

Comparación de la ceruloplasmina y cobre séricos con cobre hepático, como indicadores de cobre corporal en vacas de desecho voluntario*

Comparison of serum ceruloplasmin and copper with liver copper as indicators of body copper status in discarded cows

Gerardo F. Quiroz-Rocha**

Jan Bouda**

Luis Núñez Ochoa**

Carlos Sosa Ferreyra***

Delia Arlette Castillo Mata**

Abstract

Copper (Cu) deficiency diagnosis in ruminants is based on measurements of serum and hepatic levels. Another predictor of hypocuprosis is the serum ceruloplasmin (Cp) level. In order to try to find a reliable and practical alternative for the identification of Cu deficiencies in ruminants, Cu, Cp and Cu:Cp ratio were determined in 20 dairy cows prior to slaughter. Hepatic samples were taken from the same animals in order to obtain an accurate measurement of Cu status. Cu and Cp levels were within the reference range. Means analyses of variance and correlations between Cu and Cp were not significant ($P > 0.05$). Neither hypocupremia in serum analyses, nor hypocuprosis, in hepatic samples, were observed. Given the results, Cp:Cu ratio was not found to be a good predictor of Cu status in cows.

Key words: CERULOPLASMIN, COPPER, SERUM, LIVER, DEFICIENCY, COW.

Resumen

El diagnóstico de deficiencias de cobre (Cu) en rumiantes se ha basado en determinaciones séricas y en la concentración hepática; otro indicador de hipocuprosis es la concentración sérica de ceruloplasmina (Cp). Con la finalidad de buscar una alternativa confiable y práctica para identificar deficiencias de Cu corporal, se determinó el Cu, la Cp y la relación Cp:Cu en el suero de 20 vacas lecheras de rastro. En los mismos animales se determinó la concentración de Cu en muestras hepáticas, como indicador preciso del estado de Cu. Las concentraciones séricas de Cu y Cp estuvieron en rangos de valores de referencia. Los análisis de varianza de las medias y las correlaciones entre Cu y Cp fueron no significativas ($P > 0.05$). Los resultados de Cu sérico indicaron que no existió hipocupremia, ni se detectó hipocuprosis al tener concentraciones adecuadas de Cu en el hígado. De acuerdo con los resultados obtenidos, la relación Cp:Cu no fue buen indicador del estado de Cu en vacas.

Palabras clave: CERULOPLASMINA, COBRE, SUERO, HÍGADO, DEFICIENCIA, VACA.

Recibido el 2 de febrero de 2002 y aceptado el 10 de junio de 2002.

* Esta investigación forma parte de la tesis de maestría del primer autor y se realizó con recursos obtenidos a través del proyecto PAPIIT IN552198, DGAPA-UNAM.

** Sección de Patología Clínica, Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

*** Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, 16 de Septiembre Ote. 63, Querétaro, Querétaro, México.

Correspondencia: gferreyra@servidor.unam.mx

Introduction

Copper (Cu) deficiency, or hypocuprosis, is encountered frequently in cattle.^{1,2} There are different references concerning Cu deficiencies in ruminants. Da Silva *et al.*³ determined the copper deficiencies in sheep and cows from seven regions in four Brazilian states. In Mexico, there is little precise data concerning copper deficiency distribution and prevalence. Avila *et al.*⁴ observed Cu deficiency in dairy cattle from the Mexican high plateau region. Primary Cu deficiencies are due to insufficient dietary intake.¹ However, secondary deficiencies, due to the presence of an antagonist, are more frequent. The most common cause of secondary hypocuprosis in cattle is excessive consumption of molybdenum, which favors the formation of thiomolybdates (TM) in the rumen,^{2,5} which, in turn, interferes with Cu absorption and metabolism.⁵

Various clinical signs have been attributed to Cu deficiency⁵ such as anemia, variable infertility, achromotrichia, poor wool structure, predisposition to infectious diseases, hemolytic crises, abomasal ulcers, polioencephalomalacia, poor body condition and sudden death.^{1,6}

The most commonly used methods for determining corporal Cu are measuring Cu in plasma-serum and in hepatic tissue.⁷⁻⁹ Reference values for serum Cu in cattle range from 11 to 18mmol/l (70 to 120mg/dl).¹⁰ The determination of serum or plasma Cu concentration is only useful in severe or chronic deficiencies. In acute cases, animals with Cu deficiencies or marginal excesses can have plasmatic concentrations that fall within the reference range.^{10,11}

