

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE FIJACION DEL COMPLEMENTO Y ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTIRROTAVIRUS EN TERNEROS

Por M. Alvarez (1)

P. Rubio (1)

P. Cármenes (1)

INTRODUCCION

Los rotavirus son unos de los agentes más frecuentemente implicados en la etiología de la diarrea neonatal del ternero^{5, 7}, encontrándose ampliamente distribuidos en la población bovina de nuestro país¹. Un amplio número de pruebas han sido aplicadas para su detección: microscopía electrónica, ELISA, inmunodifusión, etc., existiendo numerosos estudios comparativos sobre la eficacia y sensibilidad entre ellas. En relación con la detección de anticuerpos específicos antirrotavirus se han adaptado diversas técnicas, siendo la Fijación del complemento y el ELISA dos de las pruebas más comúnmente empleadas. A pesar de que las pruebas serológicas tienen un valor limitado para seguir el curso de la infección a nivel individual, son de gran utilidad para la realización de estudios epidemiológicos e inmunológicos.

En este trabajo se realiza un estudio comparativo entre la Fijación del complemento y el ELISA, adaptadas ambas para la detección de anticuerpos antirrotavirus a partir de sueros recogidos secuencialmente de terneros mantenidos en condiciones de campo.

MATERIAL Y METODOS

SUEROS

El estudio se llevó a cabo en un cebadero sobre 104 terneros. De cada animal se reco-

(1) Cátedra de Enfermedades Infecciosas y Epizootiología

gieron tres muestras de sangre: aproximadamente a los 15, 45 y 135 días de vida. La sangre se mantuvo a 4°C durante 12 horas. Se centrifugó a 3.000 rpm/10 min. Una vez obtenido el suero se distribuyó en alícuotas y se congeló a -20°C hasta el momento de la realización de las pruebas.

ANTIGENO

Se empleó rotavirus bovino y su control negativo (Instituto Behring).

FIJACION DEL COMPLEMENTO (FC)

Se utilizó el micrométodo por la técnica de Kolmer³. De una forma abreviada los pasos seguidos para su realización fueron: 25 μ l de diluciones dobles seriadas de sueros inactivados por el calor (dilución de partida 1/8) se mezclaron con 25 μ l de antígeno rotavirus (2 U.) y con 25 μ l (dos unidades hemolíticas 100 % de complemento). Las placas se incubaron 18 horas a 4°C. Posteriormente se añadieron 50 μ l de la mezcla hemolítica (2 U. de hemolisina (25 μ l)-glóbulos rojos de ovino 2 % (25 μ l)). La placa se incubó a 37°C en un baño. Los controles del suero positivo y complemento indicaron el momento en que las placas eran extraídas del baño. A continuación se centrifugaron a 200 rpm/2 minutos, realizándose la lectura. En la prueba se incluyeron controles de complemento, suero y sistema hemolítico. Asimismo los sueros eran probados a su dilución 1/8 frente al control de antígeno con el fin de detectar reacciones inespecíficas.

El título del suero se expresó como el recíproco de la última dilución en la que se observó un 50 % de hemólisis.

PRUEBA INMUNOENZIMATICA. ELISA INDIRECTO

Se utilizó el método indirecto según SANCHEZ VIZCAINO Y CAMBRA ALVAREZ⁶ con algunas modificaciones introducidas por nosotros y que describimos a continuación.

Previamente a la realización de la prueba se procedió a la titulación del antígeno y del conjugado. Para la titulación del antígeno se probaron diferentes diluciones de éste y del control negativo de antígeno frente a diluciones de sueros positivos y negativos de referencia, tomándose como dilución óptima la máxima dilución del antígeno que permitía una mejor diferenciación entre sueros positivos y negativos. Para la titulación del conjugado se probaron diferentes diluciones de sueros positivos y negativos en placas tapizadas con antígeno positivo y control negativo en su concentración idónea. Fue escogida aquella dilución de conjugado que produjo menor reacción inespecífica (color de fondo) con muestras negativas y permitió una clara distinción con las muestras positivas.

