

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Leucosis bovina: una visión actualizada

Bovine Leukosis: an updated review

Silvina Elena Gutiérrez^{1,2,3}, Claudia María Lützel Schwab¹, Clarisa Natalia Barrios¹,
Marcela Alicia Juliarena^{1,2}

RESUMEN

La leucosis bovina enzoótica, causada por el virus de la leucosis bovina (BLV), es la enfermedad tumoral más frecuente del bovino. Las razas bovinas de leche y de carne son susceptibles a la infección por BLV y al linfosarcoma; sin embargo la enfermedad es más prevalente en rodeos lecheros, principalmente debido a las prácticas de manejo. La patogenicidad del BLV en el bovino está asociada a la genética del animal. La mayoría de los bovinos infectados por el BLV son asintomáticos, por lo que la infección puede pasar desapercibida cuando los índices de infección son relativamente bajos. En ausencia de medidas de control, el virus se disemina lentamente entre los animales del rodeo. El BLV causa importantes pérdidas productivas, no sólo debido a la mortandad de animales con linfosarcoma, sino también por las restricciones al comercio de animales infectados y sus subproductos. Existen distintas alternativas para el control del BLV, adecuadas para distintas situaciones epidemiológicas. Hasta el momento no existe ningún tratamiento o vacuna eficaz para el control de este virus. Cuando la prevalencia de infección es baja, inferior al 10-15% de animales infectados, se recomienda identificar y eliminar la totalidad de los animales infectados. Esta alternativa no se adecúa a rodeos con altas prevalencias de infección, como ocurre con la mayoría de los rodeos lecheros en Argentina. La selección genética de animales resistentes a la diseminación del BLV surge como una estrategia natural para limitar la diseminación de este virus y, por ende, para el control del linfosarcoma asociado.

Palabras clave: virus de la leucemia bovina, diagnóstico, control, resistencia genética, *BoLA-DRB3*

¹ Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), CIC- CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

³ E-mail: segutier@vet.unicen.edu.ar

Recibido: 22 de octubre de 2019

Aceptado para publicación: 24 de junio de 2020

Publicado: 11 de agosto de 2020

ABSTRACT

Enzootic bovine leukosis, caused by bovine leukaemia virus (BLV), is the most frequent neoplasm in dairy cattle. Both dairy and beef cattle are susceptible to BLV infection and BLV-associated lymphosarcoma. However, the disease is more prevalent in dairy herds, mostly because of the management practices in dairy farms. The pathogenicity of BLV in cattle is associated with the genetic background of the animal. Most BLV-infected cattle are asymptomatic; hence infection may be overlooked when infection rates are relatively low. BLV spreads slowly and silently when control measures are not undertaken. BLV causes important economic losses, not only because of the death of animals with lymphosarcoma but also because of restrictions in the trade of infected animals and their by-products. Different strategies to control the virus have been attempted, each for the different epidemiologic situations. At present, no treatment or vaccine has proven effective for the control of BLV. When the prevalence of infection is low, below 10 to 15% of infected animals, it is recommended to identify and cull the totality of infected cattle. This approach is not suitable for herds with high prevalence of infection, as is the case of most dairy herds in Argentina. The genetic selection of resistant animals emerges as a natural approach for the containment of BLV dissemination, and thereby, for the control of lymphosarcoma.

Key words: bovine leukaemia virus, diagnosis, control, genetic resistance, *BoLA-DRB3*

INTRODUCCIÓN

La Leucosis Bovina Enzootica es una enfermedad infecciosa de distribución mundial con mayor incidencia en las explotaciones lecheras debido, en gran medida, al hacinamiento y las diferentes prácticas veterinarias que facilitan la transmisión. Es causada por el Virus de la Leucosis Bovina (BLV), perteneciente a la familia Retroviridae.

El BLV es un virus de RNA cadena simple diploide, que contiene la información genética para las proteínas estructurales y enzimas en los genes *gag*, *pol* y *env* (Vogt, 1997). El BLV codifica, además, proteínas no estructurales en una región denominada pX, que se transcriben a través de splicing alternativo: Tax, Rex, y en menos abundancia R3 y G4 (Alexandersen *et al.*, 1993). Estas proteínas no estructurales tienen fundamental importancia en la interacción del virus con la célula hospedadora, modulando la expresión de genes virales y celulares, la replicación viral y la patogénesis (Willems *et al.*, 2000).

Las prevalencias de infección por BLV son altas en la mayoría de los países productores de leche (Figura 1), excepto en países de la Comunidad Económica Europea, los que, desde 1980, han implementado medidas de control y erradicación del virus. Las tasas de prevalencia en el continente americano son muy altas, tanto a nivel individual como a nivel de rodeo (Figura 2). La diseminación de la infección por BLV en estos países posiblemente sea consecuencia de que, durante muchos años, se subestimaran los efectos de la infección sin la implementación de las políticas sanitarias necesarias.

En Argentina, desde hace más de 30 años se observa una amplia diseminación del virus, sin que hasta el momento se haya implementado un plan oficial de control/erradicación a nivel nacional. En consecuencia, esta enfermedad es una de las principales causas de muerte y descarte entre las vacas de producción láctea. Los primeros relevamientos serológicos de la situación en Argentina se realizaron en la cuenca Mar y Sierras entre 1979 y 1981, encontrando solo un 4.35%

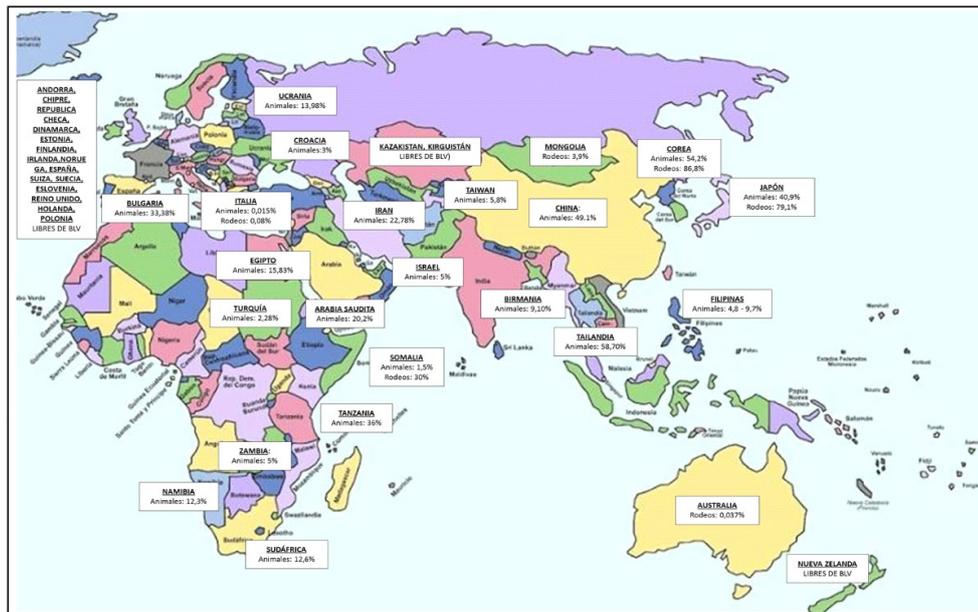


Figura 1. Prevalencias de infección por el virus de la leucosis bovina (BLV) en países de Europa, Asia, África y Oceanía. Se muestran datos de prevalencia a nivel individual (animales) y de rodeo

de rodeos infectados. Quince años después, este porcentaje llegaba al 68.5% (Ghezzi *et al.*, 1997). Esta rápida diseminación del BLV también se observó en el resto de las cuencas lecheras argentinas. Los relevamientos serológicos realizados entre 2001 y 2004 en diferentes zonas del país mostraron valores similares (84-86%) de rodeos infectados para la provincia de Santa Fé (Trono *et al.*, 2001; Mariño *et al.*, 2003) y 97% para el sudeste de la provincia de Santiago del Estero (Revelli *et al.*, 2004).

Datos más actuales de las cuencas lecheras de las provincias de Córdoba y Santa Fé, norte de la provincia de Buenos Aires y Sudoeste de la provincia de Santiago del Estero indican que más del 99% de los tambos están infectados (Barrios *et al.*, 2012). Todas las zonas estudiadas muestran una alta tasa de diseminación de la infección dentro de los establecimientos, con valores entre 30 y 48.9% en el periodo 2001-2004 (Trono *et*

al., 2001; Mariño *et al.*, 2003; Revelli *et al.*, 2004). Datos más recientes de establecimientos en estas provincias obtenidos por el Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN) muestran que, en promedio, más del 80% de los animales en producción están infectados. En la categoría vaquillonas, la prevalencia de infección varía entre 15 y 75% (datos de los autores, no publicados), evidenciando una disminución de la edad a la cual los animales se infectan y el consecuente agravamiento de la situación.

