

Estudio comparativo entre las pruebas de ELISA e inmunodifusión en el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina

Juan I. Monroy Basilio*
Francisco J. Trigo Tavera**
Aline S. de Aluja**
Rosa María García Escamilla**

Resumen

El Linfosarcoma Enzoótico Bovino (LEB) es el problema neoplásico más común e importante por las pérdidas económicas que ocasiona, principalmente en el ganado lechero. En México escasea la información concerniente al LEB. El objetivo del presente trabajo fue comparar la efectividad de las pruebas de Inmunodifusión en gel de agar y ELISA para el diagnóstico de la enfermedad en sueros de bovinos Holstein-Friesian. Se formaron tres grupos de 10 animales cada uno y un cuarto grupo con 15 animales. El primero consistió en animales seropositivos con leucocitosis persistentes (LP), el segundo en seropositivos sin presentación enzoótica de la enfermedad y sin LP, y el tercero con LEB, comparados con un grupo testigo de 15 animales clínicamente sanos y negativos serológicamente al Virus de la Leucosis Bovina (VLB). Se obtuvieron tres muestras sanguíneas de cada animal con intervalos de un mes para cada una. Las dos pruebas resultaron ser igualmente específicas. Los mayores títulos de anticuerpos se detectaron en el grupo 1, sin correlación directa entre éstos y la presentación de la enfermedad. Los títulos de anticuerpos detectados con la prueba de ELISA no variaron durante los tres muestreos de los grupos infectados.

Introducción

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) en su forma clínica, es un padecimiento neoplásico letal producido por un retrovirus tipo C; se caracteriza por la proliferación y agregación de linfocitos neoplásicos en casi todos los órganos, con la correspondiente variación de las manifestaciones clínicas.³⁰ Otros términos que suelen usarse como sinónimos son: Leucosis (refiriéndose al aumento de linfocitos sanguíneos), lin-

fosarcoma, linfoma, hemoblastosis, linfoblastoma, linfadenosis, linfomatosis, linfoma maligno, linfocitoma, leucosis viral bovina, complejo viral leucosis linfosarcoma, leucemia bovina. Este último término es incorrecto desde el punto de vista de la patología, ya que la leucemia ocurre también en otros padecimientos en el ganado.^{3,9}

Se han publicado múltiples estudios en relación con la clasificación de esta enfermedad denotando dos formas importantes: Leucosis Enzoótica Bovina (LEB), que afecta a ganado mayor de tres años y Leucosis Esporádica Bovina, que se subdivide en tres categorías según su presentación: Juvenil, tímica y cutánea. En la leucosis esporádica no se ha podido demostrar la presencia del retrovirus tipo C^{8,30} que sí se aisla de las otras formas.

El complejo de Leucosis Linfosarcoma Bovino se puede considerar la enfermedad neoplásica maligna más frecuente del ganado bovino, aunque probablemente menos del 10% del total de animales portadores sanos asintomáticos desarrolla LEB y alrededor de 29% presenta la forma benigna de linfocitosis persistente (LP).^{8,9,25}

Las estadísticas mundiales de la LEB no pueden considerarse exactas, pues sólo en algunos países es un padecimiento de denuncia obligatoria. En Europa y Asia, la enfermedad se encuentra distribuida ampliamente.¹⁵

En el continente americano se han realizado estudios de seroprevalencia. Se estima que el 20% de los bovinos lecheros en E.U.A. está infectado con el virus y en un porcentaje menor el ganado de engorda. También se considera la principal causa de los decomisos por tumores, con las consecuentes pérdidas económicas directas, calculadas en más de siete millones de dólares anuales.^{9,29,32} En Canadá se estudiaron sueros de bovinos productores de leche; se encontró una prevalencia de 10%.³¹ Marín *et al.*²⁴ determinaron 21% de seropositividad en el ganado bovino productor de carne en Venezuela. Igualmente, mediante estudios serológicos, se ha detectado la enfermedad en Brasil, Colombia y Argentina.^{9,11,17}

En México, los conocimientos relativos a la LEB datan de 1967.^{2,36} Tiempo después, se diagnosticaron

Recibido para su publicación el 20 de enero de 1992

* CENID-Microbiología, INIFAP, SARH, Carretera México-Toluca, km 15.5, Cuajimalpa, 05110, México, D.F.

