

Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche[#]

Comparative study of nested PCR, ELISA and AGID tests in the detection of bovine leukaemia virus infection in serum, blood and milk samples

R Felmer^{*1}, J Zúñiga¹, M Recabal¹

¹ Laboratorio de Biotecnología Animal, Unidad de Biotecnología, INIA-Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile.

SUMMARY

Different methods available for the detection of bovine leukaemia virus (BLV) infection were evaluated. The methods evaluated were AGID in serum, ELISA in serum and milk, and PCR in blood lymphocytes. The AGID test identified a smaller number of positive animals (75/126) compared to PCR and ELISA tests (100/126). Three positive animals by AGID were negative by PCR and 28 of the 51 negative samples by AGID were positive by PCR. The sensitivity of PCR with respect to AGID was 96%, whereas the specificity was 45% (*kappa* 0.45). All positive animals by AGID were also positive by ELISA in serum and milk samples, whereas 25 negative animals by AGID were considered positive by the ELISA test, in both biological samples. Thus, sensitivity of the ELISA with respect to AGID was 100%, whereas specificity was 51% (*kappa* 0.55). The smaller sensitivity of AGID is not due to false positive reactions of ELISA and PCR tests, but rather to a greater sensitivity of these, which suggests a revision of AGID in those countries in which it is still used as the official method in the eradication programs of leukaemia.

Palabras clave: ganado, leucosis, ELISA, PCR.

Key words: cattle, leukaemia, ELISA, PCR.

INTRODUCCION

La leucosis enzoótica bovina es una enfermedad infecciosa del ganado, causada por el virus de la leucosis bovina (VLB), un retrovirus de la familia *Retroviridae* (Van Regenmortel y col 2000). El VLB infecta principalmente a los linfocitos B (Ballagi-Pordani y col 1992), pero también posee la capacidad de infectar otras células, tales como linfocitos T (Stott y col 1991, Schwartz y col 1994) y monocitos (Domenech y col 2000). Una de las características de esta enfermedad es una respuesta humoral que dura toda la vida del animal (Burny y col 1988). La enfermedad se manifiesta con curso clínico lento, desarrollando un período de incubación de 1 a 5 años, por lo que afecta fundamentalmente a los animales mayores de 2 años de edad (Johnson y col 1985). El ganado infectado puede permanecer clínicamente asintomático durante toda su vida. Sin embargo, solo un 30-70% desarrolla linfocitosis persistente (LP), la que se caracteriza por una expansión policlonal de linfocitos B infectados. A su vez, un porcentaje incluso menor de

animales (0,1-10%) eventualmente desarrolla tumores linfoides, que es la forma clínica fatal de esta enfermedad (Burny y col 1985).

La infección por VLB estimula una fuerte reacción inmune humoral en contra de las principales proteínas virales gp51 y p24 que constituyen la base para la detección mediante pruebas serológicas (Portetelle y col 1989). Dentro de éstas, la inmunodifusión en gel de agar (AGID) ha sido la prueba oficial en muchos países para la detección de anticuerpos contra VLB. Recientemente, se ha desarrollado y evaluado una serie de métodos enzimoinmunoensayos (ELISA), algunos de los cuales son actualmente reconocidos como métodos oficiales en EE.UU., Canadá y otros países (Simard y col 2000). Sin embargo, independiente del método serológico empleado, la principal desventaja de estas pruebas es su incapacidad para discriminar anticuerpos maternos pasivos de una infección activa, los que pueden persistir durante los primeros 6 meses de vida del animal (Burrige y col 1982). Además, estos métodos no proporcionan evidencia de la infección en su etapa temprana, esto es, antes de la seroconversión, que para esta enfermedad en particular puede tardar hasta 14 semanas en presentarse (Dinter 1989). En cambio, las pruebas de detección directa, como la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), permiten un diagnóstico confiable en las etapas iniciales de la enfermedad y se pueden aplicar a la detección del virus en

Aceptado: 06.12.2005.

[#] Financiado por Proyecto FIA BID-PI-C-2001-1-P-035

* Casilla 58-D, Temuco. Fono: 45-215706; Fax: 45-216112; rfelmer@inia.cl

animales menores de 6 meses, evitando así reacciones falso positivas, causadas por la transferencia pasiva de inmunoglobulinas a través del calostro. Otra ventaja radica en la capacidad para detectar el virus en animales inmunotolerantes, los que no desarrollan una respuesta inmune normal (Fechner y col 1996).