La infección por BLV genera importantes pérdidas económicas. Las pérdidas directas incluyen: muerte de animales en producción por leucemia o linfosarcoma, eliminación prematura de los animales y restricciones en el comercio internacional de bovinos y de material genético. Por otro lado, las pérdidas económicas indirectas (reemplazo del animal en producción, el diagnóstico y la atención del veterinario, y la pérdida de un ternero y

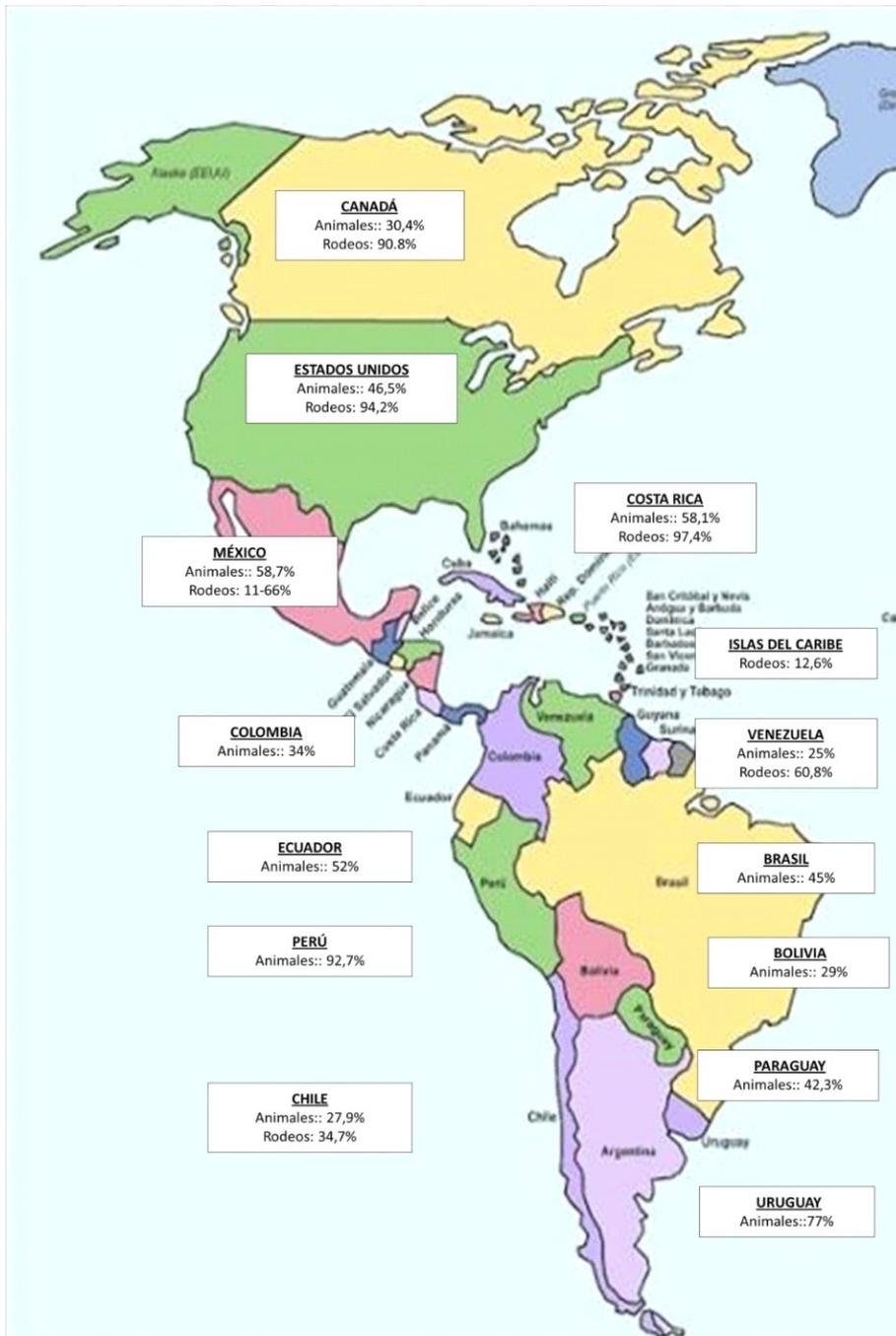


Figura 2. Prevalencias de infección por el virus de la leucosis bovina (BLV) a nivel individual (animales) y a nivel de rodeos infectados en el continente americano

de la producción de leche durante aproximadamente 10 meses) también son relevantes aunque difíciles de estimar (Rhodes *et al.*, 2003). El efecto de la infección por el BLV en los parámetros productivos aún es controversial. Estudios previos no encontraron una asociación significativa entre la infección por BLV y la producción de leche (Jacobs *et al.*, 1991; Kale *et al.*, 2007; Tiwari *et al.* 2007; Sorge *et al.*, 2011). Trabajos más recientes indican un efecto negativo en la producción y calidad de la leche debido a la infección. A nivel de rodeo se encontró una asociación lineal entre la mayor prevalencia de infección por el BLV y una menor producción de leche (Ott *et al.*, 2003; Erskine *et al.*, 2012). A nivel individual, se observó que la infección por BLV disminuye la producción de leche en 1.5%/vaca/año (Norby *et al.*, 2016), estimándose una pérdida de 11 000 kg/animal en su vida productiva (Nekouei *et al.*, 2016).

La infección por BLV también se ha asociado con un aumento en el recuento de células somáticas en leche, lo cual sucede especialmente en vacas con más de cuatro lactancias (Yang *et al.*, 2016). El aumento en el recuento de células somáticas es un indicador de mastitis clínica y subclínica y, por ende, está asociado a una menor producción láctea, a leche con mayor carga bacteriana y menor porcentaje de grasa y caseína, a una menor producción y calidad de quesos, y a un menor tiempo de conservación de los productos lácteos. También se le ha asociado a un aumento del intervalo entre partos y mayor número de servicios por concepción, sugiriendo que el BLV podría tener influencia en el comportamiento reproductivo del ganado lechero (Vanleeuwen *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2015).

El BLV puede afectar las células del sistema inmune en muchos niveles, especialmente en la proliferación, apoptosis y expresión de receptores y citoquinas (Kabeya *et al.*, 2001; Frie y Coussens, 2015; Iwan *et al.*, 2017). Además, al afectar el crecimiento, la

diferenciación y la sensibilidad de las células, podría regular la potencia y la duración de las reacciones inmunológicas (Kabeya *et al.*, 2001; Blagitza *et al.*, 2017; Brym *et al.*, 2018). Se ha propuesto que la infección con este virus predispone o disminuye la resistencia a la infección contra otros patógenos. Frie *et al.* (2017) hallaron que las vacas infectadas con BLV presentan títulos significativamente más bajos de anticuerpos específicos de antígeno en comparación con las vacas no infectadas. Asimismo, se ha observado una respuesta serológica disminuida frente a la vacunación contra varios patógenos en animales positivos a BLV, sugiriendo una menor protección vacunal en las vacas infectadas (Erskine *et al.*, 2011; Frie y Coussens, 2015; Frie *et al.*, 2016; Puentes *et al.*, 2016).

PATOLOGÍA INDUCIDA POR EL BLV EN SU HUÉSPED NATURAL

El blanco principal del BLV son los linfocitos B, aunque se sabe que el virus puede infectar *in vivo* e *in vitro* otras poblaciones celulares, como por ejemplo los macrófagos. La mayoría de las células B infectadas expresan el marcador CD5 (Depelchin *et al.*, 1989; Meiom *et al.*, 1993; Mirsky *et al.*, 1993). Al estar infectado el linfocito B, el genoma de ARN es copiado a ADN por la enzima transcriptasa reversa codificada por el virus. Mediante infecciones experimentales, se sabe que el virus se replica rápida e intensamente a través del ciclo infeccioso, el cual involucra la producción de nuevos viriones, la infección de linfocitos, y la transcripción reversa e integración del genoma viral como provirus en las células infectadas. Este proceso conduce a un pico de carga proviral hacia las 4-8 semanas post-infección. Una vez que el animal infectado desarrolla la respuesta inmune específica, las células infectadas en esta etapa inicial son eliminadas masivamente por el sistema inmune, y la carga proviral desciende significativamente (Gillet *et al.*, 2013). A partir de ese momento

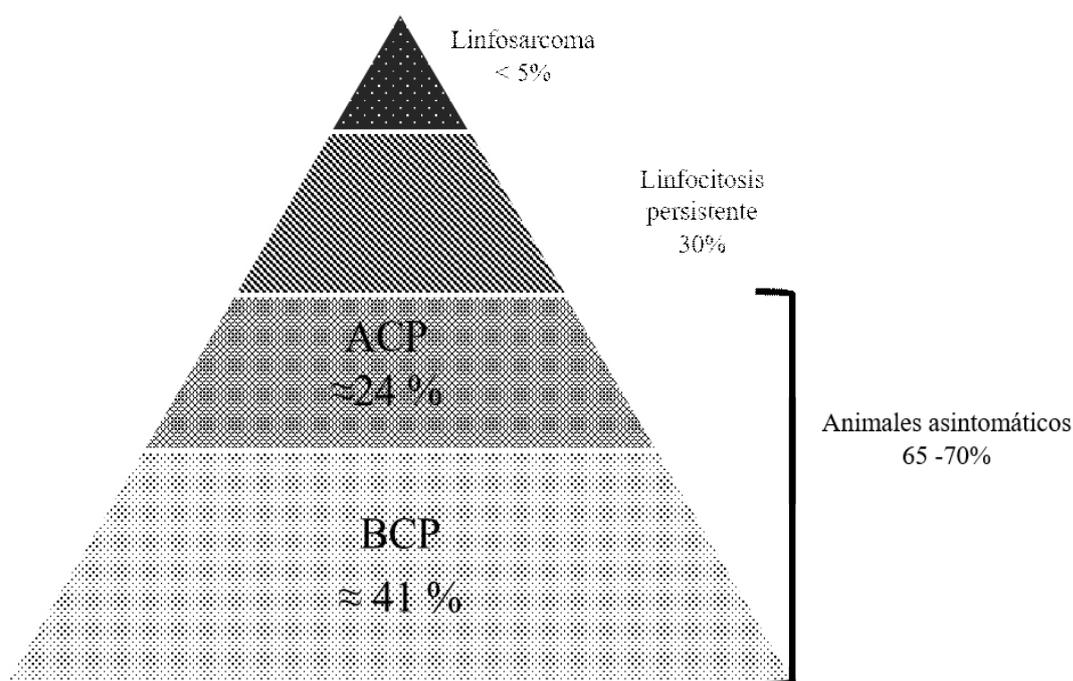


Figura 3. La infección por el virus de la leucosis bovina (BLV) se ajusta al fenómeno «iceberg». La mayoría de las infecciones por BLV son clínicamente inaparentes, con o sin alteraciones hematológicas (linfocitosis persistente). La infección inaparente se puede identificar por métodos serológicos (presencia de anticuerpos específicos) o moleculares (detección del provirus por PCR). Los casos clínicos de linfoma se observan en menos del 5% de los animales infectados, y se identifican a través del examen clínico o como hallazgos de necropsia, y deben ser confirmados mediante métodos histopatológicos. *ACP*: alta carga proviral; *BCP*: baja carga proviral

el virus comienza a propagarse a través de la expansión clonal de células infectadas, que, al duplicar su material genético replican también el genoma del BLV integrado como provirus, sin evidencia de transcripción reversa (Florins *et al.*, 2007; Pomier *et al.*, 2008).

