

Leucosis Enzoótica Bovina: estudio seroepidemiológico en rebaños de cría de la provincia de La Pampa – Argentina

ALVAREZ RUBIANES, N¹.

¹Facultad de Ciencias Veterinarias - UNLPam.

alruni@hotmail.com

RESUMEN

La infección por el virus de la leucosis bovina (VLB) es pandémica y si bien la seroprevalencia en rebaños lecheros, es tema de innumerables trabajos, ello no ocurre en rebaños productores de carne. Ante la inminente implementación en Argentina del Plan Nacional de Control y Erradicación de la leucosis enzoótica bovina, acompañando a otros planes en vigencia, es necesario conocer sobre que parámetros se trabajará, cual es la prevalencia de infección y cuales los factores de riesgo asociados a nuestras condiciones de manejo y sistemas de producción. Se analizó la presencia y magnitud de la leucosis enzoótica bovina en 1798 muestras de suero de vacas pertenecientes a 30 rebaños de cría, estratificados en categorías de acuerdo al tamaño de los mismos y distribuidos en el departamento Mará-Có, de la provincia de La Pampa – Argentina. Los sueros fueron evaluados por la presencia de anticuerpos anti-VLB, utilizando la técnica de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y la totalidad de las muestras de sueros de los rebaños, en donde se evidenció al menos un animal positivo, se corroboraron utilizando una prueba ELISA. A efectos de evaluar factores de riesgo asociados con la transmisión del VLB, y teniendo en cuenta las condiciones de manejo y sistemas de producción regionales, se requirió en cada predio contestar un cuestionario referente a tamaño y características del rebaño y variables de manejo, reproductivas, alimenticias y sanitarias. Se detectaron en 3 de los 30 rebaños analizados, un animal positivo en cada uno de ellos, resultando una prevalencia predial del 10% y una poblacional del 0,17%. Los rebaños clasificados como positivos, corresponden a la categoría de pequeños, lo que lleva implícito características de los mismos, que podrían constituirse en factores de riesgo de esta enfermedad. Se sientan las bases para profundizar en estudios de este tipo en otras regiones de la provincia de La Pampa y del resto del país, haciendo especial énfasis en la valoración de rebaños de pequeños productores, por las características particulares en cuanto a la comercialización y constitución de los mismos.

SUMMARY

Bovine leukosis virus (BLV) infection is pandemic in cattle and there are many seroprevalence studies in dairy herds, but not in beef cattle. A National Program of Control and Eradication of bovine leukosis is ready to start in Argentina, therefore it is necessary to know what is the prevalence of infection and what are the risk factors associated with the management and production systems. The presence of the bovine leukosis was analyzed in 1798 serum samples from 30 beef herds, in the Mará-Có department of La Pampa–Argentina. The samples were tested for the presence of BLV antibodies by agar-gel immunodiffusion, and the samples coming from the herds, where there was at least one positive cow, were all retested by ELISA. In order to evaluate BLV transmission risk factors associated to local conditions of management and production systems, a questionnaire including aspects on herd's size, breeding, alimentary and sanitary status was carried out in each farm. In 3 of the 30 herds studied, there was one positive cow in each one of them. This means 10% of herd prevalence and 0.17% poblacional prevalence. The positive herds belong to the small ones sampled, with particular characteristics that could become in risk factors of the disease. This work could be a precedent to carry out assays of this kind in other regions of La Pampa and to other provinces of the country, making a special emphasis on the evaluation of small herds.

INTRODUCCIÓN

La leucosis enzoótica bovina (LEB) es un cáncer linfoideo de ocurrencia natural en el ganado bovino, causado por un retrovirus exógeno Tipo C, denominado virus de la leucosis bovina (VLB). Taxonómicamente ubicado en la Familia *Retroviridae*, género BLV-HTLV (Murphy et al., 1995).

Si bien la infección con VLB, en la mayoría de los bovinos no está asociada con signos clínicos de la enfermedad, el 30% de los animales infectados pueden desarrollar una linfocitosis persistente, considerada una manifestación benigna, y sólo el 5% o menos desarrollarán linfosarcomas. Esta es una enfermedad de importancia económica debido a la pérdida de mercados que requieren la condición de animales libres de dicha enfermedad, los costos que implican las técnicas de diagnóstico, la eliminación prematura o muerte de animales particularmente de raza de alto valor genético y el

descarte de reses o carcazas en matadero, como así también la menor producción de leche y carne de los rodeos infectados (D'Angelino et al., 1998).

