

DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS SÉRICOS CONTRA O VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA

DEVELOPMENT OF AN ELISA FOR DETECTION OF SERUM ANTIBODIES AGAINST BOVINE LEUKEMIA VIRUS

C. TOCHETTO¹, A. C. BALBINOT², K. C. PRIOR³, D. DEZEN^{3*}

RESUMO

A leucose enzoótica bovina é uma enfermidade crônica que acarreta prejuízos econômicos ao produtor. Detectar a presença de animais infectados é uma etapa importante no controle desta doença. Portanto, neste trabalho procurou-se investigar a prevalência do vírus na região do Alto Uruguai Catarinense e, paralelamente, desenvolver um ensaio imunoenzimático (ELISA) capaz de discriminar animais sorologicamente positivos e negativos para o vírus da leucose bovina (BLV). Para a padronização do ELISA foram realizadas titulações em bloco do antígeno e de amostras de soros controles. Em seguida, foram analisadas 289 amostras de soro bovino, colhidas em 42 rebanhos leiteiros. Os resultados obtidos foram comparados aos da imunodifusão em gel de ágar (IDGA). A análise dos critérios de comparação permitiu concluir que o ELISA desenvolvido apresentou um desempenho satisfatório e foi capaz de discriminar animais infectados e não infectados. Embora os valores de sensibilidade (80,2%) e especificidade (71,2%) do teste tenham sido menores aos relatados em estudos utilizando kits comerciais ou testes *in house*, o ELISA desenvolvido pode ser associado à IDGA como teste de triagem, visando diminuir o número de falso-negativos. A prevalência de anticorpos contra o BLV na população amostrada foi de 31% para a IDGA e 45% para o ELISA. Das propriedades, 20 (47,6%) possuíam ao menos um animal positivo no ELISA. Estes dados indicam que a leucose enzoótica bovina (LEB) está amplamente disseminada nos rebanhos leiteiros da região. Portanto, o teste desenvolvido pode servir como uma ferramenta de triagem inicial, contribuindo desta maneira para o monitoramento sorológico do rebanho.

PALAVRAS-CHAVE: Bovino. Imunoensaio. IDGA.

SUMMARY

The Enzootic bovine leucosis is a chronic disease that causes economic losses to cattle. The detection of infected animals is an important step to control the disease. Therefore, this study aimed to investigate the prevalence of the virus in the *Alto Uruguai Catarinense* (Brazil) region and in parallel develop an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) able to discriminate serologically positive and negative animals for bovine leukemia virus (BLV). For ELISA standardization, antigen and serum controls block titrations were performed. Then, 289 bovine serum samples collected from 42 dairy herds were analyzed. The results obtained were compared with Agar Gel Immunodiffusion (AGID). The comparative analysis concluded that the developed ELISA showed a satisfactory performance and was able to discriminate between infected and uninfected animals. Although the sensitivity (80.2%) and specificity (71.2%) of the test showed lower values than those found in previous studies using commercial kits or in-house assays, the ELISA developed can be associated with IDGA as a screening test, in order to reduce the number of false negatives. The prevalence of antibodies against BLV found was 31% for AGID and 45% for ELISA. From 42 properties, 47.6% had at least one positive animal in the ELISA. These results indicate that bovine leukosis is widespread in dairy herds of the region analyzed. Therefore, the test developed could be used as an initial screening tool, thus contributing to the serological monitoring of the herd.

KEY-WORDS: Bovine. Immunoassay. IDGA.

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

² JBS Foods, Concórdia, SC.

³ Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC.

*Autor para correspondência: diogenes.dezen@ifc-concordia.edu.br

INTRODUÇÃO

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma enfermidade viral crônica, mundialmente distribuída e que causa sérios prejuízos econômicos à pecuária bovina (JUNIOR et al., 2001). A enfermidade é induzida pelo vírus da leucose bovina (BLV), um retrovírus que infecta preferencialmente os linfócitos B. Dos animais que são infectados pelo BLV, todos permanecem persistentemente infectados, porém apenas 1 a 5% desenvolve a forma clínica da doença e aproximadamente 30% apresenta linfocitose persistente. A forma clínica é observada com maior frequência em animais de 5 a 8 anos de idade e cursa com a formação de linfossarcomas em vários órgãos (BARROS, 2007; RAVAZZOLLO, DA COSTA, 2007).