La infección por BLV se ajusta al fenómeno conocido como «iceberg», típico de muchas infecciones virales (Figura 3). La infección es asintomática en la mayoría de los casos, mientras que en algunos animales desarrolla un incremento permanente y estable de linfocitos B en sangre periférica, conocido como linfocitosis persistente (LP) (Ferrer *et al.*, 1978). La LP se considera una condi-

ción benigna que resulta de la acumulación de linfocitos B no transformados, debido a un desbalance entre la proliferación y la muerte celular (Debaq *et al.*, 2003). La punta del iceberg está representada por 1-5% de los animales infectados que desarrollan la enfermedad tumoral (Ferrer *et al.*, 1979).

La condición patológica (linfoma o linfoma multicéntrico) resulta de la acumulación de linfocitos transformados por el virus en uno o más órganos, luego de un periodo de latencia prolongado que puede durar entre 1 y 8 años (Ferrer, 1980). Las lesiones se observan como masas tumorales firmes y blanquecinas, pero también puede presentar-

se como un infiltrado tisular difuso, manifestándose a la necropsia como un órgano de mayor tamaño y de color pálido, que puede ser confundido con un cambio degenerativo (Radostitis *et al.*, 2007). El linfosarcoma puede comprometer diversos órganos, especialmente el abomaso, corazón, linfonodos viscerales y periféricos, bazo, útero y riñones. Esta condición es más frecuente en animales de 4-8 años, y muy raro en animales menores de 2 años (Ferrer, 1980).

Los signos clínicos dependen de la ubicación y ritmo de crecimiento de los tumores. En la mayoría de los casos, el curso de la enfermedad es subagudo a crónico y su inicio muchas veces coincide con el parto, comprometiendo la siguiente lactancia. Los signos más frecuentemente observados son: debilidad, pérdida de apetito y de peso, disminución en la producción de leche, linfadenopatía externa e interna y paresia posterior (Radostitis *et al.*, 2007). El curso es hiperagudo en el 5-10% de los casos, donde los animales mueren sin signos clínicos previos. Esta presentación puede ocurrir si se afectan las glándulas adrenales, o a consecuencia de una hemorragia interna por la ruptura del bazo o de una úlcera abomasal perforada (Radostitis *et al.*, 2007). La enfermedad es invariablemente fatal. La descripción detallada de las características clínicas y hallazgos de necropsia puede encontrarse en Radostitis *et al.* (2007).

Los bovinos infectados con BLV que no presentan signos clínicos ni hematológicos, comprenden al menos dos grupos que pueden ser diferenciados según el nivel de carga proviral (CP) en sangre periférica; es decir, la cantidad de provirus que portan, y el nivel de su respuesta inmune hacia el BLV (Juliarena *et al.*, 2007, 2017a). Algunos animales se caracterizan por alcanzar altos niveles de CP (>100 000 copias de provirus/ μ g ADN), medida a través de la técnica de PCR, y una elevada respuesta de anticuerpos contra la proteína más antigénica del BLV, la glicoproteína de 51kDa de la envoltura viral

(BLVgp51). Este grupo se denomina de «alta carga proviral» (ACP), y no se diferencia de los animales con LP en términos de CP o respuesta de anticuerpos hacia el virus. El segundo grupo abarca aproximadamente el 60% de los animales clínicamente y hematológicamente sanos, y comprende aquellos animales que presentan muy baja carga proviral en sangre periférica y bajo nivel de anticuerpos específicos contra los principales antígenos del BLV, y se les denomina animales de «baja carga proviral» (BCP). Los bovinos con BCP usualmente tienen menos de 100 copias del provirus/ μ g ADN, de allí que muchas veces no son detectados por los métodos moleculares habitualmente utilizados (PCR y PCR en tiempo real) (Juliarena *et al.*, 2007).

El mecanismo de patogenicidad del BLV no está aun completamente dilucidado. Este virus no porta oncogenes, pero codifica proteínas no estructurales con potencial oncogénico como Tax y G4 (Willems *et al.*, 1990; Kerkhofs *et al.*, 1998). La integración del provirus en regiones cercanas a genes «impulsores o controladores de cáncer» (*cancer drivers*), altera la actividad de estos genes y constituye un mecanismo inicial de tumorigénesis (Rosewick *et al.*, 2017). Utilizando tecnologías modernas como el secuenciamiento profundo de RNA (RNAseq) se han identificado transcritos antisentido y microRNAs codificados por el BLV, los que jugarían un rol importante en el ciclo vital del virus, en la persistencia en el hospedador y su patogenicidad (Durkin *et al.*, 2016; Gillet *et al.*, 2016).

Los primeros estudios epidemiológicos mostraron que tanto el linfosarcoma como la LP se observaban más frecuentemente en determinadas líneas genéticas, y que ambas condiciones están bajo el control de factores genéticos del hospedador (Ferrer *et al.*, 1978; Ferrer, 1980). La estimación de la heredabilidad sugiere que la genética también influye la susceptibilidad a la infección por BLV (BurrIDGE *et al.*, 1979). Las bases moleculares de la resistencia y susceptibilidad

genética al desarrollo de LP en el bovino han sido mapeadas a nivel de las moléculas de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) bovino (BoLA), más específicamente en el gen DRB3 (Xu *et al.* 1993a; Zanotti *et al.* 1996). El CMH comprende un conjunto aproximado de 150 genes que se encuentra presente en todos los vertebrados y que interviene en los procesos de inmunidad (Janeway *et al.*, 2001).

Específicamente, el gen DRB3 codifica las cadenas β de las moléculas de clase II del CMH (Gutiérrez *et al.*, 2017). La función de las moléculas de clase II del CMH es presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T durante la inducción de la respuesta inmune específica (Takeshima y Aida, 2006). Estos genes son altamente polimórficos (para el gen DRB3 se han descrito 136 alelos) (European Bioinformatics Institute, s.f.) y han sido asociados con el nivel de respuesta inmune a los antígenos y con la resistencia o susceptibilidad a varias enfermedades (incluyendo mastitis, leucosis bovina, parasitosis, entre otras) (Takeshima y Aida, 2006). Otro gen perteneciente al CMH, el gen del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) también ha sido asociado con el BLV. Altos niveles de esta citoquina en la fase temprana de la infección podrían contribuir a la eliminación del BLV (Kabeya *et al.*, 1999). Un polimorfismo en este gen, que afecta el nivel de expresión de TNF- α , ha sido asociado con el linfosarcoma inducido por BLV y ACP en bovinos infectados (Konnai *et al.*, 2006).

Estudios del presente grupo de investigación han demostrado que los fenotipos de BCP y ACP también están fuertemente asociados al gen BoLA DRB3 en la raza Holstein, sugiriendo que la respuesta inmune celular es importante para el control de la diseminación del BLV (Juliarena *et al.*, 2008). Estos resultados han sido confirmados posteriormente por otros autores, y ampliados a otras razas bovinas (Miyasaka *et al.*, 2013; Carignano *et al.*, 2017; Hayashi *et al.*, 2017; Hernandez *et al.*, 2018).

TRANSMISIÓN

Normalmente el BLV no se encuentra en el animal infectado como virus libre sino integrado como provirus al genoma del hospedador. Por lo tanto, los fluidos que contienen linfocitos infectados como sangre, leche u otra secreción pueden, al entrar en contacto con las membranas mucosas o tejidos lesionados, o al ser directamente inoculados, transmitir la infección viral a animales susceptibles (Hopkins y DiGiacomo, 1997). La principal vía de transmisión del BLV es horizontal, ya sea en forma natural o iatrogénica (Nekouei *et al.*, 2015). Las intervenciones humanas asociadas a prácticas médico-veterinarias y de manejo como: descornados, castraciones, extracciones de sangre, palpaciones rectales y aplicaciones de caravanas pueden, si se realizan sin la correcta desinfección del instrumental utilizado, causar el contacto de sangre entre animales (Hopkins y DiGiacomo, 1997). Probablemente esta sea la principal causa de la amplia diseminación del virus en la mayoría de los rodeos argentinos.