Debido a la alta prevalencia, los costos prohibitivos de cualquier forma de terapia de linfomas en bovinos y la poca perspectiva de lograr vacunas eficientes, el énfasis de los estudios epidemiológicos se ha puesto en conocer la forma de transmisión del VLB y los factores de riesgo asociados a la infección, como también en el desarrollo de programas de control para prevenir la transmisión del agente, minimizar las pérdidas económicas asociadas y lograr finalmente rebaños libres de infección con VLB (Johnson y Kaneene, 1992).

En Argentina no existe un relevamiento real de prevalencia de la enfermedad, aunque se conocen valores puntuales en rebaños lecheros que arrojan cifras bastante alarmantes. Poco se ha estudiado en cuanto a rebaños de carne, tanto en Argentina como en el resto del mundo.

En Argentina durante el periodo 1989-1993 se evaluaron 9.114 bovinos lecheros de raza Holando Argentino y 5.519 bovinos de razas productoras de carne, usando la técnica de inmunodifusión en gel de agar (IDGA), obteniéndose un 9,3 y 1,8% respectivamente de animales positivos a VLB (Huici et al., 1996; Huici et al., 1997).

En la zona denominada "Mar y Sierra", de la provincia de Buenos Aires-Argentina, área de producción lechera que comprende unos 300 establecimientos, usando un ELISA indirecto sobre 4.203 muestras de leche de 73 granjas, 23 granjas (31,5%) estaban libres de infección, 36 (49,4%) tenían una prevalencia de infección de hasta 15%, 13 (17,8%) una prevalencia entre 15 y 30% y 1 granja (1,4%) con prevalencia mayor a 30% (Ghezzi et al., 1997).

Por otro lado, en un estudio realizado sobre 798 muestras de sueros provenientes de 41 rebaños de carne del noroeste de la provincia de Río Negro (Patagonia Argentina), todos fueron negativos para la infección con VLB (Layana et al., 1997).

Evidentemente para poner en marcha un programa de control y erradicación, es prioritario conocer sobre que parámetros se trabajará, cual es la prevalencia de infección y cuales los factores de riesgo asociados a nuestras condiciones de manejo y sistemas de producción.

En el presente proyecto se realiza un estudio seroepidemiológico en rebaños productores de carne de una zona de la provincia de La Pampa-Argentina, a efecto de determinar tasas de prevalencia a VLB asociado con evaluación de factores de riesgo de dicha enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo biológico

Se utilizó a tal efecto, la vaca de cría entre primer y cuarto o más parto, pertenecientes a rebaños ubicados en el departamento Mará-Có de la provincia de La Pampa-Argentina.

Definición de las unidades de observación

Vaca de cría: Toda vaca de cualquier raza productora de carne, perteneciente a un rebaño de al menos 10 vacas de cría en periodo reproductivo, ubicado en el área donde se realiza el estudio.

Rebaño de cría: Que pertenezca a predios ubicados en el área donde se realiza el estudio y cuente con al menos 10 vacas de cría en periodo reproductivo.

Predio: Aquel que dedique toda su superficie o parte de ella a la producción de terneros de razas de carne, que posea un rebaño de al menos 10 vacas de cría en periodo reproductivo y se halle ubicado dentro de los límites del área donde se realiza el estudio.

Diseño de la muestra

Se realizó un muestreo aleatorio estratificado con afijación proporcional de acuerdo al tamaño del rebaño.

Los predios se estratificaron en cuatro categorías de acuerdo al número de vacas que conforman el rebaño de cría (Tabla 1).

Tabla 1.-

DISTRIBUCIÓN DE PREDIOS Y VACAS DE CRÍA, SEGÚN TAMAÑO DE REBAÑO. DEPARTAMENTO MARÁ-CÓ, LA PAMPA - ARGENTINA

Categoría de rebaño	Nº de predios (%)	Nº de vacas (%)	Promedio vacas/predio
10-50	42 (31,3)	1227 (8,2)	29
51-100	38 (28,4)	2678 (17,8)	70
101-200	39 (29,1)	5376 (35,7)	138
> 201	15 (11,2)	5768 (38,3)	385
TOTAL	134 (100,0)	15049 (100,0)	112

Dentro de cada rebaño, las vacas muestreadas se estratificaron en cuatro categorías de acuerdo al número de parto: 1ro., 2do., 3ro.y 4to. o más.