The determination of Cu content in the liver is currently the most precise technique available for knowing the status of corporal Cu. The hepatic sample is measured using atomic absorption spectrometry following digestion. However, obtaining the sample requires an invasive biopsy and owners are frequently wary of permitting such a procedure on live animals. Similarly, sample collection in slaughter houses can be complicated. Furthermore, there are few laboratories that can carry out such tests.^{2,12}

An alternative approach to reach an approximation of the status of Cu in animals is the determination of substances that contain Cu in their molecular structure,^{10,13,14} as is the case of ceruloplasmin (Cp), serum cytochrome oxidase and superoxide dismutase contained in erythrocytes. The Cp enzyme is the main transporter of Cu and has an oxidative function.

Introducción

Las deficiencias de cobre (Cu) o hipocuprosis se presentan con frecuencia en los bovinos.^{1,2} Existen diferentes referencias sobre las deficiencias de Cu en rumiantes. Da Silva *et al.*³ determinaron deficiencias de cobre en ovinos y bovinos en siete regiones de cuatro estados de Brasil. En México no existen datos precisos sobre distribución y la prevalencia de estas deficiencias. Ávila *et al.*⁴ observaron deficiencia de Cu en vacas lecheras del altiplano mexicano. Existen deficiencias primarias de Cu debido a un aporte insuficiente de éste en la dieta.¹ Sin embargo, son más frecuentes las deficiencias secundarias por la presencia de un antagonista. La causa más común de hipocuprosis secundaria en bovinos es el consumo excesivo de molibdeno que favorece la formación de tiomolibdatos (TM) en el rumen,^{2,5} que interfieren con la absorción y metabolismo del Cu.⁵

Se describen varios signos clínicos asociados a la deficiencia de Cu,⁵ como anemias, infertilidad variable, acromotriquia, mala estructura de lana, predisposición a enfermedades infecciosas, crisis hemolíticas, úlceras abomasales, polioencefalomalacia, mala condición corporal y muerte súbita.^{1,6}

Actualmente para evaluar el estado de Cu corporal se emplea con mayor frecuencia la determinación del Cu en plasma-suero y en tejido hepático.^{7,9} Los valores de referencia de Cusérico en bovinos son de 11 a 18mmol/l (70-120 mg/dl).¹⁰ La determinación de las concentraciones séricas o plasmáticas de Cu es útil sólo en deficiencias severas o crónicas. En casos agudos, animales con deficiencias o excesos marginales de Cu pueden tener concentraciones plasmáticas dentro de rangos de referencia.^{10,11}

La determinación del contenido de Cu en el hígado es actualmente la técnica más precisa para conocer el estado corporal de Cu. Se efectúa por espectrometría de absorción atómica y previa digestión del tejido. Sin embargo, la obtención de muestras por biopsia del hígado es un método invasivo y los propietarios son renuentes a permitir tomar muestras en animales vivos. Igualmente la obtención de muestras hepáticas en los rastros puede ser complicada. Asimismo, son pocos los laboratorios que pueden realizar estas determinaciones.^{2,12}

Una alternativa que se ha descrito para tener una aproximación del estado de cobre en los animales, es la determinación de sustancias con Cu en su molécula,^{10,13,14} como la ceruloplasmina (Cp), la citocromo-oxidasa sérica y la superóxido dismutasa de los eritrocitos. La enzima Cp es la principal transportadora de Cu y tiene función de oxidasa.

Se ha descrito que existe una relación directa entre Cu y Cp en el plasma sanguíneo;^{1,7,15} es decir, el incremento de Cu plasmático causará incremento de la Cp y donde el valor debe ser mayor a 2.0. Telfer *et al.*¹⁵ refieren que en vacas lecheras el valor de la relación

It has been stated that there is a direct relation between Cu and Cp in plasma;^{1,7,15} that is, an increase in plasmatic Cu will cause an increase in Cp, producing values greater than 2.0. Telfer *et al.*¹⁵ state that in dairy cattle the Cp:Cu ration must be > 2.0.¹⁵ It is imperative to establish a quick, relatively easy and less invasive technique for the determination of Cu. The objective of this study was to determine the Cp:Cu ratio and compare it to hepatic concentrations of Cu in dairy cows.