Como fase sólida se utilizaron microplacas (Dynatech Microelisa M129). El antígeno se reconstituyó y diluyó en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6, de acuerdo con su título, y se añadió una cantidad de 100 μ l por pocillo. Su adsorción a la placa se llevó a cabo mediante incubación a 4°C durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se efectuaron cuatro lavados con solución salina (0,85 % ClNa y 0,05 % Tween 80) con un equipo semiautomático Dynadrop SR (Dynatech). Las placas de uso no inmediato se envolvieron en parafilm y se conservaron a 4°C. El período máximo de almacenamiento de las placas fue de una semana. Durante este tiempo no se observó nunca pérdida de actividad. Los sueros fueron previamente inactivados en baño maría a 56°C durante 30 minutos. Posteriormente, partiendo de la dilución 1:25, se realizaron diluciones dobles seriadas en PBS-Tween 20 (0,05 %)-ovoalbúmina (1 %). A continuación 100 μ l de las distintas diluciones de los sueros fueron transferidos a los pocillos de las placas previamente

sensibilizadas con el antígeno. En cada placa se utilizó una columna de pocillos para cada suero. En todas las placas se incluyeron dos sueros de referencia: un control positivo y un control negativo (fetal bovino). Al comienzo de la realización de las pruebas inmunoenzimáticas, ambos sueros fueron diluidos en alícuotas y mantenidos a -20°C . Para la realización diaria de la prueba se descongeló una alícuota nueva. Las placas se incubaron a 37°C por dos horas. Después de una nueva operación de lavado se adicionó el inmunoconjugado (RAB/IgG (H+L)/PO Laboratorios Nordic). Su dilución se realizó en PBS-Tween 20 (0,05 %)-ovoalbúmina (1 %), y se distribuyó en cantidades de $100\ \mu\text{l}$ por pocillo. Las placas se incubaron a 37°C durante dos horas. Después de un nuevo ciclo de lavado se añadió $100\ \mu\text{l}$ del sustrato enzimático por pocillo. El sustrato utilizado fue OPD/Agua oxigenada en tampón citrato pH 5. Tras una incubación a temperatura ambiente, la coloración de los sueros controles (positivo y negativo) indicó el momento del frenado de la reacción, mediante la adición de $100\ \mu\text{l}$ de ácido sulfúrico 3N por pocillo. La lectura se efectuó a 490 nm en un minilector MR 590 Dynatech. El título del suero se expresó como el recíproco de la dilución más alta del suero que mostró una densidad óptica mayor o igual a 2 desviaciones estándar sobre la media de los valores de densidad óptica del suero negativo. El título del suero problema se consideró únicamente válido cuando el título del suero control positivo era el apropiado. Todos los sueros problemas se probaron frente al control negativo del antígeno, para detectar reacciones inespecíficas.

RESULTADOS

En la Tabla I se expresa la evolución del título de anticuerpos, por ambas pruebas, sobre los 104 terneros muestreados. El aumento del título se comprobó en un total de 72 animales, siendo detectados por ambas pruebas a la vez en 57 (79, 1 %). Los 15 terneros restantes mostraron aumento en su título por una técnica exclusivamente: 9 por ELISA y 3 por FC (Tabla II).

La seroconversión se constató en 29 terneros. Veinte animales seroconvirtieron por ambas pruebas, 5 solamente por ELISA y 4 únicamente por FC (Tabla III).

El título medio inicial se mantuvo casi invariable tanto por ELISA como por FC, a los 45 días, bajando ostensiblemente a los 135 días (Tabla IV).

Las dos técnicas mostraron una correspondencia en títulos elevada, siendo el coeficiente de correlación entre títulos por ambas pruebas de 0,87.

En la Fig. 1 se representa la relación entre los títulos en anticuerpos antirrotavirus obtenidos por FC y ELISA. La correspondencia para cada título de FC en título ELISA se representa en la Fig. 2.

La ecuación de regresión que predice el título ELISA conociendo el de FC es $y = 8,0x + 50,2$. El coeficiente de regresión entre el título FC y ELISA fue de $b = 7,9$; $b = 7,7$ y $b = 11,7$, a los 15,45 y 135 días respectivamente (Fig. 3).

Ambas técnicas mostraron una eficacia similar para seguir el curso de la infección, ahora bien, ELISA fue más sensible que FC para detectar anticuerpos específicos anti-

TABLA I
Evolución del título de anticuerpos (FC y ELISA)

FC				TERNERO		ELISA			
1ª R	2ª R	3ª R		Nº		1ª R	2ª R	3ª R	
64	32	32		1		600	300	400	
32	16	64		2		600	200	800	
64	32	<8		3		800	400	100	
16	8	<8		4		200	100	<50	
<8	<8	32		5		<50	50	400	
32	16	NM		6		200	200	NM	
32	16	<8		7		200	100	50	
16	16	32		8		200	200	600	
64	32	<8		9		800	400	50	
<8	8	32		10		<50	50	300	
8	32	8		11		100	300	150	
8	32	32		12		50	200	200	
<8	8	<8		13		75	100	100	
16	64	8		14		150	400	200	
16	8	<8		15		150	150	<50	
<8	<8	16		16		50	50	200	
8	<8	NM		17		50	50	NM	
8	16	8		18		100	100	50	
<8	128	32		19		<50	1600	400	
8	16	16		20		100	200	300	
<8	16	16		21		<50	100	200	
<8	64	32		22		<50	400	400	

