

# CONTAGEM LINFOCITÁRIA E ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA EM REBANHOS DO RIO DE JANEIRO<sup>1</sup>

MARIA IGNEZ C. FERREIRA<sup>2</sup>, CARLOS H. ROMERO<sup>3</sup> E CHERYL A. ROWE<sup>3</sup>

**ABSTRACT.**- Ferreira M.I.C., Romero C.H. & Rowe C.A. 1982. [Absolute lymphocyte counts and antibodies against enzootic bovine leukosis virus in dairy herds of Rio de Janeiro.] Contagem linfocitária e anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina em rebanhos do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2(3):99-104. Embrapa - Patologia Animal, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23460, Brazil.

Fifty-five dairy cows from two herds located in the State of Rio de Janeiro, were evaluated monthly over a six month period for persistent lymphocytosis (PL) and for the presence of plasma antibody to the major glycoprotein (gp51) of bovine leukosis virus (BLV), as evidence of infection. Absolute lymphocyte counts were superimposed on Bendixen's hematological key for bovine leukosis. Animals were considered to have PL when, during the six month period, three absolute lymphocyte counts were above 7000 per mm<sup>3</sup> of blood. In herd A, of 15 absolute lymphocyte counts from three antibody-negative cows, 13 (86.7%) were normal and two (13.3%) suspect. Counts from 17 antibody-positive cows from the same herd showed 29 (30.5%) normal, 36 (37.9%) suspect and 30 (31.6%) leukotic. In herd B, of 82 absolute lymphocyte counts from 14 antibody-negative cows, 45 (54.9%) were normal, 23 (28.1%) suspect and 14 (17.0%) leukotic. Counts from 21 antibody-positive cows showed that 53 (45.3%) were normal, 40 (34.2%) were suspect and 24 (20.5%) were leukotic. It is concluded that PL is an unreliable criterion to identify cattle infected with BLV in the subtropical environment, and must not be used in programs aimed at controlling or eradicating BLV from infected herds. However, the hematological keys will continue to be useful in the diagnosis of the clinical disease, that is, the bovine lymphosarcoma. The use of the immunodiffusion test to detect antibody to gp51 in the plasma or serum of infected cattle is a simple and sensitive tool in the control of BLV infection.

**INDEX TERMS:** Enzootic bovine leukosis, virus, persistent lymphocytosis, antibodies, glycoprotein.

**SINOPSE.**- Cinquenta e cinco vacas leiteiras de dois rebanhos localizados no Estado do Rio de Janeiro foram examinadas mensalmente, durante um período de seis meses, para determinar a linfocitose persistente (LP) e a presença, no plasma, de anticorpos contra a glicoproteína maior (gp51) do vírus da leucose bovina (VLB), como evidência da infecção. As contagens linfocitárias absolutas foram sobrepostas à chave hematológica de Bendixen para leucose bovina. Os animais foram considerados portadores de LP quando, durante o período de seis meses, três contagens linfocitárias absolutas estavam acima de 7000 por mm<sup>3</sup> de sangue. No rebanho A, de 15 contagens linfocitárias absolutas de três vacas anticorpo-negativas, 13 (86,7%) eram normais e duas (13,3%) atingiram a faixa de suspeitas. De 17 contagens de 17 vacas anticorpo-positivas do mesmo rebanho, 29 mostraram-se (30,5%) normais, 36 (37,9%) suspeitas e 30 (31,6%) leucóticas. No rebanho B, de

82 contagens linfocitárias absolutas de 14 vacas anticorpo-negativas, 45 (54,9%) eram normais, 23 (28,1%) suspeitas e 14 (17,0%) leucóticas. As 21 contagens de 21 vacas anticorpo-positivas mostraram que 53 (45,3%) eram normais, 40 (34,2%) eram suspeitas e 24 (20,5%) eram leucóticas. Concluiu-se que a LP é um critério pouco confiável na detecção de bovinos infectados com o VLB num ambiente subtropical e não deve ser utilizada em programas que objetivam a controlar ou erradicar o VLB de rebanhos infectados. Porém, as chaves hematológicas continuarão sendo úteis no diagnóstico da doença clínica, o linfossarcoma bovino. Ficou também evidente que a prova de imunodifusão para detectar anticorpos contra gp51 no plasma ou soro de animais infectados é um método simples e sensível para o controle da leucose bovina.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Leucose enzoótica bovina, vírus, linfocitose persistente, anticorpos, glicoproteína.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 12 de janeiro de 1982.

Parte de tese de Mestrado pela autora principal, Curso de Pós-graduação em Patologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

<sup>2</sup> Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Seropédica, RJ 23460; bolsista do CNPq.