Material and methods

Twenty voluntary-slaughter Holstein dairy cows from a slaughterhouse in the State of Mexico were selected. The reasons for slaughter were milk production lower than 15 liters, as determined by the farmer. These cows did not present any clinical signs of disease. All cows underwent a physical examination which included respiratory rate, pulse and rectal temperature measurements. Prior to slaughter, blood samples were obtained through caudal vein venipuncture using plain glass vacuum-tubes (Venoject®). The tubes were centrifuged at 1 200 g for 10 min within the first two hours following sample collection. Sera were transferred to fresh tubes and frozen at -10°C until analysis. Within the first 15 min following slaughter, 15 cm³ liver samples were obtained from the edge of the right ventral lobule and were conserved at -10°C until analysis.

Serum Cu was determined using atomic absorption spectrometry,^{**} while Cp concentration was determined using nephelometry¹⁶ in an automated Array Protein System^{***} analyzer. Values for Cp and Cu ratio (Cp:Cu) were obtained applying the following formula: $Cp:Cu = Cp \div Cu$.¹⁵ These values were then used to obtain an accurate value for corporal Cu status. Hepatic Cu concentration was determined using the following procedure: liver samples were placed on individual trays, weighed and oven-dried at 105°C for 48 h to attain constant weight,¹⁷ then reweighed and incinerated at 550°C for 48 h. Ash obtained was digested using nitric acid and prepared to a final dilution on 1:100. Cu measurement was also carried out using the spectrometer, as for serum values. The result was expressed in mmol/g dry matter (DM). The humidity percentage was also determined.

Statistical analysis

Mean, standard deviation, analysis of variance of the means and correlation coefficients were determined

Cp:Cu debe ser >2.0. Se plantea la posibilidad de usar esta determinación como indicador de hipocuprosis secundaria.¹⁵ Es necesario establecer una técnica rápida y relativamente sencilla, empleando métodos menos invasivos de obtención de muestras. Por ello se decidió determinar la relación Cp:Cu y compararla con las concentraciones hepáticas de Cu en vacas lecheras.

Material y métodos

En un rastro del Estado de México, México, se seleccionaron 20 vacas lecheras Holstein de desecho voluntario. Las causas de eliminación fueron: producción inferior a 15 litros; esto último, de acuerdo con la economía del rancho. Estas vacas no presentaron ningún signo clínico de enfermedad. A éstas se les realizó un examen físico que incluyó las frecuencias respiratoria, cardíaca y la temperatura rectal. Antes del sacrificio se les tomaron muestras de sangre de la vena caudal en tubos de vidrio con vacío sin aditivos (Venoject®). Los tubos se centrifugaron a 1 200 g durante 10 min dentro de las siguientes 2 h después de la toma de las muestras. El suero se transfirió a otros tubos y se congeló a -10 °C hasta su análisis. Dentro de los primeros 15 min posteriores al sacrificio de los animales, se obtuvieron muestras de hígado del borde ventral del lóbulo derecho de 15 cm³ aproximadamente y se conservaron en congelación a -10 °C hasta el análisis.

En el suero sanguíneo se determinó el Cu en un espectrómetro de absorción atómica,^{**} y la concentración de Cp mediante la técnica de nefelometría¹⁶ en un analizador automatizado Array Protein System.^{***} Con los valores obtenidos de Cp, se obtuvo la relación entre Cp y Cu (Cp:Cu) aplicando la fórmula: relación Cp:Cu = $Cp \div Cu$.¹⁵ Con los valores de esta relación se buscó obtener un dato confiable para la identificación precisa del estado de Cu corporal. En las muestras de hígado se determinó la concentración de Cu bajo el siguiente procedimiento: Se colocaron las muestras de hígado en charolas individuales, se pesaron y secaron en estufa a 105 °C durante 48 h hasta alcanzar peso constante,¹⁷ se pesaron nuevamente y se sometieron a incineración en mufla a 550 °C durante 48 h. La ceniza se digirió con ácido nítrico y se preparó una dilución final 1:100. La determinación de Cu se hizo en el mismo espectrómetro usado con las muestras de suero. El resultado se expresó en mmol/g de materia seca (MS). Además se determinó el porcentaje de humedad del tejido.