FC				TERNERO		ELISA			
1ª R	2ª R	3ª R		Nº		1ª R	2ª R	3ª R	
32	16	<8		43		400	150	<50	
<8	16	8		44		<50	100	100	
32	<8	<8		45		200	50	<50	
32	8	<8		46		400	100	75	
8	<8	8		47		200	150	200	
8	<8	16		48		50	50	300	
8	64	16		49		<50	800	100	
8	32	8		50		50	200	100	
32	8	<8		51		300	150	<50	
8	8	<8		52		100	100	50	
8	16	16		53		75	200	100	
8	16	<8		54		100	200	100	
32	16	<8		55		600	300	50	
<8	32	8		56		<50	150	75	
16	8	NM		57		100	50	NM	
32	8	+		58		400	100	+	
8	<8	<8		59		100	50	<50	
8	16	8		60		50	200	100	
<8	16	8		61		50	100	75	
<8	8	16		62		<50	100	200	

FC				TERNERO		ELISA			
1ª R	2ª R	3ª R		Nº		1ª R	2ª R	3ª R	
<8	32	16		23		50	400	200	
64	16	8		24		400	200	75	
32	8	16		25		200	50	300	
<8	8	8		26		<50	50	75	
64	32	16		27		800	300	150	
128	32	8		28		800	400	100	
32	16	NM		29		400	200	NM	
<8	64	8		30		50	400	200	
32	16	<8		31		200	100	<50	
32	32	8		32		400	400	150	
8	32	16		33		100	300	300	
A	64	<8		34		600	400	100	
32	+	+		35		200	+	+	
64	16	<8		36		600	150	<50	
64	32	8		37		300	300	100	
128	32	<8		38		800	400	100	
A	16	8		39		400	200	50	
128	64	16		40		1200	600	200	
8	8	64		41		100	100	600	
64	32	<8		42		400	200	50	

R: Recogida de sueros. 1ª R: a los 15 días. 2ª R: a los 45 días. 3ª R: a los 135 días.
 NM: No muestreado. A: Anticomplementario. +: Muerto

TABLA I (CONT.)
Evolución del título de anticuerpos (FC y ELISA)

FC				TERNERO N°	ELISA		
1ª R	2ª R	3ª R	1ª R		2ª R	3ª R	
64	32	8		63	400	400	100
16	32	<8		64	200	400	100
8	8	32		65	50	100	600
32	16	<8		66	300	100	<50
16	8	<8		67	200	100	50
<8	64	16		68	50	600	300
64	8	<8		69	400	100	50
8	16	8		70	50	200	100
<8	128	32		71	75	600	400
8	A	32		72	50	600	300
8	16	8		73	75	200	150
32	32	8		74	400	400	100
32	16	16		75	300	200	200
16	16	8		76	400	300	100
32	16	64		77	400	100	800
<8	8	16	8	78	<50	50	100
<8	32	8		79	<50	200	100
8	16	32		80	75	200	200
32	16	32		81	200	200	800
A	16	<8		82	800	300	50

FC			TERNERO N°	ELISA		
1ª R	2ª R	3ª R		1ª R	2ª R	3ª R
32	32	32	83	400	600	400
8	128	8	84	200	800	150
64	16	<8	85	800	200	50
16	32	+	86	100	200	+
128	16	<8	87	800	400	50
8	16	8	88	50	100	100
64	16	8	89	800	200	100
<8	8	<8	90	<50	50	<50
<8	64	16	91	50	300	400
<8	8	<8	92	<50	100	100
32	16	NM	93	400	200	NM
8	8	16	94	50	50	400
64	32	8	95	600	400	100
16	16	16	96	200	200	300
32	16	8	97	300	100	200
8	32	16	98	50	200	200
8	32	64	99	100	400	800
64	16	<8	100	600	300	50
32	16	8	101	200	200	100
8	128	32	102	50	1200	400
<8	16	NM	103	<50	100	NM
<8	8	16	104	<50	100	200

R: Recogida de sueros. 1ª R: a los 15 días. 2ª R: a los 45 días. 3ª R: a los 135 días.
 NM: No muestreado. A: Anticomplementario. +: Muerto