Aunque con algunas discrepancias, diversos autores han demostrado una menor sensibilidad de AGID respecto de las pruebas diagnósticas ELISA y PCR (Eaves y col 1994, Fechner y col 1996, Trono y col 2001). Dado que diversos factores pueden afectar la concordancia entre estas pruebas, como la secuencia elegida como blanco para la amplificación y el método para purificar ADN en la PCR, el antígeno utilizado en los métodos serológicos o las características de la población animal en estudio, entre otros; el objetivo de este estudio fue comparar el método AGID que se utiliza en Chile frente a un ELISA indirecto comercial en muestras de suero y leche, y una prueba PCR anidado en linfocitos sanguíneos para la detección de la infección por el VLB.

MATERIAL Y METODOS

Obtención de las muestras biológicas y procesamiento. Muestras de leche, sangre y suero fueron recolectadas desde 126 animales de un predio de la Comuna de Freire, Temuco. Las muestras de leche (60 ml) se obtuvieron por ordeña manual en frascos conteniendo dicromato de potasio (0,1% p/v) como preservante. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos Vacutainer de 7 ml usando EDTA-potásico (1,5 mg/ml de sangre) como anticoagulante, mientras que las muestras de suero se recolectaron en tubos Vacutainer de 10 ml sin anticoagulante. Las muestras de leche se descremaron mediante centrifugación por 10 minutos a 3.500 r.p.m. y la fracción clarificada se conservó a -20°C para su posterior análisis en nuestro laboratorio mediante ELISA, mientras que la fracción de células somáticas se utilizó para la extracción de ADN.

Aislamiento de ADN. El pellet de células somáticas correspondiente a 60 ml de leche se utilizó para la extracción de ADN de acuerdo a un protocolo estándar que consistió en una lisis celular (Tris-HCl, 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM, Proteinasa K 1 mg/ml y SDS 1%) e incubación a 55°C durante toda la noche. Los restos celulares se precipitaron y separaron mediante la adición de NaCl 6 M y centrifugación a máxima velocidad por 10 minutos. El ADN se recuperó finalmente de la fase acuosa mediante precipitación con etanol y se resuspendió en tampón T.E. Para las muestras de sangre se utilizó un procedimiento similar adicionando una etapa preliminar de hemólisis de los eritrocitos con una solución de NH_4Cl al 0,85%.

Diagnóstico serológico. La detección de anticuerpos al VLB en las muestras de leche y suero se realizó median-

te la técnica de enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA-i) empleando un kit comercial (SVANOVA, Suecia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las lecturas espectrofotométricas se realizaron en un lector ELISA (Labsystems, Multiskan EX) a 450 nm y utilizando para la interpretación de los resultados una relación de densidad óptica corregida (DO muestra/DO control positivo) igual o superior a 6% para las muestras de leche y 10% para las muestras de suero. Una alícuota de las muestras de suero fueron enviadas al Laboratorio del Complejo de Lo Aguirre del SAG, para su análisis mediante el método oficial de AGID.

Diagnóstico viral mediante PCR. El virus se detectó directamente desde ADN purificado de la fracción de leucocitos de leche y sangre mediante un PCR anidado empleando dos pares de partidores correspondientes a una región altamente conservada del gen *env* viral (Beier y col 2001).

La primera reacción se realizó en un volumen final de 30 ml conteniendo 20-100 ng de ADN, 0,2 mM de cada partidador (F-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA y R-AACAACAACCTCTGGGGAGGGT), 75 mM dNTP, 3 ml de tampón PCR 10X, (Promega), 1,5 mM MgCl_2 y 0,75 U de Taq DNA Polimerasa.

En la segunda reacción se utilizó como templado 3 ml del producto de la primera amplificación y los partidores F-CCCACAAGGGCGGGCGCCGGTTT y R-GCGAGGCCGGTCCAGAGCTG G. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador GeneAmp 9700 (Perkin Elmer) y los perfiles térmicos incluyeron una etapa de denaturación inicial a $94^{\circ}\text{C}/5$ minutos, seguido por 40 ciclos de $94^{\circ}\text{C}/30$ segundos, $57^{\circ}\text{C}/30$ segundos y $72^{\circ}\text{C}/1$ minuto, para terminar con una extensión final a $72^{\circ}\text{C}/5$ minutos. En la segunda reacción las condiciones fueron las mismas, excepto que la temperatura de annealing se aumentó a 68°C .