A soroprevalência do BLV em rebanhos bovinos é variável, sendo que há relatos de 8,3% a 54,3%, dependendo da região do Brasil analisada (ROMERO, ROWE, 1981; SIMÕES, 1988; POLETTO et al., 2004; MATOS et al., 2005; FERNANDES, 2007; SPONCHIADO, 2008; BARROS FILHO et al., 2010; PIOVESAN et al., 2013).

Testes como a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) têm sido utilizados para a determinação da soroprevalência do BLV. A IDGA é o teste de triagem recomendado internacionalmente por apresentar boa sensibilidade e especificidade. No entanto, alguns autores reportaram que a prevalência de LEB nos rebanhos examinados pela IDGA pode estar subestimada, pois ela é menos sensível que o ELISA (MALOVRH et al., 2005; CASTRO et al., 2013). Além disso, a interpretação de seus resultados é às vezes subjetiva e depende de um bom treinamento e experiência. Por outro lado, o ELISA é um teste prático, relativamente barato e pode ser utilizado em larga escala (MALOVRH et al., 2005).

Por esse motivo, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um ELISA baseado na detecção de anticorpos contra BLV. Para isso, foram analisados soro de bovinos, provenientes da região do Alto Uruguai Catarinense, e realizada a pesquisa de anticorpos contra o BLV utilizando-se as técnicas de IDGA e de ELISA.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 289 amostras de sangue de bovinos de raças leiteiras, provenientes de 42 propriedades dos municípios catarinenses de Concórdia, Jaborá e Seara. Em cada propriedade, aproximadamente 20% dos animais do rebanho foram amostrados. As colheitas foram realizadas por meio de venopunção da veia coccígea caudal, com agulhas descartáveis (22G), em tubos com vácuo sem anticoagulante. Após a formação do coágulo, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante obtido foi aliquoteado em microtubos e armazenado a -20°C até a realização dos testes de IDGA e ELISA.

Como padrão ouro, foi empregado o teste de IDGA por meio da técnica de imunodifusão radial dupla

de Ouchterlony, conforme preconizado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2012). Para isso, foi utilizado um kit para diagnóstico de leucose enzoótica bovina (TECPAR, Curitiba, PR, Brasil) o qual detecta anticorpos séricos específicos anti-BLV.

A padronização do ELISA foi realizada conforme as recomendações da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - FAO/OIE (WRIGHT et al., 1993). Inicialmente foram realizadas titulações em bloco com diferentes diluições de antígeno (Ag) e do soro primário (Ac) utilizando planejamento fatorial 2 em duplicata, com 2 variáveis (Ag e Ac) em doze e sete níveis de variação, respectivamente. Os níveis de variação para Ag foram diluições de 1:10 a 1:20.480; já os níveis de variação utilizados para o Ac foram diluições de 1:5 a 1:320. Como controles, foram utilizados, em duplicata, um soro controle positivo e um soro controle negativo, previamente testados na IDGA. O antígeno (10 µg/uL) utilizado no ELISA foi obtido de células de rim de cordeiro persistentemente infectadas com o BLV (VAN DER MAATEN, MILLER, 1975) seguindo metodologia previamente descrita (TRONO et al., 2001).

Placas de 96 orifícios com fundo plano foram sensibilizadas com 100 µL/orifício do antígeno diluído em tampão carbonato/bicarbonato (0,05M, pH 9,6) na proporção 1:10 a 1:20.480, incubadas a 4°C por 18-24 horas e lavadas três vezes com solução tampão fosfato pH 7,4 (PBS), contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Para neutralizar reações inespecíficas entre o antígeno e o soro bovino, foram adicionados 100 µL/orifício de solução de PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e depois foram realizadas três lavagens com solução PBS-T.

Os soros controles positivo e negativo foram diluídos em PBS-T, na proporção de 1:5 a 1:320, adicionados em duplicata na placa e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. Depois de realizadas três lavagens, foi adicionado em cada orifício 100 µL de imunoglobulina caprina anti-IgG bovina conjugada com peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA), diluída 1:10.000 em PBS-T. Após a incubação em temperatura ambiente por 30 minutos, a placa foi lavada três vezes, seguida de adição de 100 µL/orifício do revelador (TMB – tetrametilbenzidina, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), incubação por 10 minutos em temperatura ambiente e bloqueio da reação através do acréscimo de 100 µL de solução de parada (HCL 1M).

