

## EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE INMUNOABSORBANCIA LIGADA A ENZIMAS (ELISA) EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

Alfredo Delgado C.<sup>1</sup> y Armando González Z.<sup>2</sup>

### Abstract

The use of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of bovine tuberculosis infection was evaluated. Protein Purified Derivate (PPD) was used as antigen providing an alternative to the traditional skin test. Sensitivity, specificity, and both positive and negative predictive values were determined for the PPD ELISA test. One hundred and three sera from a non-endemic area (Arizona, USA) were used to calculate specificity, and fifty-three sera from necropsy positive animals (with both active and sub-clinical TB) were used to calculate sensitivity. Thirty-seven positive control sera also yielded positive results, giving a sensitivity of  $69.81 \pm 12.36\%$ . Similarly, 74 of the 103 negative control sera were also negative to the test, yielding a specificity of  $71.84 \pm 8.69\%$ . The positive and negative predictive values were  $56.06 \pm 11.97\%$  and  $81.22 \pm 7.90\%$  respectively.

**Key words:** Bovine, tuberculosis, ELISA, PPD.

### Resumen

El trabajo evaluó la prueba serodiagnóstica de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) empleando el Derivado Proteico Purificado (PPD) como antígeno en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, con la finalidad de adecuarlo en la detección rápida de la infección. Se determinó la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo de la prueba, en la detección de la tuberculosis clínica y subclínica. La evaluación se efectuó utilizando 103 sueros de animales negativos y 53 positivos a la enfermedad. De los sueros controles positivos, la prueba de ELISA detectó 37 como positivos, que representa una sensibilidad del  $69.81 \pm 12.36\%$ . De los sueros controles negativos, la prueba detectó 74 sueros como negativos, que representa una especificidad del  $71.84 \pm 8.69\%$ . De los 66 sueros diagnosticados como positivos por la prueba de ELISA, 37 eran realmente positivos, que representa un valor predictivo positivo de la prueba de  $56.06 \pm 11.97\%$  y de los 90 sueros diagnosticados como negativos por la prueba de ELISA, 74 eran realmente negativos lo que representa un valor predictivo negativo del  $81.22 \pm 7.90\%$ .

**Palabras claves:** Bovino, tuberculosis, ELISA, PPD.

<sup>1</sup> Hospital Veterinario - Clínica de Animales Mayores - FMV - UNMSM. Apdo. 41-0068 Lima - Perú.

<sup>2</sup> Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva - FMV - UNMSM

## Introducción

El futuro de la producción lechera está condicionada a la calidad de los productos que puedan colocarse en el mercado interno y/o externo, para lo cual debe producirse leche de calidad higiénica y sanitaria. Una serie de enfermedades en los bovinos, entre ellas la tuberculosis causada por el *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), representan una condicionante que limita la comercialización de este producto, deprimiendo por otro lado, los parámetros productivos de los animales afectados y constituyendo fuente de infección para el hombre (Acha y Szyfres, 1986; Blood y Radostits, 1992). Además en nuestro medio, Castagnino (1968) reportó frecuencias de 37.6 y 18.1% de bovinos afectados por tuberculosis en Lima y a nivel nacional, respectivamente.

La repercusión económica va más allá de la simple eliminación de animales reactivos, debido a que los animales provenientes de hatos infectados y que como consecuencia de ello no cuentan con la acreditación de libre expedidas por los organismos de control (Servicio Nacional de Sanidad Agraria - SENASA), tienen problemas en la comercialización de sus animales. Dentro de esta limitación, se ven afectados principalmente, aquellos animales que son destinados a reproducción (Nader y Husberg, 1988).

Otro aspecto relacionado a la tuberculosis bovina es el hecho de ser permanente fuente de infección para la salud humana, constituyéndose en un serio problema de zoonosis. Si bien es cierto que la leche fresca procedente de los diversos hatos en su mayoría van a plantas industriales donde son sometidos a la pasteurización, debe considerarse que un volumen importante de la producción, es derivada para la venta libre, aún más, en poblaciones urbano marginales donde la leche puede ser consumida cruda (Acha y Szyfres, 1986; Blood y Radostits, 1992).