Análisis estadístico. Para determinar los parámetros de sensibilidad, especificidad y concordancia (valor *kappa*) se utilizaron tablas de contingencia (2x2) empleando el programa computacional Win Episcope 2.0. Todos los análisis se realizaron con un nivel de confianza de 95%.

RESULTADOS

La prueba AGID identificó un menor número de animales positivos que las pruebas de PCR en sangre, ELISA en suero y ELISA en leche (figura 1). De 126 animales analizados, AGID detectó 75 animales positivos, lo que equivale al 60% del total. Por otro lado, PCR detectó un 25% más de positivos que AGID (100/126). Tres animales positivos a AGID fueron negativos, según la prueba PCR en sangre, y 28 de las 51 muestras negativas a AGID fueron positivas a PCR (cuadro 1). La concordancia obtenida entre ambas pruebas fue de 75% mientras que el valor

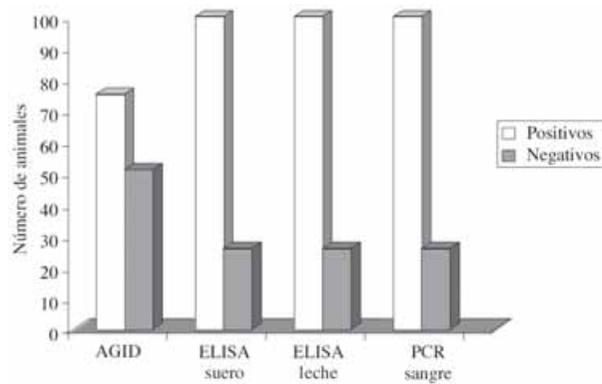


Figura 1. Análisis comparativo de las distintas pruebas analíticas. Número de animales positivos y negativos identificados con cada una de las pruebas AGID, ELISA suero, ELISA leche y PCR en sangre de bovinos.

Number of positive and negative animals identified by the tests AGID, ELISA in serum, ELISA in milk and PCR in blood of dairy cows.

Cuadro 1. Resultados del análisis de sensibilidad, especificidad y concordancia del PCR en sangre en relación a AGID.

Sensitivity, specificity and agreement analysis between the PCR and AGID test.

	AGID		Total
	+	-	
+	72	28	100
-	3	23	26
Total	75	51	126

Sensibilidad: 96%
Especificidad: 45%
Concordancia: *kappa* 0,45

estadístico *kappa* fue de 0,45, considerándose moderado. La sensibilidad diagnóstica de PCR con respecto a AGID fue de 96% mientras que la especificidad fue de 45%.

El método ELISA, aplicado tanto en suero como en leche, permitió detectar un total de 100 animales positivos (79%), lo que equivale a un 25% más de animales positivos que la prueba AGID (cuadro 2). Todos los animales positivos a AGID fueron también positivos a ELISA aplicado tanto en suero como en leche, mientras que 25 animales negativos a AGID fueron consignados como positivos a ELISA, en ambas muestras biológicas. De esta forma, la concordancia entre ambas pruebas fue de 79% con un valor *kappa* de 0,55 y los parámetros de sensibilidad y especificidad fueron 100 y 51%, respectivamente.

El mismo análisis se realizó considerando a la prueba PCR en sangre como el método de referencia y comparando a los métodos AGID, ELISA en suero y ELISA en leche (cuadro 3). En este caso, el valor *kappa* de 0,85 indica una concordancia casi perfecta, tanto en suero como en leche, entre las pruebas de PCR y ELISA (Landis y Koch 1977), manteniéndose la concordancia descrita en el Cuadro 1 para PCR y AGID.

Cuadro 2. Resultados del análisis de sensibilidad, especificidad y concordancia del ELISA tanto en suero como en leche en relación a AGID.

Sensitivity, specificity and agreement analysis between the ELISA and AGID test.

	AGID		Total
	+	-	
+	75	25	100
-	0	26	26
Total	75	51	126

Sensibilidad: 100%
Especificidad: 51%
Concordancia: *kappa* 0,55

Cuadro 3. Resultados del análisis de sensibilidad, especificidad y concordancia de AGID, ELISA en suero y ELISA en leche en relación a la prueba de PCR en sangre.

Sensitivity, specificity and agreement analysis between the AGID, ELISA of serum and milk, an the PCR test of blood.

