

17
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DETERMINACION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS
CONTRA EL VIRUS DE LEUCOSIS EN BOVINOS
HOLSTEIN UTILIZANDO LAS PRUEBAS DE
INMUNODIFUSION Y ELISA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A :
ABRAHAM ARANDA SANCHEZ**

Co-Asesores: MVZ. Juan Monroy Basilio
MVZ. Heroldo Palomares Hilton
MVZ. Moises Fraire Cachon



México, D. F.

1991

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

III
C O N T E N I D O

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS GENERALES	8
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS	12
DISCUSION	13
CONCLUSIONES	15
GRAFICAS	16
LITERATURA	21

RESUMEN

Aranda Sanchez Abraham. Determinación de anticuerpos específicos contra el virus de leucosis en Bovinos Holstein Friesian utilizando las pruebas de Inmunodifusión y ELISA. Como Co-asesores M.V.Z. M.C. Juan Monroy Basilio; M.V.Z. Heroldo Palomares Hilton y M.V.Z. Moises Fraire Cachon.

La Leucosis Enzoótica Bovina se considera la principal neoplasia maligna de los bovinos que afecta el sistema linfocitario y se presenta más comúnmente en ganado adulto, entre los 5 y 8 años de edad, en razas lecheras. Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) Determinar la presencia de anticuerpos específicos al virus de Leucosis bovina mediante las pruebas de Inmunodifusión en gel de agar y Valoración inmunoabsorbente ligada a enzima en Bovinos Holstein Friesian de importación y nacionales y 2) Determinar la prevalencia de la enfermedad en los Bovinos Holstein Friesian del Centro de Mejoramiento Genético de Leche Industrializada Conasupo, el cual cuenta con una población de 1739 animales. Analizar los resultados al utilizar la prueba de I.D.G.A. y la prueba de ELISA. Se muestrearon 134 animales de la raza Holstein Friesian al azar que se dividieron en 4 grupos:

1) animales adultos nacionales; 2) animales jóvenes nacionales; 3) animales adultos de importación y el 4) animales jóvenes importación. Se obtuvo de cada animal 10 ml de sangre por medio de punción en la vena yugular y arteria coccígea, utilizando tubos al vacío.

Las 2 pruebas inmunológicas utilizadas mostraron resultados similares obteniendo una prevalencia del 34.3% y no se encontró diferencia significativa entre bovinos jóvenes y adultos. La diferencia entre animales nacionales con importados fué significativa ($p < .05$) lo que indica que los animales importados en este centro de Mejoramiento Genético presentan mayor frecuencia de reactores positivos al virus de leucosis bovina que los nacionales.

II. INTRODUCCION

La Leucosis bovina, también llamada: Leucemia Bovina, Linfoma maligno, Linfocitoma, Linfosarcoma bovino, Linfoblastoma, Leucosis linfoide, Pseudoleucemia, Leucemia adulta, Linfomasarcomatosis, Linfadenosis, Leucemia aleucémica, Hemoblastosis, Linfoblastoma, es una de las principales neoplasias malignas del sistema linfocitario de los bovinos. (1,2,7,12,27,30)

Dentro del complejo de Leucosis Bovina se han considerado 3 formas anatomoclínicas:

1) La Leucosis Esporádica Bovina (LSB) es rara, comúnmente afecta a ganado menor de 3 años de edad; en ésta se incluyen tres categorías clínicas juvenil, tímica y cutánea, caracterizadas por una proliferación del tejido linfoide.

2) El Linfosarcoma enzootico bovino (LEB) se sigue considerando la neoplasia maligna mas frecuente en los bovinos. Se caracteriza por la aparición de múltiples casos de linfosarcoma multicéntrico en animales adultos; desarrollándose los tumores con rapidez en muchos sitios y se acompaña con variación de signos y síndromes clínicos.

