ELISA Y PATA.

	* Z.A.P.	**Z.B.P.	*** Z.L.	TOTALES
N° de Sueros	84	35	108	227
Sueros con reacciones similares.	75 <sup>1</sup>	25 <sup>2</sup>	108	208
% de concordancia.	89.28	71.42	100.00	91.62

\* Zona de Alta Prevalencia.

\*\* Zona de Baja Prevalencia.

\*\*\* Zona Libre.

1 = 6 Sueros + en ELISA fueron - en PATA y 3 Sueros -en ELISA fueron + en PATA.

2 = 6 Sueros + en ELISA fueron - en PATA y 4 Sueros -en ELISA fueron + en PATA.

Cuadro N° 2.

DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-ANAPLASMA EN BECERROS EXPUESTOS EN  
FORMA NATURAL EN ZONA ENDEMICA.

	M E S E S					
	1	2	3	4*	5	6
Animales (+)	0	1	2	6	6	6
E L I S A						
Total animales	7	7	7	6	6	6
Animales (+)	-	-	2	2	4	5
P A T A						
Total animales	7	7	7	6	6	6

\* Un animal murió.



## D I S C U S I O N

Un diagnóstico serológico confiable de los portadores de anaplasmosis es un aspecto esencial en programas de control. De la concordancia obtenida en este estudio que fue del 91.62 se observa que es similar a las encontradas en trabajos análogos, en los cuales al comparar PATA con FC e IFA se observó un 88.21 y 91.53% de similitud respectivamente (31), mientras que PATA y FC fue del 86% (2). González Long y Todorovic en 1978 observaron la concordancia de PATA contra FC e IFA obteniendo un 86.15 de similitud para ambas pruebas (11).

En el presente estudio se observó que las 2 pruebas mostraron un alto grado de especificidad, entendiéndose ésta como la capacidad de una prueba para detectar animales negativos como tales (Cuadro N° 1), lo que concuerda con lo señalado anteriormente por Kuttler en 1963 (14), Ristic 1962 (20), Amerault, Rose y Roby en 1972 (4) y Wilson et al. en 1978 (31).

La utilización de cualquiera de las pruebas mencionadas, puede ser integrada como herramienta importante en programas de prevención y control de anaplasmosis.

La prevalencia de animales seropositivos a A. marginale en la zona de alta prevalencia, mostró un 86.9% y 85.3% para ELISA y PATA respectivamente, no observándose diferencia estadística significativa entre ambas ( $P > .05$ ) (8), estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por Palma quien obtuvo una prevalencia del 81.1% (16).

En la detección temprana de anticuerpos, empiezan a aparecer becerros positivos primeramente en ELISA a partir del 2º mes, y de PATA en el 3º mes estos resultados pueden obedecer a que ELISA presenta una alta sensibilidad (26), -- mientras que PATA es una prueba serológica con características a la especificidad debido a ser una prueba de aglutinación (12, 28), a esta misma baja en sensibilidad se puede deber que en uno de los becerros no se observara presencia de anticuerpos anti-anaplasma mediante el uso de PATA. En lo que se refiere a la transferencia de la Inmunidad pasiva adquirida a través de calostro, el que ELISA haya detectado anticuerpos en solamente en el 60% de los animales en estudio puede deberse a diversos factores que llegan a influir en la absorción de las inmunoglobulinas; el stress se ha mencionado como posible explicación en la pobre absorción de Inmunoglobulinas calostrales (15). En el amamantamiento se ha observado que becerros que succionan calostro de sus madres, generalmente poseen mayor concentración de inmunoglobulinas en suero -- que becerros alimentados manualmente (25), probablemente esta condición repercutió en una baja en la cantidad de Inmunoglobulinas, las cuales no alcanzaron los niveles adecuados en su absorción para poder ser detectados serológicamente.

## C O N C L U S I O N E S

La concordancia general obtenida entre PATA y ELISA permiten la utilización de ambas pruebas con el mismo grado de confianza para integrarlas en programas de prevención y control de anaplasmosis.