A absorbância foi lida em espectrofotômetro (MR-96A, Mindray, Shenzhen, GD, China) com filtro de 630 nm e a diluição ótima do Ag e do Ac foi determinada pela maior razão obtida entre o controle positivo e negativo. Após a padronização, as amostras colhidas foram testadas por meio da técnica de ELISA nas condições otimizadas, seguindo os procedimentos previamente descritos.

A partir dos valores de absorbância obtidos das amostras testadas, foi calculada a razão entre amostra e controle positivo (S/P) através da seguinte fórmula:

$$S/P = \frac{AA - ACN}{ACP - ACN}$$

Onde, “AA” é a média dos valores de absorbância da amostra; “ACN” é média dos valores de absorbância do controle negativo e “ACP” é a média dos valores de absorbância do controle positivo (ADASKA et al., 2002).

Foram utilizadas medidas de validade de teste diagnóstico para verificar a habilidade do teste de ELISA desenvolvido em discriminar amostras positivas e negativas. Os resultados obtidos no ELISA foram comparados aos resultados das amostras previamente testadas na IDGA pela determinação da área sob a curva ROC (*Receiver Operator Characteristic*) ou curva operacional relativa (GREINER et al., 1995). Por meio da curva ROC foi estabelecido o ponto de corte com base nos valores de S/P obtidos. A partir da definição do ponto de corte, determinou-se a sensibilidade e a especificidade do ELISA em relação à IDGA. A curva ROC, o índice *kappa* e o valor de sensibilidade e especificidade foram determinados utilizando o pacote estatístico SPSS® versão 19.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*, IBM Company). Os valores de sensibilidade foram traçados em relação aos falsos positivos (1–

Especificidade) para cada possível ponto de corte da razão S/P do ELISA. Os valores de especificidade e sensibilidade foram calculados tendo como base o teste referência, no caso a IDGA. O ponto onde se obteve, simultaneamente, os maiores valores de sensibilidade e especificidade, foi definido como o ponto de corte.

Durante o experimento, foram cumpridas as exigências de conforto e bem-estar dos animais, de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (CETEA/UDESC), processo nº 1.47.12.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ELISA foi otimizado utilizando-se diluições de 1:20 e 1:40 do antígeno e do anticorpo, respectivamente. Nestas diluições encontrou-se a maior razão entre a densidade óptica do soro controle positivo e do soro controle negativo. A representação gráfica da curva ROC está ilustrada na Figura 1, e a seta indica o ponto de corte o qual correspondeu a S/P = 0,53. A área sob a curva foi de 0,77 classificando o desempenho do teste como satisfatório (MARTINEZ et al., 2003).