<sup>3</sup> Unidade de Pesquisa de Patologia Animal, EMBRAPA, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23460.

## INTRODUÇÃO

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma neoplasia do tecido linfóide caracterizada por proliferação descontrolada de linfócitos B (Muscoy et al. 1974). A doença é causada por um oncovírus de tipo C (Miller et al. 1969) da família Retroviridae, o vírus da leucose bovina (VLB). O vírus parece ser exóge-

no à espécie bovina (Kettmann et al. 1976) e a infecção é adquirida principalmente por transmissão horizontal de bovinos infectados. As vacas infectadas também transmitem o VLB, epigeneticamente, no útero, a cerca de 20% de suas crias (Piper et al. 1979). Aproximadamente 29% dos bovinos que adquirem a infecção, desenvolvem linfocitose persistente (LP) e menos de 5%, eventualmente, desenvolvem a doença clínica e morrem com tumores linfóides (Ferrer et al. 1979). Estes achados questionam a utilização de chaves hematológicas para detectar bovinos portadores (Bendixen 1960) pois a infecção de muitos animais deixa de ser reconhecida e tais animais se constituem em contínuas fontes de infecção. Estas chaves foram concebidas tomando como critério valores hematológicos de bovinos de origem européia localizados no continente europeu e não teriam, necessariamente, o mesmo valor prático em bacias leiteiras tropicais e sub-tropicais nas quais se incrementa, cada vez mais, a exploração de bovinos mestiços *Bos indicus x Bos taurus* e onde as condições sanitárias são diferentes.

A prova de imunodifusão em ágar gel para detectar anticorpos no plasma ou no soro contra a glicoproteína maior (gp51) do VLB (Miller & Van Der Maaten 1977) tem sido adotada pelos órgãos sanitários de vários países como o teste oficial para diagnosticar a infecção pelo VLB. A prova é sensível e fácil de ser executada e um resultado positivo é indicativo da infecção pelo VLB e não da doença.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade diagnóstica da chave de Bendixen, a chave hematológica mais utilizada para o diagnóstico da LEB, e compará-la com a prova de imunodifusão em ágar gel para detectar anticorpos contra gp51 do VLB, em vacas leiteiras mestiças, criadas numa região subtropical e mantidas em um sistema de pastagem extensivo

## MATERIAL E MÉTODOS

**Animais de experimentação.** Foram utilizadas vacas com mais de quatro anos de idade que se encontravam dentro dos três primeiros meses de lactação. As vacas pertenciam a dois rebanhos leiteiros localizados no município de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, e eram mestiças zebu x holandês, com vários graus de sangue. Ambos os rebanhos eram mantidos em sistema de pastagem extensivos e são referidos neste trabalho como rebanhos A e B.

**Amostras de sangue.** As vacas dos rebanhos A e B foram classificadas como livres ou infectadas com o VLB em levantamento soro-epidemiológico preliminar, utilizando-se a prova de imunodifusão em ágar gel. Para o presente estudo, foram selecionadas três vacas livres e 17 vacas infectadas do rebanho A e 14 vacas livres e 21 vacas infectadas do rebanho B. Todos os animais em experimentação foram sangrados mensalmente, durante um período de seis meses, para determinação das contagens linfocitárias absolutas de cada um e para ser verificada a associação dos valores hematológicos encontrados com a ausência ou a presença de anticorpos contra o VLB. O sangue de cada animal era obtido por punção da veia jugular e coletado em frascos de vidro contendo EDTA, utilizando-se agulha estéril para cada vaca.

**Contagens linfocitárias absolutas.** O número total de linfócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue foi calculado depois de determinado o número total e diferencial de leucócitos por técnicas hematológicas conhecidas (Ferreira Neto et al. 1975).

**Plasmas para determinação de anticorpos.** Uma porção do sangue com EDTA de cada animal era centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos e o plasma obtido era congelado a  $-20^\circ\text{C}$  antes de ser testado para detecção de anticorpos pela prova de imunodifusão.

**Prova de imunodifusão para o VLB.** Foi utilizada a prova em placa de imunodifusão em ágar gel com antígenos e soros referência que reagiam formando duas linhas de precipitação específicas para a proteína estrutural p25 e gp51 do VLB. A origem dos reagentes referência assim como as condições de montagem da prova de imunodifusão foram previamente descritas (Romero & Rowe 1981, Ferreira et al. 1982).