Prueba Referencia	Prueba Alternativa	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor <i>kappa</i>
PCR sangre	AGID	72	88	0,45
ELISA suero	97	88	0,85	
ELISA leche	97	88	0,85	

DISCUSION

En este estudio se evaluó el uso de un método de PCR anidado como prueba directa y los métodos AGID y ELISA como pruebas indirectas para la detección del VLB en un rebaño lechero con alta prevalencia de la infección. De acuerdo a nuestros resultados, el PCR en sangre y el ELISA en suero y leche detectaron un mayor número de animales positivos (25%) que AGID. Todas las muestras negativas a ELISA, tanto en suero como en leche, fueron también negativas a AGID. Sin embargo, tres muestras negativas a PCR fueron positivas a AGID y ELISA, situación que se podría explicar por la ausencia del VLB en linfocitos sanguíneos (Eaves y col 1994), una infección restringida a órganos linfoides (Klintevall y col 1994) o las variaciones de la secuencia nucleotídica de algunos aislados del virus, que podrían inducir a errores en la hibridación de los oligonucleótidos utilizados como cebadores, disminuyendo consecuentemente la sensibilidad del PCR (Marsolais y col 1994, Fechner y col 1997). Finalmente, no podemos descartar que, a pesar de haber utilizado una etapa de hemólisis y lavado de eritrocitos, persistan trazas de inhibidores que afecten la sensibilidad del PCR (Panaccio y Lew 1991).

En forma interesante, la prueba de PCR en sangre identificó tres muestras positivas, que, sin embargo, fueron negativas en las pruebas serológicas empleadas, sugiriendo la presencia de animales inmunotolerantes o con

baja respuesta inmunológica al VLB en el rebaño analizado. Para clarificar esta situación, se re-muestraron estos animales al año siguiente y se repitieron los análisis con las pruebas de ELISA en suero y PCR en sangre. Lamentablemente, uno de los animales había sido eliminado del predio; sin embargo, los otros dos aún permanecían por lo que fue posible repetir el análisis. El resultado de ambas muestras (datos no mostrados) fue similar al obtenido durante el primer análisis, es decir, ELISA confirmó el valor negativo obtenido anteriormente mientras que PCR confirmó el resultado positivo en ambos animales. Este resultado confirma los hallazgos realizados previamente por algunos autores (Fechner y col 1997), quienes habían sugerido la presencia de animales inmunotolerantes al VLB, observación que es siempre cuestionada al argumentarse que se debería a una mayor sensibilidad del PCR, lo que permitiría detectar animales infectados antes de que estos desarrollen una respuesta inmunológica, animales con una baja carga de exposición del virus (Kaaden y col 1982), animales cursando un período prolongado de latencia o a coinfecciones con otro virus (Jacobs y col 1992). De esta forma, estos resultados resaltan la importancia de incorporar en los programas de control y erradicación del VLB un diagnóstico complementario del virus con alguna técnica directa como puede ser PCR.

Cuando las pruebas de ELISA en suero, ELISA en leche y PCR en sangre fueron comparadas con respecto a AGID, el método oficial en Chile para el diagnóstico serológico del VLB, la especificidad diagnóstica obtenida fue baja (51, 51 y 45%, respectivamente). Sin embargo, esta situación no se debe a reacciones falso positivas de estas pruebas, sino más probablemente a la mayor sensibilidad de las mismas respecto a AGID (Eaves y col 1994). De la misma forma, la concordancia de las distintas pruebas empleadas, medida por el valor *kappa*, se puede considerar como moderado cuando AGID se utilizó como referencia. Estos resultados contrastan cuando se utiliza el PCR como método de referencia, ya que, en este caso, se obtuvo una buena concordancia casi perfecta de esta técnica con ELISA, con un valor *kappa* entre ambas pruebas de 0,85.

Nuestros resultados se comparan favorablemente con los resultados obtenidos por Fechner y col (1996) y más recientemente Trono y col (2001), quienes detectaron un total de 17,7 y 24,8% más de animales positivos al comparar un método de PCR con AGID, respectivamente. Sin embargo, contrastan con lo obtenido por Nagy y col (2003), quienes determinaron una sensibilidad del PCR respecto a ELISA de sólo un 67%, a diferencia de nuestros resultados, donde PCR fue muy similar en su capacidad para detectar animales positivos que el ELISA empleado (sensibilidad de 97%). En nuestro caso, el mejor resultado que se obtuvo con PCR se debería fundamentalmente a la adición, durante el proceso de extracción de ADN, de una etapa de hemólisis de los eritrocitos con

NH₄Cl, ya que está descrito el efecto inhibitor de residuos de hemoglobina sobre la Taq polimerasa (Panaccio y Lew 1991). Además, el PCR desarrollado por nosotros correspondió a un PCR anidado, lo cual aumenta la sensibilidad y especificidad del método. Otro factor importante y que puede afectar la correlación de ambas técnicas tiene que ver con el recuento de linfocitos y la carga de linfocitos infectados de los animales, aunque este dato se desconoce en cada uno de los estudios realizados.

