

Ocorrência da leucose enzoótica dos bovinos no Estado do Pará, Brasil¹

Éva Molnár², László Molnár², Hilma Tavares Dias³, Aluízio Otávio Almeida da Silva⁴ e William Gomes Vale⁵

ABSTRACT.- Molnár É., Molnár L., Dias H. T., Silva A. O. A. & Vale W. G. 1999. [Occurrence of enzootic bovine leukosis in the State of Pará, Brazil.] Ocorrência da leucose enzoótica dos bovinos no Estado do Pará, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 19(1):7-11. Laboratório de Investigação e Diagnóstico de Enfermidade Animal, Centro Agropecuário, Universidade Federal do Pará, Belém, PA 66075-900, Brazil.

The occurrence of the infection with Bovine Leukosis Virus (BLV) was examined in agar-gel immunodiffusion (AGID) test and with indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in the State of Pará, Brazil. The blood sera were collected from different breeds including Nelore, Piemontes, Simental, Holstein Frisian, Indubrasil, Girolanda, Simbrasil and their cross-breedings. The majority of the animals were adults. The overall occurrence of infections was 49.8% (359/721) and 26.0% (174/668) for ELISA and AGID test, respectively. All animal groups examined showed infection in ELISA, however in the AGID test two groups were sera negative.

INDEX TERMS: Enzootic bovine leukosis, indirect ELISA, immunodiffusion, bovine leukemia, bovine.

RESUMO. - A ocorrência da infecção pelo Vírus da Leucose Enzoótica dos Bovinos (BLV) no Estado do Pará, foi estudada através do método de imunodifusão em ágar-gel (AGID) e por um ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto, paralelamente. Os exames foram realizados com amostras de soros sanguíneos oriundos de bovinos de diferentes raças sendo a maioria deles adultos. A prevalência observada foi de 49,8% (359/721) no ELISA e 26,0% (174/668) no AGID. Todos os 14 grupos dos animais estudados pelo ELISA indireto, mostraram a existência da infecção, enquanto que pelo método da AGID, dois grupos de animais foram negativos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Leucose Enzoótica dos Bovinos, ELISA indireto, imunodifusão.

INTRODUÇÃO

A leucemia e o linfossarcoma dos bovinos são enfermidades economicamente importantes (Da et al. 1993, Thurmond 1987). A doença tem sido considerada como uma enfermidade infecciosa desde o início deste século, mas seu agente foi demonstrado pela primeira vez somente 30 anos atrás (Miller et al. 1969).

Após a descoberta do vírus da leucose dos bovinos (BLV), iniciou-se a elaboração de métodos diagnóstico para a demonstração da infecção. Desde o primeiro momento, os seguintes testes sorológicos foram utilizados mais amplamente: imunodifusão em gel de ágar (AGID) (Miller & Olson 1972, Miller & Van der Maaten 1976, Bex et al. 1979, Mammerrickx et al. 1980, Miller et al. 1981, Roberts et al. 1989); radioimunoensaio (Devare et al. 1976); fixação do complemento (Miller & Van der Maaten 1974, Portelle et al. 1978); reverse transcriptase ensaio (Graves et al. 1977); vírus neutralização (Miller et al. 1981) e ensaio imunoenzimático (ELISA; Portelle et al. 1983; Portelle et al. 1989, Florent 1988, Have & Hoff-Jorgensen 1991, Noda-Gomes et al. 1992).

Com o acúmulo de conhecimentos e dados em relação às provas sorológicas surgiu a possibilidade de realização de estudos comparativos a respeito da sensibilidade dos diferentes métodos diagnósticos, assim como, sobre a aplicabilidade dos mesmos (Mammerrickx et al. 1980, Jacobsen et al.

¹Aceito para publicação em 24 de abril de 1998.

Este trabalho contou com o apoio da Joint FAO/IAEA, Agriculture and Biotechnology Laboratory, Agency Laboratories Division, Seibersdorf, Austria.

²Programa de Medicina e Saúde Animal, Convênio CNPq/UFPA. Centro Agropecuário-Laboratório de Investigação e Diagnóstico de Enfermidades Animal (LIDEA), Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Pará 66075-900.

³Bolsista de Desenvolvimento Regional do CNPq, Centro Agropecuário-LIDEA, UFPA.

⁴Centro de Ciências Biológicas e Centro Agropecuário, UFPA.