El tamaño muestral (Thrusfield, 1995) se estableció para un prevalencia esperada de 5%, un error relativo del 20% y un α : 0.05, en 1627 vacas de cría distribuidas proporcionalmente en las distintas categorías de rebaño.

A efectos prácticos, entre los 134 rebaños, con un total de 15.049 vacas de cría, presentes en el área geográfica en estudio, se eligieron, en forma aleatoria, 30 rebaños (22,3%) y un total de 1800 vacas (12,0%) distribuidas proporcionalmente en las distintas categorías de rebaño (Tabla 2).

Sobre la base de distribución de predios, según la categoría de rebaño, indicado en Tabla 1, los mismos se numeraron de 1 a 42; 1 a 38; 1 a 39 y 1 a 15 y utilizando el programa de computación VETSTAT, para números al azar, se extrajeron 10, 8, 8 y 4 números respectivamente, y de tal manera se eligieron los predios correspondientes a los números obtenidos. La identificación de cada predio se extrajo de la base de datos correspondientes al departamento Mará-Có, de SENASA, delegación General Pico.

La elección de las vacas a muestrear en cada rebaño, se realizó teniendo en cuenta a los animales a medida que iban entrando a la manga, dado que en la gran mayoría de los predios, las vacas no estaban identificadas individualmente, ni existían registros de cada una de ellas. Tal identificación fue realizada en el momento de la toma de la muestra de sangre, utilizando caravanas con números, que siguen normas de seguridad para evitar la transferencia de sangre de un animal a otro, colocadas en las orejas de cada animal muestreado.

Tabla 2.-

PREDIOS Y VACAS DE CRÍA MUESTREADOS, SEGÚN TAMAÑO DE REBAÑO. DEPARTAMENTO MARÁ-CÓ, LA PAMPA - ARGENTINA

Categoría de rebaño	Predios	%	Vacas/Predio	Total vacas	%
10-50	10/42	23,8	20	200	16,3
51-100	8/38	21,0	40	320	11,9
101-200	8/39	20,5	80	640	11,9
>201	4/15	26,7	160	640	11,1
Total	30/134	22,3		1800/15049	12,0

Muestreo

De las vacas seleccionadas se obtuvo una muestra de sangre por venipuntura de la vena yugular (o en su defecto coccígea media), utilizando aguja y jeringa individual estériles. Obtenido el suero, se transfirió a tubos tipo "Eppendorf" y se mantuvo a -20°C hasta la realización de la prueba.

Por cada rebaño se confeccionó una planilla de trabajo donde consta n° de protocolo, fecha, nombre del propietario/establecimiento, n° de vacas muestreadas y por cada vaca, n° identificadorio, n° de parto, raza y estado general.

Se requirió además, a cada propietario o responsable del predio, contestar un cuestionario referente a características del predio, variables reproductivas (n° ordinal del parto, tipo de preñez y otras), alimenticias (tipo de pastoreo, tipo de alimento) y de manejo (características del rebaño, uso o no individual de elementos como jeringas, marcadores, guantes, etc.).

Prueba inmunodifusion doble en gel de agar (IDGA)

Los sueros fueron evaluados utilizando un "kit" comercial.

La puesta a punto de ésta técnica diagnóstica se realizó utilizando, además del suero control positivo provisto por el "kit", con sueros positivos, débil positivos y negativos, cedidos gentilmente por los doctores Gustavo Montes, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile y Eduardo Esteban, del Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Tandil, Argentina, con resultados de identidad inmunológica comprobable.

RESULTADOS

Características de los rebaños muestreados

Del análisis de la base de datos recopilados en el informe epizootiológico requerido en cada uno de los predios muestreados para la realización del presente estudio, surge que 24 rebaños (80%), corresponden a la condición de cerrados, donde la reposición de los animales de reemplazo se logra a través de vaquillonas de producción propia, mientras que 6 rebaños (20%), obtienen los animales de reemplazo por compra de vaquillonas o vacas de otros productores, configurando la condición de rebaño abierto.