TABLA II
 Número de terneros que aumentaron su título en anticuerpos específicos antirrotavirus

Aumento Título	Total	Por FC	Por ELISA	Por FC-ELISA a la vez
A los 45 días	47	42	45	40
A los 135 días	25	18	24	17
Total	72	60	69	57

TABLA III
 Número de terneros que seroconvirtieron a los 45 días de vida

Total	Por FC	Por ELISA	Por FC-ELISA a la vez
29	24	25	20

TABLA IV
 Títulos medios (FC y ELISA) según la edad

Prueba	Edad		
	15	45	135
FC	24,7	24,0	13,3
ELISA	250,2	251,2	189,7

rrotavirus a los 135 días de vida, como se deduce de que ningún ternero con un título menor de 50 por ELISA a los 135 días de edad, le correspondiera un título mayor de 8 por FC. mientras que el 65,5 % de los terneros con título menor de 8 por FC, en el mismo período, mostraron un título mayor o igual a 50 por ELISA.

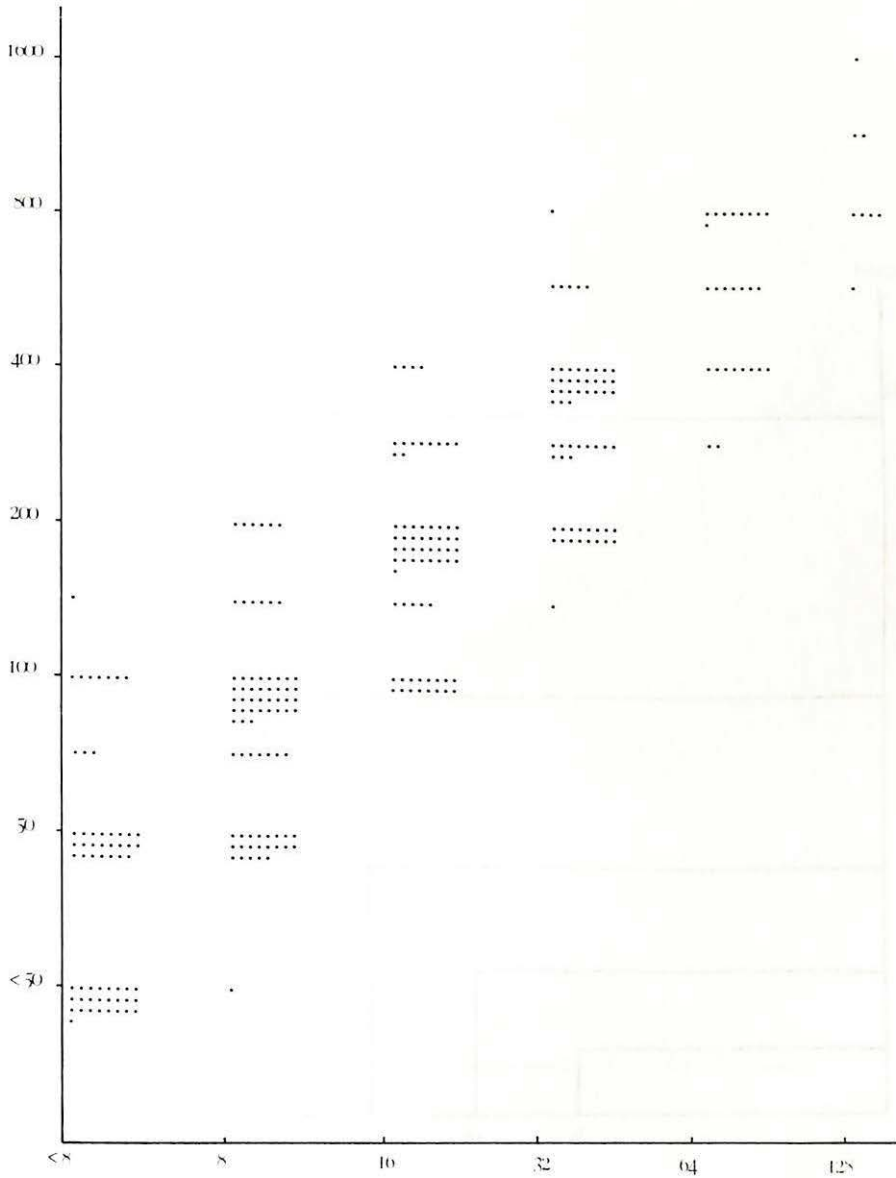


Fig. 1.- Relación entre los títulos en anticuerpos antirrotavirus obtenidos por FC y ELISA.