## RESULTADOS

Os resultados obtidos estão representados em quatro gráficos visando demonstrar, sob forma panorâmica, a variação mensal, durante um período de seis meses, das contagens linfocitárias absolutas de cada animal (Fig. 1 a 4). Estes resultados foram enquadrados na chave hematológica de Bendixen, apresentada no Quadro 1. O número total de linfócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue de cada bovino é representado por uma letra. Assim, por exemplo, as contagens linfocitárias absolutas<sup>4</sup> da vaca K, sorologicamente portadora de anticorpos contra gp51 do VLB, do rebanho B, foram de 9.417, 6.816, 9.933, 6.475, 8.416 e 9.883 para os meses de abril, maio, junho, julho, agosto e setembro, respectivamente. De acordo com a chave hematológica de Bendixen estas taxas enquadravam-se quase sempre na faixa positiva, com exceção dos meses de maio e julho, em que se enquadravam como suspeitas.

Foram testados 15 plasmas de três vacas soro-negativas do rebanho A, pela prova de imunodifusão para detectar anticorpos contra o VLB, com resultados negativos. As contagens linfocitárias absolutas nestas vacas variaram entre 2.968 e 6.072 linfócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue enquanto que as percentagens de linfócitos fluuavam entre 28 e 50%. Quando as contagens linfocitárias absolutas foram sobrepostas à chave hematológica de Bendixen, encontrou-se que 13 (86,7%) dos casos correspondiam a achados hematológicos negativos para leucose enquanto que dois (13,3%) foram considerados como suspeitos (Fig. 1). Ainda no rebanho A, entre 95 plasmas correspondentes a 17 vacas soro-positivas pela prova de imunodifusão, encontram-se anticorpos em 90 amostras, dois plasmas foram negativos e três não foram testados. As contagens linfocitárias absolutas nestas 17 vacas variaram entre 2.632 e 18.860 linfócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue enquanto que as percentagens de linfócitos fluuavam entre 22 e 82%. As 95 contagens linfocitárias absolutas realizadas foram enquadradas na chave de Bendixen encontrando-se que 29 (30,5%) correspondiam a taxas

<sup>4</sup> As contagens linfocitárias absolutas de cada bovino podem ser encontradas em Ferreira (1982).

negativas, 36 (37,9%) a suspeitas e 30 (31,6%) a positivas em relação à LEB (Fig. 2).

No rebanho B, das 14 vacas soro-negativas, 13 mantiveram-se livres de infecção com o VLB. De 82 plasmas testados na prova de imunodifusão, 81 não continham anticorpos enquanto que um plasma se tornou positivo (vaca N) no quarto mês de avaliação. As contagens linfocitárias absolutas nas 14 vacas variaram entre 1.838 e 12.888 linfócitos por mm<sup>3</sup> de sangue enquanto que as percentagens de linfócitos variaram entre 25 e 89%. Quando as contagens linfocitárias absolutas destas vacas foram avaliadas pela chave de Bendixen, verificou-se que 45 (54,9%) eram negativas, 23 (28,1%) suspeitas e 14 (17,0%) positivas enquanto que a amostra que se tinha tornado soro-positiva caía na faixa de suspeita (Fig. 3). Foram também testadas 117 amostras de plasma correspondentes a 21 vacas soro-positivas do mesmo rebanho, encontrando-se anticorpos em 115. Um plasma foi negativo e outro não foi testado. As contagens linfocitárias absolutas nas 21 vacas variaram entre 2.112 e 13.735 linfócitos por mm<sup>3</sup> de sangue enquanto que as percentagens de linfócitos variaram entre 28 e 82%. Quando as 117 contagens linfocitárias absolutas foram sobrepostas à chave de Bendixen, 53 (45,3%) indicavam um resultado negativo, 40 (34,2%) eram suspeitas e 24 (20,5%) foram consideradas como infectadas (Fig. 4).

DISCUSSÃO

Durante a realização do estudo, 55 vacas pertencentes a dois rebanhos leiteiros localizados no Estado do Rio de Janeiro, uma região subtropical, foram examinadas, mensalmente, du-