3) La Linfocitosis Persistente (LP) es la forma subclínica o preleucémica de la (LEB). se observa en animales sanos y en estado de portador asintomático en el que el virus permanece en el organismo sin causar signos clínicos. (1.2.3.7.12,27,28)

El LEB es causado por un Retrovirus Tipo C antigénicamente diferente a otros virus causantes de leucemia de otras especies y caracterizado por ocasionar la proliferación y agregación de linfocitos neoplásicos en la mayoría de los órganos (1.12).

La enfermedad fué descrita inicialmente en 1878 en Alemania y Polonia y se difundió por toda la costa del mar Báltico. En el transcurso de la primera y segunda guerras mundiales se movilizó gran cantidad de ganado procedente de Europa hacia ciudades de Norteamérica y de aquí se extendió a otras ciudades lo que provocó que se diseminara. Actualmente la distribución es mundial, habiendo información sobre la Leucosis enzoótica bovina en Europa, Norteamérica, Centroamérica, Sudamérica y en Asia (3,14). En México los primeros informes de la presencia de la enfermedad en el país data de 1967 (1).

La importancia económica y epidemiológica del virus de la Leucemia Bovina (VLB) radica principalmente en las pérdidas que ocasiona a consecuencia de la presentación maligna del mismo (12,22). Por lo que se establecen algunos principios, a nivel de hato para su detección y control, ya que algunos

países europeos y latinoamericanos han impuesto restricciones a países exportadores del ganado portador del virus como los E.U., Colombia, Costa Rica, (12,22,24). Los antígenos son de gran importancia en las pruebas de serología como IDGA y Valoración Inmunoabsorbente Ligada a Enzima (27,34,36).

Etiología: El virus de la Leucemia Bovina fue aislado por primera vez en 1969 a partir de linfocitos infectados de bovino. (12) Es un virus de la familia Retroviridae, subfamilia Oncoviridae, género oncovirus con RNA de 100 a 120 nanómetros y por contener la enzima transcriptasa reversa que le permite hacer filamentos de DNA que se acoplan a la estructura de su propio RNA. Los filamentos dobles de DNA se insertan al DNA de un linfocito donde se replican por medio de divisiones celulares. Los organismos infectados responden produciendo anticuerpos contra el virus, los que no pueden atacar porque se encuentran intracelularmente e inhiben la liberación de viriones a la circulación general por lo que no hay viremia (10,12,27). El (VLB) integra a dos tipos de antígenos estructurales: el antígeno externo, compuesto de glicoproteínas gp51, gp58, gp60, que son las de mayor tamaño (70,000 Daltones) y un antígeno de constitución proteica p24 ó p25, de menor peso molecular (24,000 Daltones) (2,26). Es diferente a los virus tipos C de otras especies, por no poseer antígenos p30 y p70, aunque es morfológicamente similar a estos. El virus puede ser destruido por pasteurización. "sobrevive" pocas

horas en el medio ambiente y puede conservarse a temperatura bajo cero y en medios de cultivo amortiguados de -70 a -180°C (12).

El virus, en condiciones naturales, sólo afecta al bovino y en forma experimental a ovinos y caprinos. Tiene capacidad para infectar células de ovino, caprino, canideo, murciélago, simio y humano. (2,7,25,30,33). No se ha comprobado que afecte al humano, ni se relaciona con la leucemia de otras especies (11,25).

El modo de transmisión por contacto, resulta de la exposición de animales sanos a enfermos mediante fomites que contienen el virus. Otras formas de transmisión son por medio de agujas, jeringas, descornadores, instrumentos quirúrgicos y aretadores, entre otros.