El potencial de transmisión de un animal infectado depende del número de linfocitos infectados contenidos en la sangre periférica, por lo que los animales con fenotipo de ACP, especialmente con LP, son mejores transmisores del virus que los animales con fenotipo de BCP (Juliarena *et al.*, 2007). La dosis mínima infectante proveniente de un animal con LP e inoculada en corderos es de 926 linfocitos (Mammerickx *et al.*, 1987). El volumen de sangre estimado que contiene ese número de linfocitos infectados es menor a 0.5 μ l para un animal con fenotipo de ACP, y mayor a 5 ml para un animal con fenotipo de BCP (Juliarena, 2008). En consecuencia, todos los bovinos que presentan el fenotipo de ACP son potenciales transmisores del BLV, mientras que los animales que presentan el fenotipo de BCP no transmiten la infección en las condiciones normales de manejo productivo (Juliarena *et al.*, 2016). En condiciones experimentales es posible transmitir el

BLV de un animal con perfil de BCP a corderos, lo cual demuestra que el BLV mantiene su poder infectante y su virulencia en los animales de BCP. Sin embargo, es necesario inyectar un volumen grande de sangre (entre 10 y 100 ml) para lograr la transmisión (Juliarena, 2008; Esteban *et al.*, 2009; Juliarena *et al.*, 2016).

Otra posible vía de transmisión horizontal del BLV es a través de insectos hematófagos, que pueden actuar como vectores mecánicos, especialmente en zonas de climas cálidos (Ohshima *et al.*, 1981). Este tipo de transmisión depende de la densidad de insectos, de la proporción de animales infectados y del nivel de la carga proviral en los animales (Foil *et al.*, 1988; Kohara *et al.*, 2018). Esto explicaría que durante los meses de verano, coincidente con una mayor densidad de insectos hematófagos, se produce el contagio de la enfermedad en establecimientos donde se aplican medidas de higiene estrictas en las maniobras de manejo animal, tanto entre animales criados a campo como en estaca o en corrales contiguos (Kobayashi *et al.*, 2014, 2015).

La transmisión vertical prenatal ocurre a tasas bajas (3-8%), principalmente por infección transplacentaria después de establecida la competencia inmunitaria (tercer mes de gestación) (Lassauzet *et al.*, 1991; Hopkins y DiGiacomo, 1997) o durante el pasaje por el canal de parto. La LP y altos niveles de carga proviral en la madre son factores de riesgo para la transmisión prenatal del BLV (Lassauzet *et al.*, 1991; Agresti *et al.*, 1993; Mekata *et al.*, 2014). La transmisión vertical postnatal en terneros alimentados con leche o calostro proveniente de madres infectadas es poco frecuente, probablemente debido a que los anticuerpos específicos obtenidos por transferencia pasiva natural les confieren protección (Ferrer y Piper, 1981). Sin embargo, los terneros nacidos de madres no infectadas son susceptibles a la infección si se los alimenta con leche de vacas infectadas, porque carecen de la protec-

ción que confieren los anticuerpos anti-BLV maternos (Romero *et al.*, 1983). El BLV raramente se detecta en el semen de toros infectados (Choi *et al.*, 2002; Dus Santos *et al.*, 2007; Benitez *et al.*, 2019b). La transmisión del BLV a través del semen no ha sido demostrada ni por medio de la inseminación artificial ni por servicio natural (Benitez *et al.*, 2019a).

Recientemente, la preocupación sobre el potencial zoonótico del BLV ha reemergido, a raíz de publicaciones que sugieren una asociación entre el BLV y el cáncer de mama humano (Buehring *et al.*, 2015, 2017; Schwingel *et al.*, 2019). Un estudio reciente reporta la detección de secuencias del BLV y anticuerpos anti-BLV en un alto porcentaje de muestras de sangre humana, pero no se encuentra correlación entre la presencia del genoma y los anticuerpos específicos (Buehring *et al.*, 2019). Sin embargo, la evidencia de esta asociación es controversial y la opinión de la comunidad científica internacional es escéptica acerca de la posible asociación entre el BLV y el cáncer de mama, o del potencial zoonótico de este retrovirus (Sinha, 2016). Zhang *et al.* (2016) no detectaron anticuerpos ni secuencias de BLV en muestras de sangre y tejidos de mujeres con y sin cáncer de mama en China. Asimismo, en otro estudio de secuenciamiento profundo de genoma completo efectuado sobre 51 muestras de cáncer de mama tampoco se identificaron secuencias del BLV (Gillet y Willems, 2016). A pesar de las controversias, y siendo el BLV un retrovirus emparentado con el virus de la leucemia a células T de humanos (HTLV), es necesario considerar el potencial riesgo de transformarse en una zoonosis.

DIAGNÓSTICO

En el diagnóstico de la leucosis bovina es importante diferenciar la enfermedad (leucosis o linfosarcoma) y la LP, de la infección por BLV. El diagnóstico de la enferme-

dad es el primer indicio de la presencia de la infección en el rodeo, mientras que el diagnóstico de la infección permitiría orientar su control.

La LP se define como un incremento en el recuento absoluto de linfocitos de tres o más desvíos estándar por encima de la media determinada para la raza y para la edad; incremento que debe mantenerse por más de tres meses. La detección de animales con LP a través de las denominadas «claves hematológicas» fue la base de un procedimiento utilizado en el pasado (previo al desarrollo de los métodos serológicos) para clasificar los animales como normales, sospechosos o linfocitóticos en función de los recuentos absolutos de linfocitos y la edad (Bendixen, 1965).

El diagnóstico de linfosarcoma se lleva a cabo a través del examen clínico o hallazgos de necropsia. Este diagnóstico debe ser confirmado mediante el análisis histopatológico de una biopsia de los órganos afectados. Sin embargo, este método no permite distinguir entre el linfoma esporádico y aquellos inducidos por BLV, por lo cual debe ser complementado con un análisis por PCR o una prueba serológica (EFSA 2015). La mayoría de los linfomas bovinos presentan un patrón difuso, con pérdida total de la arquitectura nodal. El tipo celular más frecuente es el difuso grande, con elevados índices mitóticos (Vernau *et al.*, 1992). El análisis inmunofenotípico muestra expresión de moléculas de clase II del CMH, cadenas pesadas tipo γ y cadenas livianas λ (Vernau *et al.*, 1997). Los animales afectados suelen tener un elevado recuento linfocitario en sangre periférica, con valores entre 20 000 y 30 000 linfocitos/ μ l, pudiendo en algunos casos elevarse hasta 80 000-90 000 linfocitos/ μ l, y más; sin embargo, en ciertos casos el recuento linfocitario puede estar disminuido (Radostitis *et al.*, 2007).

El diagnóstico de la infección por BLV puede realizarse en forma indirecta, a través de la detección de anticuerpos específicos, o por métodos directos que evidencien la pre-

sencia del virus. La presencia de anticuerpos específicos en suero o leche, determinada mediante métodos serológicos, es una evidencia clara de infección en animales mayores de 6 meses de edad (Gutiérrez *et al.*, 2001). Los anticuerpos específicos pueden detectarse entre 2 y 6 semanas pos-infección, dependiendo de la sensibilidad de la técnica empleada (Klintevall *et al.*, 1997). En estas pruebas se incluyen la inmunodifusión en gel de agar (IDGA) (Miller y Van Der Maaten, 1977) y las de radioinmunoprecipitación (RIP) utilizando como antígenos las proteínas más inmunogénicas del virus, la proteína principal de la cápside de 24kDa (p24) y la glicoproteína de la envoltura viral de 51kDa (gp51) (Levy *et al.*, 1977, 1980). Los anticuerpos contra gp51 generalmente aparecen antes y alcanzan mayores títulos que los anticuerpos anti-p24 (Mammerickx *et al.*, 1985).

La prueba de IDGA ha sido ampliamente utilizada por su simplicidad y especificidad. Sin embargo, los estudios comparativos muestran que la RIP, utilizando la gp51 como antígeno, seguido de la RIP con p24, son más sensibles que la IDGA para la identificación de animales infectados (Gupta y Ferrer, 1981; Miller *et al.*, 1981). Además, la técnica de IDGA arroja frecuentemente resultados falso-negativos en muestras de vacas en el periparto (Burrige *et al.*, 1982) o en animales que desarrollan bajos títulos de anticuerpos (Ferrer, 1980; Gupta y Ferrer, 1981).

Posteriormente se han desarrollado varios ELISAs que han ido reemplazando gradualmente a la IDGA y al RIP (Portetelle *et al.*, 1989; Klintevall *et al.*, 1991; Gutiérrez *et al.*, 2001), y varios de ellos están disponibles comercialmente. La principal ventaja del ELISA respecto de la IDGA es su mayor sensibilidad, y la posibilidad de aplicarlo a muestras de suero o plasma, leche y pool de leche. La prueba en pool de leche resulta útil para monitorear el estado situacional de los rodeos lecheros en forma económica, con la ventaja de que puede detectar los niveles de anticuerpos en leche que son significativamente inferiores al del suero. Se han ob-

tenido resultados positivos en pool de leche con prevalencias de infección de 2.5-5% o superiores (Klintevall *et al.*, 1991; Gutierrez *et al.*, 2001). A pesar de la marcada superioridad de algunos ELISA respecto de la IDGA, ambas pruebas son recomendadas por la OIE para el diagnóstico serológico de la infección (OIE, 2018).