⁵Centro Agropecuário e Centro de Ciências Biológicas, UFPA; Pesquisador Bolsista I-B do CNPq.

1985, Hoff-Jorgensen 1989, Roberts et al. 1989, Moreno et al. 1992).

Têm sido realizadas pesquisas comparativas também em relação ao diagnóstico através das provas sorológicas e demonstração direta do agente causador (Gupta et al. 1981, Klintevall et al. 1993).

Está fundamentado o fato de que os bovinos sororreagentes (BLV) estão realmente infectados com o vírus (Devare et al. 1976). Por outro lado, todos os bovinos e ovinos inoculados experimentalmente com BLV, soroconvertaram-se na AGID em quatro meses e, no ELISA, dentro de duas semanas (Jacobsen et al. 1985); isso ocorre geralmente, embora hajam exceções (Cockerell & Rovnak 1988, Murtaugh et al. 1991).

Os resultados do teste AGID mostraram uma considerável variação na concentração dos anticorpos dos bovinos infectados com BLV (Kono et al. 1982), pois em alguns casos, esta flutuação determina um resultado temporariamente negativo. Outras pesquisas evidenciaram uma diminuição da concentração de anticorpos relacionada às fases finais da gestação e após o parto, assim como há também uma negatividade transitória em alguns animais infectados (Bause et al. 1978, Bause & Schmidt 1980, Burridge et al. 1982).

Sobre a disseminação desta enfermidade no Brasil, publicou-se ultimamente um artigo (Birgel Junior et al. 1995). Em todos os onze Estados da Federação pesquisados comprovou-se a infecção por BLV, variando a proporção de sororreagentes entre 9,1% no Estado de Ceará (Abreu 1993) e 44,3% no Estado de Rio de Janeiro (Romero & Rowe 1981, Cunha et al. 1982).

Não foi encontrando nenhum dado na literatura sobre a ocorrência do BLV no Estado do Pará e pelo fato de que os exames sorológicos no país foram feitos exclusivamente através da AGID, os objetivos do presente estudo são de pesquisar a presença do BLV neste Estado e comparar a sensibilidade das duas provas sorológicas que são amplamente utilizadas para o diagnóstico desta doença.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas no presente estudo foram obtidas de 14 rebanhos, criados extensivamente em diferentes regiões do Estado do Pará (Quadro 1). O número de amostras colhidas em cada rebanho variou de 16 a 137, provenientes de animais de diversas faixas etárias. Do total foram examinados 721 amostras pelo ELISA indireto e 668 amostras pela prova de AGID.

As amostras de sangue foram colhidas e os soros preparados a partir da retração do coágulo, conservados em temperatura de -20° C, até a realização dos testes sorológicos.

Para o diagnóstico através do método de ELISA, foi utilizado um kit diagnóstico (Leukosis ELISA kit), fornecido pela Animal Production Unit, Joint FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory, Agency Laboratories Division, Seibersdorf, Austria, que apresenta as seguintes características: O antígeno empregado consistiu na glicoproteína (gp51) de BLV, derivado de cultura de células. Utilizou-se um conjugado comercial constituído por monoclonal anti-bovino IgG1 de camundongo, conjugado com peroxidase de raiz-forte (horseradish peroxidase, HRP, Sigma). Foram utilizados como controle, soros fortemente e fracamente positivos e negativos. Todos estes soros foram de origem de bovino, liofilizados até a utilização.

Os soros para teste foram diluídos a 1:50 e examinados em duplicata. Procedia-se a repetição do exame do soro nos casos em que os valores individuais estivessem fora do valor de PP (por cento de positividade), estabelecido como padrão. A leitura da densidade ótica foi realizada no aparelho de "Immunoscan BDSL" com medição do desenvolvimento de cor de substrato a 450nm. O software foi utilizado o EDI, com o valor 35 de *cut-off*.

A imunodifusão foi realizada segundo Tekes et al. (1984) utilizando-se antígeno glicoprotéico (gp51) produzido pelo laboratório BIOVETA⁶. Utilizando esta metodologia, foram analisadas 60 amostras por placa de Petri de 9 cm de diâmetro.