rante um período de seis meses, tanto pela chave hematológica de Bendixen (1960) para determinar a linfocitose persistente (LP) como pela prova de imunodifusão para detectar anticorpos contra a glicoproteína maior gp51 do VLB, para comparar estes dois métodos de diagnóstico da LEB. As vacas foram selecionadas dentro de uma população maior, como positivas ou negativas, com base na presença ou ausência de anticorpos contra gp51 do VLB no soro. Cada animal era considerado como portador de LP quando apresentava um mínimo de três contagens enquadradas dentro da faixa positiva da chave de Bendixen durante os seis meses do experimento. Assim sendo, as três vacas soro-negativas do rebanho A não apresentaram LP em nenhum exame, já das 17 vacas soro-positivas deste mesmo rebanho, seis (35,3%) apresentaram LP em, pelo menos, três contagens. Em outras palavras, 64,7% dos bovinos infectados não puderam ser identificados quando avaliados pela chave hematológica de Bendixen. Das 14 vacas soro-negativas do rebanho B, 13 mantiveram-se livres de anticorpos durante o transcurso da avaliação. Destas 13 vacas, 10 (76,9%) não apresentaram LP e três (23,1%) revelaram falsa LP. Das 21 vacas soro-positivas do mesmo rebanho, apenas três (14,3%) apresentaram LP enquanto que 18 (85,7%) não puderam ser reconhecidas como positivas pela chave de Bendixen, comportando-se como falso-negativas.

Se, no presente trabalho, fosse tomado como critério o resultado de um único exame hematológico para diagnosticar a infecção com a LEB (Miller 1980), os resultados individuais de cada exame mensal revelariam 86,7% de contagens negativas de 13,3% de suspeitas para a LEB nas vacas soro-negativas do rebanho A. Neste mesmo rebanho, considerando-se as con-

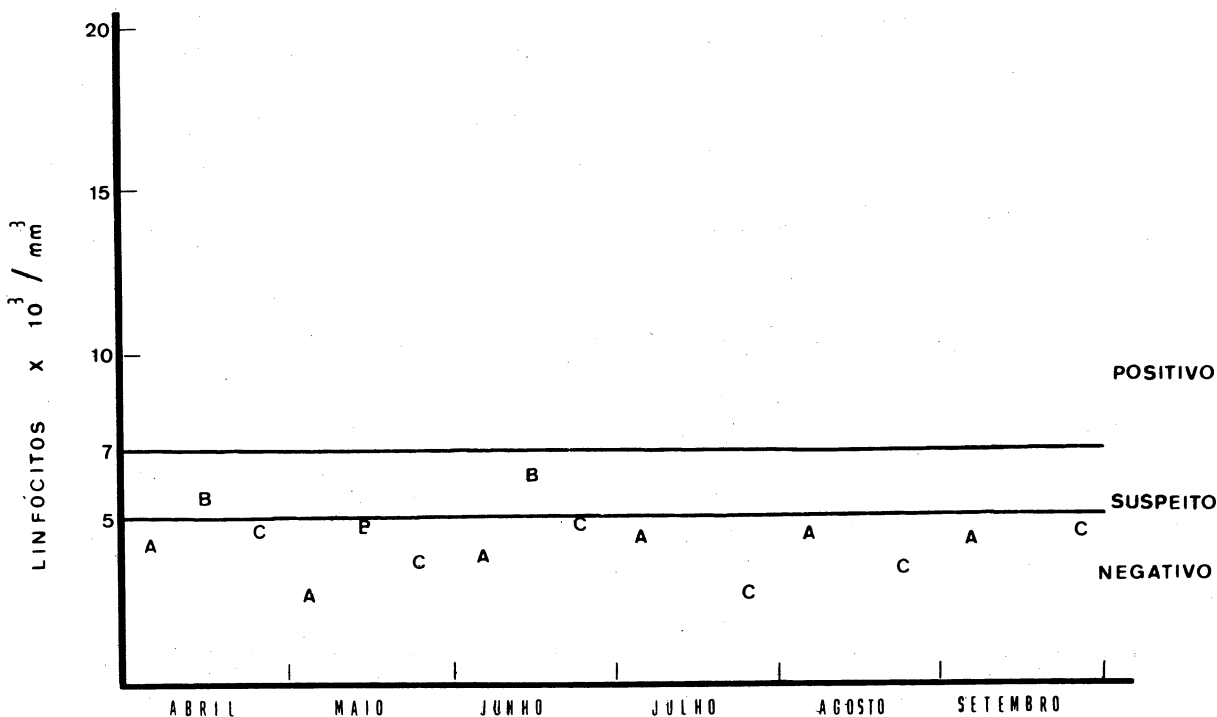


Fig. 1. Distribuição das contagens linfocitárias absolutas segundo a chave de Bendixen para leucose bovina, de três vacas livres de anticorpos contra o VLB, do rebanho A.