La prueba de ELISA por sus características es más eficaz en detectar primeramente la seroconversión de becerros expuestos en forma natural; ocurriendo esto también en la detección de anticuerpos en sueros de becerros que recibieron calostro con anticuerpos específicos de A. marginale. La prueba de PATA es simple de realizar y fácilmente adaptable para su uso en un gran número de muestras para el diagnóstico de rutina de anaplasmosis. En lugares con prevalencias muy bajas existiría la necesidad de un procedimiento complementario de gran sensibilidad, tal como la prueba de ELISA, para el tratamiento y eliminación de animales portadores. Otra ventaja de la prueba de PATA es que puede efectuarse en los ranchos o en laboratorios poco equipados e inmediatamente se puede tener la identificación de los reactores seropositivos a la enfermedad.

L I T E R A T U R A   C I T A D A

- 1.- Alley, J.L. and Christenberry, C.C.: An evaluation of -- the rapid Card Agglutination Test for anaplasmosis in -- field diagnosis. Proceedings of the 6th. National Anaplasmosis Conference, Las Vegas, Nev. Heritage Press, Stillwater, Okla. 137 - 140 (1973).
- 2.- Amerault, T.E. and Roby, T.O.: A rapid Card Agglutination Test for bovine anaplasmosis. J. Am. Vet. Med. Ass., 153: 1828 - 1834 (1968).
- 3.- Amerault, T.E. and Roby, T.O.: Card Agglutination and Complement-Fixation reactions after vaccination of cattle -- against anaplasmosis. J. Am. Vet. Med. Ass., 159: 1749 - 1751 (1971).
- 4.- Amerault, T.E., Rose, J.E. and Roby, T.O.: Modified Card Agglutination Test for bovine anaplasmosis. Evaluation --- with serum and plasma from experimental and natural cases of anaplasmosis. Proc. Annu. Meet. US Anim. Health. Assoc. 76: 736 - 739 (1972).
- 5.- Amerault, T.E., Rose, J.E. and Kuttler, K.L.: Comparative titration of Anaplasma marginale antibodies by Card Agglutination and Complement Fixation Tests. Am. J. Vet. Res., 42: 1055 - 1056 (1981).
- 6.- Bullock, S.L. and Walls, K.W.: Evaluation of some of the - parameters of the Enzyme-Linked Immunospecific Assay. J. - Infec. Dis., 156: 279 - 285 (1977).

- 7.- Cantó, J., Biberstein, E.L., Schulte, T.A. and Behymer, D.: Cross reactivity of Haemophilus somnus antibody in Agglutination and Complement Fixation Tests and in the Enzyme Linked Immunosorbent Assay. J. Clin. Microbiol., 17: 500 - 506 (1983).
- 8.- Daniel, W.W.: Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa, México, D.F. 1982.
- 9.- Duane, L.H.: Anaplasmosis. In: Infectious Diseases of -- wild mammals. Edited by Davis, J.W., Karstad, L.H. and --- Trainer, D.O., Ch: 39. The Iowa State University Press -- Ames, Iowa, USA. 1970.
- 10.- González, A.J., Vega y M.C., Rodríguez, C.S., Juárez, F.J., Fernández, R.M. y López, S.F.: Experiencias con la prueba de Aglutinación en Tarjeta para el diagnóstico serológico de anaplasmosis (PATA). Téc. Pec. Méx., 44: 35 - 40 (1983).
- 11.- González, E.F., Long, R.F. and Todorovic, R.A.: Compari-- sons of the Complement Fixation, Indirect Fluorescent Anti-- body and Card Agglutination Tests for the diagnosis of bo-- vine anaplasmosis. Am. J. Vet. Res., 39: 1538 - 1540 (1978).
- 12.- Hilderbrand, R.L.: ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent -- Assay) Rapid diagnosis in infectious diseases. CRC Press -- Inc. Florida 1979.
- 13.- Jubb, K.V.F. y Kennedy, P.C.: Patología de los Animales - Domésticos. Tomo I. Ed. Labor. Barcelona, España. 371 - 382, 1973.