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

clínicamente nueve casos en un total de 22,669 animales sacrificados en el rastro de Ferreña.³⁶ Aluja¹ encontró 110 casos de linfosarcoma en México entre 1969 y 1974, según los datos proporcionados por la Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico de Salud Animal de la SARH. Este informe indica la presencia de la enfermedad en 17 entidades, principalmente del centro de la República; asimismo, conviene mencionar un incremento anual en el número de casos.

Jaramillo¹³ recopiló entre 1966 y 1975 información de diversas instituciones oficiales de diagnóstico en el valle de México, encontrando 40 casos. Posteriormente, la Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico (SARH) informó de 220 casos clínicos de 1969 a 1982 en la República Mexicana.

En el ganado lechero de la cuenca de Tizayuca, Hidalgo, se demostró en 1983 un 40% de seropositividad con la prueba de inmunodifusión en gel de agar.^{19, 33} Larios *et al.*²⁰ al determinar anticuerpos contra VLB, encontraron porcentajes variables entre 8 y 50% en los estados de Puebla, Veracruz, Oaxaca, Yucatán y Tamaulipas.

Durante la década de los sesentas, las pruebas de virus neutralización,¹⁰ fijación de complemento,²⁶ inmuno-fluorescencia indirecta,⁹ inhibición temprana de la policariocitosis,¹² radio inmuno análisis (RIA),²¹ inhibición de la transcriptasa de reversa³² e inmuno difusión en gel de agar (IDGA),²⁷ se adaptaron para la detección de anticuerpos específicos contra el VLB. El sistema RIA parece ser el de mayor sensibilidad. Sin embargo, la prueba de IDGA producida comercialmente es práctica, económica, con buen grado de sensibilidad y se utiliza ampliamente en los trámites de importación de bovinos y de semen. La Comunidad Económica Europea y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA) la recomiendan para estudios de seroprevalencia y medidas de control.^{8, 28}

La prueba de immunoensayo enzimático (ELISA) se utiliza también para la detección y cuantificación de anticuerpos contra el VLB, debido a que es sumamente sensible, específica y sencilla para adaptarse como técnica de rutina en el laboratorio de diagnóstico.^{5, 6, 16, 21, 22, 23, 31, 34}

El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis comparativo entre las pruebas de ELISA e inmunodifusión en gel de agar para la detección de anticuerpos séricos específicos contra el Virus de la Leucosis Bovina.

Material y métodos

El trabajo se realizó en un complejo agropecuario del estado de Hidalgo. La población promedio es de 20,000 bovinos Holstein-Friesian, distribuidos en una superficie aproximada de 75 hectáreas bajo un sistema de explotación intensiva.

El criterio empleado, tanto serológico como de biometría hemática, para seleccionar a los 45 animales fue el siguiente: Se realizaron tres muestreos previos (con intervalos de un mes cada uno) en los animales

con antecedentes clínicos y hemáticos de linfocitosis persistente indicativos de LEB.

Para la identificación de anticuerpos séricos específicos contra el VLB, se utilizaron comparativamente las técnicas de ELISA e inmunodifusión en gel de agar (IDGA).

El procedimiento utilizado para la prueba indirecta de ELISA fue el desarrollado por Todd y Adair.³⁴ El antígeno glicoproteínico* fue diluido al 0.01 M en solución amortiguada de carbonatos (pH 9.5) y se repartió en volúmenes de 25 µl en cada pozo de las placas de polivinil para microtitulación. Las placas se conservaron durante toda la noche a 4°C y fueron fijadas con PBS contenido 3% de formalina. Antes de usar las placas, fueron lavadas 5 veces con PBS contenido medio Tween 20** (PBS-T). Las muestras de suero (100 µl) con 4 diluciones dobles seriadas con PBS-T con 1% de albúmina sérica bovina se realizaron por triplicado en las microplacas. Despues de la incubación a 37°C durante una hora, las placas fueron lavadas 5 veces con PBS-T y a cada pozo de la placa se le adicionaron 100 µl de conjugado de peroxidasa anti IgG de bovino producido en conejo***, a una dilución de 1:1024. Tras de incubar las placas una hora a temperatura ambiente, se lavaron con PBS-T y se agregaron a cada pozo 200 µl de o-fenilendiamina con 0.03% de peróxido de hidrógeno como sustrato. La reacción se detuvo a los 30 minutos con la agregación de ácido sulfúrico 8 N. Cada placa tuvo un suero de referencia testigo positivo y uno negativo. Se determinó la absorción de cada pozo a 490 nm mediante espectrofotometría. Las diluciones 1:64 o mayores fueron consideradas como ELISA positivas.