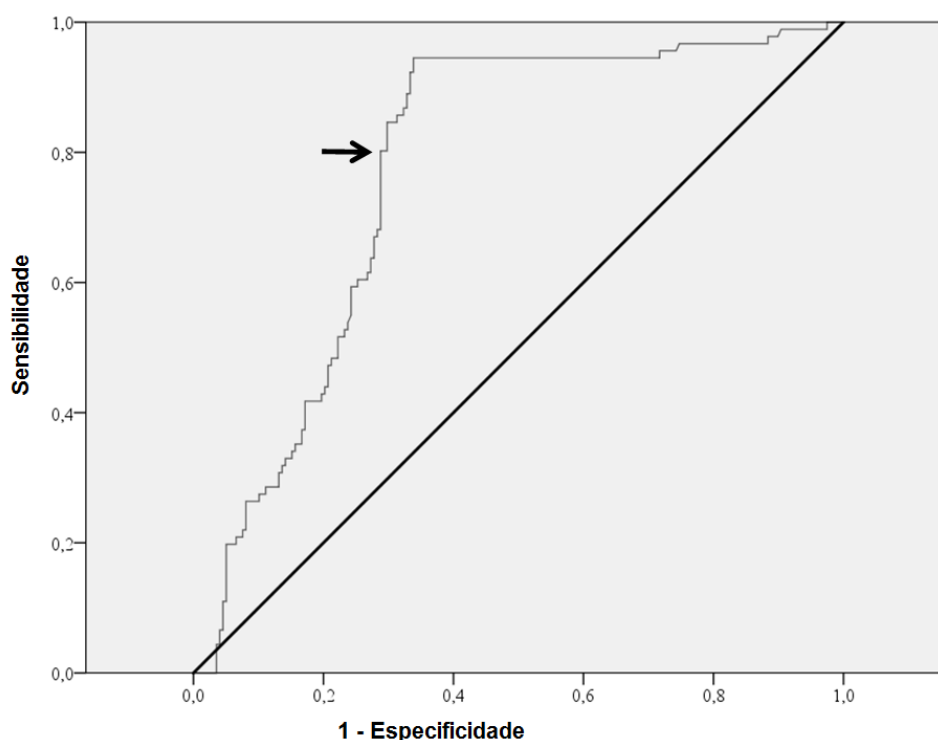


Figura 1 - Curva ROC (*Receiver Operator Characteristic*) mostrando os resultados de sensibilidade e 1 - Especificidade em relação a todos possíveis pontos de corte da razão entre amostra e controle positivo (S/P) obtidos no ELISA para detecção de anticorpos séricos anti-vírus da leucose bovina. A seta indica o melhor limiar de corte, onde S/P = 0,53. No gráfico, a área sob a curva gerada é de 0,77.

A partir da curva ROC, o ponto de corte da razão S/P foi definido em 0,53, uma vez que nesse ponto encontrou-se, simultaneamente, o menor erro possível de falso-positivos e falso-negativos, apresentando o ELISA sensibilidade de 80,2% e especificidade de 71,2%. O índice *kappa* calculado entre os testes foi de 0,463, o que indica uma

correlação moderada (LANDIS, KOCH, 1977). Os valores obtidos para sensibilidade e especificidade se mostraram abaixo dos valores encontrados em estudos utilizando kits comerciais ou testes *in house*, os quais variaram de 97,2 a 100% para a sensibilidade e de 79,7 a 99,8% para a especificidade (KLINTEVALL et al., 1991; TRONO et al., 2001; GONZÁLEZ et al., 2007).

A discordância destes valores pode ter sido gerada devido às diferenças antigênicas do antígeno comercial e do antígeno utilizado no ELISA, uma vez que diferenças significativas entre genótipos do vírus têm sido relatadas e estas podem se traduzir em diferenças antigênicas (RODRIGUEZ et al., 2009; D'ANGELINO et al., 2013).

Os valores da razão S/P obtidos nas amostras testadas frente ao ELISA variaram de -332,00 a 30,04. Na Figura 2 é possível observar que a maioria destes

valores (64,3%) estão no intervalo compreendido de -0,5 a +3. A partir da definição do ponto de corte as amostras foram classificadas em positivas ($S/P \geq 0,53$) e negativas ($S/P < 0,53$). Verificou-se que no ELISA, 45% ($n = 130$) das amostras foram classificadas como positivas e 55% ($n = 159$) como negativas (Tabela 1). Na IDGA, 31% ($n = 91$) e 69% ($n = 198$) das amostras foram positivas e negativas, respectivamente.

Tabela 1 - Comparação dos resultados da detecção de anticorpos séricos anti-vírus da leucose bovina obtidos pelas técnicas de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e ensaio imunoenzimático (ELISA).

	IDGA – Negativo	IDGA – Positivo	Total
ELISA – Negativo	141	18	159
ELISA – Positivo	57	73	130
Total	198	91	289