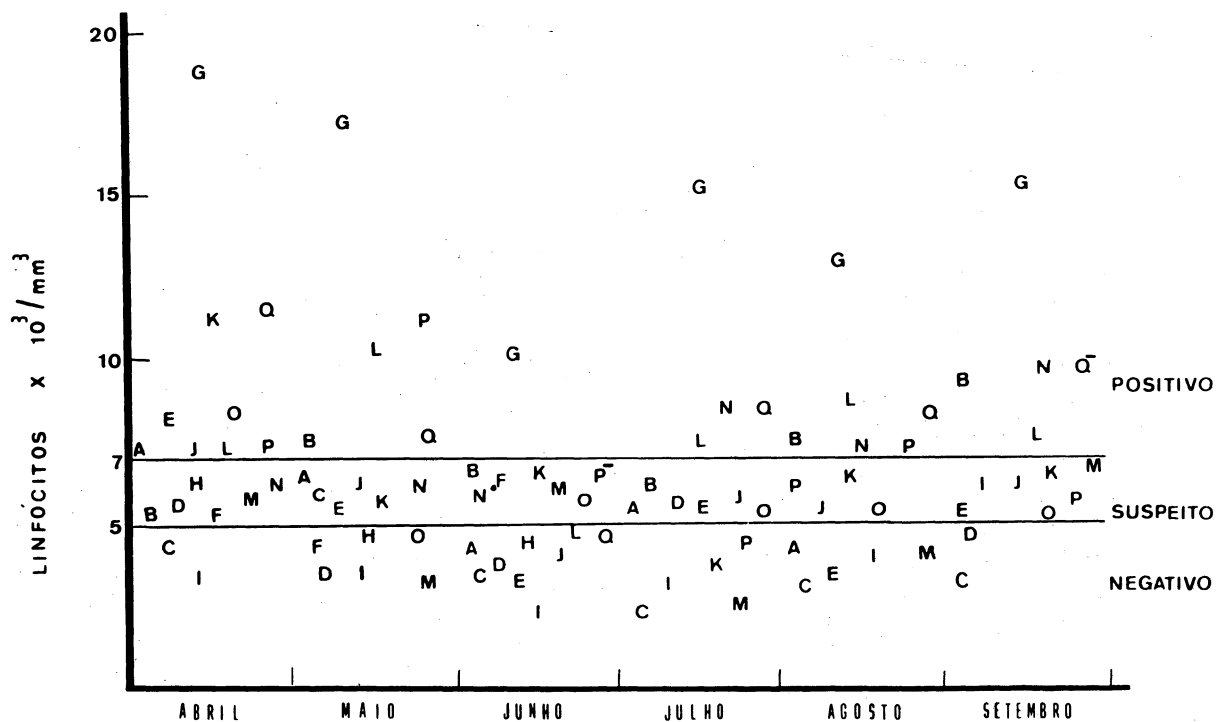


Fig. 2. Distribuição das contagens linfocitárias absolutas segundo a chave de Bendixen para leucose bovina, de 17 vacas com anticorpos contra gp51 do VLB, do rebanho A.