Para la prueba de IDGA, el agar se preparó al 0.95% en solución amortiguadora de fosfatos (pH 8.6). Se vertieron 15 ml de esta solución por cada caja de Petri. Una vez solidificado el medio, se realizaron 7 orificios de 5 mm de diámetro: uno central para el antígeno, rodeado de 6 equidistantes para 3 sueros problemas sin diluir y sus testigos respectivos: positivo, negativo y positivo moderado. Las cajas se mantuvieron a 20°C durante 48 horas para incubación. Las pruebas se registraron como positivas cuando las líneas de precipitación eran idénticas a las del suero testigo positivo.

Para la detección de 10 animales con LP, se determinó la cantidad de leucocitos por mm³ en la sangre colectada con anticoagulante EDTA. La cuenta diferencial se expresó en porcentajes y cifras absolutas, según las técnicas convencionales descritas por Benjamín.⁴

El estudio consistió en dos fases:

Fase I. Selección de cuatro grupos de animales en producción con las siguientes características:

Grupo 1. 10 animales ELISA positivos al VLB más leucocitosis persistente (LP).

Grupo 2. 10 animales serológicamente positivos al VLB utilizando la prueba ELISA.

* Leukoassay-B. Pitman-Moore, Nueva Jersey, EUA

** Lab. Gibco. Nueva York, EUA

*** Cappel Labs, Pennsylvania, EUA

Cuadro 1
NIVELES DE ANTICUERPOS ANTI-VLB

Grupos Muestreos	I 1-2-3		II 1-2-3		III 1-2-3		IV 1-2-3		
	1	1/ 128*	(+)**	1	1/ 64*	(+)**	1	1/ 128*	(+)**
1	1	1/ 128*	(+)**	1	1/ 64*	(+)**	1	1/ 128*	(+)**
2	2	1/ 64	(+)	2	1/ 64	(+)	2	1/ 64	(+)
3	3	1/ 64	(+)	3	1/ 64	(+)	3	1/ 64	(+)
4	4	1/ 64	(+)	4	1/ 64	(+)	4	1/ 256	(+)
5	5	1/ 512*	(+)	5	1/ 64	(+)	5	1/ 128	(+)
6	6	1/ 256	(+)	6	1/ 64	(+)	6	1/ 64	(+)
7	7	1/ 64	(+)	7	1/ 128	(+)	7	1/ 64	(+)
8	8	1/ 64	(+)	8	1/ 64	(+)	8	1/ 128	(+)
9	9	1/ 64	(+)	9	1/ 64	(+)	9	1/ 64	(+)
10	10	1/ 64	(+)	10	1/ 64	(+)	10	1/ 64	(+)
									11
									12
									13
									14
									15

* Prueba de ELISA ** Prueba de IDGA positiva

I- (+LP)

II- (+)

III- (+ tumoral)

IV- (testigo)

Grupo 3. 10 animales ELISA positivos al VLB más presentación clínica de la enfermedad.

Grupo 4. 15 animales clínicamente sanos y ELISA negativos al VLB (testigos).

De cada animal se obtuvieron dos muestras de 12 ml de sangre cada una, una sin y la otra con anticoagulante Etilen-Diamino-Tetra-Acético (EDTA), a partir de la vena coccígea, empleando el sistema de tubos al vacío. De la sangre colectada sin anticoagulante se obtuvo el suero mediante centrifugación y se congeló a -20°C hasta el momento de su análisis.

Fase II. De los 45 animales seleccionados para formar los cuatro grupos, se realizaron tres muestreos sanguíneos seriados con intervalos de un mes cada uno y se procedió en la forma descrita.

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza totalmente al azar y con un nivel de significancia de ($P < 0.01$).

Resultados

Serología

Los resultados de los 30 sueros de los bovinos detectados como positivos y de los 15 negativos con la prueba de ELISA se comprobaron con IDGA.

