

## EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN EN GEL AGAR PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA LEUCOSIS ENZOOTICA BOVINA

### Assessment of the Efficacy of the Agar Gel Immunodiffusion Test for the Detection of Antibodies Against the Enzootic Bovine Leukosis Virus

Zoraida Nava<sup>\*1</sup>, César Obando<sup>\*\*</sup>, Magaly Bracamonte<sup>\*\*</sup>, Aurico Sousa<sup>\*</sup> y Mayra Hidalgo<sup>\*\*</sup>

*\*Cátedra de Microbiología e Inmunología, Departamento de Patología Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela (FCV-UCV), Apartado 4563, Maracay 2101A, estado Aragua, Venezuela. \*\*Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Sanidad Animal, Apartado 70, Maracay 2101A, estado Aragua, Venezuela*

**Correo-E:zomnav@gmail.com**

Recibido:26/10/11 - Aprobado: 13/07/12

#### RESUMEN

Se evaluó la eficacia de la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) para la detección de anticuerpos contra el virus de la leucosis enzoótica bovina (VLEB), comparándola con el ensayo inmunoenzimático (ELISA). Se procesaron 360 muestras de suero bovino para ambas pruebas, siguiendo las indicaciones del fabricante. El grado de concordancia (GC), valores predictivos (VP) y razones de verosimilitud (RV) fueron determinados y analizados. El GC entre ambas pruebas resultó ser del 86,4%, con un coeficiente Kappa (K) = 0,7. La IDGA detectó una significativa ( $P < 0,001$ ) menor proporción (47,2%) de sueros positivos que el ELISA (60,8%). La sensibilidad de la IDGA resultó ser del 77,6% por debajo de lo deseado, mientras que tuvo un 100% de especificidad. El VP positivo de 100% y la razón de verosimilitud positiva RV con valor indeterminado ( $\infty$ ), mostraron que ésta es una prueba segura para la identificación de bovinos infectados con el VLEB. Contrariamente, el VP negativo de 74,2% y la RV negativa de 0,2, indican que existe una baja probabilidad, de que los bovinos con resultados seronegativos al

#### ABSTRACT

The efficacy of the agar gel immunodiffusion test (AGID) for the detection of antibodies against the enzootic bovine leukosis virus (EBLV) was evaluated and compared with the ELISA test. A total of 360 bovine serum samples were tested for both tests, following the manufacturer instructions. The agreement degree (AD), predictive values (PV), and coefficient of probability (CP) were determined and analyzed. There was a good AD between both tests (86.4%; Kappa coefficient = 0.7). The AGID test detected a significant ( $P < 0.001$ ) lesser proportion (47.2%) of positive sera than the ELISA test (60.8%). The AGID sensitivity was 77.6% lower than the expected, while there was 100% specificity. The positive PV of a 100% and the positive CP with an undetermined value ( $\infty$ ) showed that AGID is a safe test for the detection of cattle infected with EBLV. In contrast, the negative PV of 74.2% and the negative CP of 0.2 indicate that there is a slight probability that cattle, whose sera were negative to EBLV using the AGID, are really free of EBLV infection. These results suggest that AGID is a suitable test for epidemiological studies, in

<sup>1</sup> A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

VLEB, estén realmente libres de la infección por el VLEB. Los resultados sugieren que la IDGA es una prueba adecuada para estudios epidemiológicos en poblaciones con alta prevalencia del VLEB, por ser baja la posibilidad de generar resultados falsos positivos. Sin embargo, en poblaciones de baja prevalencia, su uso estaría restringido, debido a la considerable probabilidad de emitir resultados falsos negativos. En consecuencia, el ELISA debería ser la prueba de elección en programas de erradicación. Este trabajo es una contribución para el control y erradicación de la leucosis enzoótica bovina, al aportar información que permite seleccionar la técnica más adecuada, según la situación epidemiológica de esa enfermedad en la zona y el objetivo sanitario que se persigan.