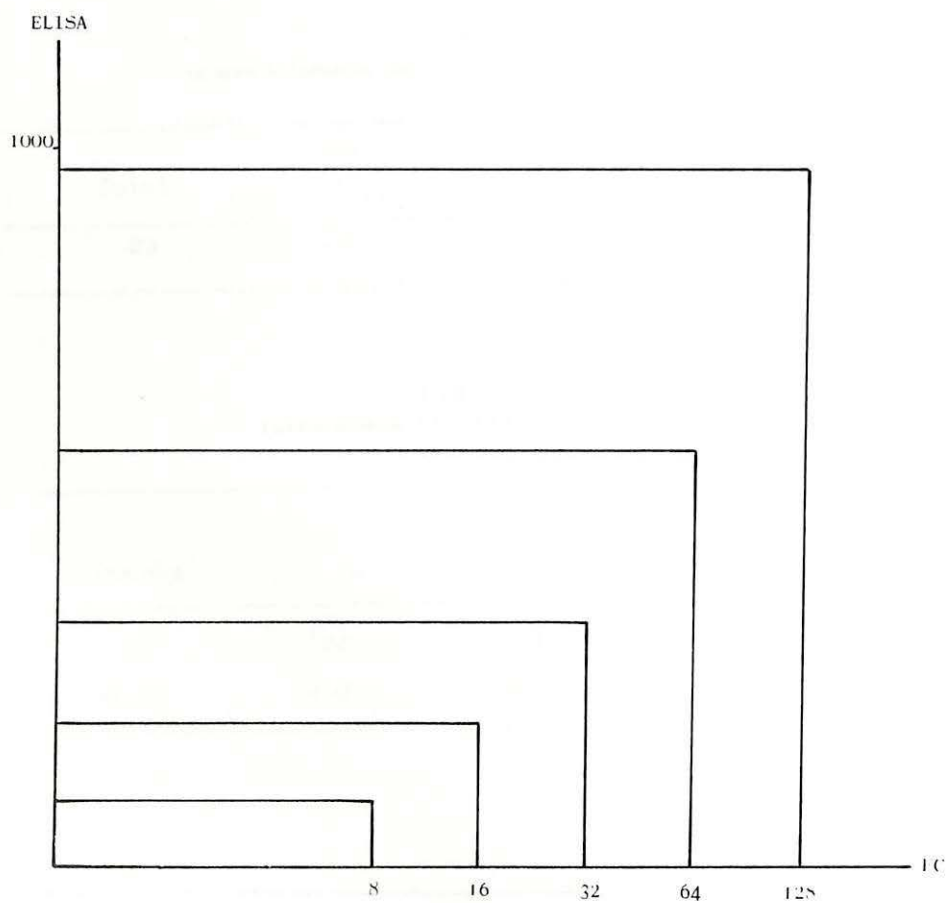


Fig. 2.- Correspondencia para cada título FC en título ELISA.