Ningún animal del grupo testigo negativo presentó reacciones seropositivas al VLB durante los tres muestreos seriados.

Con la prueba de ELISA el título de anticuerpos más elevado se observó en un animal del grupo 1 (1/512).

La especificidad de la prueba de IDGA fue de 100% comparada con los resultados de ELISA.

En los treinta bovinos que formaron los tres grupos de animales seropositivos, el título de anticuerpos detectados mediante la prueba de ELISA permaneció constante durante las tres determinaciones (una cada

mes); no hubo diferencias estadísticas significativas (Cuadro 1).

Biometría hemática

Los valores del hematocrito en los animales de los grupos 1, 2 y 4 no presentaron variaciones significativas, pero en el grupo 3 los niveles fueron significativamente bajos ($P < 0.05$). En el conteo de eritrocitos no se observaron cambios significativos en los grupos 1, 2 y 4; en el grupo 3 fueron bajos ($P < 0.05$). La concentración de hemoglobina en el grupo 3 fue baja ($P < 0.05$); en los otros grupos permaneció normal. En los animales de los grupos 1 y 3 aumentó considerablemente el número de leucocitos ($P < 0.01$); en los grupos 2 y 4 éste se mantuvo dentro de los límites de referencia. El porcentaje de linfocitos en los grupos 1 y 3 fue significativamente superior al de los otros grupos ($P < 0.01$ (Cuadro 2, Figuras 1-4).

Discusión

En este trabajo se supone que la infección con el VLB se asocia directamente a la respuesta de los anticuerpos

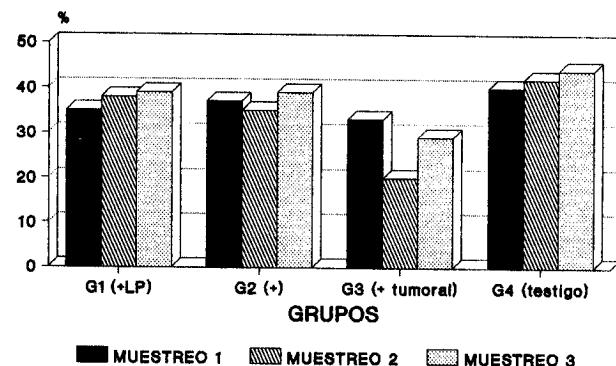


Figura 1. Valores de hematocrito

Cuadro 2
BIOMETRIA HEMATICA

Grupo	No. de bovino	HT** %	G.R. ** mm ³	HB* g/100 ml	G.B. ** mm ³	Linfocitos** %
1	10	36.35 ^b	6.92 ^b	11.95 ^b	35.71 ^a	71.32 ^a
2	10	37.67 ^b	7.15 ^b	12.18 ^b	7.82 ^c	59.84 ^b
3	10	30.96 ^c	6.35 ^c	10.09 ^c	15.57 ^b	67.43 ^a
4	15	40.30 ^a	7.95 ^a	13.04 ^a	8.13 ^c	47.75 ^c

* Las medias con diferentes letras son significativas P < 0.05

1- (+LP) 3- (+ tumoral)

2- (+) 4- (testigo)

** Las medias con diferentes letras son altamente significativas P < 0.01

anti-VLB. Esta característica proporciona una confiable opción para identificar animales infectados mediante pruebas inmunológicas como lo señalan Ferrer *et al.*^{9,10}

Recientemente se han desarrollado múltiples estudios sobre la detección y cuantificación de anticuerpos anti-VLB. Kajikawa *et al.*¹⁶ demostraron que la sensibilidad de la prueba de ELISA es mayor que la prueba de IDGA, para la detección de anticuerpos contra el virus de la LB. En otro trabajo se comprobó mayor efectividad en la prueba de ELISA que en la de IDGA al emplear anticuerpos monoclonales, para la detección de animales infectados con el VLB.¹⁴ Burridge *et al.*⁷ observaron en 32 muestras sanguíneas de bovinos infectados con VLB escasa variación en los títulos de anticuerpos dentro de un periodo aproximado de seis meses, similar a lo obtenido en este estudio.