La importancia de la tuberculosis bovina, también se relaciona a la salud del hombre, bajo el aspecto de enfermedad

ocupacional, en función de que muchas personas por sus actividades laborales están en contacto directo con los animales, como sucede con los ordeñadores, sanitarios, médicos veterinarios, y otros (Acha y Szyfres, 1986).

Debido a la importancia de esta enfermedad, se hace necesario intensificar los programas conducentes a su erradicación. En nuestro país, el estado actual de la lucha contra la tuberculosis bovina se encuentra en una fase voluntaria por parte del ganadero, lo que dificulta la erradicación de la enfermedad. A ello se debe de sumar las dificultades que enfrenta el actual programa de erradicación, entre ellas el retraso en las pruebas diagnósticas, por no contar con antígeno PPD a tiempo y la falta de personal especializado para la realización de las pruebas, factores que dificultan la eliminación.

En las últimas décadas, muchos países considerados en vías de desarrollo, están emprendiendo estudios con la finalidad de evaluar pruebas serológicas que permitan un mejor diagnóstico de la tuberculosis bovina, obteniéndose buenos resultados (Benjamin y Daniel, 1982; Nassau *et al.*, 1976; Kalish *et al.*, 1983; Daniel y Debanne, 1988; Daniel y Anderson, 1978; Thoen *et al.*, 1983; Hall y Thoen, 1986; Hanna *et al.*, 1989; Raheman *et al.*, 1988). Nuestro país, como uno de los que cuenta con alta prevalencia de la enfermedad, necesita trabajar en ello, motivo por el cual se planteó el presente estudio de estandarización de una prueba serológica para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, con el objetivo de obtener una herramienta diagnóstica más sensible y específica que la empleada hasta hoy, la prueba de intradermorreacción.

## Materiales y Métodos

### Lugar de estudio

El estudio se llevó a cabo en la ciudad de Lima. Las muestras se obtuvieron de dos zonas geográficas epidemiológicamente

diferentes respecto a la enfermedad. Los controles positivos provinieron de establos que no pertenecen al programa de control de tuberculosis bovina y con antecedentes de enfermedad, y los controles negativos de establos declarados libres de esta enfermedad de la ciudad de Tucson (Arizona-USA).

#### Obtención de sueros controles

El estudio consideró trabajar con 53 sueros control positivo y 103 sueros control negativos. La secuencia de la búsqueda de los controles positivos fue la siguiente:

- Aplicación de la prueba de tuberculina a una población de vacas pertenecientes a establos con antecedentes de animales tuberculosos.
- Los animales que resultaron positivos fueron objeto de seguimiento al camal. Se observó lesiones compatibles con tuberculosis en tejido pulmonar y nódulos linfáticos y se tomó una muestra de sangre.
- Las muestras de tejido pulmonar y nódulo linfático con lesiones compatibles con tuberculosis fueron sometidos a pruebas bacteriológicas (cultivo en medio Loweinstein Jensen y coloración ácido resistente) e histopatología.
- Se consideró un suero control positivo aquellos que resultaron positivos a la prueba histopatológica y al menos una prueba bacteriológica.

Los controles negativos se obtuvieron a partir de bovinos provenientes de establos declarados libres de tuberculosis y en los cuales no se realiza la prueba de tuberculina de la ciudad de Tucson-Arizona (USA).

Los exámenes histopatológicos y bacteriológicos fueron realizados en el Laboratorio de Patología Animal y Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### Desarrollo de la prueba de ELISA

Los antígenos para la prueba de ELISA (preparados de PPD) fueron aquellos utilizados en nuestro medio y por lo tanto fueron adquiridos en el mercado nacional.