El papel que juegan los insectos hematófagos en la transmisión del VLB es de importancia ya que se ha comprobado que en zonas donde la población de insectos es alta, la incidencia de la infección por el VLB y de linfocitosis persistente es particularmente alta. (8,11,12)

No se ha demostrado la presencia del virus en la saliva y en secreciones nasales pero sí aparece en forma intermitente en orina de ganado infectado (11,12). La infección a través de la leche infectada con el VLB parece ser de poca importancia en la transmisión de la enfermedad al becerro (7). La transmisión prenatal o congénita de VLB es baja de aproximadamente el 18% y ocurre al tercer mes de la gestación, ya que el feto ha adquirido competencia

inmunológica demostrable con la producción de anticuerpos contra el VLB que se detectan por IDGA (8.11.12.28). En 1981 Lucas demostró la presencia del VLB en semen de toros por la prueba de I.D.G.A. (19), no representando esta forma mayor importancia, debido a que el proceso para obtención de semen evita que el virus permanezca viable, pero no deja de considerarse una forma potencial de transmisión (16.21).

La transmisión de la enfermedad no ocurre en ovocitos o embriones, por lo que la inseminación artificial y la transferencia de embriones de donadoras positivas a receptoras negativas son medios que impiden la propagación de la infección por el VLB (7.11.12.15.16).

Para el diagnóstico de la infección se han empleado las siguientes técnicas:

1.- Prueba de Inmunodifusión (ID) o Precipitación en Gel de Agar: se usa esta técnica para descubrir antígenos virales o determinar la reactividad cruzada de dichos antígenos virales (2.12.23.29.33). La prueba falla al detectar reactores positivos con niveles bajos de la infección y se recomienda como método de rastreo inicial.

2.- Inmunofluorescencia (IF): es un procedimiento inmunológico que se basa en la detección de una reacción antígeno-anticuerpo in vitro hecha visible por la conjugación de un colorante fluorescente o fluorocromo a los anticuerpos (32).

3.- Prueba de Radioinmunovaloración (RIA): se lleva a cabo la detección de anticuerpo contra antígeno viral por radioinmunoprecipitación, usando el antígeno p25 o el gp51 que se utiliza principalmente cuando el suero tiene bajos niveles de anticuerpos .(22)

4.- Prueba de Contraínmunolectroforesis (IEP): se aplica esta prueba para virus o antígenos virales cargados negativamente (23).

5.- Valoración Inmunoabsorbente Ligada a Enzima (ELISA): esta prueba se puede utilizar para descubrir antígenos o anticuerpos. Para la identificación de anticuerpos, se sensibilizan con antígeno, pozos o huecos de placas de microtítulos y después se lavan para eliminar el exceso de antígeno y se añade el antisuero para que reaccione con el antígeno. Después de un período de incubación, el anticuerpo en exceso no fijado se elimina y los pozos se lavan de nuevo. Entonces, un anticuerpo conjugado antiespecie-enzima adicional se fija al anticuerpo presente y después de otro lavado y período de incubación, se agrega un sustrato enzima. En un resultado positivo se produce un producto de reacción con color que se mide espectrofotométricamente (23).

III. OBJETIVOS GENERALES

- 1.- Determinar la presencia de anticuerpos específicos contra el virus de leucosis bovina mediante las pruebas de ELISA e Inmunodifusión en Gel de Agar.
- 2.-Determinar la prevalencia de la enfermedad en los Bovinos Holstein Friesian del Centro de Mejoramiento Genético de LICONSA.

IV. MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el CEMEGEN de Leche Industrializada Conasupo, S.A. de C.V., localizado en el municipio de Tepetzotlan Edo. de Mex., con una altitud de de 2450 msnm, el clima de esta región es provincia de humedad C subhúmeda, temperatura B', con temperatura en verano de 25 y 34°C (13).

La población existente al mes de septiembre de 1990 en el centro fue de 1739 animales que correspondieron a diferentes razas como: Pardo Suizo, Jersey, F1 Holstein x Cebú, Simental, Simbrah y Holstein Friesian.