**(Palabras clave:** Virus leucemia bovina, técnica de inmunodifusión, ELISA, anticuerpos)

populations with high EBLV prevalence, due to the minor risk of producing false positive results. However in populations with low prevalence of the disease, the use of the AGID test would be restricted due to the high possibility of giving false negative results. Therefore, the ELISA should be the test selected for eradication programs. This work is a contribution to the control and eradication programs of the enzootic bovine leucosis, since it provides information which allows the selection of the most adequate technique, according to the epidemiological status of this disease in the zone and the sanitary target pursued.

**(Key words:** Bovine leukaemia virus, immunodiffusion test, ELISA, antibodies)

## INTRODUCCIÓN

La leucosis enzoótica bovina (LEB), también llamada leucemia, linfoma maligno o linfosarcomatosis es una enfermedad de curso crónico e inaparente, ampliamente distribuida, ocasionada por el virus de la leucosis enzoótica bovina (VLEB). En los bovinos infectados, se ha descrito una fase inicial de la enfermedad con seroconversión contra la glicoproteína (gp51) antigénica, en la cual no hay manifestaciones características, tales como: linfosarcomatosis (LS), linfocitosis persistente (LP) o adenopatías; posteriormente, del 30% al 70% de ellos genera LP o LS (Johnson y Kaneene, 1992; Leuzzi *et al.*, 2001; Monti, 2005). La transmisión del VLEB puede ser vertical u horizontal, esta última por ingestión de calostro o leche de vacas infectadas, picadura de artrópodos hematófagos o por el uso de agujas hipodérmicas, guantes ginecológicos o contacto directo (Leuzzi *et al.*, 2001; Kohara *et al.*, 2006). La enfermedad es importante por el gran impacto económico que genera, debido a muerte de animales, decomiso a nivel de matadero, disminución en la producción de leche, segregación prematura de afectados, disminución de la eficiencia reproductiva; además de las limitaciones al comercio internacional

de reproductores o material genético (D'angelino *et al.*, 1998; Sandev *et al.*, 2004; Trainin y Brenner, 2005) y del potencial zoonótico del VLEB, el cual, aún no ha sido demostrado consistentemente. La presencia de la gp51 del virus sugiere que en el 7% de pacientes con carcinoma canicular del seno, la ingestión de leche de vacas infectadas con el VLEB es la vía de infección más importante. (Ochoa *et al.*, 2006). Recientemente, en humanos y animales, se identificó tanto el genoma del VLEB, en células mononucleares y líneas celulares, como los anticuerpos (Acs) anti-VLEB en suero, revelando la presencia por primera vez en el hombre, del provirus y el elevado riesgo para la salud (Nikbakht *et al.*, 2010). Las recomendaciones generales propuestas a nivel internacional para el control y la erradicación de la LEB, a pesar de no estar acreditadas, se han basado en pruebas serológicas, sacrificio, segregación y medidas correctivas de manejo de los rebaños; entendiéndose que el saneamiento de rebaños infectados con el VLEB no es fácil y que depende en gran medida de los niveles de prevalencia (Kaja *et al.*, 1984; Thurmond, 1991; Johnson y Kaneene, 1992; Tekes, 1994; Servicio Nacional de Sanidad, 2004; Monti, 2005; Suh *et al.*, 2005). La inmunoprofilaxis en el campo experimental no

ha tenido mucho éxito hasta el presente (Johnson y Kaneene, 1992). El VLEB es un virus oncogénico que presenta tropismo marcado por linfocitos B y, en menor grado, por linfocitos T y monocitos, en los cuales se replica, trayendo como resultado un animal seropositivo e infectado de por vida (Monti, 2005). La infección por el VLEB estimula una respuesta humoral frente a las principales proteínas virales, gp 51 y proteína del núcleo p24, generando Acs específicos contra éstas, lo que constituye el fundamento de las pruebas serológicas de diagnóstico (Simard *et al.*, 2000; Leuzzi *et al.*, 2001; Felmer *et al.*, 2006). La inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA), son las pruebas serológicas más utilizadas para el diagnóstico y vigilancia de la LEB (Organización Internacional de Epizootias, 2004). Estas pruebas tienen la ventaja de ser económicas, fáciles de usar, sencillas y permiten analizar un número considerable de muestras simultáneamente (Martín *et al.*, 2000; Camargos *et al.*, 2003; Felmer *et al.*, 2006; Betancur y Rodas, 2008; Nava *et al.*, 2011). A pesar de que existen reportes previos en otros países, es conveniente evaluar la sensibilidad y especificidad del IDGA con respecto al ELISA (Simard *et al.*, 2000; González *et al.*, 2001), particularmente en las condiciones tropicales de Venezuela, motivado a que se han señalado discrepancias con relación a la efectividad del IDGA (Monroy *et al.*, 1993; Felmer *et al.*, 2006). Adicionalmente, no hay reportes en Venezuela sobre la comparación de la eficacia de la IDGA vs. ELISA como herramientas diagnósticas.