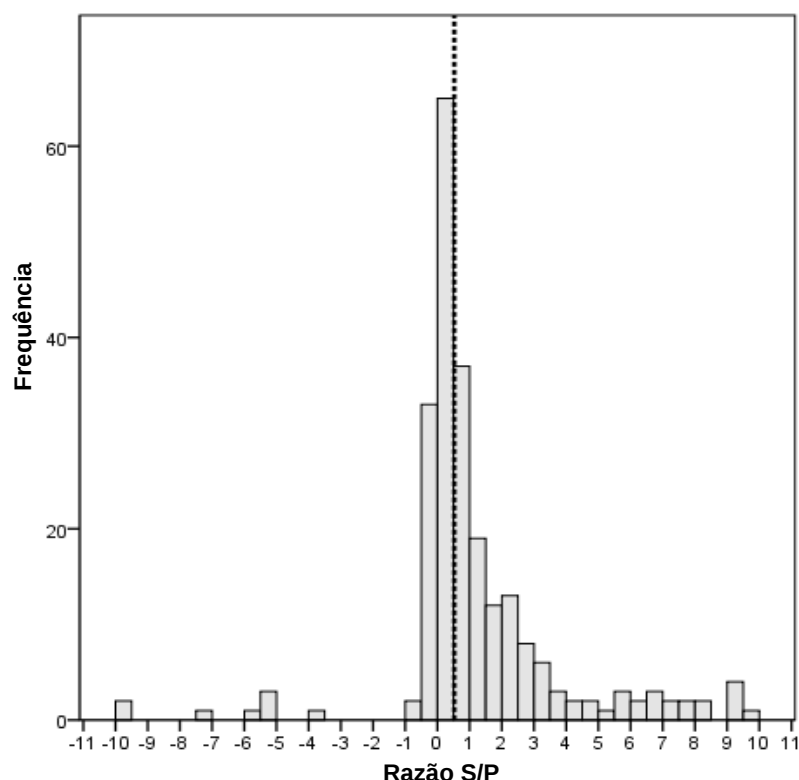


Figura 2 - Histograma dos valores obtidos da razão entre amostra e controle positivo (S/P) no ELISA para detecção de anticorpos séricos anti-vírus da leucose bovina. A linha pontilhada representa o ponto de corte ($S/P = 0,53$), à esquerda dessa linha estão as amostras consideradas negativas, e à direita, as positivas.

A prevalência de animais infectados pelo BLV, obtidas no teste de IDGA, foi semelhante à relatada em outras regiões do país (ROMERO, ROWE, 1981; SIMÕES, 1988; POLETO et al., 2004; MATOS et al., 2005; FERNANDES, 2007; SPONCHIADO, 2008; BARROS FILHO et al., 2010; PIOVESAN et al., 2013).

A diferença de 14% na prevalência obtida pelas duas técnicas pode ser explicada pelas diferenças de sensibilidade e especificidade entre as provas, justificando 31 e 45% de soropositivos para a IDGA e o ELISA, respectivamente. Das 289 amostras testadas, 73 e 141 amostras foram simultaneamente positivas e

negativas, respectivamente, em ambos os testes (Tabela 1), observando-se uma concordância de 74% dos resultados. Entretanto, adotando-se como teste padrão ouro o IDGA, obteve-se no ELISA 57 falso-positivos e 18 falso-negativos. Por outro lado, sabe-se que a IDGA apresenta menor sensibilidade que o ELISA (TRONO et al., 2001; MALOVRH et al., 2005) e, por isso, pode ter subestimado o número de animais infectados. Trono et al. (2001) identificaram que a IDGA não foi capaz de detectar 24,8% dos animais infectados pelo BLV, enquanto que apenas 2,8% não foram detectados pelo ELISA.

A partir da análise da soroprevalência, pela técnica de ELISA, nas 42 propriedades avaliadas, foi observado que 20 (47,6%) continham pelo menos um animal soropositivo, enquanto que 22 (52,4%) foram livres para o BLV (Figura 3). Esse resultado difere dos encontrados por Trono et al. (2001) e Ott et al. (2003) que obtiveram 84 e 88% das propriedades infectadas na

Argentina e nos Estados Unidos, respectivamente. Em Mafra (SC), apenas 7,6% dos animais foram soropositivos para o BLV e 10,9% das propriedades estavam infectadas (LUDERS, 2001). Já em Londrina (PR), a prevalência foi de 70%, porém a taxa de propriedades infectadas, foi menor, de 35,8% (CARVALHO et al., 1996). O resultado encontrado evidencia o risco de disseminação do BLV nos rebanhos, uma vez que a coabitação de animais saudáveis e infectados contribui para o aumento da prevalência da LEB. Isso reforça a importância do desenvolvimento e aplicação de testes mais sensíveis para o diagnóstico precoce e implantação de programas de controle e erradicação, a fim de evitar a disseminação do BLV nos rebanhos e, consequentemente, os prejuízos ocasionados pela infecção, como queda na produção, mortalidade e restrições de mercado.