También se comprobó la efectividad de estas dos pruebas (ELISA-IDGA) en el suero de leche de bovinos infectados; la primera resultó más sensible y con menor porcentaje de falsos positivos. Klementwski¹⁸ empleó la técnica de ELISA en sueros sanguíneos para demostrar 51.7% de reactores positivos al VLB, comparado con 42.4% con la de IDGA. El título de anticuerpos detectados durante tres meses no varió de manera importante. Toma *et al.*³⁵ observaron alta especificidad en la prueba de ELISA (99%) en muestreos seriados de sangre y leche de bovinos infectados con el VLB; concluyeron que ELISA es una prueba factible para detectar infecciones iniciales y para evaluar hatos libres de la enfermedad. La prueba de ELISA es muy sensible y

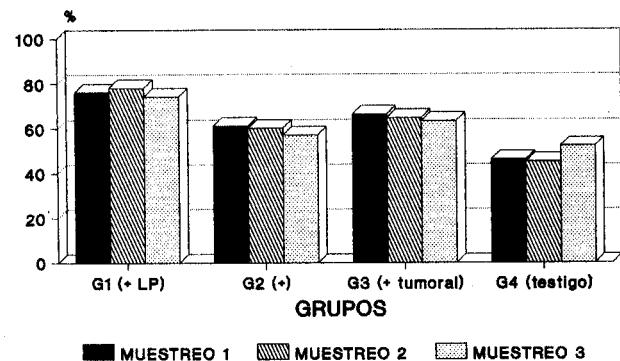


Figura 3. Valores de linfocitos

específica para la medición de anticuerpos; no obstante, la prueba de IDGA, por su bajo costo y fácil desarrollo, puede considerarse una buena alternativa para aplicarse en estudios epidemiológicos.

En el presente estudio todos los sueros de bovinos con títulos ELISA positivos al VLB también lo fueron con IDGA. Luego, se concluye que para fines prácticos y para estudios epidemiológicos es factible usar esta última, ya que es económica y fácil de realizar. Asimismo, los títulos de anticuerpos detectados por el método de ELISA permanecieron constantes durante todo el experimento. No se observó ninguna correlación entre el título de anticuerpos anti-VLB con las tres presentaciones de la enfermedad (seropositivos más leucocitosis persistente, seropositivos y seropositivos tumorales).

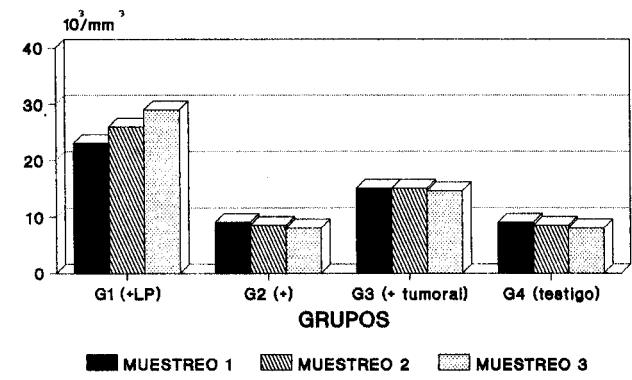


Figura 2. Valores de glóbulos blancos

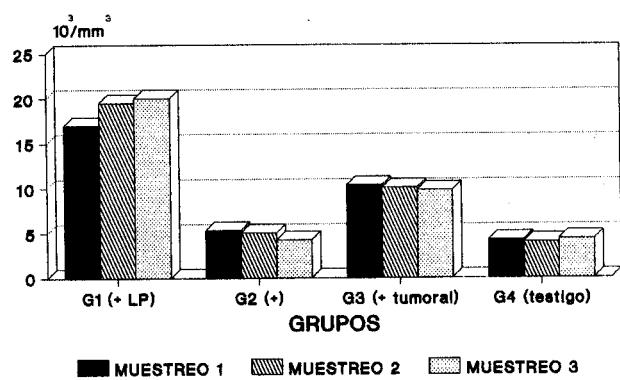


Figura 4. Valores absolutos de linfocitos

Abstract

Bovine enzootic lymphosarcoma is the most important and common neoplastic disease in cattle. Information concerning this problem in Mexico is scarce. The objective of the study was to compare the effectiveness of the agar gel immunodiffusion test with the ELISA one for the diagnosis of this disease in Holstein-Friesian cattle sera. Three groups were formed with ten animals each and a fourth one with fifteen. The first consisted of seropositive animals with persistent leucocytosis; the second one of seropositive animals without presentation of the disease and without persistent leucocytosis; the third one with bovine enzootic leucosis and the fourth, was the control. Three samples of blood were obtained from each animal with monthly intervals. Serological tests resulted equally specific. Major antibody titers were detected in Group I, not finding a direct correlation between titers and presence of the clinical disease. Antibody titers detected with ELISA did not change during the three samples in the infected groups.