Por los antecedentes expuestos, se realizó un ensayo para evaluar la eficacia de la prueba de IDGA, utilizando como técnica de referencia un estuche de ELISA comercial, el cual ha sido utilizado mundialmente, cuya sensibilidad y especificidad son mayores de 95% (Martín *et al.*, 2000; González *et al.*, 2001; Felmer *et al.*, 2006; Rama, 2009).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Muestras*

En este estudio se utilizaron 360 muestras de suero, provenientes de 331 de vacas ordeño y 29 reproductores, todas obtenidas de bovinos mayores de 2 años de edad, ubicados en fincas lecheras del estado Barinas, Venezuela, bajo el sistema de manejo

semiintensivo con pastoreo tradicional, durante el año 2007. Una vez separados los sueros previa centrifugación, éstos fueron mantenidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Las muestras de suero fueron procesadas para determinar la presencia de Acs contra el VLEB, mediante IDGA y ELISA, usando estuches comerciales (Pourquier, Francia, P00410 y PO2120), respectivamente, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para la detección de Acs por IDGA, se preparó agar al 0,95% en solución tampón Tris-HCl con NaCl (pH: 8,6), de la cual se dispensaron 18 mL en placas de Petri (Schott Duran®) descartables de 85 mm, y se dejaron en posición horizontal hasta su solidificación. Posteriormente, se perforaron siete orificios, de 6 mm de diámetro c/u, equidistantes entre sí, uno central para el antígeno y seis periféricos, donde se agregaron los sueros problema sin diluir y el suero control positivo. Las placas se incubaron en cámara húmeda a  $21^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ), por 72 h. Los resultados se interpretaron como positivos, negativos o dudosos, siendo considerados como positivos aquellos con líneas de precipitación idénticas a las del control positivo (E4 europeo, diluido 1/10 en suero bovino negativo).

En el caso del ELISA, volúmenes de 200  $\mu\text{L}$  de las muestras de suero y de los controles, diluidos 1/20 en solución tampón para dilución (suministrada en el estuche), se agregaron por duplicado en los pocillos pre-absorbidos con antígeno de VLEB (columnas pares) y en los pocillos correspondientes a los controles de antígeno, carentes de proteína vírica (columnas impares), en placas de microtécnica de 96 pozos. Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por una hora y se lavaron con solución tampón de fosfatos, manualmente, tres veces consecutivas, cada vez a razón de 300  $\mu\text{L}$  por pozo. Seguidamente, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de conjugado por pozo, diluido 1/100 en solución tampón para dilución, se incubaron y lavaron tal como se describió previamente. Luego, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de solución sustrato por pozo, dejándose actuar por 20 min a  $21^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) y se frenó la reacción con 100  $\mu\text{L}$  de solución de parada 0,5M. Posterior a la etapa de frenado, se realizó la lectura de la placa, en un tiempo máximo de una hora, a 450 nm en un espectrofotómetro ELx800 (Biotek Instrument, Inc). Los valores de densidad óptica (DO) de las muestras y sueros controles se corrigieron restándole a los valores de DO de los

pocillos pre-adsorbidos con antígeno (columnas pares), los valores correspondientes de DO de los controles de antígeno (columnas impares). Para la interpretación correspondiente, se calculó para cada muestra el porcentaje de positividad con respecto al control positivo (% S/P), como sigue:

$$\% S/P = \text{DO corregida del suero problema} / \text{DO corregida control positivo} \times 100.$$

Las muestras de suero con % S/P  $\geq 115\%$  se consideraron positivas. Las muestras con % S/P entre 85% y 115% se consideraron dudosas y las muestras que resultaron  $< 85\%$  se dieron como negativas.