Análisis estadístico

Se obtuvo la media, desviación estándar, análisis de varianza para las medias y los coeficientes de correla-

* Terumo Corp. Leuven, Bélgica

** Atomic Absorption Spectrometer, Mod 3110. Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, EUA.

*** Array Protein System, mod. 7571. Beckman, Brea, Ca, EUA.

for serum Cu, serum Cp and hepatic Cu concentrations. All statistical analyses were carried out using the SAS statistical package.¹⁸

Results

Upon physical examination all cows had respiratory rate, pulse and temperature within normal reference ranges ($21 \pm 3.4/\text{min}$, $57 \pm 8.4/\text{min}$ y $38.2 \pm 1.1^\circ\text{C}$, respectively).

Cu and Cp serum concentration means, hepatic Cu mean concentration and Cp:Cu ration are described in Table 1. Only three cows had Cp:Cu ratio values greater than 2.0. Upon visual inspection, the livers did not show gross pathologic changes. Humidity in hepatic tissue was $72.75 \pm 2.65\%$. Correlations between serum Cp, serum Cu and hepatic Cu can be seen in Table 2. The correlation coefficients between serum Cp \times serum Cu, serum Cp \times hepatic Cu, and serum Cu \times hepatic Cu are all negative, being -0.222 , -0.060 and -0.341 , respectively.

ción entre los valores de las concentraciones de Cu en suero, Cp en suero y Cu en hígado. Los análisis estadísticos se efectuaron aplicando el programa estadístico computacional SAS.¹⁸

Resultados

En el examen físico todas las vacas presentaron la frecuencia respiratoria, cardíaca y la temperatura dentro de valores de referencia antes del sacrificio ($21 \pm 3.4/\text{min}$, $57 \pm 8.4/\text{min}$ y $38.2 \pm 1.1^\circ\text{C}$, respectivamente).

Las medias de las concentraciones de Cu y Cp en suero sanguíneo, la concentración media del Cu en hígado y la relación Cp:Cu se describen en el Cuadro 1. Sólo tres vacas tuvieron valores de relación Cp:Cu superiores a 2.0. En la inspección hepática, en ningún caso se observaron cambios patológicos macroscópicos. La humedad en el tejido hepático fue de $72.75 \pm 2.65\%$. Las correlaciones entre la Cp sérica, el Cu sérico y el Cu hepático se muestran en el Cuadro 2. Los coeficientes de correlación de la comparación Cp en suero \times Cu en suero, Cp en suero \times Cu en hígado y Cu

Cuadro 1

CONCENTRACIÓN DE COBRE SÉRICO, CERULOPLASMINA SÉRICA, COBRE EN HÍGADO Y RELACIÓN Cu:Cp EN VACAS LECHERAS
SERUM COPPER, SERUM CERULOPLASMIN, HEPATIC COPPER CONCENTRATION AND Cp:Cu RATIO IN DAIRY COWS

Analyte	Mean	Standard deviation
Serum Cu (mmol/L)	14.18	3.03
Serum Cp (mg/dL)	16.92	6.42
Hepatic Cu (mmol/g)	3.95	2.35
Cp:Cu relation	1.30	0.72

Cuadro 2

CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CERULOPLASMINA SÉRICA, COBRE SÉRICO Y COBRE EN HÍGADO DE VACAS
LECHERAS Y SU PROBABILIDAD ESTADÍSTICA
CORRELATIONS BETWEEN SERUM CERULOPLASMIN, SERUM COPPER AND HEPATIC COPPER CONCENTRATIONS IN DAIRY COWS
AND THEIR STATISTICAL PROBABILITY

	Correlation coefficient	Probability r
Plasma Cp \times Plasma Cu	-0.222	0.446
Plasma Cu \times Liver Cu	-0.060	0.846
Liver Cu \times Plasma Cp	-0.341	0.255

Discussion

Cu and Cp can be measured in both serum and plasma, with no significant differences being found between methods.¹⁴ The values for serum Cu, hepatic Cu and serum Cp were found to fall within reference ranges (11 – 18mmol/l, 0.47 – 4.72mmol/g and 10 – 20mg/dl, respectively),^{8,10,19} thus explaining why none of the animals in the study showed signs of hypocuprosis. Furthermore, there did not appear to be a direct relation between Cp and Cu determination.