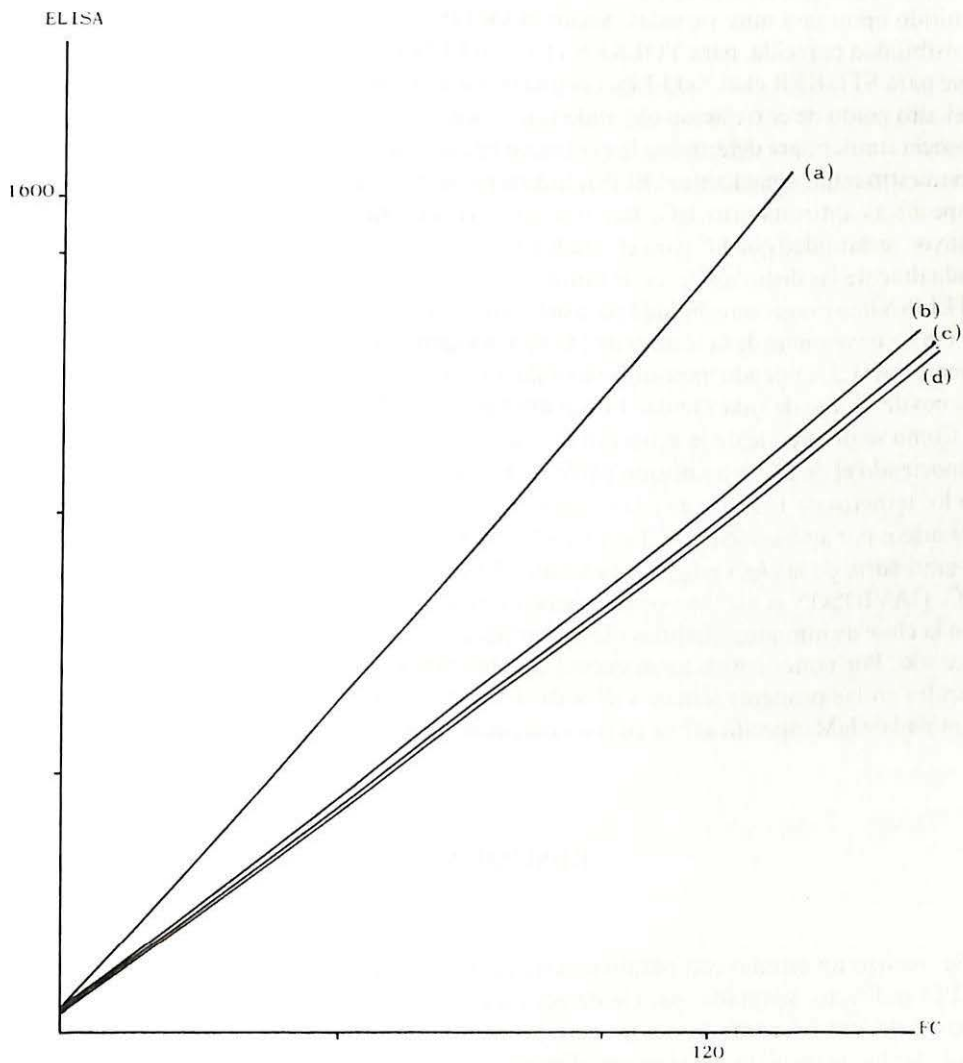


Fig. 3.- Representación de las ecuaciones de regresión.

(a) $y = 11,7x + 50,2$; (b) $y = 8,0x + 50,2$

(c) $y = 7,9x + 50,2$; (d) $y = 7,7x + 50,2$

DISCUSION

El título a partir del cual se consideraron positivos los animales por FC fue de 8, que parece ser el más adecuado (resultados no publicados). En la técnica ELISA se partió de un título de 50, se escogió este título basándonos en que a ningún ternero con un título de 8 por FC le correspondió un título inferior a 50 por ELISA. Por otra parte, algunos sueros no daban resultados específicos por debajo de esta dilución.

En relación con los trabajos publicados de comparación entre ambas pruebas, se han emitido opiniones muy variadas. Según MARTIN et al.⁴ ambas técnicas muestran una sensibilidad parecida, para YOLKEN et al.⁹ el ELISA es más sensible que FC, mientras que para STUKER et al.⁸ el ELISA es una técnica mucho más sensible. Como se deduce del alto grado de correlación obtenido por nosotros, las dos técnicas muestran una eficiencia similar para determinar la evolución en anticuerpos séricos. Ahora bien, aunque en nuestro estudio mediante el ELISA indirecto, se detectaron únicamente las globulinas específicas antirrotavirus IgG, hay que tener en cuenta que esta prueba muestra una mayor versatilidad que FC para el estudio de la infección, ya que puede determinar individualmente las distintas clases de inmunoglobulinas. Por otra parte hay que reconocer al ELISA una mayor sensibilidad para detectar anticuerpos a los 135 días de vida.

Un inconveniente de la técnica de FC es que algunos sueros se mostraron anticomplementarios (1,3 %) siendo imposible su titulación. Todos ellos pertenecieron a terneros de menos de 45 días de vida y tenían títulos altos por ELISA (iguales o mayores a 400).

Como se desprende de la ecuación de regresión para la predicción del título ELISA, conociendo el de FC, a un mismo título de FC correspondió un título de ELISA mayor en los terneros de 135 días de edad, con respecto a la relación existente entre los títulos obtenidos por ambas técnicas a los 15 y 45 días. Ello puede ser debido a que la FC detecta gran parte de las IgG e IgM, y la técnica ELISA, usada por nosotros, solamente las IgG. DAVIDSON et al.² han comprobado que en las infecciones por rotavirus, las IgM son la clase de inmunoglobulinas más abundantes en la fase aguda y las IgG en la convalecencia. Por tanto, teniendo en cuenta que las infecciones por rotavirus son más frecuentes en las primeras semanas de vida del ternero, es posible que exista una mayor cantidad de IgM específicas que en fases más avanzadas de la vida del animal.