Los resultados de la prueba de IDGA se compararon con los obtenidos por ELISA, esta última considerada la de referencia por su alta sensibilidad y especificidad, a fin de analizar el grado de concordancia entre ambas pruebas, con el uso del índice Kappa (K), el cual fue estimado manualmente. Además, se determinó el valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), razón de verosimilitud positiva (RVP) y razón de verosimilitud negativa (RVN), utilizando para su cálculo las fórmulas correspondientes.

Criterios de interpretación para el coeficiente Kappa (Aranguren, 2003).

| Kappa                 | Grado de acuerdo |
|-----------------------|------------------|
| K con valores $< 0,3$ | Deficiente       |
| $K \geq 0,3 \leq 0,5$ | Aceptable        |
| $K \geq 0,5 \leq 0,7$ | Buena            |
| $K > 0,7$             | Excelente        |

Guía aproximada para la interpretación de las razones de verosimilitud (Fernández, 2011)

| RVP           | RVN              | Probabilidad estudiada |
|---------------|------------------|------------------------|
| $RV > 10$     | $RV < 0,1$       | Amplia                 |
| $5 < RV < 10$ | $0,1 < RV < 0,2$ | Moderada               |
| $2 < RV < 5$  | $0,2 < RV < 0,5$ | Pequeña                |
| $1 < RV < 2$  | $0,5 < RV < 1$   | Insignificante         |

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La infección por el VLEB se asocia directamente con la respuesta de anticuerpos contra el virus, de allí la importancia de valerse de pruebas serológicas de alta sensibilidad y especificidad (González et al., 2001; Leuzzi et al., 2001; Nava et al., 2011).

Como se observa en la Figura 1, la prueba

de IDGA identificó menor número de bovinos seropositivos, 170/360 (47,22%), que la prueba de ELISA (219/360; 60,83%), siendo esta diferencia de seropositivos estadísticamente significativa ( $P < 0,0001$ ).

En la Tabla 1, se observa que la prueba IDGA tuvo una concordancia de 86,4%, con respecto a la del ELISA, con un valor Kappa de 0,7, indicativo de un buen grado de acuerdo. La validez de una prueba diagnóstica es el grado en el cual dicha prueba mide lo que se supone que se desea medir, siendo la sensibilidad y especificidad los parámetros que mejor la estiman. Estos parámetros definen su validez, independientemente de cuál sea la prevalencia de la enfermedad en la población a la cual se aplica; sin embargo, estos parámetros cuando se aplican en poblaciones en las cuales la situación de la enfermedad a investigar es desconocida, no aportan información suficiente sobre el comportamiento de la prueba (Pita y Pértegas, 2003; Jaimes, 2007).

La sensibilidad relativa de la IDGA al compararla con el ELISA resultó en 77,6%, es decir, por debajo de lo deseado para una prueba eficaz. En este caso, IDGA deja de detectar 49/219 (13,41%) sueros positivos, desempeño que podría influir negativamente si la empleáramos en un programa de erradicación.

La mayor proporción de bovinos seropositivos detectados por ELISA probablemente se debe a la

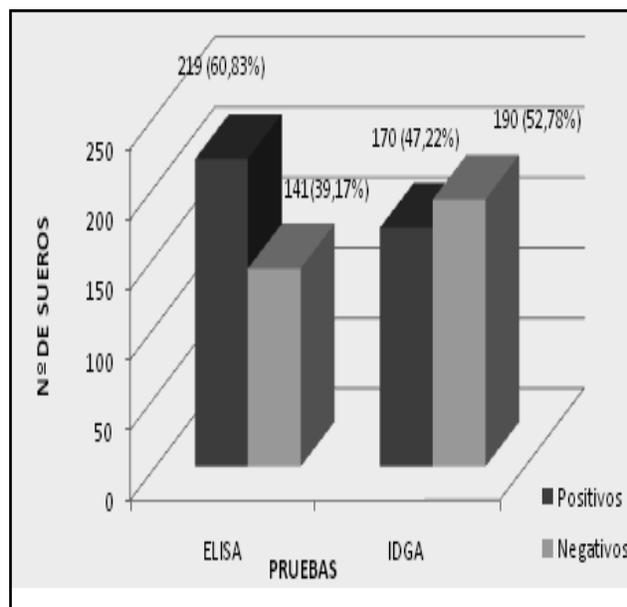


Figura 1. Distribución de la detección de anticuerpos contra el virus de la Leucosis Enzoótica Bovina en 360 sueros bovinos, por IDGA y ELISA