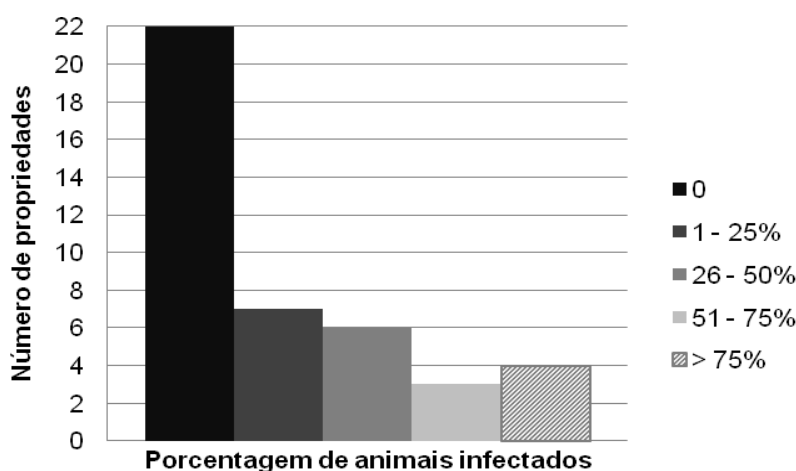


Figura 3 - Representação gráfica da porcentagem de animais com sorologia positiva para o vírus da leucose bovina em relação ao número de propriedades leiteiras, detectada pela técnica de ELISA.

Além disso, o ELISA desenvolvido foi produzido com antígeno viral total, enquanto que kits comerciais de ELISA tem utilizado como antígeno a glicoproteína de superfície gp-51 do BLV (NAGY, 2006). Apesar da gp-51 produzir uma resposta imune persistente, induzindo altos títulos de anticorpos em animais infectados por BLV (VAN DER MAATEN, MILLER, 1990), anticorpos induzidos por outras proteínas virais não são detectáveis nestes ensaios comerciais. Neste sentido, é provável que o ELISA desenvolvido detecte também estes anticorpos, resultando em aumento de intensidade do sinal obtido e, consequentemente, da sensibilidade do ensaio. Contudo, testes comparativos são necessários a fim de verificar tal hipótese. Porém, ressalta-se o potencial uso do ensaio produzido como teste de triagem, o que resultaria em maior rapidez no diagnóstico em relação à técnica de IDGA.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que o ELISA desenvolvido apresentou

um desempenho satisfatório e foi capaz de discriminar animais infectados e não infectados. Embora a sensibilidade e especificidade do teste tenham sido menores que os encontrados na literatura, ele pode ser utilizado em conjunto com a IDGA como teste de triagem, a fim de diminuir as chances de amostras falso-negativas. A prevalência da LEB foi considerada alta e o BLV está amplamente disseminado nos rebanhos leiteiros da região analisada. Esses resultados reforçam a necessidade da implantação de programas de controle da doença e conscientização dos produtores e técnicos sobre os prejuízos ocasionados pela presença do BLV no rebanho.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos médicos veterinários Eduardo Peres Neto e Henrique Ventura, da Secretaria de Agricultura da Prefeitura Municipal de Seara-SC, pelo auxílio na coleta das amostras.