Se muestrearán al azar 134 animales de la raza Holstein Friesian que comprendieron a 4 grupos con las siguientes características:

GRUPO I.	Animales adultos nacionales:	11
GRUPO.II.	Animales jóvenes nacionales:	36
GRUPO.III.	Animales adultos de importación:	65
GRUPO.IV.	Animales jóvenes de importación:	22
T O T A L		134

El criterio para definir entre animales jóvenes y adultos fue: animales recién nacidos a 3 años de edad se consideraron jóvenes y animales mayores de tres años, adultos.

Se obtuvo de cada animal 10 ml de sangre, por medio de la punción en la vena yugular y en la arteria coccígea.

utilizando tubos al vacío. Una vez que las muestras de sangre fueron tomadas e identificadas, se mantuvieron inclinadas y a la sombra para que coagularan. Se separó el suero y se congeló hasta su uso.

Se realizó la prueba directa IDGA y la prueba indirecta de ELISA. El agar para IDGA fue preparado con 0.9% de agar en solución amortiguadora de fosfatos ph 8.6, se vertieron 15 ml de esta solución a una caja de petri. A continuación se hicieron 7 orificios de 5 mm de diámetro, uno central para el antígeno glicoproteico gp51*, rodeado de 6 orificios equidistantes para tres sueros problema y sus testigos respectivos: positivo, negativo, débil positivo. Las cajas se mantuvieron a 20o C durante 48 horas. La prueba se registró como positiva cuando las líneas de precipitación fueron idénticas a las del suero testigo positivo (16,22,25,27).

La técnica directa de ELISA utilizada fue desarrollada por Engvall y Perlman 1972(26) y utilizada por: Tood y Adair 1980(31), Mammerickx 1984(28), Peña, Bravo, Fajardo 1986(26). Las diluciones de los sueros fueron de 1/25 y el antígeno glicoproteico gp51* para IDGA se trabajó a una dilución de 1/200 y el conjugado anti-IgG bovino en conejo con peroxidasa de rábano** a 1/200 y se adaptaron dos para utilizados con ELISA en el Laboratorio de Virología de la

* Leukoassay B: Pitman Moore

**Conjugado Anti-IgG Bovino en conejo: Lab. de Virología FMVZ

F.M.V.Z. U.N.A.M. Las placas para ELISA se leyeron en el espectrofotometro Dynatech a una DO de 490 nm.

Los resultados obtenidos fueron agrupados estadísticamente en base a la distribución de ji-cuadrada (χ^2) (35).

V RESULTADOS

I.-De los 134 sueros de bovinos analizados resultaron:

- | | |
|-----------------------------------|----------------------|
| 1) Inmunodifusión en gel de agar: | 40 positivos (29.9%) |
| | 94 negativos (70.1%) |
| 2) ELISA: | 46 positivos (34.3%) |
| | 88 negativos (75.6%) |

(Grafica 1)

II.-Las diferencias entre bovinos jóvenes y adultos fueron:

- | | |
|------------|-----------------------|
| 1) Jóvenes | 14 positivos (10.44%) |
| 2) Adultos | 25 positivos (18.66%) |

(Grafica 2 y 2 B)

III.-Comparación de animales nacionales con importados:

- | | |
|----------------------------|----------|
| 1) 12 positivos nacionales | (8.95%) |
| 2) 27 positivos importados | (20.15%) |

(Gráfica 3 y 3 B)

VI. DISCUSION

Para la determinación de anticuerpos anti-Virus Leucemia Bovina se han venido empleando varias técnicas inmunológicas; siendo las mas utilizadas Inmunodifusión y ELISA.

Klimentowski (17) utilizó la prueba de ELISA para suero sanguíneo bovino obteniendo 51.7% de reactores positivos y 42.4% con IDGA. Tambien Kuzmak (18) hizo estudios comparativos con las 2 pruebas y demostro un 100% para ELISA y 81.2% para IDGA resultando la prueba de ELISA mas sensible y con menor cantidad de reacciones falsas positivas. Biancifiiori. (4) demostró que la prueba de ELISA es más sensible, rápida y demuestra reacciones positivas antes que IDGA. Cada autor utiliza un antígeno y conjugado a diferentes diluciones y concentraciones.