**Tabla 1.** Concordancia en la detección de anticuerpos contra el virus de la Leucosis Enzootica Bovina, entre ELISA e IDGA, de 360 sueros bovinos procesados

|       | ELISA    |          | Concordancia |     |      |
|-------|----------|----------|--------------|-----|------|
|       | Positivo | Negativo | Total        | (%) |      |
| IDGA  | Positivo | 170      | 0            | 170 | 86,4 |
|       | Negativo | 49       | 14           | 190 |      |
| Total |          | 219      | 141          | 360 |      |

Valor Kappa: 0,7

IDGA

Sensibilidad % : 77,6

Especificidad %: 100,00

Prevalencia aparente %: 47,2

Valor predictivo positivo (%): 100,00

Valor predictivo negativo (%): 74,2

Razón de verosimilitud positiva :  $\infty$

Razón de verosimilitud negativa: 0,2

Leucosis Enzootica Bovina: LEB

mayor sensibilidad de la prueba, planteamiento que coincide con lo reportado en Canadá, Argentina, Chile y Uruguay, donde se señala que es poco probable que se deba a falsas reacciones positivas del ELISA (Simard *et al.*, 2000; González *et al.*, 2001; Felmer *et al.*, 2006; Rama, 2009), condición que permite dejar muy pocos animales con Acs sin detección o falsos negativos. En consecuencia, esta prueba serológica pareciera ser de elección para realizar planes de control o erradicación de la LEB.

En relación al porcentaje de especificidad de la IDGA (100%), la cual detectó un mayor número de animales negativos (190), en comparación a los identificados negativos por ELISA (141), sugiere que la utilización de la IDGA tiene menos riesgos que la prueba de ELISA en la identificación de falsos positivos.

Simard *et al.* (2000); González *et al.* (2001); Felmer *et al.* (2006) y Rama, (2009), publicaron resultados análogos al comparar el ELISA e IDGA en el diagnóstico de LEB. En contraposición a lo obtenido en el presente trabajo, Monroy *et al.* (1993), reportaron que las pruebas IDGA y ELISA, usadas para la detección de Acs frente a LEB, tienen similar sensibilidad e igual especificidad, concluyendo que cualquiera de las dos técnicas pudieran ser efectivas en estudios epidemiológicos, siendo más ventajosa la

IDGA por su bajo costo y facilidad de ejecución. No obstante, Martín *et al.* (2000), en España, reportaron que para estudios epidemiológicos, en regiones de alta prevalencia, se pudiera elegir la prueba de IDGA para minimizar la posibilidad de detectar animales falsos positivos. Por otro lado, en regiones de baja prevalencia sería conveniente utilizar el ELISA para evitar resultados falsos negativos.

El VPP de la prueba de IDGA reflejó que esta prueba cuenta con un nivel muy bueno de seguridad, significando que el 100% de los bovinos que resultaron positivos tenían realmente Acs contra el VLEB. Sin embargo, el VPP depende en gran medida de la prevalencia previa de la enfermedad en la población que se desea estudiar, por consiguiente, cualquier modificación en la composición de la población bajo estudio, puede afectar los resultados observados o esperados en dichos valores, aun en presencia de la misma sensibilidad y especificidad (Sánchez *et al.*, 2006). El VPN de IDGA (74,2%) demuestra una situación diferente, ya que de los bovinos con resultado negativo, sólo el 74,2% podrían estar realmente libres de LEB.