RESUMEN

Se realizó un estudio comparativo entre las pruebas de Fijación del complemento y ELISA indirecto, adaptadas para la detección de anticuerpos específicos antirrotavirus, a partir de 300 muestras de suero recogidas de 102 terneros a los 15, 45 y 135 días de edad. Ambas técnicas mostraron una eficacia similar para seguir el curso de la infección, aunque ELISA fue más sensible para detectar anticuerpos antirrotavirus a los 135 días de vida.

COMPARATIVE STUDY BETWEEN THE COMPLEMENT FIXATION TEST AND AN INDIRECT ELISA FOR DETECTING ROTAVIRUS SPECIFIC ANTIBODIES

SUMMARY

A comparative study was made between complement fixation test and indirect ELISA in order to detect specific rotavirus antibodies. It was performed on 300 serum samples taken from 102 calves about 15, 45 and 135 days of life. Both test showed a similar efficacy in following the course of the infection, although ELISA was more sensitive in detecting rotavirus antibodies at 135 days of life.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ALVAREZ, M., FERNANDEZ, M. y CARMENES, P. (1986).- Prevalencia de las infecciones por rotavirus en explotaciones de cebo de terneros. *Med. Vet.*, 3:83-89.
- 2) DAVIDSON, G. P., HOGG, R. J. y KIRUBAKARAN, C. P. (1983).- Serum and intestinal immune response to rotavirus enteritis in children. *Infect. Immun.*, 40: 447-452.
- 3) LENNETTE, E. H. y SCHMIDT, N. J. (1969).- *Diagnostic procedures for viral and Rickettsial*. American Public Health Association, New York.
- 4) MARTIN, M. L., GARY, G. W. y PALMER, E. L. (1979).- Comparison of hemagglutination-inhibition, complement fixation and enzymelinked immunosorbent assay for quantitation of human rotavirus antibodies. *Arch. Virol.*, 62: 131-136.
- 5) MOERMAN, A., DE LEEUW, P. W., ZIJDERVELD, F. G. VAN, BAANVINGER, T. y TIESSINK, J. W. A. (1982).- Prevalence and significance of viral enteritis in dutch dairy calves. *Proc. XIIIth Wrld. Cong. Dis. Cattl. Utrech, the Netherlands*, 1: 228-237.
- 6) SANCHEZ-VIZCAINO, J. M. y CAMBRA ALVAREZ, M. (1981).- *Técnicas inmunoenzimáticas en patología animal y vegetal*. I.N.I.A. Madrid.
- 7) SNODGRASS, D. R., SHERWOOD, D., TERZOLO, H. G. y SYNGE, B. A. (1982).- A field survey of the aetiology of neonatal calf diarrhoea. *Proc. XIIIth Wrld. Cong. Dis. Cattl. Utrech, the Netherlands*, 1: 380-384.
- 8) STUKER, G., SCHMIDT, N. J., FORGHANI, B., HOLMBERG, C. A., HENRICKSON, R. V. y ANDERSON, J. H. (1979).- Rotavirus antibody assays on monkey sera: a comparison of enzyme immunoassay with neutralization and complement-fixation tests. *Am. J. Vet. Res.*, 40: 1620-1623.
- 9) YOLKEN, R. H., BARBOUR, B. A., WYATT, R. G. y KAPIKIAN, A. Z. (1978).- Immune response to rotaviral infection measurement by enzyme immunoassay. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 173: 552-554.

DISCUSION

El título a partir del cual se consideraron positivos los animales por FC fue de 8, que parece ser el más adecuado (resultados no publicados). En la técnica ELISA se partió de un título de 50, se escogió este título basándonos en que a ningún ternero con un título de 8 por FC le correspondió un título inferior a 50 por ELISA. Por otra parte, algunos sueros no daban resultados específicos por debajo de esta dilución.

En relación con los trabajos publicados de comparación entre ambas pruebas, se han emitido opiniones muy variadas. Según MARTIN et al.⁴ ambas técnicas muestran una sensibilidad parecida, para YOLKEN et al.⁹ el ELISA es más sensible que FC, mientras que para STUKER et al.⁸ el ELISA es una técnica mucho más sensible. Como se deduce del alto grado de correlación obtenido por nosotros, las dos técnicas muestran una eficiencia similar para determinar la evolución en anticuerpos séricos. Ahora bien, aunque en nuestro estudio mediante el ELISA indirecto, se detectaron únicamente las globulinas específicas antirrotavirus IgG, hay que tener en cuenta que esta prueba muestra una mayor versatilidad que FC para el estudio de la infección, ya que puede determinar individualmente las distintas clases de inmunoglobulinas. Por otra parte hay que reconocer al ELISA una mayor sensibilidad para detectar anticuerpos a los 135 días de vida.