En el presente trabajo se adaptó el Ag gp 51^a comercial para IDGA y se adaptó para ELISA. Al evaluar por ambas técnicas los 134 sueros bovinos no hubo una diferencia significativa en las dos: ELISA (34.3%), IDGA (29.9%). Resultados que confirman lo dicho por los autores citados anteriormente.

Las técnicas de IDGA y ELISA son confiables y de gran utilidad en la ejecución de programas de control de la infección en determinadas zonas y hatos; sobre todo en el caso de animales de importacion. que se requiere estén libres de ésta.

Las comparaciones hechas en este trabajo encontramos que en el ganado Holstein Friesian del CEMEGEN existe una

diferencia significativa $p < 0.05$ de reacciones positivas al VLB entre ganado nacional y de importación procedente de E.U y Canada, que son países con una prevalencia muy alta al VLB.(7.14)

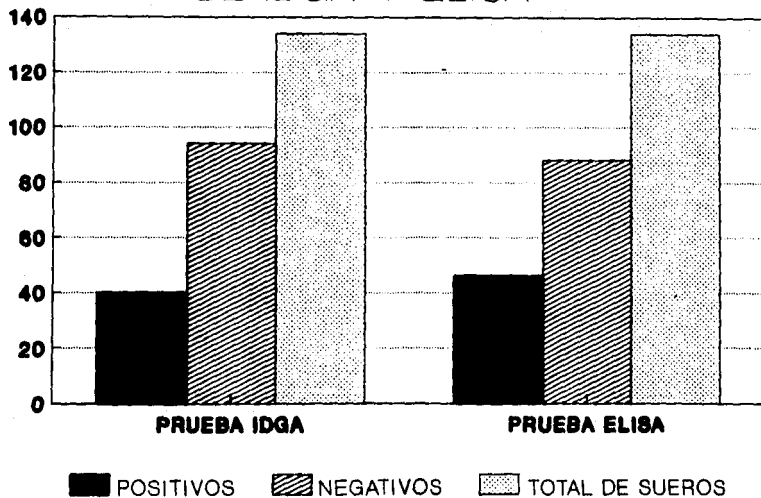
VII. CONCLUSIONES

-De los sueros probados inicialmente con I.D.G.A. los que resultaron positivos a ésta lo fueron igualmente a ELISA, obteniendo en esta última 6 sueros más por ser más sensible.

-Las diferencias de seropositividad entre bovinos Holstein Friesian nacionales e importados presentaron diferencia significativa.

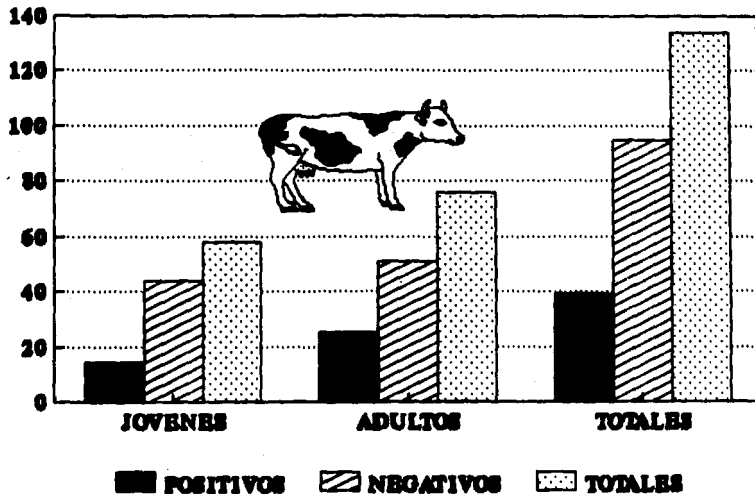
-El antígeno gp 51* (Comercial) para I.D.G.A. fue útil para ser utilizado en la prueba de ELISA, y emplea en esta cantidades de antígeno y suero problema mínimas y es más rápida.