RESULTADOS

O protocolo utilizado para o recebimento do material, assim como os resultados obtidos nos exames estão resumidos no Quadro 1. Através do ELISA, em todos os rebanhos foram encontrados animais soro-reagentes, e em alguns o índice de infecção variou entre 6,6% e 83,0%, o que representou em termos médios, uma prevalência de 49,8% de animais infectados. Contudo, através de prova da IDAG, dois rebanhos não mostraram-se infectados, e os índices de infecção nos rebanhos infectados variaram entre 5,4% e 49,0% com uma prevalência média de 26,0%.

Na presente triagem não foi possível examinar a distribuição da infecção segundo a faixa etária, porque a idade dos animais somente foi conhecida em alguns rebanhos, mas nestes, a média de infecção sempre foi elevada, aumentando significativamente com a progressão da idade, exceto em bezerros até 3 meses de idade. Em um dos rebanhos foram examinados oito soros de bezerros com a idade variando de 2 a 3 meses, todos mostrando-se soro-positivos através do ELISA, assim como os soros de suas mães.

DISCUSSÃO

Vários estudos epidemiológicos comprovaram a existência de bovinos infectados pelo BLV em todos os Estados da Federação pesquisados. Baseado nestes estudos, deduziu-se que a infecção provavelmente ocorreria também no Estado do Pará, só não imaginava-se que a sua prevalência fosse tão elevada.

Para o Brasil, o método empregado rotineiramente para o diagnóstico desta enfermidade é a prova da AGID (Alencar Filho 1978, Samara et al. 1996).

As diferenças entre as taxas de prevalência encontradas nas diversas regiões do Brasil, podem ser explicadas considerando-se os diferentes tipos raciais, manejo e a tecnologias empregada na criação (Birgel Junior et al. 1995). Este fenômeno que parece ser bem conhecido, é caracterizado pelo fato da enfermidade estar bastante disseminada, principalmente nos rebanhos leiteiros com sistema de criação intensivo. Não obstante, no presente estudo foi surpreendente o fato de que em todos os rebanhos examinados encontraram-se animais sororreagentes, apesar de a grande maioria desses rebanhos ser criada em regime extensivo e ser especializada para a produção de carne. É de amplo conhecimento

⁶BIOVETA Komenského 212, 68323 Ivanovice na Hané, República Tcheca.

Quadro 1. Apresentação do protocolo, dados e prevalência da leucose enzoótica dos bovinos em rebanhos criados no Estado do Pará, através de duas diferentes provas de diagnóstico

No. de ordem	Características dos rebanhos	No. das amostras	Animais soro-reagentes			
			ELISA		AGID	
			n	%	n	%
1.	Raça: Nelore, Piemontes e SRD ^a ; o rebanho de 46 animais; idade 3 a 5 anos	46	20	43,4	9	19,5
2.	Raça: Nelore, rebanho com 180 animais; soro de fêmeas adultas	30	2	6,6	0	0
3.	Raça: Nelore e 1/2 sangue; rebanho com mais que 1.000 animais; idade 2 a 3 anos.	16	9	56,2	0	0
4.	Raça: Nelore e 1/2 sangue; de 200 animais diferentes rebanhos; e idade	29	11	37,9	5	17,2
5.	Raça: Nelore puro e 1/2 sangue; vacas e novilhas.	31	14	45,1	2	6,4
6.	Raça: Simental, Holandês, Girolando, Indubrasilcom com a maioria Nelore; 2 a 7 anos.	53	44	83,0	26	49,0
7.	Raça: Nelore e 1/2 sangue fêmeas entre 3 a 16 anos.	137	74	54,0	38	27,7
8.	Raça: Nelore, Simbrasil. Rebanho com 365 animais; soro de vacas entre 3 a 15 anos.	37	19	51,3	2	5,4
9.	Raça: Nelore, Holandês, Girolanda; idade 2,5 a 6 anos.	51	20	39,2	11	21,5
10.	Raça: Nelore e 1/2 sangue. Rebanho: de cerca 1.300 animais; de vacas e novilhas.	126	65	51,5	33	26,1
11.	Raça: Nelore e 1/2 sangue; de vacas e novilhas.	71	36	50,7	29	40,8
12.	Raça: Suiço, Simental, Holandês, Indobrasil; animais entre 2 meses a 5 anos.	41	25	60,9	19	46,3
13.	Raça: Simental e Holstein; fêmeas importadas, com 2 a 3 anos; sangue foi obtido cerca 2 meses após a chegada no Brasil	31	4	12,9	- ^b	
14.	Raça: SRD; vacas e machos de diferentes rebanhos, > 3 anos	22	16	72,7	-	
	Total	721	359	49,8	174	26,0

^aSRD = sem raça definida.