La RVP y RVN, las cuales relacionan la sensibilidad y especificidad en un mismo índice, no varían con la prevalencia, lo cual permite utilizarlas como índices de comparación de distintas pruebas de diagnóstico (Sánchez *et al.*, 2006). La RVP obtenida para IDGA ( $\infty$ ), indica que un animal con resultado positivo tendrá una probabilidad amplia de valor indeterminado ( $\infty$ ) de estar infectado con el virus de la LEB. El resultado correspondiente a la RVN de la prueba de IDGA (0,2), significa que un animal con resultado negativo es poco probable que no esté infectado con el virus. Para Sánchez *et al.* (2006) y Fernández (2011), cuanto más alto sea el valor de RVP, mejor será la prueba para diagnosticar una enfermedad determinada, por el contrario, cuanto más bajo sea el valor de la RVN mejor será la prueba para excluir la enfermedad, refiriendo que los valores de RVP > 10 y de RVN < 0,1, resultan ser los más idóneos para clasificar una prueba como segura.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de verosimilitud, son indicativos de que la IDGA, es una prueba segura

en la detección de los bovinos infectados con el VLEB, en poblaciones con alta prevalencia al virus, debido a la baja posibilidad de generar falsos resultados positivos. Por el contrario, al utilizarla en poblaciones de baja prevalencia, existe una posibilidad baja de emitir resultados falsos negativos. En consecuencia, se indica el uso de la IDGA para el estudio epidemiológico de poblaciones con alta prevalencia, sugiriéndose el ELISA en áreas con baja prevalencia.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela (UCV), por el apoyo financiero otorgado a través del Proyecto bajo N°: PI 11-00-6776-2007-2; a la Coordinación de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV, por otorgar parte del financiamiento en viáticos y el vehículo, para efectuar la recolección de muestras de sangre en Barinas; al Sr. Rangalvi Velásquez, técnico asociado a la investigación del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Sanidad Animal, por su ayuda en la graficación de datos y a la Sra. Arelys Blanco, auxiliar de Laboratorio de la Cátedra de Microbiología e Inmunología de la UCV, quien colaboró en la preparación de los agares a ser usados en esta investigación.

## REFERENCIAS

Aranguren, F. 2003. Detección temprana de la Encefalitis Equina Venezolana en cerebro de ratón lactante por inmunofluorescencia indirecta. Tesis de Maestría. Postgrado en Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Aragua, Venezuela. 132 p.

Betancur, C.; Rodas, J. 2008. Seroprevalencia del virus de la Leucosis Viral Bovina en animales con trastornos reproductivos de Montería. *Rev. MVZ Córdoba*, 13:1197-1204.

Camargos, M.; Stancek, D.; Lessa M.L.; Reis, J.K.; Rocha, M.A.; Leite R.C. 2003. Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase e comparação com a imunodifusão em gel de Agar na detecção de infecções pelo vírus da leucemia bovina. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 40:341-348.

D'angelino, J.L.; Garcia, M.; Birgel, E.H. 1998. Productive and reproductive performance in cattle

infected with bovine leukosis virus. *J. Dairy. Res.*, 65:693-695.

Felmer, R.; Zuniga, J.; Recabal, M. 2006. Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la Leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. *Arch. Med. Vet.*, 38:137-141.

Fernández, D. 2011. Contribución al estudio epidemiológico de la brucelosis bovina en la Comunidad Autónoma de Galicia: investigación y aplicabilidad de nuevas técnicas diagnósticas. Tesis Doctoral. Postgrado en Medicina Veterinaria, Universidade Santiago de Compostela, España. 228 p.

González, E.T.; Oliva, G.A.; Valera, A.; Bonzo, E.; Licursi, M.; Etcheverrigaray, M.E. 2001. Leucosis Enzoótica Bovina. Evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Anal. Vet.*, 21:12-20.

Jaimes, F. 2007. Diagnostic tests: use and interpretation. *Acta Med. Colomb.*, 32:29-33.

Johnson, R.; Kaneene, J.B. 1992. Bovine Leukemia virus and Enzootic Bovine Leukosis. *Vet. Bull.*, 62: 287-312.

Kaja, R.; Olson, C.; Rowe, R.; Stauffacher, R. 1984. Establishment of a bovine leukosis virus free dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 184:184-185.

Kohara, J.; Konnai, S.; Onuma, M. 2006. Experimental transmission of bovine leukemia virus cattle via rectal palpation. *Jpn. J. Vet. Res.*, 54:25-30.