Telfer *et al.*¹⁵ described the Cp:Cu ratio as an indicator of TM in the circulation, given that these cause a decrease in Cu availability even when plas-matic concentrations of Cu and Cp are within refer-ence ranges. They suggested that the Cp:Cu ratio in cattle should be greater than 2.0 and that values below these would indicate secondary hypocupro-sis, attributing this to the presence of TM in the blood since Cu deficiency due to excess Mo is com-monly encountered. The fundamental concept they postulated is that Cu antagonists will have a direct effect on the concentration of this element, as well as a secondary effect on Cp production.¹⁵ The value measured in this study, for Cp:Cu ratio, was 1.30 ± 0.72 . Applying Telfer *et al.* criteria with respect to Cp:Cu ratio, only three of the 20 cows have values superior to 2.0, which would thus imply TM pres-ence in the majority of the cows in the study. How-ever, none of the individual measurements demon-strate this situation, in particular hepatic Cu levels were not abnormal. We also did not observe a direct relationship between Cp and Cu in serum. The per-centage of humidity in hepatic tissue corresponded to that described by Graham.¹⁰

Serum Cp and Cu concentrations in this study cor-responded to ranges found by Wikse *et al.*⁸ and Gra-ham.¹⁰ Mulryan and Mason²⁰ indicate that the concen-trations of analytes such as serum Cu and Cp are maintained within normal reference ranges so long as the liver contains less than 0.47 mmol of Cu/g DM of liver, and that there is only an important level of hypocupremia when hepatic Cu concentration falls below 0.31mmol/g (20mg/kg).

Given the values of serum Cu, hepatic Cu and serum Cp, there was no indication of hypocuprosis in the animals studied.

It is concluded that the results obtained for Cp and Cu did not prove any utility of the Cp:Cu ratio in identifying hypocuprosis. Furthermore, a value of 2.0 for the same ratio, proposed as a valid measure of TM in cattle, could not be demonstrated. Further study are required to find simpler and trustworthy methods for the determination of Cu in ruminants.

en suero \times Cu en hígado tienen valor negativo (-0.222 , -0.060 y -0.341 , respectivamente).

Discusión

La evaluación de Cu y Cp puede realizarse indistinta-mente en suero o plasma, ya que no existen diferencias significativas usando uno y otro.¹⁴ De acuerdo con los resultados obtenidos del Cu en suero, Cu en hígado y Cp en suero, todos los analitos se encontraron dentro de valores de referencia (11-18mmol/l, 0.47-4.72mmol/g y 10 –20 mg/dl, respectivamente),^{8,10,19} por eso no se tuvieron indicios de hipocuprosis en los animales mues-treados. Tampoco se observa que la determinación de Cp y Cu tengan una relación directa.

Telfer *et al.*¹⁵ describieron la relación Cp:Cu como un indicador de la presencia de TM en circulación, esto último propicia disminución en la disponibilidad del Cu, aun cuando las concentraciones plasmáticas de Cu o Cp se encuentren en rangos de referencia. Ellos postularon que el valor de la relación Cp:Cu en los bovinos debe ser mayor a 2.0, valores inferiores tendrían relación con una hipocu-prosis secundaria, estos investigadores la atribuyen a la presencia de TM en sangre debido a que la deficiencia de Cu asociada a exceso de Mo es la circunstancia más común. El fundamento planteado es que los antagonistas del Cu tendrán un efecto directo sobre las concentraciones de este elemento y en forma secundaria sobre la producción de la Cp.¹⁵ El valor medio de la relación Cp:Cu encontrado en estas vacas fue de 1.30 ± 0.72 . Aplicando el criterio descrito por Telfer *et al.*¹⁵ respecto de los valores de la relación Cp:Cu, sólo tres de 20 vacas tuvieron valores superiores a 2.0, lo cual supondría presencia de TM en circulación en la mayoría de las vacas estudiadas. Sin embargo, ninguna de las determinaciones individuales ayudaron a demostrar esta situación, particularmente las concentraciones de Cu en hígado. Tampoco se observó que la determinación de Cp y Cu en suero tengan una relación directa. El porcentaje de humedad determinado en el tejido hepático correspon-dió a lo descrito por Graham.¹⁰

Las concentraciones séricas de Cp y Cu en este estudio correspondieron con los rangos informados por Wikse *et al.*⁸ y Graham.¹⁰ Mulryan y Mason²⁰ indi-can que las concentraciones de analitos como el Cu y la Cp séricos se mantienen en valores adecuados, mien-tras el hígado tenga al menos 0.47mmol de Cu/g de MS de hígado, y que sólo cuando la concentración de Cu hepático es menor a 0.31mmol/g (20mg/kg) se presenta una hipocupremia importante.