^bExame não realizado.

que a raça parece ter grande importância na prevalência e disseminação desta enfermidade (Szent-Iványi & Mészáros 1985), porém surge a questão: porque existem rebanhos soro-negativos em gado de corte no Estado de São Paulo e nas outras regiões brasileiras (Birgel et al. 1993)? Seria pela resistência natural desses animais ao vírus, ou porque nestes animais não encontrou-se o vírus, ou a metodologia empregada não é suficientemente eficiente para o diagnóstico da enfermidade?

Algumas vezes é difícil encontrar a fonte da infecção no rebanho. Neste sentido, foram interessantes as observações de Tekes et al. (1984) que, nos rebanhos onde haviam-se colocado machos da raça Frísia-holandesa, com o objetivo de melhoramento genético, todos apresentaram-se infectados, entretanto estavam livres da infecção aqueles rebanhos onde sêmen diluído dos mesmos machos era utilizado para a inseminação artificial.

No rebanho, a infecção pode difundir-se rapidamente, caso não seja realizado um controle voltado para a erradicação da doença. A experiência geral demonstra que um rebanho com 15 a 20% de soropositividade, a frequência da infecção aumenta de 60 a 70% em 2 a 3 anos (Mészáros et al. 1986). A difusão da doença parece ser mais lenta no Estado do Pará pela extensão territorial e forma de manejo utilizado, porém em alguns casos, as manifestações no Brasil também foram muito se-

melhantes das observadas em outros países (Samara et al. 1996).

As diferenças observadas entre os resultados obtidos através do ELISA e da AGID foram bastante evidentes em alguns rebanhos (no. 3, 5, 8) e, em outros casos os resultados foram semelhantes (no. 11, 12, Quadro 1), porém em todos os casos o ELISA manifestou-se mais sensível e, somente dois animais foram positivos através da AGID e negativos pelo ELISA. Em conjunto, considerando-se os resultados em AGID, a proporção da infecção (26,0%) está na média, entretanto, baseada nos resultados obtidos pelo ELISA, 49,8%. Conforme calculado entre dois testes utilizando-se estatística, $kappa$ é 0,99, onde o ensaio referente é a AGID; o Estado do Pará está altamente infectado.

Na literatura internacional acumulam-se dados nos últimos anos sobre a maior sensibilidade da prova de ELISA do que a AGID (Noda-Gomez et al. 1992, Moreno et al. 1992, Klintevall et al. 1993, Tekes 1994), e no presente estudo, os resultados confirmaram este fato. Apesar de tudo, torna-se difícil explicar através do presente trabalho porque ocorreu alta prevalência da infecção em alguns rebanhos quando utilizou-se a prova de ELISA e pouco frequente (no. 15 e 8) ou nula (no. 3) quando foi utilizada a prova da AGID (Quadro 1). Moreno et al. (1992) constataram que existem diferenças na sensibilidade entre os "kits" empregados no diagnóstico des-

ta enfermidade, oferecidos pelo mercado internacional. No presente estudo, pode-se especular que a qualidade dos "kits" utilizados, produzidos e fornecidos pela Joint FAO/IAEA, tenha sido responsável pela alta sensibilidade demonstrada pelos mesmos. Estes "kits" têm sido adaptados em vários países e em diferentes condições ambientais, parecendo desta forma serem mais sensíveis e específicos (Moreno et al. 1992, Noda-Gomes et al. 1992, Klintewall et al. 1993).

Em função dos resultados aqui encontrados, é possível especular-se que o BLV, provavelmente encontra-se disseminada na região Amazônica, devido o desenvolvimento desordenado que vem sofrendo, em especial no setor da pecuária bovina, indicando com que outros Estados da região, ou mesmo os países com fronteiras limítrofes, possam ter esta enfermidade sem ainda existir diagnóstico. Entretanto, se fazem necessárias pesquisas adicionais para avaliar a prevalência da infecção e elaborar um mapa epidemiológico da enfermidade, nas diferentes regiões da Panamazônia.

CONCLUSÕES

1. A Leucose Enzoótica dos Bovinos ocorre também no Estado do Pará e sua prevalência é bastante alta em suas diferentes regiões.

2. A prova de ELISA é mais sensível que a da AGID, sendo portanto mais recomendada para o diagnóstico, controle e erradicação desta enfermidade.