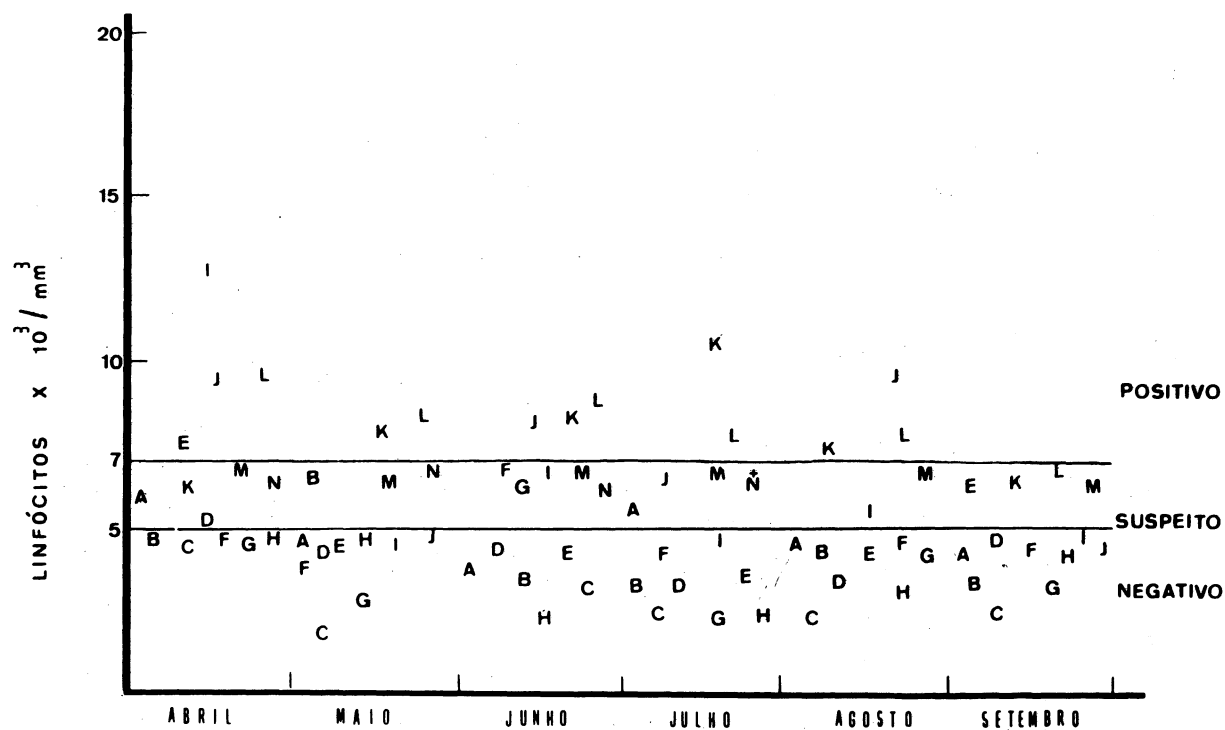


Fig. 3. Distribuição das contagens linfocitárias absolutas segundo a chave de Bendixen para leucose bovina, de 14 vacas livres de anticorpos contra o VLB, do rebanho B.

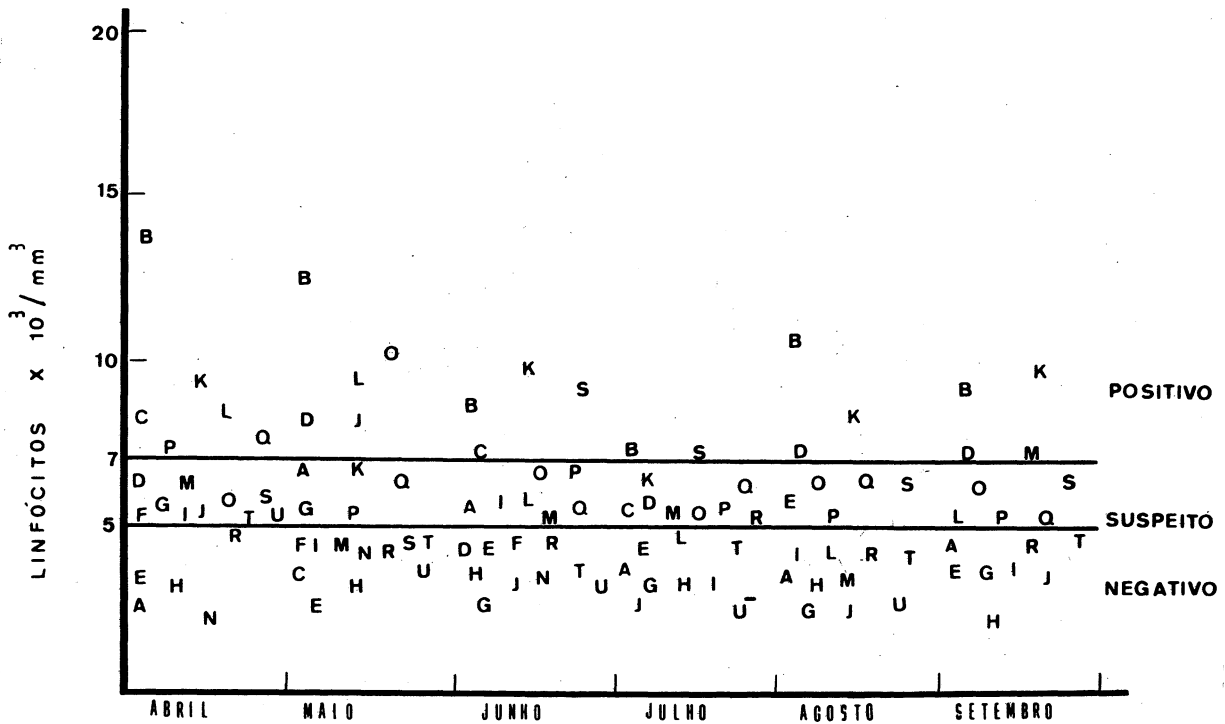


Fig. 4. Distribuição das contagens linfocitárias absolutas segundo a chave de Bendixen para leucose bovina, de 21 vacas com anticorpos contra gp51 do VLB, do rebanho B.

tagens linfocitárias absolutas das vacas sorologicamente positivas obter-se-ia apenas 31,6% de resultados positivos, 37,9% suspeitos e 30,5% de resultados falso-negativos. Já no rebanho B, observar-se-iam 17,1% de resultados falso-positivos, 28% suspeitos e 54,9% de resultados negativos nas vacas sorologicamente negativas e tão somente 20,5% de resultados positivos, 34,2% suspeitos e 45,3% de resultados falso-negativos, no grupo de vacas sorologicamente positivas.