Debido a la ausencia de expresión viral y viremia en los animales infectados, la identificación directa del BLV en forma de partículas virales o sus antígenos requiere el cultivo *in vitro* de los leucocitos de sangre periférica (Ferrer, 1980). Este procedimiento activa la expresión de transcritos, proteínas y partículas virales, los cuales pueden ser detectados por métodos moleculares, inmunológicos o microscopía electrónica. Estas metodologías son muy laboriosas y, por lo tanto, imprácticas para el diagnóstico de rutina, por lo que su uso está prácticamente restringido al campo de la investigación científica (Gutiérrez y Forletti, 2016). Los métodos moleculares, fundamentalmente la PCR y sus variantes, son considerados actualmente como los métodos más útiles y rápidos para la detección directa del BLV.

La detección directa del provirus es el método de elección en terneros menores de seis meses (Agresti *et al.*, 1993; Eaves *et al.*, 1994) (ya que los anticuerpos adquiridos pasivamente a través del calostro interfieren en el diagnóstico serológico), y en los estadios iniciales de la infección, previo al desarrollo de la respuesta inmune específica. También resultan de utilidad para clarificar resultados dudosos o inconsistentes obtenidos por métodos serológicos (Fechner *et al.*, 1996; Rola-Luszczak *et al.*, 2013), y para diferenciar casos clínicos de linfomas esporádicos y enzoóticos (Radostitis *et al.*, 2007). Se han desarrollado numerosas variantes de la técnica de PCR, incluyendo la amplificación simple, PCR anidada (Fechner *et al.*, 1996; Gutierrez *et al.*, 2001), ELISA-PCR (Naif *et al.*, 1992; Rola y Kuzmak, 2002), *in situ* PCR (Duncan *et al.*, 2005) y amplificación

isotérmica (Komiya *et al.*, 2009; Okuwa *et al.*, 2017). La eficiencia en la detección del provirus por las distintas variantes de PCR es variable, dependiendo principalmente del gen viral amplificado y de los cebadores (*primers*) utilizados (Kuckleburg *et al.*, 2003). Los mejores resultados se han obtenido amplificando regiones de los genes *pol* y *env* (Fechner *et al.*, 1996; Kuckleburg *et al.*, 2003) y utilizando el formato *nested* o anidado, para obtener un nivel de sensibilidad aceptable.

La técnica de PCR ha mostrado ser más sensible que los métodos serológicos, principalmente debido a la detección de animales infectados en la etapa inicial de la infección, antes de la seroconversión (Klintevall *et al.*, 1994; Fechner *et al.*, 1996; Beier *et al.*, 1998). La introducción, en los últimos años, de equipamiento y reactivos que permiten realizar la PCR en tiempo real ha favorecido la aplicación de esta técnica para la detección y cuantificación del BLV (Kuckleburg *et al.*, 2003; Lew *et al.*, 2004; Heenemann *et al.*, 2012; Rola-Luszczak *et al.*, 2013). Sin embargo, por razones de costo, el uso de esta tecnología está restringido casi completamente a la investigación.

Se han reportado resultados negativos por PCR en animales serológicamente positivos (Jacobsen *et al.*, 1985; Murtaugh *et al.*, 1991; Fechner *et al.*, 1996; Reichel *et al.*, 1998; Gutierrez *et al.*, 2001). Ante esto, no debe excluirse la posibilidad de infección con BLV a partir de un resultado negativo en PCR aplicada a células de sangre. Esta situación es frecuente en animales que portan un número extremadamente bajo de copias del provirus en sangre, es decir, animales con BCP. De hecho, el nivel de copias de provirus en animales con BCP está al límite o por debajo del nivel de detección de una PCR anidada, de manera que estos animales en muchos casos son indetectables mediante esta técnica (Juliarena *et al.*, 2017b). Con relación a la respuesta serológica, los animales con BCP desarrollan usualmente títulos de

anticuerpos contra las proteínas BLVp24 y BLVgp51 significativamente inferiores que los animales de ACP (Juliarena *et al.*, 2007). Los anticuerpos anti-BLVgp51, a pesar de encontrarse en niveles inferiores en animales con BCP respecto de los animales con ACP, son fácilmente detectables por pruebas serológicas como el ELISA, cuando se utiliza la gp51 como antígeno (Gutiérrez *et al.*, 2001). Por el contrario, los anticuerpos anti-BLVp24 son indetectables en la mayoría de los animales con BCP, o alcanzan títulos muy bajos. Por esta razón, la sensibilidad diagnóstica de las pruebas de laboratorio basadas exclusivamente en BLVp24 suele ser relativamente baja.

TRATAMIENTO Y CONTROL

Tratamiento Farmacológico

Una característica importante de la infección por el BLV es que, como todo retrovirus, el virus incorpora su información genética al genoma del hospedador, manteniéndose en un estado silente, como provirus, dentro de las células infectadas. Este es un mecanismo de evasión del sistema inmunitario, evitando así que las células infectadas sean eliminadas. Si bien hasta el momento no existe ningún tipo de tratamiento para aquellos animales infectados con el BLV, se han evaluado algunas estrategias de tratamiento en forma experimental como la administración de compuestos capaces de revertir la latencia del BLV para hacer que el virus se exprese. La expresión viral en las células infectadas permite que estas puedan ser reconocidas y eliminadas por parte del sistema inmunitario (Achachi *et al.*, 2005).

Cierto grupo de sustancias, llamadas inhibidores de la acetilación de histonas (IAH) entre ellas, el anticonvulsivo ácido valproico (VPA) y el antibiótico tricostatina A (TSA) han demostrado tener la capacidad de activar la expresión de virus latentes (Chen y Townes, 2000). Las drogas IAH se han pro-

bado en preclínica y ensayos clínicos solas o en combinación con fármacos anti-retrovirales como terapéuticos para infecciones por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y los virus de leucemia a células T de simios (STLV) y HTLV, surgiendo entonces un nuevo potencial terapéutico para retrovirus (Lehrman *et al.*, 2005; Lezin *et al.*, 2007; Afonso *et al.*, 2010). Achachi *et al.* (2005) probaron el tratamiento con VPA en ovinos leucémicos observando un aumento transitorio de la carga proviral, una disminución en el número de linfocitos, y la regresión de la leucemia/linfoma. No obstante, a pesar de estos resultados iniciales alentadores, los animales quedaron persistentemente infectados. En un estudio de seguimiento de dos años en ovejas donde la carga proviral disminuyó inicialmente, la interrupción del tratamiento llevó a la reaparición de una leucemia incontrolable y a la falta de respuesta a la nueva administración de VPA, siendo necesario utilizar drogas más potentes (Gillet *et al.*, 2012).

Recientemente se han reportado los resultados de un experimento piloto utilizando el inhibidor de la enzima ciclo oxigenasa-2, meloxicam, combinado con anticuerpos anti-ligando de muerte programada-1 (PD-L1) (Sajiki *et al.*, 2019). Este nuevo tratamiento fue probado por estos autores obteniendo una reducción significativa de la carga proviral. Sin embargo, la evidencia de este ensayo está limitada a un solo animal, por lo que se necesitan más estudios para poder evaluar su eficacia.

Vacunas

Una solución más práctica y económica sería contar con una vacuna que prevenga la infección por BLV. Sin embargo, debido a que el BLV es un retrovirus, el desarrollo de una vacuna eficaz no es una tarea fácil. Si bien, tanto los bovinos como los ovinos, son capaces de desarrollar una fuerte respuesta inmunitaria antiviral frente a la infección primaria por el BLV, las respuestas inmunitaria humoral e inmunitaria mediada por

células son deficientes para la eliminación de células infectadas que portan el virus latente (Abdala *et al.*, 2019).

Debido a que los anticuerpos maternos transferidos a la cría a través del calostro son capaces de proteger al recién nacido de la infección durante varios meses, los primeros intentos de inmunización estuvieron dirigidos a inducir anticuerpos neutralizantes (Callebaut *et al.*, 1993, 1994). Inicialmente, se probó una vacuna que contenía un provirus defectuoso (Altaner *et al.*, 1987a, 1988, 1991). Esta vacuna, compuesta por células infectadas, indujo la producción de anticuerpos neutralizantes en las ovejas vacunadas, pero fue desechada al encontrarse que el provirus podía transmitirse por el contacto entre células, representando un riesgo de transmisión de la enfermedad (Altaner *et al.*, 1987b). También se probaron vacunas a virus inactivado, pero solo una porción de los animales resistió al desafío con una dosis baja de virus infectante (Miller y Van Der Maaten, 1978; Fukuyama *et al.*, 1993). Por otro lado, las vacunas a subunidades virales, si bien produjeron una respuesta inmunitaria humoral, también fallaron en prevenir la infección del ganado vacunado (Burkhardt *et al.*, 1989; Cherney y Schultz, 1996).

La primera evidencia de que la respuesta mediada por células podría ser importante en la protección sobrevino con el uso de vacunas recombinantes a subunidades (env) que utilizaban vectores virales como el virus vaccinia (Ohishi *et al.*, 1991). Esta vacuna no previno la infección con el BLV, pero redujo significativamente la diseminación del virus entre los linfocitos en los animales vacunados. En este ensayo, no se encontró una correlación con los anticuerpos neutralizantes presentes en el suero de los animales, sugiriendo que la respuesta mediada por células cumplía un rol más importante en limitar la multiplicación viral (Ohishi *et al.*, 1992, 1996).

Hasta el momento, la vacuna perfecta que pueda inducir la producción de anticuerpos neutralizantes y una respuesta inmunitaria protectora mediada por células no ha sido alcanzada. Los animales están expuestos a la reinfección durante toda su vida (Asfaw *et al.*, 2005), de allí que la capacidad para inducir una respuesta inmunitaria protectora de larga duración depende de un estímulo antigénico adecuado. Esto se lograría principalmente con una vacuna viva atenuada, con capacidad de replicación *in vivo* (Siegrist, 2013). Asimismo, la respuesta inducida por esta vacuna también debería diferenciar entre animales vacunados e infectados.