3. Seria importante a realização de um levantamento geral nas diferentes regiões do Estado, para avaliar a difusão da doença, e, ao mesmo tempo, dar início a estudos para o controle e a possível erradicação desta enfermidade.

Agradecimentos.- A Joint FAO/IAEA, Agriculture and Biotechnology Laboratory, Agency Laboratories Division, Seibersdorf, Austria, pelo fornecimento dos "kits" e o apoio no estabelecimento do Setor de ELISA do LIDEA, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Abreu J. M. G. 1988. Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose bovina em animais criados na Bacia Leiteira de Fortaleza, Estado do Ceará. Dissertação (Mestrado), Fac. Med. Vet. Zootec., USP, São Paulo.
- Alencar Filho R. A. 1978. Imunodifusão como recurso diagnóstico da leucemia linfática crônica em bovinos. *Biológico*, S. Paulo, 44:27-28.
- Bause I. & Schmidt F. W. 1980. Zur Persistenz precipitierender Antikörper in Blutseren leukoseinfizierter Rinder unter besonderer Berücksichtigung des Kalbezeitpunktes. *Tierärztl. Umschau* 35:642-649
- Bause I., Maas-Inderwiesen F. & Schmidt E. W. 1978. Results of an epidemiological survey of enzootic bovine leukosis in the northern part of Lower Saxony and a preliminary communication of an examination into the relationship between BLV-antibody development and calving. *Ann. Vet. Res.* 9:765-769.
- Bex F., Bruck C., Mamerickx M., Portetelle D., Ghysdael J. & Cleuter Y. 1979. Humoral antibody response to bovine leukemia virus infection in cattle and sheep. *Cancer Res.* 39:11188-1130.
- Birgel Junior E. H., D'Angelino J., Benesi F. J. & Birgel E. H. 1995. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos, em animais da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.* 15:93-99.
- Burridge M. J., Thurmond M. C., Miller J. M., Schmerr M. J. & Van der Maaten M. J. 1982. Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period. *Can. J. Comp. Med.* 46:270-271.
- Cockerell G. L. & Rovnak J. 1988. The correlation between the direct and indirect detection of bovine leukemia virus infection in cattle. *Leuk. Res.* 12:465-469.
- Cunha R. G., Teixeira A. C. & Souza D. M. 1982. Antígenos do vírus da leucose bovina e anticorpos precipitantes em bovinos. *Pesq. Agropec. Bras.* 17:1363-1370.
- Da Y., Shanks R. D., Stewart J. A. & Lewin H. A. 1993. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Proc. Natl Acad. Sci.* 90:6538-6541.
- Devare S. G., Stephenson J. R., Sarma P. S., Aaronson S. A. & Chander S. 1976. Bovine lymphosarcoma: development of a radioimmunologic technique for detection of the etiologic agent. *Science* 194:1428-1430.
- Florent G. 1988. An ELISA for the diagnosis of bovine leukemia virus infection. *Vet. Rec.* 123:570-571.
- Graves D. C., Diglio C. A. & Ferrer J. L. 1977. A reverse transcriptase assay for detection of the bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* 38:1739-1744.
- Gupta P. & Ferrer J. F. 1981. Comparison of various serological and direct methods for the diagnosis of BLV infection in cattle. *Int. J. Cancer* 28:179-184.
- Have P. & Hoff-Jørgensen R. 1991. Demonstration of antibodies against bovine leukemia virus (BLV) by blocking ELISA using polyclonal anti-BLV immunoglobulin. *Vet. Microbiol.* 27:221-229.
- Hoff-Jørgensen R. 1989. An international comparison of different laboratory tests for the diagnosis of bovine leukosis: suggestions for international standardization. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 22:293-297.
- Jakobsen K. L., Kaneene J. B., Miller J. M. & Bull R. 1985. Comparison of the commercial agar gel immunodiffusion test and radioimmunoprecipitation assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* 46:1430-1433.
- Klintevall K., Berg A., Svedlund G., Ballagi-Pordány A. & Belák S. 1993. Differentiation between enzootic and sporadic bovine leukosis by use of serological and virological methods. *Vet. Rec.* 133:272.
- Kono Y., Sentsui H., Miyamoto T., Morozumi K. & Sacamoto Y. 1982. Changes in antibody titers in cattle infected clinically and subclinically with bovine leukemia virus. *Int. J. Cancer* 30:655-657.
- Mamerickx M., Portetelle D., Burny A. & Lennen J. 1980. Detection by immunodiffusion and radio-immunoassay of antibodies to bovine leukemia virus antigen in sera of experimentally infected sheep and cattle. *Zentralbl. Veterinärmed., Reihe B*, 27:291-297.
- Mészáros J., Antal T., Polner A., Szabó I., Szentmiklóssy Cs. & Tekes L. 1986. [Experiences of the eradication of bovine leukosis in Hungary.] *Magy. Áo. Lapja* 41:277-285.
- Miller J. M. & Olson C. 1972. Precipitating antibody to an internal antigen of C-type virus associated with bovine lymphosarcoma. *J. Natl Cancer Inst.* 49:1459-1461.
- Miller J. M. & Van der Maaten M. J. 1974. A complement-fixation test for bovine leukemia (C-type) virus. *J. Natl Cancer Inst.* 53:1699-1702.
- Miller J. M. & Van der Maaten M. J. 1976. Serologic detection of bovine leukaemia virus infection. *Vet. Microbiol.* 1:195-202.
- Miller J. M., Miller L. D., Olson C. & Gillette K. G. 1969. Virus like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Natl Cancer Inst.* 43:1297-1305.
- Miller J. M., Van der Maaten M. J. & Phillips M. 1976. Various methods of molecular virology, p. 69. In: Burny A. (ed.) *Bovine Leukosis*. EEC, Luxemburg, p. 69.
- Miller J. M., Schmerr J. F. & Van der Maaten M. J. 1981. Comparison of four serologic tests for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* 42:5-8.
- Moreno E., Doltz G., Bonilla J., Jimenez C., Rodriguez L., Salazar I., Raminetz M., Bolanos E., Mora M. & Silva S. 1992. Serological studies on bovine leukemia virus (BLV) infection in Costa Rica by ELISA, immunodiffusion and