COMPARACION ENTRE LA PRUEBA DE IDGA Y ELISA



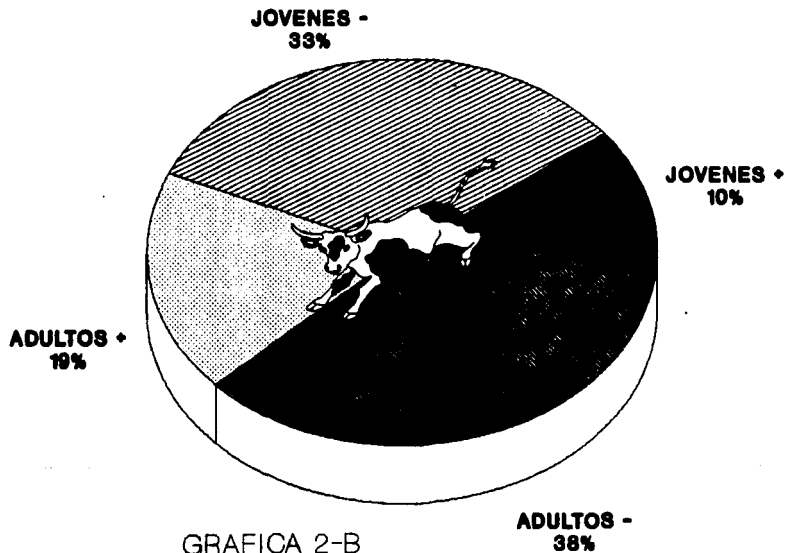
GRAFICA 1

COMPARACION DE REACCIONES POSITIVAS ENTRE ANIMALES JOVENES Y ADULTOS



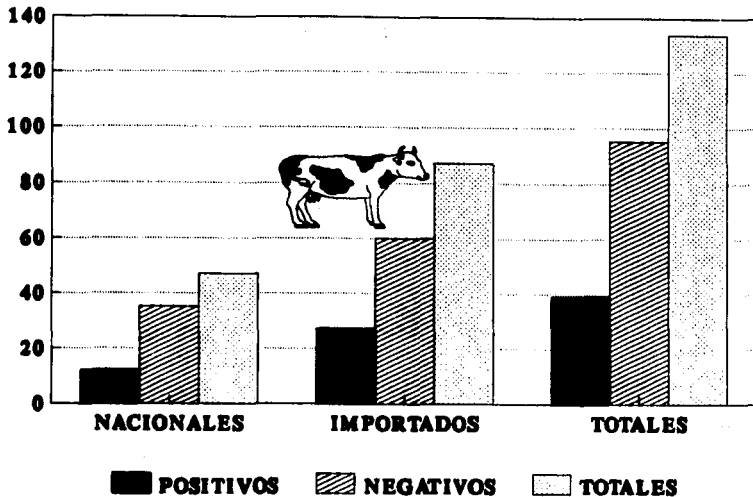
GRAFICA 2

POSITIVOS JOVENES CON ADULTOS



GRAFICA 2-B

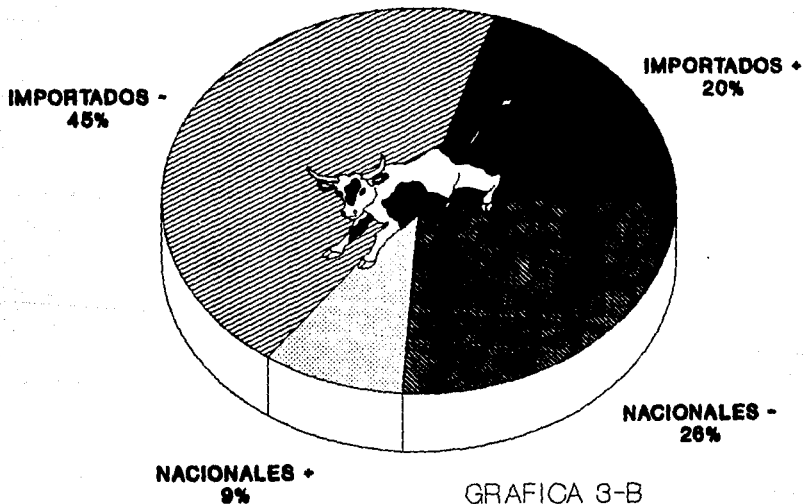
COMPARACION DE REACCIONES POSITIVAS ENTRE ANIMALES NACIONALES CON IMPORTADOS



GRAFICA 3

ESTA TESIS NO DEBE
SAIR DE LA BIBLIOTECA

POSITIVOS NACIONALES CON IMPORTADOS



GRAFICA 3-B

VIII LITERATURA CITADA

- 1.- Aluja, A.S.: Linfosarcoma bovino. Vet. Mex., 6: 73-77 (1975).
- 2.-Amstutz, H.E.: Bovine Medicine and Surgery. American Veterinary Publications, ed. 5 USA:638-641. (1980)
- 3.-Bendixen, H : In Bovine Medicine and Surgery. (W.J. Gibbons E.J. catcott and J.F. Smiths eds.) Am. Vet. Publ. Wheaton Illinois: 547- 560. (1970).
- 4.- Biancifiori, F, Cenci, G.: ELISA test for detection of antibodies to enzootic bovine leukosis virus. Vet. Med. An. Sci., 15: 167-172 (1980)
- 5.-Buck, C.;McKeirnan, A.;Evermann, J.;Magnuson, N.S.;Reeves, R.: A rapid method for the large seale preparation of bovine leukemia virus antigen. Veterinary Microbiology, 17:107-116 (1988).
- 6.- Burrige, M.J., Puhr, D. and Hannemann, J.F.:Prevalence of Bovine leukemia virus infection in Florida. J. Am. Vet. Med. Ass., 179:704-707 (1981).
- 7.- Cruz, M.M.: Leucosis bovina. Vet. Mex., 19: 151-159 (1988).