En los últimos años se ha proclamado el éxito en el desarrollo de una vacuna que utiliza un provirus con múltiples modificaciones genéticas (Rodríguez *et al.*, 2011; Gutierrez *et al.*, 2014; Abdala *et al.*, 2019). Sin embargo, no se ha mostrado una prueba de concepto, así como tampoco existe información sobre las características de este provirus mutado, de la protección inmunitaria conferida a largo plazo a los animales vacunados, de la evaluación de seguridad de la vacuna, ni tampoco de la estrategia a ser utilizada para diferenciar animales vacunados de animales infectados. La nueva evidencia científica sobre la biología del virus y sobre la alteración en la función de genes represores de tumores que representa la incorporación de retrovirus en el genoma del hospedador enfatiza aún más la necesidad de precaución al momento de utilizar vacunas retrovirales vivas atenuadas (Gillet *et al.*, 2016; Rosewick *et al.*, 2017).

En conclusión, hasta la fecha, ninguna vacuna contra el BLV ha tenido éxito, y una vacuna preventiva adecuada tomará muchos años en materializarse. Tal como ocurre en otras enfermedades retrovirales, se ha fallado en conseguir un estímulo antigénico continuo del sistema inmunitario que genere una inmunidad esterilizante.

Estrategias de Control

Estrategias tradicionales

La estrategia de control y erradicación del BLV más eficiente consiste en la identificación y eliminación de todos los animales infectados del rodeo. Esta medida sanitaria ha tenido excelentes resultados en varios países europeos, logrando la erradicación de la enfermedad (EFSA, 2015).

En Argentina, desde 1994, se ha implementado un programa voluntario de erradicación de la leucosis bovina. La Resolución N.º 337/94 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) establece las normas y procedimientos para la certificación de establecimientos libres de leucosis (SENASA, 2005). Como primera medida se debe hacer el diagnóstico de la situación inicial por medio de una prueba serológica oficial (IDGA o ELISA) a todos los animales del rodeo mayores de seis meses a fin de clasificar al rodeo como «libre» o «infectado». Para certificar un rodeo como «libre de BLV» se deberá repetir el examen serológico a la totalidad de los animales después de 60-90 días, y se recertificará anualmente previo análisis serológico negativo de todos los animales mayores de 15 meses.

En los casos donde el establecimiento se encuentra en la categoría de «infectado», y de acuerdo con el número de animales afectados, se puede optar por la eliminación simultánea o gradual de los animales positivos. Los establecimientos se clasifican según el porcentaje de animales infectados en: Infectado Clase A (1-15% de positivos); Infectado Clase B (15-30% de positivos); Infectado Clase C (>30% de positivos). En general, el plan de saneamiento a seguir depende de la edad de los animales afectados, del porcentaje de animales infectados en el rodeo, de la infraestructura del establecimiento, de las prácticas de manejo y de las posibilidades económicas del productor.

Si la tasa de infección es baja (<10%), es conveniente eliminar los animales positivos, implementar medidas de manejo higiénico-sanitarias estrictas y realizar el control serológico cada tres meses para ir descartando los animales infectados, que pudieran haber sido no detectados en el testeo inicial (infecciones recientes). Una vez que la totalidad de los animales tiene serología negativa, se realizará un control anual, manteniendo siempre las medidas de higiene en las prácticas semiológicas y quirúrgicas habituales. El establecimiento podrá declararse libre de leucosis, una vez que se obtengan resultados negativos en la totalidad de los animales, en dos controles consecutivos. A partir de ese momento se deberá hacer un seguimiento anual. Todos los bovinos que se incorporen deben ser serológicamente negativos y mantenerse en aislamiento. Podrán incorporarse al rodeo si resultan negativos a una segunda prueba serológica realizada después de tres meses.

Si la tasa de infección es alta (>10%) se establecen medidas de control estrictas en todas aquellas prácticas que involucren transferencia accidental de cualquiera de los fluidos biológicos con el objetivo de disminuir la transmisión en el rodeo. Las medidas de bioseguridad y de manejo que se recomienda implementar son las siguientes:

- Uso de agujas y jeringas descartables para extracciones de sangre e inyecciones.
- Uso de guantes obstétricos individuales para palpación transrectal (o guantes separados para vacas no infectadas de vacas infectadas con BLV).
- Uso de material descartable o adecuadamente desinfectado para todos los procedimientos que conlleven un riesgo de contaminación con sangre (descornes, castraciones, tatuado, etc.)
- Control de insectos hematófagos.
- Alimentación de los terneros con leche de vacas no infectadas con BLV, con sustitutos de leche o con leche de vacas infectadas con BLV inactivada por calor.

- Utilización de inseminación artificial o monta natural con toros no infectados con BLV.
- Introducción al rodeo solo de animales BLV negativos provenientes de rodeos libres de BLV, o con cuarentena de 2-3 meses para confirmar la negatividad.

La aplicación de estas medidas en rodeos donde conviven animales infectados con animales libres de BLV requiere de una minuciosa y estricta sistematización del manejo animal y, aun así, la eficacia de este enfoque puede verse socavada por factores humanos y ambientales. Como medidas adicionales a las ya descritas, se recomienda aplicar conjuntamente programas de control de vectores hematófagos, como aplicación de pesticidas sobre los animales o colocación de mallas mosquiteras en los establos donde habitan los bovinos (Ooshiro *et al.*, 2013; Kohara *et al.*, 2018). Se recomienda además, ordeñar las vacas infectadas al final de cada ordeño, especialmente los animales con ACP.

Otra estrategia utilizada para mantener e incrementar el número de bovinos libres de BLV del establecimiento es dividir el rodeo en tres grupos y en corrales distantes: 1) vacas infectadas, 2) vacas no infectadas y 3) animales de reemplazo en cuarentena. Se requiere, además, del seguimiento periódico de los animales de los grupos 2 y 3 para detectar seroconversiones (Shettigara *et al.*, 1989; Suh *et al.*, 2005)

Estrategias alternativas de control mediante selección genética de animales resistentes

Los enfoques tradicionales de control son económicamente inviables en rodeos con alta prevalencia de infección por BLV. Para estos casos, se ha diseñado un programa de control y erradicación de BLV basado en la selección genética de animales asistida por un marcador molecular (Juliarena *et al.*, 2017b). Se consideran alelos de resistencia al BLV a los alelos del exón 2 del gen *BoLA-DRB3* que están asociados al fenotipo de

BCP. El alelo *BoLA-DRB3*0902* mostró una fuerte asociación con el fenotipo de BCP, tanto en bovinos de raza Holando Argentino como Japanese Black (Juliarena *et al.*, 2008; Miyasaka *et al.* 2013; Carignano *et al.*, 2017; Hayashi *et al.*, 2017; Takeshima *et al.*, 2019). Los estudios realizados en animales infectados Holando Argentino, tanto natural como experimentalmente, demostraron que la penetrancia de este alelo es notablemente alta, toda vez que más del 80% de las vacas portadoras del alelo *DRB3*902* desarrollan el fenotipo de BCP (Juliarena, 2008; Juliarena *et al.*, 2008). Además, la identificación de animales portadores de este alelo se puede realizar fácilmente mediante análisis de PCR alelo específica o por PCR en tiempo real (Forletti *et al.*, 2013). Por lo tanto, se considera que el alelo *BoLA-DRB3*0902* es un buen marcador molecular para la identificación de animales que desarrollarán BCP en las poblaciones actuales de las razas Holando Argentino y Japanese Black.

El diseño del programa de control por selección genética de animales resistentes incluye dos etapas (Figura 4). En una primera etapa, los animales con ACP (que presentan alto riesgo de transmisión de la infección) se reemplazan paulatinamente por animales con BCP o por animales no infectados, portadores de alelos de resistencia. En la segunda etapa se reemplazan progresivamente los bovinos de BCP por animales no infectados hasta declarar el establecimiento libre de BLV. En esta etapa, la genética de los animales de reposición es irrelevante; es decir, pueden ser portadores o no de alelos de resistencia, ya que todos los bovinos infectados que quedan en el rodeo presentan BCP y, por lo tanto, no transmitirán el virus. Esto último ha sido confirmado en un rodeo experimental en producción (Juliarena *et al.*, 2016), donde las vacas de BCP portadoras del alelo *BoLA-DRB3*0902* convivieron durante 20 meses con vacas no infectadas, sin que se haya aplicado alguna medida de control para minimizar la transmisión de BLV, teniendo en cuenta que los animales estuvieron expuestos a una gran densidad de insectos hematófagos.



Figura 4. Esquema del diseño del plan de control y erradicación del BLV mediante selección genética de animales utilizando el alelo *BoLA-DRB3*0902* como marcador molecular. (ACP: alta carga proviral; BCP: baja carga proviral)

En dicho lapso no se observó transmisión del BLV de los animales de BCP a los animales negativos, mientras que la tasa de incidencia en otros rodeos cercanos que utilizan el manejo usual para la región varió entre 0.06 a 0.17 contagios cada 100 días de contacto entre animales infectados y no infectados.