- 14.- Kuttler, K.C.: Comparisons of Complement-Fixation and Capillary Tube-Agglutination Tests for detection of bovine anaplasmosis. J. Am. Vet. Med. Ass., 143: 729 - 733 - (1963).
- 15.- Osburn, B.I., Stabenfeldt, G.H., Ardanss, A.A., Trees, C. C. and Sawyer, M.: Perinatal immunity in calves. J. Am. Vet. Med. Ass., 164: 295 - 298 (1974).
- 16.- Palma, M.M.A.: Determinación de la prevalencia de anaplasmosis y babesiosis bovina mediante dos métodos de muestreo: Población y estratificación. Tesis de Licenciatura. Fac. de Est. Sup. Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. 1987.
- 17.- Palmer, H.G., Barbet, F.A., Davis, C.W. and McGuire, C.T.: Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle against anaplasmosis. Science., 231: 1299 - 1302 (1986).
- 18.- Palmer, H.G. and McGuire, C.T.: Immuneserum against Anaplasma marginale initial bodies neutralizes infectivity for cattle. J. Immunol., 133: 1010 - 1014 (1984).
- 19.- Quiroz, R.H.: Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Ed. Limusa, D.F. México. 1984.
- 20.- Ristic, M.: Capillary Tube Agglutination Test for Anaplasmosis. A preliminary report. J. Am. Vet. Ass., 141 : 588 - 594 (1962).

- 21.- Ristic, M.: Chlamydial and rickettsial diseases. Anaplasmosis. In: Bovine Medicine and Surgery. Edited by Amstutz, H.E., 324 - 348. American Veterinary Publications. Santa Barbara, California. USA. 1980.
- 22.- Ristic, M.: Protozoal Diseases, Babesiosis. In: Bovine Medicine and Surgery. Edited by Amstutz, H.E., 355 - 369. American Veterinary Publications. Santa Barbara, California, USA. 1980.
- 23.- Saunders, G.C.: Development and evaluation of an Enzyme-labeled antibody test for the detection of hog cholera -- antibodies. Am. J. Vet. Res., 38: 21 - 25 (1977).
- 24.- Schwabe, C.W., Rieman, H.P. and Franti, C.E.: Epidemiology in Veterinary Practice. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia, 1977.
- 25.- Selman, I.E., Fuente, G. and Fisher, E.W.: The Serum Immunoglobulin Concentration of newborn dairy heifer calves. A farm survey. Vet. Rec., 88: 460 - 464 (1971).
- 26.- Tello, R.M., Alvarez, M.J.A., Ramos, A.J.A., Aboytes, T.R. y Cantó, A.G.J.: La prueba de ELISA en el diagnóstico de la Anaplasmosis. Téc. Pec. Méx. 52: 45 - 50, (1986).
- 27.- Thoen, C.O., Blackburn, B., Mills, K., Lomme, J. and Hopkins, M.P.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detecting Antibodies in cattle in a herd in which Anaplasmosis was diagnosed. J. Clin. Microbiol., 11: 499-502 (1980).

- 28.- Tizard, I.R.: Inmunología Veterinaria. Ed. Interamericana, México, D.F. 1977.
- 29.- Yolken, R.H.: Enzyme Immunoassays for the detection of - infectious Antigens in body fluids: Current limitations and future prospects. Rev. Infec. Dis., 4: 35-68 (1982).
- 30.- U.S.D.A. s/a.: A microtiter technique for the complement test for Anaplasmosis. U.S. Department of Agriculture, - Betsville, Maryland.
- 31.- Wilson, J.A., Trueman, F.K., Spinks, G. and McSorley, F.A.: A comparison of 4 serological tests in the detection of - humoral antibodies to anaplasmosis in cattle. Aust. Vet. J., 54: 383 - 386 (1978).