De acuerdo con los resultados obtenidos del Cu en suero, Cu en hígado y Cp en suero, no se tuvieron indicios de hipocuprosis en los animales muestreados.

Se concluye que de acuerdo con los resultados de Cp y Cu no se comprobó la utilidad de la relación Cp:Cu para identificar estados de hipocuprosis. No se demos-

Once a simple and trustworthy technique can be applied for the detection of Cu deficiencies in Mexico it will be easier to improve knowledge concerning this problem, as well as learn more about its prevalence.

Referencias

1. Keen CL, Graham TW. Trace elements. In: Kaneko JJ, editor. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 4th ed. San Diego (Ca): Academic Press, 1989.
2. Gay CC, Pritchett LC, Madson W. Copper deficiency in cattle: a review. *Proceedings of the 20th Annual Meeting of the American Association of Bovine Practitioners*; 1988 September 18-21; Kansas City (Ka). Rome (Ge): American Association of Bovine Practitioners, 1988:134-138.
3. Da Silva MS, Hubinger TC, Döbereiner J. Deficiências e desequilíbrios de microelementos em bovinos e ovinos em algumas regiões do Brasil. *Pesq Vet Bras* 1999;19:19-33.
4. Ávila GJ, Bouda J, Quiroz RGF, Yabuta OA. Impacto de deficiencias minerales sobre la reproducción de vacas lecheras. *Memorias del XXI Congreso Nacional de Buiatría*; 1997 julio 9-12. Colima (Col) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A.C., 1997:191-193.
5. Quiroz-Rocha GF, Bouda J. Fisiopatología de las deficiencias de cobre en rumiantes y su diagnóstico. *Vet Méx* 2000;32:289-296.
6. Gooneratne SR, Buckley WT, Christensen DA. Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. *Can J Anim Sci* 1989;69:819-845.
7. Vermunt JJ, West DM. Predicting copper status in beef cattle using serum copper concentrations. *NZ Vet J* 1994;42:142-143.
8. Wikse SE, Herd D, Field R, Holland P. Diagnosis of copper deficiency in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1992;200:1625-1629.
9. Clark RG, Ellison RS. Mineral testing - the approach depends on what you want to find out. *NZ Vet J* 1993;41:98-100.
10. Graham TW. Trace element deficiencies in cattle. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 1991;7:153-215.
11. Suttle NF. Copper deficiency in ruminants; recent developments. *Vet Rec* 1986;119:519-522.
12. Suttle NF. Problems in the diagnosis and anticipation of trace element deficiencies in grazing livestock. *Vet Rec* 1986;119:148-152.
13. Suttle NF, McMurray CH. Use of erythrocyte copper:zinc superoxide dismutase activity and hair or fleece copper concentrations in the diagnosis of hypocuprosis in ruminants. *Res Vet Sci* 1983;35:47-52.
14. Kincaid RL, Gay CC, Krieger RI. Relationship of serum and plasma copper and ceruloplasmin concentrations of cattle and the effects of whole blood sample storage. *Am J Vet Res* 1986;47:1157-1159.
15. Telfer SB, Mackenzie AM, Illingworth DV, Jackson DW. The use of caeruloplasmin activities and plasma copper concentrations as indicators of copper status in cattle. *Proceedings of the XIX World Buiatrics Congress*; 1996 July 8-12.; Edinburgh (UK). Edinburgh (UK): British Veterinary Cattle Association, 1996:402-404.
16. Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994.
17. Ayres GH. *Análisis químico cuantitativo*. 2^a ed. México (DF): Harla, 1970.
18. SAS: SAS/STAT user's guide. Volume 2 GLM-VARCOMP. Version 6. 4th ed. Cary (NC): SAS Institute Inc., 1990.
19. Kaneko JJ. Blood analyte reference values in large animals. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, editors. *Clinical biochemistry of domestic animals*. San Diego (Ca): Academic Press, 1997:890-895.
20. Mulryan G, Mason J. Assessment of liver copper status in cattle from plasma copper and plasma copper enzymes. *Ann Rech Vét* 1992;23:233-238.