El PPD (antígeno para la prueba) fue diluido en una solución tampón de carbonato/bicarbonato (pH; 9.5) para obtener la concentración de 20 ng/ml. Se añadieron 100  $\mu$ l a cada pocillo de la microplaca, y se incubó toda una noche (entre 12 a 18 horas) a 4 °C. En los pocillos de control se colocó la solución tampón. Después de 3 a 5 minutos las placas fueron lavadas con solución PBS-Tween 20 al 0.05%. Posteriormente, se añadieron 100  $\mu$ l de cada dilución de suero problema a los pocillos recubiertos con antígeno. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente (entre 16 a 28 °C durante 2 horas). Después de 3 lavadas con PBS-Tween 20 al 0.05% se añadieron 100  $\mu$ l de anticuerpos caprino anti-bovino conjugados con peroxidasa en una dilución 1:500 a las placas y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas 3 veces y se añadieron 100  $\mu$ l de orthophenyldiamina (OPD) al 0.06% a cada pocito; 15 minutos después se añadieron 100  $\mu$ l de ácido sulfúrico 0.1 M para detener la reacción. La densidad óptica se determinó por un lector de ELISA utilizando un filtro de 492 nm (Tsang *et al.*, 1989).

#### Cálculo del punto de corte

Para calcular el punto de corte se utilizaron las lecturas de la prueba de ELISA en los sueros positivos y negativos (controles), anotándose la densidad óptica de cada suero. Posteriormente, se calculó las curvas de sensibilidad y especificidad considerando la densidad óptica de cada lectura como punto de corte. De esta manera, a cada densidad óptica dada le correspondió un valor de sensibilidad y especificidad. Después, se graficó los valores de sensibilidad (Y) y especificidad (Y') de cada densidad óptica en el eje de las ordenadas contra todas las densidades ópticas en el eje de las abscisas

(X). El punto de corte final para cada dilución fue la densidad óptica con el valor óptimo de sensibilidad y especificidad.

### Análisis de datos

Se determinó el número de animales que resultaron positivos y negativos a la prueba en evaluación. Posteriormente estos resultados fueron introducidos a una base de datos y analizados mediante el programa WINEPISCOPE Versión 1.0 para determinar la sensibilidad, especificidad y los valores predictivos positivo y negativo de la prueba. Los resultados se expresan en forma porcentual con sus respectivos intervalos de confianza del 95% (Feinstein, 1985).

### Resultados

Del total de sueros controles positivos, la prueba de ELISA detectó solamente 37 sueros como positivos lo que representa una sensibilidad del  $69.81 \pm 12.36\%$  y del total de sueros control negativo la prueba en evaluación

detectó 74 sueros como negativos lo que representa una especificidad del  $71.84 \pm 8.69\%$ .

La prueba de ELISA diagnosticó un total de 66 sueros como positivos y 90 sueros como negativos. Del total de sueros diagnosticados como positivos a la prueba, solamente 37 fueron realmente positivos (controles positivos) lo que representa un valor predictivo de la prueba de  $56.06 \pm 11.97\%$  y del total de sueros diagnosticados como negativos a la prueba, 74 de ellos fueron realmente negativos (controles negativos), representando un valor predictivo negativo de  $82.22 \pm 7.90\%$ .

La prueba de ELISA diagnosticó 29 sueros como falsos positivos de un total de 103 sueros controles negativos y 16 sueros como falsos negativos de un total de 53 sueros controles positivos. El Cuadro 1 resume la información ofrecida comparando los resultados a la prueba de ELISA y los respectivos controles positivos y negativos. El Cuadro 2, muestra las medidas de resumen de estandarización de la prueba mostrando los intervalos de confianza correspondientes.

Cuadro 1. Resultados de la prueba de ELISA para el diagnóstico serológico de tuberculosis bovina con sueros controles positivos y negativos, Lima, 1999.

Resultados	Controles		Total
	Positivos	Negativos	
Positivo	37	29	66
Negativo	16	74	90
Total	53	103	156

Cuadro 2. Medidas de resumen de la prueba de ELISA para el diagnóstico serológico de tuberculosis bovina, Lima 1999.

Medidas	Media	Intervalo de confianza (95%)	
		Límite inferior	Límite superior
Sensibilidad	69.81	57.45	82.17
Especificidad	71.84	63.15	80.53
Valor predictivo positivo	56.06	44.09	68.03
Valor predictivo negativo	82.22	74.32	90.12

## Discusión

La evaluación de los sueros controles mediante la prueba de ELISA utilizando como antígeno el derivado proteico purificado (PPD) utilizado para las pruebas de tuberculina, no llegaron a ser del todo satisfactorias. Al final del estudio la prueba de ELISA mostró una sensibilidad y especificidad baja ( $69.81 \pm 12.36\%$  y  $71.84 \pm 8.69\%$  respectivamente).