- 8.- D.H. Roberts, M.H. Lucas, o Wibberley, C. Swallow: Infec-tivity of enzootic bovine leukosis infected animals during the incubation period. Vet. Rec., 116: 310-313 (1985).

- 9.- Espada R., Foglioi, A., Gurría, L., Meixueiro, H., Pérez, J., Kafetz, V., Hernández, O., Beymer, D y Riemann, H.: Prevalencia de anticuerpos contra las enfermedades infecciosas más comunes del ganado bovino en Baja California. Vet.Méx., 17: 23-29 (1986).
- 10.- Evermain, J.F., Di Giacomo, R.F., Ferrer, J.F. and Parish, S.M.: Transmission of Bovine leukosis virus by blood inoculation. Am. J. Vet. Res. 47: 1885-1887 (1986).
- 11.- Ferrer, J.F.: Bovine Leukosis Natural Transmission and principles of control. J. Am. Vet. Med. Assoc., 175: 1291-1286 (1979).
- 12.- Ferrer, J.F.: Bovine Limphosarcoma. Adv. Vet. Sci. Comp. Med., 24: 2-60 (1980).
- 13.- García, E.: Modificaciones al sistema de clasificación Climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. (1972).
- 14.- Gibbons, W.J., Catcott, E.J., Smithcors, J.F.: Medicina y cirugía de los Bovinos. Prensa Médica: 559-571 México, D.F. 1984.
- 15.- Hare, D., Mitchel, D., Singh, L., Bovillant, P., Eaglesome, Ruckerbauer, M., Bielanski, A. and Randall, B.: Embrio transfer in relation to Bovine leukemia virus control and eradication. Canadian Vet. J. 26: 231-234 (1985).
- 16.- Henry, E.T., Levine, J.F., Goggins, L.: Rectal transmission of bovine leukemia virus in cattle and sheep. Am. J. Vet. Res., 48: 634-636 (1987).