- Western blot test. Regional network for Latin América on animal disease diagnosis using immunoassay and labelled DNA probe techniques. IAEA, Vienna, p. 99-114, IAEA-TECDOC 657.
- Murtaugh M. P., Lin G. F., Haggard D. L., Weber A. F. & Meiske J. C. 1991. Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 33:73-85.
- Noda-Gomes J., Perez M., Marreras M. & Abeledo M. A. 1992. The use of ELISA and nucleic acid hybridization test in research and diagnosis of bovine leukosis virus. Regional network for Latin América on animal disease diagnosis using immunoassay and labelled DNA probe techniques. IAEA, Vienna, p. 85-91, IAEA-TECDOC-657.
- Portetelle D., Bruck C., Bex F., Burny A., Dekegel D. & Mammerickx M. 1978. Detection of complement-dependent lytic antibodies in sera from bovine leukemia virus-infected animals by the 51 Cr-release assay proceedings. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 86:955-959.
- Portetelle D., Bruck C., Mammerickx M. & Burny A. 1983. Use of monoclonal antibody in an ELISA test for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. *J. Virol. Methods* 6:19-28.
- Roberts D. H., Lucas M. H. & Swallow C. 1989. Comparison of the agar-gel immunodiffusion test and ELISA in the detection of bovine leukosis virus antibody in cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 22:275-281.
- Romero C. H. & Rowe C. A. 1981. Enzootic bovine leucosis in Brasil. *Trop. Anim. Health Prod.* 13: 107-111.
- Samara S. J., Lima E. G. & Nascimento A. A. 1996. Evolução da leucose enzoótica bovina no gado leiteiro da região de Pitangueiras (SP). X Congr. Panam. Med. Vet., Campo Grande, p. 261. (Resumo)
- Szent-Iványi T. & Mészáros J. 1985. [Doenças Infeciosas dos Animais Domésticos.] *Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.*
- Tekes L. 1994. Influence of management technology and parturition on antibody levels in cows with bovine leucosis. *Acta Vet. Hung.* 42:57-67.
- Tekes L., Máté Zs. & Ruzska Gy. 1984. [A serological survey on the distribution of leucosis in different cattle breeds in Hungary]. *Magy. Áo. Lapja* 39:202-204.
- Thurmond M. C. 1987. Economics of enzootic bovine leukosis, p. 71-84. In: Burny A. & Mammerickx M. (ed.) *Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus.* Martinus Nijhoff Publishing, Boston.