Respecto a los valores predictivos se puede mencionar que el valor predictivo positivo es también bastante bajo ( $56.06 \pm 11.97\%$ ), mostrando la poca seguridad que se puede tener acerca del resultado positivo a la prueba de un animal en particular. Por otro lado, se observa que la prueba de ELISA ofrece su mayor bondad al diagnosticar un animal realmente negativo como tal. El valor predictivo negativo fue alto ( $82.22 \pm 7.90\%$ ) mostrando alta seguridad en el diagnóstico individual de animales negativos.

La pureza y calidad del antígeno pueden explicar los resultados obtenidos. En estudios realizados en otras regiones utilizando como antígeno el PPD (Kalish *et al.*, 1983; Daniel y Debanne, 1988), se ha llegado a la conclusión de que la prueba de ELISA necesita una alta especificidad para conseguir un alto valor de predicción y que contribuya substancialmente en el diagnóstico de la tuberculosis, estimándose que con este antígeno se podría lograr una especificidad de aproximadamente de 97%, siempre que se utilice antígenos altamente purificados (Raheman *et al.*, 1988).

Otras experiencias han puesto en tela de juicio el hecho de usar el PPD como antígeno en el ensayo de ELISA, considerando que no es el más adecuado, tal como lo describe un trabajo realizado por Hanna *et al.* (1989), en el que se infectaron experimentalmente a 5 terneros provenientes de hatos libres de tuberculosis con cepas de campo de *M. bovis*, por vía intranasal, manifestando un cuadro agudo de tuberculosis

cuatro de ellos. Estos animales fueron utilizados para evaluar las bondades de una prueba de ELISA en el que se utilizaron como antígeno el PPD y componentes fosfátidos de *M. bovis*. Los investigadores realizaron observaciones sobre el comportamiento inmunológico humoral en los mencionados terneros. Ellos encontraron que 14 días después de la infección los anticuerpos, se elevan en forma dramática, demostrada por el antígeno fosfátido. En el ensayo con antígeno PPD, obtuvieron respuesta positiva sólo en un caso.

Esta apreciación se refuerza con los resultados obtenidos en otras investigaciones utilizando la prueba de ELISA pero con un antígeno diferente al PPD. Los investigadores Raheman *et al.* (1988) trabajaron con dos preparados antigénicos provenientes de *M. tuberculosis* y *M. bovis* respectivamente. Empleando ELISA, cuantificaron los niveles de anticuerpos Ig G, en 169 muestras de sueros, obtenidas de 75 pacientes con tuberculosis pulmonar y de 94 individuos sanos que constituyeron el grupo control. La casi totalidad de los individuos control fueron clasificados como tales a la prueba de ELISA, con excepción de 2 que fueron clasificados como falso positivos. El método demostró una especificidad de 1.00 y una sensibilidad de 0.974. Los antígenos empleados fueron la fracción citosólica de *M. tuberculosis*, preparada de la cepa Ayoama B, y el antígeno 60 de *M. bovis*, que es preparado a partir de la cepa de Calmette-Guerin (BCG).

A la luz de los resultados encontrados en el presente estudio y comparando con otros similares realizados en otras latitudes se puede concluir que la prueba de ELISA requiere de un antígeno altamente purificado y que los esfuerzos deberían estar dirigidos a la obtención de éstos, para que la prueba alcance valores significativos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo.

La razón del esfuerzo de intentar estandarizar una prueba serológica, se apoya en el hecho que la prueba actual de