Un inconveniente de la técnica de FC es que algunos sueros se mostraron anticomplementarios (1,3 %) siendo imposible su titulación. Todos ellos pertenecieron a terneros de menos de 45 días de vida y tenían títulos altos por ELISA (iguales o mayores a 400).

Como se desprende de la ecuación de regresión para la predicción del título ELISA, conociendo el de FC, a un mismo título de FC correspondió un título de ELISA mayor en los terneros de 135 días de edad, con respecto a la relación existente entre los títulos obtenidos por ambas técnicas a los 15 y 45 días. Ello puede ser debido a que la FC detecta gran parte de las IgG e IgM, y la técnica ELISA, usada por nosotros, solamente las IgG. DAVIDSON et al.² han comprobado que en las infecciones por rotavirus, las IgM son la clase de inmunoglobulinas más abundantes en la fase aguda y las IgG en la convalecencia. Por tanto, teniendo en cuenta que las infecciones por rotavirus son más frecuentes en las primeras semanas de vida del ternero, es posible que exista una mayor cantidad de IgM específicas que en fases más avanzadas de la vida del animal.

RESUMEN

Se realizó un estudio comparativo entre las pruebas de Fijación del complemento y ELISA indirecto, adaptadas para la detección de anticuerpos específicos antirrotavirus, a partir de 300 muestras de suero recogidas de 102 terneros a los 15, 45 y 135 días de edad. Ambas técnicas mostraron una eficacia similar para seguir el curso de la infección, aunque ELISA fue más sensible para detectar anticuerpos antirrotavirus a los 135 días de vida.

COMPARATIVE STUDY BETWEEN THE COMPLEMENT FIXATION TEST AND AN INDIRECT ELISA FOR DETECTING ROTAVIRUS SPECIFIC ANTIBODIES

SUMMARY

A comparative study was made between complement fixation test and indirect ELISA in order to detect specific rotavirus antibodies. It was performed on 300 serum samples taken from 102 calves about 15, 45 and 135 days of life. Both test showed a similar efficacy in following the course of the infection, although ELISA was more sensitive in detecting rotavirus antibodies at 135 days of life.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ALVAREZ, M., FERNANDEZ, M. y CARMENES, P. (1986).- Prevalencia de las infecciones por rotavirus en explotaciones de cebo de terneros. *Med. Vet.*, 3:83-89.
- 2) DAVIDSON, G. P., HOGG, R. J. y KIRUBAKARAN, C. P. (1983).- Serum and intestinal immune response to rotavirus enteritis in children. *Infect. Immun.*, 40: 447-452.
- 3) LENNETTE, E. H. y SCHMIDT, N. J. (1969).- *Diagnostic procedures for viral and Rickettsial*. American Public Health Association, New York.
- 4) MARTIN, M. L., GARY, G. W. y PALMER, E. L. (1979).- Comparison of hemagglutination-inhibition, complement fixation and enzymelinked immunosorbent assay for quantitation of human rotavirus antibodies. *Arch. Virol.*, 62: 131-136.
- 5) MOERMAN, A., DE LEEUW, P. W., ZIJDERVELD, F. G. VAN, BAANVINGER, T. y TIESSINK, J. W. A. (1982).- Prevalence and significance of viral enteritis in dutch dairy calves. *Proc. XIIIth. Wrld. Cong. Dis. Catt., Utrech, the Netherlands.*, 1: 228-237.
- 6) SANCHEZ-VIZCAINO, J. M. y CAMBRA ALVAREZ, M. (1981).- *Técnicas inmunoenzimáticas en patología animal y vegetal*. I.N.I.A. Madrid.
- 7) SNODGRASS, D. R., SHERWOOD, D., TERZOLO, H. G. y SYNGE, B. A. (1982).- A field survey of the aetiology of neonatal calf diarrhoea. *Proc. XIIIth Wrld Cong. Dis. Catt., Utrech, the Netherlands.* 1: 380-384.
- 8) STUKER, G., SCHMIDT, N. J., FORGHANI, B., HOLMBERG, C. A., HENRICKSON, R. V. y ANDERSON, J. H. (1979).- Rotavirus antibody assays on monkey sera: a comparison of enzyme immunoassay with neutralization and complement-fixation tests. *Am. J. Vet. Res.*, 40: 1620-1623.
- 9) YOLKEN, R. H., BARBOUR, B. A., WYATT, R. G. y KAPIKIAN, A. Z. (1978).- Immune response to rotaviral infection measurement by enzyme immunoassay. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 173: 552-554.