Considerando-se que se apenas uma contagem linfocitária absoluta acima de 7.000 linfócitos por mm<sup>3</sup> de sangue fosse suficiente para o diagnóstico do animal portador de LP, nenhum animal soro-negativo do rebanho A poderia ser classificado como positivo para LP. No grupo soro-positivo deste mesmo rebanho, 11 vacas (64,7%) poderiam ser classificadas como positivas, deixando de ser identificados como positivos seis animais (35,3%). No rebanho B, no grupo de animais sorologicamente negativos, cinco vacas (35,7%) apresentariam pelo menos uma contagem linfocitária absoluta elevada, sendo, portanto, classificadas erroneamente como positivas. Neste mesmo rebanho, dos animais soro-positivos, poder-se-ia classificar 11 vacas (52,4%) como positivas para a LP e 10 vacas (47,6%) não poderiam ser identificadas como tal, sendo por isto diagnosticadas como falso-negativas.

No Japão, estudos sobre as taxas de infecção de bovinos de corte da raça "Japanese Black Cattle" demonstraram que aproximadamente 16% dos bovinos apresentavam linfocitose enquanto que 60% possuíam anticorpos contra gp51 (Onuma et al. 1979). Dos animais com linfocitose, 88% possuíam anticorpos contra gp55 e 38,3% dos animais com contagens lin-

focitárias normais também os possuíam. Isto quer dizer que nem todos os bovinos que apresentam linfocitose estão infectados com o VLB e que quase 40% dos bovinos infectados, a julgar pela presença de anticorpos, não são identificados com uma avaliação hematológica. Estes resultados também parecem indicar que a soro-conversão acontece antes das desordens hematológicas. Resultados de pesquisas realizadas na Holanda (Ressang et al. 1976) confirmaram as restrições sérias das chaves hematológicas na identificação precoce de bovinos infectados com o VLB. Estudos similares na Alemanha Ocidental

Quadro 1. Chave de Bendixen para classificar bovinos com linfocitose persistente<sup>(a)</sup>

Idade em anos	Contagem linfocitária absoluta por mm <sup>3</sup> de sangue		
	Negativo	Suspeito	Positivo
0 - 1	< 10.000	10.000-12.000	> 12.000
1 - 2	< 9.000	9.000-11.000	> 11.000
2 - 3	< 7.500	7.500- 9.500	> 9.500
3 - 4	< 6.500	6.500- 8.500	> 8.500
> 4	< 5.000	5.000- 7.000	> 7.000

(a) Bendixen 1960.

(Straub 1978) demonstraram a superioridade dos testes de imunodifusão com os antígenos p25 e gp51.

Os bovinos utilizados na presente pesquisa eram fêmeas mestiças zebu x holandês, maiores de quatro anos de idade e mantidos em sistemas de pastagens extensivos, o ambiente típico correspondente a uma região subtropical, na qual são abundantes os parasitismos por helmintos, artrópodos, insetos e hematozoários, entre outros. Sem dúvida, existiram oportunidades para as vacas em experimentação responderem a alguns destes elementos com respostas linfocitárias complexas e imprevisíveis, as quais poderiam ser interpretadas como devidas a infecção com o VLB. Na opinião de alguns autores, a LP dos animais infectados parece resultar de uma proliferação benigna de linfócitos B (Kenyon & Piper 1977) e em maioria os bovinos com esta linfocitose não desenvolvem a doença tumoral durante um período de oito anos (Abt et al. 1970). Estas observações indicam que a LP não é uma doença nem uma forma subclínica da LEB. Além disso, a LP deve ser diferenciada das linfocitoses transitórias que podem ocorrer em numerosas condições não associadas à LEB. Porém, Ferrer et al. (1979) afirmam que rebanhos com casos múltiplos de LEB contêm bovinos clinicamente normais mas com LP. Em alguns casos, o desenvolvimento de tumores linfóides é antecedido por esta LP, a qual pode persistir por vários anos. Bendixen (1960) interpretou suas observações originais acreditando que a LP e a LEB são duas respostas do hospedeiro frente a um mesmo agente etiológico, sendo que a LP corresponderia a uma forma subclínica da LEB. Pesquisas têm demonstrado que a LP e a LEB são influenciadas geneticamente e correspondem na verdade a respostas independentes de cada indivíduo frente a uma infecção com o VLB (Ferrer et al. 1979).