Con respecto al tipo de concepción de las vacas de cría, 29 rebaños (96,7%) utilizan la monta natural con toros propios y sólo 1 rebaño (3,3%), la inseminación artificial para tal propósito.

Surgen además conclusiones con respecto a la forma de alimentar las vacas de cría y al tipo de alimento suministrado. En 10 rebaños (33%) utilizan un pastoreo extensivo, en su gran mayoría sobre praderas naturales, en 17 rebaños (57%) instrumentan la modalidad de pastoreo rotativo, con alta carga animal por tiempo reducido, sobre praderas artificiales consociadas y 3 rebaños (10%) realizan una combinación de ambos procedimientos, de acuerdo a la época del año y a la abundancia de pastos. Ante las condiciones climáticas adversas y la escasez de pastos en invierno, en 23 rebaños (77%) suplementan con rollos de pasto y dentro de ellos en 6 rebaños (26%) suministran además grano en bateas, generalmente maíz y/o sorgo.

Con respecto al análisis de un factor de riesgo como son las prácticas parenterales u obstétricas, surge de los datos obtenidos, que en el 100% de los rebaños no se toman precauciones en cuanto a la desinfección o uso individual de elementos como jeringas, instrumental, guantes, colocado de caravanas, marcación etc.

Características de las unidades de observación

Del análisis de los datos recopilados en la planilla de trabajo realizada durante el muestreo de las vacas en cada uno de los rebaños seleccionados a tal fin, surge que de un total de 1798 vacas muestreadas, 1731 (96,3%) corresponden a animales de razas de aptitud carnífera, tanto puras como cruza y el resto, 67 vacas (3,7%) a razas lecheras, específicamente Holando Argentina o cruza, utilizadas en esos rebaños como vientres para la producción de terneros, que cumplido su ciclo, la finalidad última es la faena para consumo de carne.

En cuanto a la distribución de edades de los animales muestreados, el 13,74% corresponden a vacas de ± 25 meses o primer parto, 14,85% de ± 37 meses o segundo parto, 16,35% de ± 49 meses o tercer parto y el 55,06% de ± 61 a 120 meses o cuarto o más parto.

Prueba IDGA

Los resultados de la prueba IDGA, fueron recopilados sobre una planilla, creada a tal efecto, realizándose lectura a las 24, 48 y 72 hs. Es de destacar que en todos los

casos se evidenciaron, en los sueros control positivo, bandas de precipitación a la lectura de 24 horas.

Seroprevalencia a LEB

En 3 de los 30 rebaños analizados se identificó un animal seropositivo a LEB en cada uno de ellos.

Dichos rebaños, clasificados como positivos, corresponden a la categoría de rebaños pequeños, formados generalmente por acopio de vacas, donde conviven varias razas y específicamente los animales positivos, uno es de raza Holando Argentina de 6to parto, otro es de cruce Holando de 5to parto y el tercero es de raza Cebú de 3er parto, perteneciente al único rebaño, de los analizados, donde la mayoría de las vacas que conforman el mismo son de razas o cruces índicas.

La totalidad de los sueros correspondientes a los rebaños positivos (2x20 y 1x40: 80 sueros) fueron evaluados comparativamente por medio de la técnica de ELISA, gentilmente realizada en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Centro, y cuyos resultados confirmaron los obtenidos por IDGA.

Dada la muy baja prevalencia poblacional observada, nos encontramos frente a un acontecimiento que podríamos calificar como poco frecuente de presentarse para la población en estudio y por lo tanto, ésta variable seguiría una distribución de Poisson (Thrusfield, 1995).