Así como se han identificado alelos de resistencia, también se han identificado varios alelos del gen *BoLA-DRB3* asociados con el fenotipo de ACP, que se han denominado «alelos de susceptibilidad» (Juliarena, 2008). El alelo *BoLA-DRB3*1501* es el que presenta mayor asociación con el fenotipo de ACP (Juliarena *et al.*, 2008). Existen otros alelos de este gen que han sido identificados como alelos de resistencia o de susceptibilidad, pero su asociación con los perfiles de infección es más débil o el alelo identificado ha diferido en los diferentes estudios (Juliarena *et al.*, 2008; Miyasaka *et al.*, 2013; Carignano

et al., 2017; Takeshima *et al.*, 2019). Por otro lado, se observa que no todos los animales de BCP son portadores de alelos de resistencia, lo cual sugiere el efecto de algún otro factor indeterminado sobre este fenotipo (Juliarena *et al.*, 2008). Esto también podría explicar el desarrollo de ACP en alrededor de un 20% de animales con el marcador molecular de resistencia. Se ha sugerido que pueden existir varios genes asociados con el desarrollo del perfil de infección, u otros factores epigenéticos o ambientales que pueden influenciar el desarrollo del fenotipo (Juliarena *et al.*, 2008). Otra hipótesis es que estas asociaciones pueden simplemente ser la consecuencia del desequilibrio de ligamiento entre el marcador molecular y otros loci (Juliarena *et al.*, 2008). Si esta última hipótesis fuera correcta, el hecho que desde hace casi 30 años el alelo **0902* (antiguamente **11*) ha sido identificado como alelo de resistencia (Xu *et al.*, 1993b; Zanotti *et al.*, 1996; Juliarena

et al., 2008; Miyasaka *et al.*, 2013; Carignano *et al.*, 2017; Hayashi *et al.*, 2017; Takeshima *et al.*, 2019), demuestra que en este caso la recombinación intracromosómica es muy baja y, por ende, el alelo *BoLA-DRB3*0902* constituye el mejor marcador molecular de resistencia identificado, especialmente para la raza Holando Argentino.

Este plan de control con intervención genética ha sido puesto en práctica por una cooperativa lechera comercial, que presenta altas prevalencias de infección con el BLV en sus tambos. En un principio, la prevalencia de infección calculada para los animales de primer parto fue similar a la observada en los rodeos de primer parto de otros establecimientos de la misma cuenca lechera. Sin embargo, la incorporación del alelo *BoLA-DRB3*0902* como criterio de selección genética en los animales de recambio, aumentó significativamente el porcentaje de vacas de primera parición con fenotipo BCP ($p < 0.0001$), en concordancia con el aumento de la frecuencia del alelo **0902* en el rodeo (Juliarena *et al.*, 2017a). Estos resultados muestran que, en la práctica, la aplicación de este plan de control alternativo basado en la selección genética, ya en su primera fase, puede disminuir la carga proviral promedio del rodeo.

Debido al papel relevante de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (*BoLA*) en la respuesta inmunitaria, se plantea el interrogante sobre si la aplicación de este plan de selección genética podría aumentar la susceptibilidad de las poblaciones seleccionadas por el genotipo *BoLA* a otros agentes infecciosos. Se conoce que los animales con genotipo de resistencia presentan títulos bajos de anticuerpos contra las dos proteínas estructurales principales del BLV, env gp51 y gag p24 (Juliarena *et al.*, 2007). Sin embargo, estos animales han demostrado desarrollar una buena respuesta inmunitaria humoral cuando son infectados con otros patógenos prevalentes del ganado lechero (Esteban *et al.*, 2009; Juliarena *et al.*, 2009).

Además, hasta la fecha el alelo *BoLA-DRB3*0902* no ha sido asociado con la susceptibilidad a otros agentes infecciosos (Lützelschwab *et al.*, 2016; Gutiérrez *et al.*, 2017), ni ha afectado negativamente rasgos de producción o reproducción. Más aún, los alelos de resistencia se asocian con parámetros de mayor producción y con resistencia a infecciones intramamarias (Dietz *et al.*, 1997; Rupp *et al.*, 2007).

La expansión de la población de vacas portadoras de estos alelos con el objetivo de controlar la infección por BLV, proporcionaría el beneficio adicional de la resistencia a la mastitis. Sin embargo, con el fin de mantener la mayor diversidad genética posible del gen *BoLA-DRB3*, este plan propone la aplicación de selección genética para este marcador solamente hasta que los animales de ACP hayan sido eliminados del rodeo, y se recomienda que los animales de reemplazo sean heterocigotas para el alelo **0902*. La única excepción a esta recomendación es evitar introducir alelos asociados a susceptibilidad al desarrollo de ACP, especialmente el alelo **1501*. Su presencia disminuye la penetrancia del alelo **0902* de un 80% a un 50%, y requiere un manejo especial de la descendencia, ya que el 50% de los descendientes son portadores de alelos de susceptibilidad.

Una de las principales limitaciones para la aplicación generalizada del plan de control propuesto es la baja disponibilidad de reproductores portadores del marcador de selección. Sin embargo, es factible lograr la rápida expansión de animales portadores del alelo *BoLA-DRB3*0902* por cruzamiento dirigido o inseminación artificial, ya que a nivel poblacional (y específicamente para este gen altamente polimórfico) la frecuencia del alelo **0902* es relativamente alta (3.5-9.5%) y el patrón de herencia es codominante (Juliarena *et al.*, 2008; Nikbakht Brujeni *et al.*, 2016; Carignano *et al.*, 2017; Hayashi *et al.*, 2017; Takeshima *et al.*, 2019). Por otro lado, la creciente demanda de semen de toros portadores del marcador ha comenzado

a repercutir en las empresas comercializadoras de semen, lo que probablemente incida en la oferta de reproductores con la genética deseada a nivel internacional.

CONCLUSIONES

El BLV es un virus lento y persistente. Las elevadas prevalencias de infección que se registran en varios países generan preocupación por los efectos negativos de la infección sobre la productividad y la salud de los animales, y por su potencial riesgo para la salud humana. Hasta el momento no existe ningún tratamiento o vacuna eficaz para el control del BLV. La oportunidad de controlar la infección a través del diagnóstico y eliminación de animales infectados ya no es posible para muchos países. La selección de animales resistentes, portadores del marcador *BoLA-DRB3*0902* surge como una estrategia natural para limitar la diseminación del BLV y, por ende, para el control del linfosarcoma asociado.

LITERATURA CITADA

1. **Abdala A, Alvarez I, Brossel H, Calvino L, Carignano H, Franco L, Gazon H, et al. 2019.** BLV: lessons on vaccine development. *Retrovirology* 16: 26. doi: 10.1186/s12977-019-0488-8
2. **Achachi A, Florins A, Gillet N, Debacq C, Urbain P, Foutsop GM, Vandermeers F, et al. 2005.** Valproate activates bovine leukemia virus gene expression, triggers apoptosis, and induces leukemia/lymphoma regression in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10309-10314. doi: 10.1073/pnas.0504-248102
3. **Afonso PV, Mekaouche M, Mortreux F, Toulza F, Moriceau A, Wattel E, Gessain A, et al. 2010.** Highly active antiretroviral treatment against STLV-1 infection combining reverse transcriptase and HDAC inhibitors. *Blood* 116: 3802-3808. doi: 10.1182/blood-2010-02-270751
4. **Agresti A, Ponti W, Rocchi M, Meneveri R, Marozzi A, Cavalleri D, Peri E, et al. 1993.** Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *Am J Vet Res* 54: 373-378.
5. **Alexandersen S, Carpenter S, Christensen J, Storgaard T, Viuff B, Wannemuehler Y, Belousov J, Roth JA. 1993.** Identification of alternatively spliced mRNAs encoding potential new regulatory proteins in cattle infected with bovine leukemia virus. *J Virol* 67: 39-52.
6. **Altaner C, Altanero V, Ban J, Janik V, Volejnicek V, Frajs Z, Cerny L. 1988.** Cell-derived vaccine against bovine leukaemia virus infection. *Zentralbl Veterinarmed B* 35: 736-746. doi: 10.1111/j.1439-0450.1988.tb00553.x
7. **Altaner C, Ban J, Altanero V, Burny A, Kettmann R. 1987a.** Bovine leukemia virus: isolation and characterization of nonproducer cell clones. *Neoplasma* 34: 641-652.
8. **Altaner C, Ban J, Altanero V, Cerny L. 1987b.** Experimental transmission of the bovine leukaemia virus genome by cell contact. *Folia Biol (Praha)* 33: 400-409.
9. **Altaner C, Ban J, Altanero V, Janik V. 1991.** Protective vaccination against bovine leukaemia virus infection by means of cell-derived vaccine. *Vaccine* 9: 889-895. doi: 10.1016/0264-410x(91)-90009-u
10. **Asfaw Y, Tsuduku S, Konishi M, Murakami K, Tsuboi T, Wu D, Sentsui H. 2005.** Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan. *Arch Virol* 150: 493-505. doi: 10.1007/s00705-004-0433-5
11. **Barrios CN, Rensetti DE, Revelli GR, Ceriani MC, Trabattoni E, Esteban EN, Juliarena MA. 2012.** En 2012, al norte del paralelo 34° S, el virus de la leucosis bovina infectaría más del 99% de los tambos con endemias en rodeos de carne. En: XXXII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología.