Una de las ventajas del PCR es su capacidad para detectar el virus en terneros infectados que recibieron calostro desde madres seropositivas. Además, mediante PCR se pueden determinar infecciones recientes, entre 2-4 semanas más temprano que mediante AGID (Naif y col 1992, Kelly y col 1993) y puede constituir, por tanto, un gran aporte en los programas de erradicación, especialmente en aquellos rebaños con una baja prevalencia de animales infectados.

La prueba AGID en suero o el ELISA en suero o leche han sido reconocidas por la Organización Internacional de Epizootias (OIE) para el diagnóstico del VLB (OIE 2001). Debido a la simplicidad y sus ventajas prácticas y económicas, la prueba AGID ha tenido una rápida incorporación como método de diagnóstico oficial en muchos países. Sin embargo, la baja sensibilidad demostrada por nosotros y otros autores, sumado a la aparición de mejores herramientas de diagnóstico de la enfermedad, que permiten alcanzar mayores niveles de sensibilidad y especificidad, debieran hacer reconsiderar la utilización de esta prueba como método de diagnóstico oficial.

En conclusión, aunque la decisión de qué prueba utilizar para el diagnóstico del VLB va a depender finalmente de factores tanto técnicos como económicos, la principal conclusión es que el uso de ELISA o PCR en lugar de AGID permite detectar un mayor número de animales infectados por el VLB. Además, dada la probabilidad de encontrar animales inmunotolerantes, se recomienda utilizar una combinación de ELISA y PCR cuando el objetivo es erradicar la infección de un rebaño.

RESUMEN

Se evaluaron distintos métodos actualmente disponibles para el diagnóstico de la infección por el virus de la leucosis bovina (VLB). Los métodos empleados fueron AGID en suero, ELISA en muestras de suero y leche y PCR en linfocitos sanguíneos. De un total de 126 animales analizados, AGID identificó un menor número de animales positivos (75) comparado con las pruebas PCR y ELISA aplicadas en muestras de suero y leche (100). Tres animales positivos a AGID fueron negativos a PCR y 28 de las 51 muestras negativas a AGID fueron positivas mediante PCR. La sensibilidad diagnóstica de PCR con respecto a AGID fue de 96%, mientras que la especificidad fue de 45% (*kappa* 0,45). Todos los animales positivos a AGID fueron también positivos a ELISA aplicado tanto en suero como en leche, mientras que 25 animales negativos a AGID fueron consignados como positivos a ELISA,

en ambas muestras biológicas. De esta forma, la sensibilidad diagnóstica de ELISA respecto a AGID fue de un 100%, mientras que la especificidad fue de 51% (κ 0,55). La menor sensibilidad observada de AGID no es debido a reacciones falso positivas de ELISA y PCR, sino más bien a una mayor sensibilidad de estas últimas, lo que sugiere reconsiderar la utilización del método AGID en aquellos países en que aún se utiliza como método oficial en los programas de erradicación de leucosis.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo técnico brindado por Horacio Floody y agradecen además, la colaboración anónima y desinteresada del productor de la IX Región que facilitó el muestreo de sus animales.