DISCUSIÓN

Si bien son escasos los trabajos aportados tanto por la literatura internacional como nacional que estudien la seroprevalencia a LEB en rebaños productores de carne, todos demuestran valores de la misma muy inferiores a lo que ocurre con los rebaños lecheros. Tal condición estaría relacionada con variables genéticas y de manejo diferenciales de ambos tipos de rebaños, así como ubicación geográfica de áreas evaluadas y asociado además con la menor frecuencia de investigación de ésta enfermedad en rebaños productores de carne.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, 10% de rebaños, con un solo animal positivo en cada uno de ellos, y 0,17% de todos los animales analizados serológicamente positivos a LEB, coinciden con lo descrito en trabajos realizados en Argentina, y específicamente con el valor 0%, obtenido por Layana et al. (1997) en la

provincia de Río Negro (Patagonia Argentina) y por Huici et al. (1995), en las provincias patagónicas de Neuquén, Chubut y Río Negro, evaluación realizada sobre 3000 sueros bovinos de aptitud carnicera, si tenemos en cuenta que dos de los tres animales positivos en éste estudio son de razas lecheras y que actualmente forman parte de rebaños de carne correspondientes a pequeños productores, que constituyen los mismos a partir de acopio de vacas generalmente de descarte de otros tipos de rebaños. El tercer animal seropositivo a LEB corresponde a la raza Cebú. Las razas índicas, en la zona geográfica evaluada, son la excepción y generalmente provienen del norte de Argentina donde es un hecho común la práctica de prepatencia a Babesiosis bovina la que se realiza utilizando sangre entera de animales positivos a la misma, y que se inocula en animales receptores, como forma de lograr un cierto grado de inmunidad contra dicho parásito. Con respecto a éste tema, en un trabajo realizado por el Dr. Eduardo Esteban (comunicación personal), en un rebaño productor de carne de la provincia de Formosa - Argentina, obtuvo altos valores de seroprevalencia a LEB, cercano a 90%. Estos animales habían sido inoculados con sangre entera de vacas lecheras con *Babesia*, las cuales además eran positivas a LEB.

Por otra parte en un trabajo realizado sobre animales de exportación provenientes de 8 provincias argentinas (Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa y La Pampa) donde se analizaron 5519 sueros bovinos de distintas razas de carne (Huici et al., 1997) obtuvieron una seroprevalencia a LEB de 1,8%, con valores extremos de 0% para la provincia de La Pampa y 9,7% para Formosa. El mismo trabajo demostró que las razas con mayor seroprevalencia a LEB, fueron la Brahma, con el 8,7% y la Brangus con 4,8%, coincidiendo con las razas explotadas en el norte de Argentina, como así también con la mayor densidad de insectos hematófagos en esas áreas subtropicales, y asociado a la práctica de prepatencia contra *Babesia sp.* en esas zonas endémicas de dicho parásito.

Con respecto a la prueba de evaluación (IDGA), utilizada en el presente trabajo, la misma es una técnica operativamente sencilla, de relativo bajo costo y realizable en cualquier laboratorio de mediana complejidad, es usada en todo el mundo acompañando planes de control y erradicación de LEB y varios países europeos han logrado dicho propósito utilizando sistemáticamente dicha técnica. La elección de ésta técnica para la evaluación serológica de las muestras en el presente trabajo, se basó justamente en las características expresadas de la IDGA y en el hecho de que en un principio el Plan Nacional de Control y Erradicación de LEB, implementado en Argentina, contemplaba

a la misma como única alternativa. Actualmente también se ha aprobado para tal fin la técnica de ELISA, usadas indistintamente.

La IDGA presenta buenos valores, tanto de sensibilidad como de especificidad (Monke et al., 1992). Dado que ELISA ha demostrado ser algo más sensible (Naif et al., 1992; Otachel-Hawranek et al., 1995; Vega, 1997), la totalidad de los sueros correspondientes a los 3 rebaños, donde se comprobó la seropositividad a LEB de un animal en cada uno de ellos, fueron evaluados comparativamente por dicha técnica para, sobre la base de su mayor sensibilidad, poder captar, en dichos rebaños, algún otro animal que no hubiera podido ser detectado por la técnica de IDGA. Si bien fueron pocos los sueros evaluados por ambas técnicas (80 sueros), es en dichos rebaños donde mayor probabilidad hay de que exista algún otro animal positivo a LEB, dadas las características epidemiológicas del VLB. Sin embargo, ambas técnicas coincidieron en un 100% en la evaluación de dichos sueros, lo que demuestra una alta correlación entre las mismas, brindando de tal manera una seguridad diagnóstica a los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta lo expresado en la Discusión, referente a las razas bovinas resultantes positivas a LEB en el presente estudio, se puede concluir que la seroprevalencia a LEB, en las razas productoras de carne, es eventualmente cero, lo que determinaría la ausencia de ésta enfermedad en los rebaños de cría de la zona geográfica evaluada.