intradermorreacción, no llega a tener los estándares de una prueba ideal (alta sensibilidad y especificidad). No podemos dejar de reconocer la importancia que ha tenido la prueba de la tuberculina a lo largo de la historia de la lucha contra la tuberculosis bovina, pues ha llevado a la erradicación de esta terrible enfermedad de muchos países, dentro de ellos los Estados Unidos de Norteamérica (USA), país que a través de reacción - sacrificio aplicando la tuberculina, ha podido erradicar la tuberculosis de los animales en 1950 (Blood y Radostits, 1992), en nuestro país, la sola aplicación de la tuberculina lleva a algunas situaciones que es bueno analizarlos. Una de ellas está relacionada a las pruebas que son realizadas en nuestro medio, y que están a cargo del médico veterinario, quien si no tiene la experiencia y el criterio suficiente para juzgar las reacciones, puede cometer errores que le costarán al ganadero. Una reacción no muy bien interpretada de acuerdo a las normas técnicas y legales vigentes, lleva al ganadero a la pérdida de su condición de libre, o a la eliminación de su o sus vacas según sea el caso, pero a la vez las normas vigentes facultan al ganadero llevar a su animal al matadero y estar presente en el beneficio de la res, y muchas veces no se encuentran lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis; situaciones que conducen a la pérdida de credibilidad de la prueba.

Otro aspecto a tenerse en cuenta está relacionado a la reacción, que cuando se realiza en pliegue caudal, su apreciación es subjetiva, pues el médico veterinario lo que evalúa es el grado de reacción, y para ello deberá haber pasado por unas 5,000 vacas, pues resulta interesante tener que discriminar entre una lesión producida momentos antes de la lectura y la reacción al antígeno tuberculina. Aún cuando el antígeno se aplica en la tabla de cuello, donde si se realiza la medición, considerándose como reacción positiva a la lesión que tenga 3 mm o más de diferencia entre la piel normal y en la que sufrió reacción; en estos casos la mayor o menor presión que se pueda aplicar al cutímetro (instrumento de medida) puede

llevar a la duda razonable de tener que considerar como reactor positivo a una vaca que tiene 1.5 a 2.0 mm de incremento en el grosor de la piel o declarándose al animal como negativo, pudiendo ser positivo o viceversa.

Por otro lado, el grado de reacción no guarda relación con la gravedad de la enfermedad o infección, es simplemente la mayor o menor capacidad de respuesta que el animal puede tener frente al antígeno tuberculina PPD. Se dan casos en que una vaca tiene reacciones tan fuertes como que el cutímetro no es capaz de medirlo y a la necropsia, el animal apenas si muestra lesiones, mientras que otra que da una reacción positiva incipiente presenta lesiones macroscópicas muy bien diferenciadas o viceversa, por lo tanto estamos frente a una prueba de dudosa seriedad. Lo que si se observa es una tendencia a que en general animales reactores positivos presentan lesiones de consideración, y es ahí donde marca la diferencia, pero no es capaz de diferenciar individualmente los casos realmente positivos de aquellos que no lo son. Frente a estas dudas y vacilaciones de la prueba, el ganadero siempre desearía, como es de esperarse, querer reconfirmar los resultados con otra prueba dentro de los 60 a 90 días siguientes, tiempo suficiente como para poder diseminar la infección por falta de un valor predictivo negativo.

Las normas legales vigentes, toman muy poco en cuenta estas situaciones particulares de reacción al antígeno tuberculina, al punto que no permite su legislación adecuada, dejando el asunto de las reacciones como una generalidad. Esto es producto evidentemente de la carencia de una prueba confirmatoria que sea más clara en sus resultados. Las pruebas confirmatorias de la prueba de tuberculina se basan en variantes de la misma y sujetas a las mismas limitaciones de la prueba de intradermorreacción aplicada ya sea en el pliegue de la cola o en la tabla del cuello.

Los antígenos de tuberculina pese a que responden a una metodología de elaboración y purificación, son motivo de controversia, pues se afirma que los antígenos procedentes especialmente de países europeos y norteamericanos son de un mayor grado de pureza, frente a los de fabricación nacional y/o de países sudamericanos, y por lo tanto pueden llevar a menos reacciones inespecíficas, situación que no ha podido ser comprobada, pero que lleva a dudas razonables en el ganadero.