Leuzzi, L.; Fernández, A.; Alcindo, A. 2001. Revisão: Leucose enzoótica bovina e vírus da leucemia bovina. *Semina Ci. Agrárias Londrina*, 22:211-221.

Martín, D.; Arjona, A.; Viana, L.; Soto, I.; Barquero, N.; Gómez, L.E. 2000. Comparación de métodos serológicos y virológicos para el diagnóstico de la infección por el virus de la leucosis bovina enzoótica (BLB). *Med. Vet.*, 17:133-141.

Monti, G. 2005. Epidemiology, infection dynamics and effective control of Bovine Leukemia Virus within dairy herds of Argentina: a quantitative approach. Ph.D. Thesis, Quantitative Veterinary Epidemiology Group, Wageningen, Institute of Animal Science, Wageningen University, Germany. 161 p.

Monroy, J.; Trigo, F.; de Aluja, A.; García, R. 1993. Estudio comparativo entre las pruebas de ELISA e inmunodifusión en el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina. *Vet. Mex.*, 24:21-25.

Nava, Z.; Obando, C.; Molina, M.; Bracamonte, M.; Tkachuk, O. 2011. Seroprevalencia de la Leucosis Enzoótica Bovina y su asociación con signos clínicos y factores de riesgo en rebaños lecheros del estado

- Barinas, Venezuela. *Rev. Fac. Cs. Vets. UCV.*, 52: 13-23.
- Nikbakht, G.; Rabbani, M.; Emam, M. and Rezatofghi, E. 2010. Serological and genomic detection of bovine leukemia virus in human and cattle samples. *Int. J. Vet. Res.*, 4:253-258.
- Ochoa, A.; Uribe, A.; Gutiérrez, M. 2006. Estudio del potencial zoonótico del virus de la leucosis bovina y su presencia en casos de cáncer de seno. *Universitas Scientiarum.*, 11:31-40.
- Organización Internacional de Epizootias. 2004. Manual de pruebas estándar para el diagnóstico y vacunas. Capítulo 2, 3 y 4, Leucosis Bovina Enzoótica. pp. 503-513. OIE, Francia.
- Pita F, S.; Pértegas D, S. 2003. Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. *Cad. Aten. Primaria.*, 10: 120-124.
- Rama, G. 2009. Aspectos sobre el diagnóstico de Leucosis Enzoótica Bovina. Tesis de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 40 p.
- Sánchez, A.; Arraga, C.; Villarroel, R.; Pino, D.; García, D.; Sánchez, G. 2006. Validez, seguridad y coeficiente de verosimilitud de los métodos tiras reactivas para orina y examen microscópico del sedimento urinario en el diagnóstico de Hematuria Enzoótica Bovina. *Rev. Cient. FCV- LUZ.*; XVI: 604-612.
- Sandev, N.; Koleva, M.; Binev, R.; Ilieva, D. 2004. Influence of enzootic bovine leucosis upon the incidence of subclinical mastitis in cows at a different stage of infection. *Vet. Arch.*, 74:411-416.
- Servicio Nacional de Sanidad. 2004. Manual de procedimientos para Leucosis Bovina Enzoótica. Dirección de Luchas Sanitarias. SENASA, 25 p.
- Simard, C.; Richardson, S.; Dixon, P.; Belanger, C.; Maxwell, P. 2000. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. *Can. J. Vet. Res.*, 64:101-106.
- Suh, G.H.; Lee, J.Ch.; Lee, Ch.Y.; Hur, T.Y.; Son, D. S.; Ahn, B.S.; Kim, N.Ch.; Lee, Ch.G. 2005. Establishment of a bovine leukemia virus-free dairy herd in Korea. *J. Vet. Sci.*; 6:227-230.
- Tekes, L. 1994. Influence of management technology and parturition on antibody levels in cows with bovine leukosis. *Acta. Vet. Hung.*; 42:57-67.
- Trainin, Z.; Brenner, J. 2005. Review: the direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. *Isr. J. Vet. Med.*, 60:94-105.
- Thurmond, M. 1991. Calf management to control bovine leukemia virus infection. *Cornell Vet.*, 81:227-231.