Literatura citada

1. Aluja, A. S.: Linfósarcoma bovino. *Vet. Méx.*, 6: 73-77 (1975).
2. Aluja, A. S. y Uruchurtu, A.: Linfósarcoma (Leucemia) en bovinos. *Vet. Méx.*, 3: 18-22 (1967).
3. Bendixen, H. J.: Bovine lymphoma. In: *Bovine Medicine and Surgery*. Edited by: Gibbons, W.J., Catcott, E.J., Smithcors, J.F., 547-560. *American Veterinary Publications*, Wheaton, Illinois, 1970.
4. Benjamin, M.M.: Outline of Veterinary Clinical Pathology. 3rd ed. *Iowa State University Press*, Ames, Iowa, 1982.
5. Biancifiori, F. and Cenci, G.: ELISA test for detection of antibodies to enzootic bovine leukosis virus. *Fourth International Symposium on Bovine Leukosis*. Bologna, Italia. 1982. 167-172. *University of Bologna*, Bologna, Italia (1982).
6. Bidwell, D.E., Bartlett, A. and Voller, A.: Enzyme immunoassays for viral diseases. *J. Infect. Dis.*, 136: 274-278 (1977).
7. Burridge, J., Thurmond, M.C. and Miller, J.M.: Duration of colostral antibodies to bovine leukemia virus by two serologic tests. *Am. J. vet. Res.*, 43: 1866-1867 (1982).
8. Evermann, J.F., DiGiacomo, R.F. and Hopkins, S.G.: Bovine leukosis virus: Understanding viral transmission and the methods of control. *Vet. Med. Sci.*, 82: 1051-1058 (1987).
9. Ferrer, J.F.: Bovine lymphosarcoma. *Adv. vet. Sci. comp. Med.*, 24: 1-68 (1980).
10. Ferrer, J.F., Piper, C.E., Abt, D.A. and Marshak, R.R.: Diagnosis of bovine leukemia virus infection: Evaluation of serologic and hematologic tests by a direct infectivity detection assay. *Am. J. vet. Res.*, 38: 1977-1981 (1977).
11. Gomez, M., Moojen, V., Fernandez, J. and Ferreiro, L.: Detection of serum antibodies to bovine leukosis virus in cattle in the state of Rio Grande do Sul. *Arq. Fac. Vet. Univ. Fed. Rio Grande do Sul*, 13: 15-22 (1985).
12. Guillemain, B., Mamoun, R.Z., Astier, T., Duplan, J.F. and Parodi, A.L.: Early polykaryocytosis inhibition test: Evaluation of its performance in a seroepidemiological survey of bovine leukemia virus induced antibodies in cattle. *Ann. Rech. Vet.*, 9: 709-720 (1978).
13. Jaramillo, B.R.: El linfósarcoma de bovinos en la cuenca lechera del valle de México. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1975.
14. Jazbek, I., Klinkom, M. and Gregorovic, V.: The ELISA test for diagnosing enzootic bovine leukosis from the tissue fluids of internal organs. *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Edvarda Kardeša Ljublj.* Vet., 24: 117-121 (1987).
15. Kaaden, O. and Stephenson, J.: Detection of BLV infection: Serological methods. *Ann. Rech. Vet.*, 9: 406-410 (1978).
16. Kajikawa, O., Koyama, H., Sasaki, T., Yoshikawa, T. and Saite, H.: Studies on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies in cattle infected with bovine leukemia virus. *Jpn. J. vet. Sci.*, 45: 347-353 (1983).
17. Kante, C.E., Kruger, E.R. and Welter, V.R.: Prevalence of bovine enzootic leukosis among dairy cattle in Paraná State, Brazil. *Pesqui. vet. Bras.*, 3: 125-129 (1983).
18. Klementowski, S.: Comparison of DCIA and ELISA tests on blood and milk for diagnosing bovine leukosis. *Med. Weter.*, 42: 342-346 (1986).