Los resultados obtenidos permitirían lograr oficialmente un área libre de ésta enfermedad, en un todo de acuerdo con el Plan Nacional de Control y Erradicación de la Leucosis Bovina e implementar medidas sanitarias, de manejo y vigilancia epidemiológica, que garanticen la permanencia, a través del tiempo, de tal condición, en los rebaños de cría del área evaluada.

Se debería avanzar en estudios epidemiológicos que permitan evaluar otras zonas, tanto de la provincia de La Pampa como del resto del país, haciendo especial énfasis en la valoración de rebaños de pequeños productores, por las características particulares que imprimen a la comercialización de sus animales y la constitución de los mismos, de tal manera que asociado a lo que ocurre con las otras provincias patagónicas, se pudiera lograr una extensa área libre de ésta enfermedad, que

posesionaría a Argentina en un lugar importante, con ventajas comparativas, de acuerdo a los requerimientos de los mercados internacionales más exigentes, con respecto a la sanidad de los animales de exportación y subproductos cármicos.

BIBLIOGRAFÍA

D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; BIRGEL, E. H. 1998. Productive and reproductive performance in cattle infected with bovine leukosis virus. *Journal of Dairy Reserch* 65, 693-695.

ESTEBAN, E. N. 1987. Leucosis Bovina. A. Microbiología y Enfermedades Infecciosas. *Revista Argentina de Microbiología* 6, 76-88.

GHEZZI, P. C.; DOLCINI, G. L.; GUTIERREZ, S. E.; BANI, P. C.; TORRES, J. O.; ARROYO, G.; ESTEBAN E. N. 1997. Prevalence of bovine leukaemia virus (BLV) in the "Mar y Sierra" dairy production area of Argentina between 1994 and 1995. *Revista Argentina de Microbiología* 29, 137-146.

HUICI, N. C., SEGADE, G.; RAMIREZ, V.; GONZALEZ GENTILE, A. 1995. Serologic diagnosis of EBL in Patagonia. *Veterinaria Argentina* XII, 303-305.

HUICI, N.; SEGADE, G; RAMIREZ, V; GONZALEZ GENTILE, A. 1996. Diagnosis of enzootic bovine leukosis in dairy cattle for export during the period 1989-1993. *Veterinaria Argentina* 12, 16-22.

HUICI, N.; SEGADE, G.; RAMIREZ, V. 1997. Diagnosis of bovine leukosis in beef cattle for export: 1989-1994. *Veterinaria Argentina* 14, 26-31.

JOHSON, N.; KANEENE, J. B. 1992. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis (Reviewed). *Veterinary Bulletin* 62, 287-312.

LAYANA, J.; GONZALEZ, N.; MOREIRA, A. S.; VAGHI, C.; UZAL, F. 1997. Serological survey on brucellosis, bovine leukaemia and paratuberculosis in the northwest of Rio Negro, Argentina. *Veterinaria Argentina* 14, 83-90.

MONKE, D. R.; ROHDE, R. F.; HUESTON, W. D.; MILBURN, R. J. 1992. Estimation of the sensitivity and specificity of the agar gel immunodiffusion test for bovine leukemia virus: 1296 cases (1982-1989). *Journal of American Veterinary Medical Association* 200, 2001-2004.

MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BOSHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A .W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. (EDS)

1995. Virus taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag Wien New York.

NAIF, H. M.; DANIEL, R. C.; COUGLE, W. G.; LAVIN, M. F. 1992. Early detection of bovine leukemia virus by using an Enzyme-Linked Assay for Polymerase Chain Reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 675-679.

OTACHEL-HAWRANEK, J.; KORFANTY, E.; SZACHNOWSKI, S.; ERBERT, M.; CISZEWSKI, G. 1995. Use of ELISA in the detection of antibodies against enzootic bovine leukaemia virus in individual and bulk milk samples. *Medycyna Weterynaryjneja* 51, 402-404.

THRUSFIELD, M. 1995. In: Veterinary Epidemiology. Second Edition, Blackwell Science Ltda.

VEGA, I. P. 1997. Evaluación de una prueba de Elisa Indirecta para el diagnóstico de la infección con el virus de la Leucosis Enzoótica Bovina en Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 62 p.