- 17.- Klimentwski, S.: Comparison of DGIA and ELISA test on blood and milk for diagnosing bovine leukosis. Medicine Veterinaryna, 42: 342-346 (1986).
- 18.- Kuzmak, J. Enzootic Bovine Leukosis II. Comparative studies on blood serum and milk with the agar gel immunodiffusion test and the ELISA. Vet. Bull., 58: 1053 (1988) (Abst. 7806).
- 19.- Lucas, M.H., Dawson, M., Chasey, D., Wibberley G. and Roberts, D.H.: Enzootic Bovine leukosis virus in semen. Vet. rec., 106: 128 (1981).
- 20.- Mammerickx, M., Portetelle, D. and Bruck, C.: Le diagnostic de la leucose bovine enzootique a l'aide d'un test immuno-enzymatique (ELISA) impliquant un anticorps monoclonal. Ann. Med. Vet., 128: 55-63 (1984).
- 21.- Mateva, V., Arnaudov, C., Milanov, M., Angelov, A.: Transmission of enzootic bovine leucosis in cows and their descendents by semen during artificial insemination. Vet. Bull., 57: 849 (1987).
- 22.- Miller, Lyle D.: Export testing for enzootic bovine leukosis. J. Am. Vet. Med. Assoc., 177: 620-623 (1980)
(Abst. 6557)
- 23.- Mohanty, S.B. y Dutta, S.K.: Virologia Veterinaria. Interamericana. México, D.F. 1988.
- 24.- Neira, R., Parrá, D.: Situación de la Leucosis bovina en Colombia, algunas recomendaciones para su control. IICA., 17: 22 (1983).

- 25.- Onions, D. E., Jarrett, O.: Naturally occurring tumours in animal as a model for human disease. Vet.Bull., 58: 728 (1988). (Abst. 5574).
- 26.- Peña, M.O., Bravo, H. y Fajardo, J. E.: Técnica de ELISA en el diagnóstico serológico de la Leucosis bovina en Colombia. IICA, 20: 315-323 (1986).
- 27.- Pérez, J.: Evaluación de las técnicas de inmunodifusión y contraímonoelectroforesis en el diagnóstico del linfosarcoma bovino. Tesis de Licenciatura Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1984.
- 28.- Ruiz, G.A.: Leucosis linfática Enzootica del bovino adulto estudio de un hato infectado. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1973.
- 29.- Starck, E., Polster, U., Wittmann, W.: Causes of nonspecific reactions to the immunodiffusion test for enzootic bovine leukosis Vet.Bull., 60: 304 (1990) (Abst. 1919).
- 30.- Stirtzinger, T., Valli, V.E.D. and Miller, J.M.: The role of virus dose in experimental bovine Leukemia virus infection in sheep. Vet.Bull., 58: 852 (1988) (Abst. 6416).

- 31.- Todd, D. and Adair, B.M.: An enzyme-linked immunosorbent assay for enzootic bovine leukosis virus antibodies. Vet. Rec., 107: 124-126 (1980).
- 32.-Tizard,I.: Inmunologia Veterinaria.2da ed.Interamericana.México.1984.
- 33.- Vilchis, M.C.: Determinación de anticuerpos contra en virus de Leucosis bovina por la técnica de Inmunodifusión. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1979.
- 34.- Wawrzkievicz, J., Platakis, J. and Dziedzic, B.: Modified agar gel immunodiffusion test and its use for diagnosing bovine leukosis. Vet.Bull., 57: 769 (1986) (Abst. 5928).
- 35.- Wayne Daniel.: Introducción a la bioestadística. Limusa, México, D.F. 1984.
- 36.- Zajac, J., Zuffa, T. and Cernek, J.: Evaluation of the results of the ELISA test in the serological diagnosis of bovine leukosis. Vet.Bull., 57: 1035 (1987) (Abst. 7918).