REFERÊNCIAS

- ADASKA, J. M.; MUNÖZ-ZANZI, C. A.; HIETALA, S. K. Evaluation of result variability with a commercial John's disease enzyme-linked immunosorbent assay kit and repeat testing of samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, n.5, p.423-426, 2002.
- BARROS, C. S. L. Leucose Bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. (Ed.). **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 3. ed. Santa Maria: Fernovi, 2007. v.1. p.159-167.
- BARROS FILHO, I. R.; GUIMARÃES, A. K.; SPONCHIADO, D.; KRÜGER, E. R.; WAMMES, E. V.; OLLHOFF, R. D.; DORNBUSCH, P. T.; BIONDO, Q.W. Soroprevalência de anticorpos para o vírus da leucose enzoótica em bovinos criados na região metropolitana de Curitiba, Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.511-515, 2010.
- CARVALHO, L.; BENESI, F. J.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Prevalência de anticorpos séricos antivírus da Leucose dos Bovinos em animais da raça holandesa preto e branca e zebrúinos da raça nelore, criados no polo regional de Londrina, Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.17, n.1, p.53-57, 1996.
- CASTRO, C. C.; NUNES, C. F.; FINGER, P. F.; SIEDLER, B. S.; DUMMER, L.; LIMA, M.; LEITE, F. P.; FISCHER, G.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S. O. Peroxidase-linked assay for detection of antibodies against bovine leukosis virus. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v.34, n.4, p.376-83, 2013.
- D'ANGELINO, R. H.; PITUCO, E. M.; VILLALOBOS, E. M.; HARAKAVA, R.; GREGORI, F.; DEL FAVA, C. Detection of bovine leukemia virus in brains of cattle with a neurological syndrome: pathological and molecular studies. **BioMed Research International**, v.2013, n.1, p.425646, 2013.
- FERNANDES, C. H. C. **Leucose enzoótica dos bovinos: soroprevalência, fatores de risco e níveis séricos de lisozima em bovinos leiteiros do Estado do Tocantins, Brasil**. 2007. 89 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.
- GONZÁLEZ, E. T., LICURSI, M.; BONZO, E. Enzootic bovine leukosis: performance of an indirect ELISA applied in serological diagnosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n. 1, p.1-5, 2007.
- GREINER, M.; SOHR, D.; GOBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, v.185, n.1, p.123-132, 1995.
- JUNIOR, L.A.L.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A. A. Leucose enzoótica bovina e vírus da leucemia bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.22, n.2, p.211-221, 2001.
- KLINTEVALL, K.; NÄSLUND, K.; SVEDLUND, G.; HAJDU, L.; LINDE, N. KLINGEBORN, B. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk. **Journal of Virological Methods**, v.33, n.3, p.319-333, 1991.
- LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, n.1, p.159-174, 1977.
- LUDERS, M.A. **Prevalência de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina em fêmeas com mais de dois anos no rebanho de bovinos leiteiros no município de Mafra, SC**. Lages, 2001. 30 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agroveterinárias/Sanidade Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lajes, 2001.
- MALOVRH, T.; PATE, M.; OCEPEK, M.; KRT, B. Comparison of agar gel immunodiffusion test, enzyme-linked immunosorbent assay and PCR in diagnostics of enzootic bovine leukosis. **Veterinarski Glasnik**, v.59, n.3-4, p.363-370, 2005.
- MARTINEZ, E. Z; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Caderno de Saúde Coletiva**, v.11, n.1, p.7-31, 2003.
- MATOS, P. F.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre os resultados do teste de ELISA e da imunodifusão em gel de ágar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.42, n.3, p.171-179, 2005.
- NAGY, D.W. **Decreasing perinatal bovine leukosis virus infection in calves**. 2006. 96f. Tese (Doctor of Philosophy in Veterinary Medicine) - Faculty of the Graduate School University of Missouri, Columbia, 2006.
- OTT, S. L.; JOHNSON, R.; WELLS, S. J. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v.61, n.4, p.249-262, 2003.
- OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. 7. ed. Paris: World Organisation for Animal Health (OIE), 2012, 1404 p.
- PIOVESAN, M.; FERNANDES, M. H. V.; CORRÊA, R. A.; PRADO, M. H. J.; CAMARGO, A. D.; RODRIGUES P. R. C. Anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1, vírus da diarreia viral bovina e vírus da leucose enzoótica bovina na região da campanha do estado do Rio Grande do Sul. **Science and Animal Health**, v.1, n.1, p.38-49, 2013.

- POLETTO, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, J. C.; BARCELLOS, L. J. G. Prevalência de Brucelose, Tuberculose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.595-598, 2004.
- RAVAZZOLLO, A. P.; DA COSTA, U. Retroviridae. In: FLORES, E.F. (Ed.) **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2007. p.819-822.
- RODRIGUEZ, S. M.; GOLEMBA, M. D.; CAMPOS, R. H.; TRONO, K; JONES, L. R. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. **Journal of General Virology**, v.90, n. 11, p.2788-2797, 2009.
- ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. Enzootic bovine leukosis virus in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.13, n.1, p.107-111, 1981.
- SIMÕES, S. V. D. **Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros criados no estado da Paraíba**, 1988. 118f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.
- SPONCHIADO, D. **Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose enzoótica bovina em rebanhos da raça Holandesa preta e branca, criados no Estado do Paraná**. Curitiba, 2008. 101f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- TRONO, K. G.; PÉREZ-FILGUEIRA, D. M.; DUFFY, S.; BORCA, M. V.; CARRILLO, C. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. **Veterinary Microbiology**, v.83, n.3, p.235-248, 2001.
- VAN DER MAATEN, M; MILLER, J. M. Bovine leukosis virus. In: DINTER, Z.; MOREIN, B. (Eds.). **Virus Infections of Ruminants**. Amsterdã: Elsevier Science Publishers B.V., 1990, p.419-429.
- VAN DER MAATEN, M. J.; MILLER, J. M. Replication of bovine leukemia virus in monolayer cell culture. **Bibliotheca Haematologica.**, v.43, n.1, p.360-362, 1975.
- WRIGHT, P. F.; NILSSON, E.; VANROOIJ, E. M. A.; LELENTA, M.; JEGGO, M. H. Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. **Revue Scientifique de l'Office International des Epizooties**, v.12, n.2, p.435-450, 1993.