REFERENCIAS

- Ballagi-Pordany A, K Klintevall, M Merza, B Klingeborn, S Belak. 1992. Direct detection of bovine leukaemia virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction. *J Vet Med B* 39, 69-77.
- Beier D, P Blankenstein, O Marquardt, J Kuzmak. 2001. Identification of different BLV proviruses isolates by PCR, RFLP and DNA sequencing. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 114, 252-256.
- Burny A, C Bruck, Y Cleuter, D Couez, J Deschamps, D Gregoire, J Ghysdael, R Kettmann, M Mammerickx, G Marbaix. 1985. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Onderstepoort J Vet Res* 52, 133-44.
- Burny A, Y Cleuter, R Kettmann, M Mammerickx, G Marbaix, D Portetelle, A Van Den Broeke, L Willems, R Thomas. 1988. Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Vet Microbiol* 17, 197-218.
- Burridge M, M Thurmond, J Miller, M Schmerr, M Van Der Maaten. 1982. Duration of colostral antibodies to bovine leukemia virus by two serologic tests. *Am J Vet Res* 10, 1866-7.
- Dinter Z. 1989. Enzootic bovine leukosis, diagnostic virology. En: *A review of methods at the National Veterinary Institute* (ed.). Moreno-López J, pp. 115-122. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands.
- Doménech A, J Govache, I Llamas, M Paya, G Suárez, E Gómez-Lucía. 2000. *In vitro* infection of cells of the monocytic macrophage lineage with bovine leukaemia virus. *J Gen Virol* 81, 109-118.
- Eaves F, J Molloy, C Dimmock, L Eaves. 1994. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet Microbiol* 39, 313-21.
- Fechner H, A Kurg, L Geue, P Blankenstein, G Mewes, D Ebner, D Beier. 1996. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed B* 10, 621-30.
- Fechner H, P Blankenstein, A Looman, J Elwert, L Geue, C Albrecht, A Kurg, D Beier, O Marquardt, D Ebner. 1997. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology* 237, 261-9.
- Jacobs R, Z Song, H Poor, J Henney, A Taylor, B Jefferson, W Vernanw, V Valli. 1992. Proviral detection and serology in bovine leukaemia virus-exposed normal cattle and cattle with lymphosarcoma. *Can J Vet Res* 56, 339-348.
- Johnson R, C Gibson, J Kaneene. 1985. Bovine leukaemia virus: a herd-based control strategy. *Prev Vet Med* 3, 339-34.
- Kaaden O, S Lange, W Romanowski, H Marre, J Pfeilsticker, R Roselius. 1982. Transient viraemia with bovine leukaemia virus in bulls. *Zentralbl Veterinarmed B* 29, 269-74.
- Kelly E, M Jackson, G Marsolais, J Morrey, R Callan. 1993. Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. *Am J Vet Res* 54, 205-9.
- Klintevall K, A Ballagi-Pordany, K Naslund, S Belak. 1994. Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet Microbiol* 3, 191-204.
- Landis J, G Koch. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159-174.
- Marsolais G, R Dubuc, J Bergeron, J Morrey, E Kelly, M Jackson. 1994. Importance of primer selection in the application of PCR technology to the diagnosis of bovine leukemia virus. *J Vet Diagn Invest* 6, 297-301.
- Nagy D, J Tyler, S Kleiboeker, A Stoker. 2003. Use of a polymerase chain reaction assay to detect bovine leukaemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1, 983-5.
- Naif H, R Daniel, W Cogle, M Lavin. 1992. Early detection of bovine leukemia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. *J Clin Microbiol* 30, 675-9.
- OIE, Organización Internacional de Epizootias. 2001. Manual of standards diagnostic tests and vaccines 2000. Pp 1-18.
- Panaccio M, A Lew. 1991. PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. *Nucleic Acids Res* 19, 1151.
- Portetelle D, D Couez, C Bruck, R Kettmann, M Mammerickx, M Van Der Maaten, R Brasseur, A Burny. 1989. Antigenic variants of bovine leukaemia virus (BLV) are defined by amino acid substitutions in the NH2 part of the envelope glycoprotein gp51. *Virology* 1, 27-33.
- Schwartz I, A Bensard, B Polack, B Perrin, M Bertheley, J Stott. 1994. *In vivo* leukocyte tropism of bovine leukaemia virus in sheep and cattle. *J Virol* 68, 4589-4596.
- Simard C, S Richardson, P Dixon, C Belanger, P Maxwell. 2000. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. *Can J Vet Res* 64, 101-6.
- Stott M, M Thurmond, S Dunn, B Osburn, J Stott. 1991. Integrated bovine leukosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes. *J Gen Virol* 72, 307-15.
- Trono K, D Pérez-Filgueira, S Duffy, M Borca, C Carrillo. 2001. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol* 26, 235-48.
- Van Regenmortel M, C Fauquet, D Bishop, E Carstens, M Estes, S Lemon, J Maniloff, M Mayo, D McGeoch, C Pringle, D Wicker. 2000. Family Retroviridae. En: *Virus Taxonomy; Classification and Nomenclature of Viruses*. Academic Press, San Diego, CA. Pp 369-362.