Por lo expuesto se puede concluir que se hace necesario mantener el esfuerzo por encontrar una prueba con altos niveles de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos, con la finalidad de sumar alternativas a los actuales, en busca de incrementar las áreas libres de la enfermedad. La prueba de ELISA representa una posibilidad que puede llegar a superar las deficiencias que aquejan a la actual prueba de referencia como son la falta de sensibilidad, necesidad de médicos veterinarios calificados para su ejecución, incomodidad del animal, baja repetibilidad y riesgo para el operador, además del retraso que en ocasiones sufren las campañas de diagnóstico por no contar con antígeno PPD disponible a tiempo. A todo esto se puede sumar aún, el hecho de que los métodos serológicos pueden ser capaces de diferenciar las reacciones debidas a antígenos de micobacterias no patógenas y las compartidos con otros microorganismos no involucrados dentro de la etiología de la enfermedad, pero que son capaces de llevar a reacciones falsas o inespecíficas.

### Conclusiones

La prueba de ELISA mostró:

- Sensibilidad del  $69.81 \pm 12.36\%$ .
- Especificidad del  $71.84 \pm 8.69\%$ .
- Valor predictivo positivo de la prueba de  $56.06 \pm 11.97\%$ .
- Valor predictivo negativo del  $82.22 \pm 7.90\%$ .

### Agradecimientos

A diversas personas e instituciones que hicieron posible el presente trabajo; entre otros, Vitaliano Cama, Teresa López y Alfonso Chavera.

### Literatura Citada

1. **Acha, P. y B. Szyfres. 1986.** Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y los Animales. 2da Ed. Washington: OPS. p.763-774
2. **Benjamin, R. y T. Daniel. 1982.** Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am Rev Respir Dis.* 126:1013 - 1016.
3. **Blood, D. y O. Radostits. 1992.** Medicina Veterinaria. Vol. 1. 7º Edición. Editorial Interamericana. México. p 851.
4. **Castagnino, R.D. 1968.** Resultados del Muestreo de la Tuberculosis bovina en el Perú. IVITA. Fac. Med. Vet. UNMSM. Tercer Boletín Extraordinario 158-162
5. **Daniel, T. y S. Debanne. 1988.** The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis.* 135:1137-1151.
6. **Daniel, T. y P. Anderson. 1978.** Isolation by immunosorbent affinity chromatography physicochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am Rev Respir Dis.* 117:533-539.;
7. **Feinstein, A. 1985.** Clinical Epidemiology: The Architecture of Clinical Research. Philadelphia: W.B. Saunders Company. p.170-190.
8. **Hall, M. y C. Tohen. 1986.** Use de sodium deoxycholate to extract cellwall components of virulent *M bovis*. *Am J Vet Res.* 47:2572-2575.
9. **Hanna, J.; S.D. Neill y J.J.O'Brien. 1989.** Use of PPD and phosphatide

- antigens in a ELISA to detect the serological response in experimental bovine tuberculosis. *Res Vet Scien.* 47:43-47.
10. **Kalish, S.; F. Radin; J. Phair; D. Levitz; C. Zeiss y E. Metzger. 1983.** Use of an enzyme-linked immunosorbent assay technique in the diferencial diagnosis of active pulmonary tuberculosis in humans. *J Infect Dis.* 147:523-530.
  11. **Nader, A. y H. Husberg. 1988.** Estimación de pérdidas de producción por tuberculosis bovina en un rodeo lechero. *Rev Med Vet.* 69:36.
  12. **Nassau, E.; E. Parsons y G. Johnson. 1976.** The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle:* 57:67-70
  13. **Raheman, S.F., S. Wagner, H. Mauch, N.D. Vasudeva y D.L. Ingole. 1988.** Evaluation of dual-antigen ELISA test for the serodiagnosis of tuberculosis. *Bull of WHO.* 66(2):203-209.
  14. **Thoen, C.O.; M.R. Hall; T.A. Petersburg; R. Harrington y D.E. Pietz. 1983.** Aplicación de un ensayo de inmunosorbente enlazado a enzimas para detectar anticuerpos micobacteriales en suero de ganado de un hato en el que se diagnosticó una infección por *Mycobacterium bovis*. Tomado de las actas de la 87ª reunión anual de la Asociación de Salud Animal de los Estados Unidos, Las Vegas, Nevada. p.603-610.
  15. **Tsang, V.C.W.; J. Brand y A. Boyer. 1989.** An Enzyme -Linked Immunotransfer Assay and Glycoprotein Antigens for Diagnosing Human Cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis.* p.159:50-59.