19. Larios, F., Madewell, B., Fernández, L., García, J. y Monroy, J.: Estudio seroepidemiológico sobre el complejo leucosis-linfosarcoma en el altiplano de México. *Memorias del IX Congreso Nacional de Buiatría*. Puebla, México. 1983. 245-249. *Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias*. México, D.F. (1983).
20. Larios, F., Madewell, B. y Monroy, J.: Complejo leucosis linfósarcoma. Estudio epidemiológico en bovinos Pardo-Suizo. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México*. México, D.F. 1985. 85. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias*. México, D.F. (1985).
21. McDonald, H.C. and Ferrer, J.F.: Detection, quantification and characterization of the major internal antigen of the bovine leukemia virus by radioimmunoassay. *J. Natl. Cancer Inst.*, 57: 875-882 (1976).
22. Mammerickx, M., Portetelle, D. and Bruck, C.: Le diagnostic de la leucose bovine enzootique à l'adage d'un test immuno-enzymatique (ELISA) impliquant un anticorps monoclonal. *Ann. Med. Vet.*, 128: 55-63 (1984).
23. Mammerickx, M., Portetelle, D., Bruck, C. and Burney, A.: Use of an ELISA involving monoclonal antibody for the detection of antibodies against bovine leukemia virus in a herd with incidence of enzootic bovine leukosis. *Zentbl. Veterinärmed. Reihe B*, 31: 210-218 (1984).
24. Marin, C., Lopez, M., Alvarez, M. and Palencia, L.: Epidemiology of bovine leukemia in Venezuela. *Ann. Rech. Vet.*, 9: 743-745 (1978).
25. Medina, C.M.: Leucosis bovina. *Vet. Méx.*, 19: 151-159 (1988).
26. Miller, J.M. and Matten van der, M.J.: A complement fixation test for the bovine leukemia (C-type) virus. *J. Natl. Cancer Inst.*, 53: 1699-1702 (1974).
27. Miller, J.M. and Matten van der, M.J.: Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Eur. J. Cancer*, 13: 1369-1375 (1977).
28. Miller, J.M. and Matten van der, M.J.: Bovine leukosis. Its importance to the dairy industry in the United States. *J. Dairy Sci.*, 65: 2194-2203 (1982).
29. Miller, J.M. and Matten van der, M.J.: A review of methods to control bovine leukosis. *Proc. U.S. Anim. Health Ass.*, 86: 119-125 (1982).
30. Mohanty, L. and Dutta, F.: Virus de leucemia bovina (VBL). En: *Virología Veterinaria*. Mohanty, L., Dutta, F., 353-358. *Interamericana*, México, D.F., 1983.
31. Perrin, B., Perrin, M., Fedida, M. and Berger, B.: Enzootic bovine leukosis: Study of 11 herds and different diagnostic techniques. *Rev. Med. Vet.*, 137: 838-845 (1986).
32. Sorensen, D.K. and Beal, V.C.: Prevalence and economics of bovine leukosis in the United States. *Proc. Bovine Leukosis. U.S. Dep. Agric.*, 16: 33-35 (1979).
33. Susan, V.M., Onuma, M., Aguilar, R. and Murakami, Y.: Prevalence of bovine herpesvirus-I, parainfluenza-3, bovine rotavirus, bovine viral diarrhea, bovine adenovirus -7, bovine leukemia virus and bluetongue virus antibodies in cattle in Mexico. *Jpn. J. vet. Med.*, 31: 125-132 (1983).
34. Todd, D. and Adair, B.M.: An enzyme-linked immunosorbent assay for enzootic bovine leukosis virus antibodies. *Vet. Rec.*, 107: 124-126 (1980).
35. Toma, B., Uillaume, A., Prevost, P., Duret, C., Elliot, M., Chapuis, G. and Parodi, A.L.: Detection of bovine leukosis by the ELISA test on bulk and individual milk samples. *Ann. Rech. Vet.*, 17: 75-83 (1986).
36. Uruchurtu, A.: Incidencia de linfósarcoma en bovinos del D.F. Tesis de licenciatura. *Esc. Nal. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1967.