As chaves hematológicas para a LEB continuarão sendo úteis no diagnóstico da doença clínica quando os tumores já estão presentes no animal, mas sua utilização não é aconselhável no teste de bovinos para fins de importação e exportação, e em programas de controle e erradicação em regiões subtropicais devido a sua pouca sensibilidade, como revelou a presente pesquisa. O desenvolvimento da prova de imunodifusão em ágar gel para detectar anticorpos contra a glicoproteína maior gp51 do VLB como evidência desta infecção tem aprimorado os programas de controle da LEB constituindo-se, na atualidade, a prova oficialmente aceita e de maior utilização na identificação de bovinos infectados com o vírus da leucose enzoótica bovina no mundo inteiro. Os resultados de nosso trabalho confirmam em ambiente subtropical, a especificidade e sensibilidade da prova de imunodifusão.

*Agradecimentos.*- Agradecemos ao Dr. Gonzalo E. Moya pelas fotografias da distribuição das contagens linfocitárias absolutas. O presente trabalho contou com o auxílio financeiro (n.º 222.1969/77) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil

## REFERÊNCIAS

- Abt D.A., Marshak R.R., Kulp H.W. & Pollock R.J. 1970. Studies on the relationship between lymphocytosis and bovine leukosis. Proc. 4th Int. Symp. Comp. Leuk. Res. Bibliotheca Haematol. 36:527-536.
- Bendixen H.J. 1960. Untersuchungen ueber die Rinderleukose in Daenemark. II. Pathogenesis und Enzoootologie der uebertragbaren Rinderleukose. Dtsch. Tieraerztl. Wschr. 67:57-63.
- Ferreira M.I.C. 1982. A leucose bovina - Estudos hematológicos e sorológicos em bovinos do Estado do Rio de Janeiro. Tese de Mestrado, Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro.
- Ferreira M.I.C., Romero C.H. & Rowe C.A. 1982. Estudo comparativo entre as provas de imunodifusão em placa e em lâmina na detecção de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina. Pesq. Vet. Bras. 2(2):49-53.
- Ferreira Neto J.M., Viana E.S. & Magalhães L.M. 1975. Patologia clínica veterinária. Belo Horizonte, Minas Gerais, p. 46-87.
- Ferrer J.F., Marshak R.R., Abt D.A. & Kenyon S.J. 1979. Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle: A review. J. Am. Vet. Med. Ass. 175:705-708.
- Kenyon S.C. & Piper C.E. 1977. Properties of density gradient-fractionated peripheral blood leukocytes from cattle infected with bovine leukemia virus. Infect. Immun. 16:898-903.
- Kettmann R., Portetelle D., Mammerickx M., Cleuter Y., Dekegel D., Galoux M., Ghysdael J., Burny A. & Chantrenne H. 1976. Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus. Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 73:1014-1018.
- Miller L.D. 1980. Export testing for enzootic bovine leukosis. J. Am. Vet. Med. Ass. 177:620-622.
- Miller J.M., Miller L.D., Olson C. & Gillette K.G. 1969. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. J. Natl Cancer Inst. 43:1297-1305.
- Miller J.M. & Van Der Maaten M.J. 1977. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. Europ. J. Cancer 13:1369-1375.
- Muscoplat C.D., Johnson D.W., Pomeroy K.A., Olson J.M., Larson V. L., Stevens J.B. & Sørensen D.K. 1974. Lymphocyte surface immunoglobulin, frequency in normal and lymphocytotic cattle. Am. J. Vet. Res. 35:593-595.
- Onuma M., Ishihara K., Ohtani T., Honma T., Mikami T. & Izawa H. 1979. Seroepizootiological survey on antibodies against bovine leukemia virus in Japanese Black cattle. Jap. J. Vet. Sci. 41:601-605.
- Piper C.E., Ferrer J.F., Abt D.A. & Marshak R.R. 1979. Postnatal and prenatal transmission of the bovine leukemia virus under natural conditions. J. Natl Cancer Inst. 62:165-168.
- Ressang A.A., Ellens D.J., Mastenbroek N., Quak J., Miller J.M. & Van Der Maaten M.J. 1976. Studies on bovine leukemia. II. Haematological, serological, virological and electron microscopical diagnosis. Zbl. Vet. Med. B, 23:566-579.
- Romero C.H. & Rowe C.A. 1981. Enzoootic bovine leukosis virus in Brazil. Trop. Anim. Hlth Prod. 13:107-111.
- Straub O.C. 1978. Diagnosis of enzootic bovine leukosis: A comparison of haematological and immunodiffusion tests. Res. Vet. Sci. 25:13-15.