12. **Beier D, Blankenstein P, Fechner H. 1998.** Possibilities and limitations for use of the polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of bovine leukemia virus (BLV) infection in cattle. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 105: 408-412.
13. **Bendixen HJ. 1965.** Bovine enzootic leukosis. *Adv Vet Sci* 10: 129-204.
14. **Benitez OJ, Roberts JN, Norby B, Bartlett PC, Maeroff JE, Grooms DL. 2019a.** Lack of bovine leukemia virus transmission during natural breeding of cattle. *Theriogenology* 126: 187-190.
15. **Benitez OJ, Roberts JN, Norby B, Bartlett PC, Takeshima SN, Watanuki S, Aida Y, et al. 2019b.** Breeding bulls as a potential source of bovine leukemia virus transmission in beef herds. *J Am Vet Med Assoc* 254: 1335-1340.
16. **Blagitza MG, Souzaa FN, Batistaa CF, Azevedoa LFF, Sanchezb EMR, Dinizc SA, et al. 2017.** Immunological implications of bovine leukemia virus infection. *Res Vet Sci* 114: 109-116. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.03.012
17. **Brym P, Zabolewicz T, Kaminski S. 2018.** Differential expression of complement subcomponent C1qA in blood samples of healthy and BLV-infected Polish Holstein-Friesian cows. *Anim Sci Pap Rep* 36: 45-55.
18. **Buehring GC, DeLaney A, Shen H, Chu DL, Razavian N, Schwartz DA, Demkovich ZR, Bates MN. 2019.** Bovine leukemia virus discovered in human blood. *BMC Infect Dis* 19: 297. doi: 10.1186/s12879-019-3891-9
19. **Buehring GC, Shen H, Schwartz DA, Lawson JS. 2017.** Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development. *PLoS One* 12: e0179367. doi: 10.1371/journal.pone.0179367
20. **Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Jin DL, Hudes M, Block G. 2015.** Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: a case-control study. *PLoS One* 10: e0134304. doi: 10.1371/journal.pone.0134304.
21. **Burkhardt H, Rosenthal S, Wittmann W, Starick E, Scholz D, Rosenthal HA, Kluge KH. 1989.** Immunization of young cattle with gp51 of the bovine leukosis virus and the subsequent experimental infection. *Arch Exp Veterinar-med* 43: 933-942.
22. **Burridge MJ, Thurmond MC, Miller JM, Schmerr MJ, Van Der Maaten MJ. 1982.** Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period. *Can J Comp Med* 46: 270-271.
23. **Burridge MJ, Wilcox CJ, Hennemann JM. 1979.** Influence of genetic factors on the susceptibility of cattle to bovine leukemia virus infection. *Eur J Cancer* 15: 1395-1400. doi: 10.1016/0014-2964-(79)90117-8
24. **Callebaut I, Mornon JP, Burny A, Portetelle D. 1994.** The bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51 as a general model for the design of a subunit vaccine against retroviral infection: mapping of functional sites through immunological and structural data. *Leukemia* 8 (Suppl 1): 218-221.
25. **Callebaut I, Voneche V, Mager A, Fumiere O, Krchnak V, Merza M, Zavada J, et al. 1993.** Mapping of B-neutralizing and T-helper cell epitopes on the bovine leukemia virus external glycoprotein gp51. *J Virol* 67: 5321-5327.
26. **Carignano HA, Beribe MJ, Caffaro ME, Amadio A, Nani JP, Gutierrez G, Alvarez I, et al. 2017.** BOLA-DRB3 gene polymorphisms influence bovine leukaemia virus infection levels in Holstein and Holstein x Jersey crossbreed dairy cattle. *Anim Genet* 48: 420-430. doi: 10.1111/age.12566
27. **Chen WY, Townes TM. 2000.** Molecular mechanism for silencing virally transduced genes involves histone deacetylation and chromatin condensation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 :377-382. doi: 10.1073/pnas.97.1.377
28. **Cherney TM, Schultz RD. 1996.** Viral status and antibody response in cattle inoculated with recombinant bovine leukemia virus-vaccinia virus vaccines

- after challenge exposure with bovine leukemia virus-infected lymphocytes. *Am J Vet Res* 57: 812-818.
29. **Choi KY, Monke D, Stott JL. 2002.** Absence of bovine leukosis virus in semen of seropositive bulls. *J Vet Diagn Invest* 14: 403-406. doi: 10.1177/104063870201400507
 30. **Debacq C, Asquith B, Reichert M, Burny A, Kettmann R, Willems L. 2003.** Reduced cell turnover in bovine leukemia virus-infected, persistently lymphocytotic cattle. *J Virol* 77: 13073-13083. doi: 10.1128/JVI.77.24.13073-13083.2003
 31. **Depelchin A, Letesson JJ, Lostrie-Trussart N, Mammerickx M, Portetelle D, Burny A. 1989.** Bovine leukemia virus (BLV)-infected B-cells express a marker similar to the CD5 T cell marker. *Immunol Lett* 20: 69-76. doi: 10.1016/0165-2478(89)90071-0
 32. **Dietz AB, Cohen ND, Timms L, Kehrl ME, Jr. 1997.** Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 80: 406-412. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)-75951-4
 33. **Duncan RB, Jr., Scarratt WK, Buehring GC. 2005.** Detection of bovine leukemia virus by *in situ* polymerase chain reaction in tissues from a heifer diagnosed with sporadic thymic lymphosarcoma. *J Vet Diagn Invest* 17: 190-194. doi: 10.1177/104063870-501700217
 34. **Durkin K, Rosewick N, Artesi M, Hahaut V, Griebel P, Arsic N, Burny A, Georges M, et al. 2016.** Characterization of novel Bovine Leukemia Virus (BLV) antisense transcripts by deep sequencing reveals constitutive expression in tumors and transcriptional interaction with viral microRNAs. *Retrovirology* 13: 33. doi: 10.1186/s12977-016-0267-8
 35. **Dus Santos MJ, Trono K, Lager I, Wigdorovitz A. 2007.** Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. *Vet Microbiol* 119: 10-18. doi: 10.1016/j.vetmic.-2006.08.030
 36. **Eaves FW, Molloy JB, Dimmock CK, Eaves LE. 1994.** A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet Microbiol* 39: 313-321. doi: 10.1016/0378-1135(94)90167-8
 37. **[EFSA] EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). 2015.** Enzootic bovine leukosis. *EFSA J* 13(7): 63. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4188
 38. **[EMBL-EBI] European Bioinformatics Institute. n.d.** Immuno Polymorphism Database - MHC Database BoLA Nomenclature, Cattle, BoLA DRB3. [Internet]. <https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/BoLA>
 39. **Erskine RJ, Bartlett PC, Byrem TM, Render CL, Febvay C, Houseman JT. 2012.** Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci* 95: 727-734. doi: 10.3168/jds.2011-4760
 40. **Erskine RJ, Bartlett PC, Sabo KM, Sordillo LM. 2011.** Bovine Leukemia virus infection in dairy cattle: effect on serological response to immunization against J5 *Escherichia coli* bacterin. *Vet Med Int* 2011: 915747. doi: 10.4061/2011/915747
 41. **Esteban EN, Poli M, Poiesz B, Ceriani C, Dube S, Gutierrez S, Dolcini G, Gagliardi R, Perez S, et al. 2009.** Bovine leukemia virus (BLV), proposed control and eradication programs by marker assisted breeding of genetically resistant cattle. In: Rechi LJ (ed). *Animal genetics*. Hauppauge, NY, USA: Nova Science Publishers. p 107-130.
 42. **Fechner H, Kurg A, Geue L, Blankens-tein P, Mewes G, Ebner D, Beier D. 1996.** Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed B* 43: 621-630. doi: 10.1111/j.1439-0450.1996.tb00361.x

43. **Ferrer JF, Marshak RR, Abt DA, Kenyon SJ. 1978.** Persistent lymphocytosis in cattle: its cause, nature and relation to lymphosarcoma. *Ann Rech Vet* 9: 851-857.
44. **Ferrer JF, Marshak RR, Abt DA, Kenyon SJ. 1979.** Relationship between lymphosarcoma and persistent lymphocytosis in cattle: a review. *J Am Vet Med Assoc* 175: 705-708.
45. **Ferrer JF, Piper CE. 1981.** Role of colostrum and milk in the natural transmission of the bovine leukemia virus. *Cancer Res* 41: 4906-4909.
46. **Ferrer JF. 1980.** Bovine lymphosarcoma. *Adv Vet Sci Comp Med* 24: 1-68.
47. **Florins A, Gillet N, Asquith B, Boxus M, Burteau C, Twizere JC, Urbain P, et al. 2007.** Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Front Biosci* 12: 1520-1531. doi: 10.2741/2165
48. **Foil LD, Seger CL, French DD, Issel CJ, McManus JM, Ohrberg CL, Ramsey RT. 1988.** Mechanical transmission of bovine leukemia virus by horse flies (Diptera: Tabanidae). *J Med Entomol* 25: 374-376. doi: 10.1093/jmedent/25.5.374
49. **Forletti A, Juliarena MA, Ceriani C, Amadio AF, Esteban E, Gutierrez SE. 2013.** Identification of cattle carrying alleles associated with resistance and susceptibility to the Bovine Leukemia Virus progression by real-time PCR. *Res Vet Sci* 95: 991-995. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.07.018
50. **Frie MC, Coussens PM. 2015.** Bovine leukemia virus: a major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 163: 103-114. doi: 10.1016/j.vetimm.2014.11.014
51. **Frie MC, Sporer KR, Wallace JC, Maes RK, Sordillo LM, Bartlett PC, Coussens PM. 2016.** Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Vet Immunol Immunopathol* 182: 125-135. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.10.013
52. **Frie MC, Sporer KRB, Benitez OJ, Wallace JC, Droscha CJ, Bartlett PC, Coussens PM. 2017.** Dairy cows naturally infected with bovine leukemia virus exhibit abnormal B- and T-cell phenotypes after primary and secondary exposures to keyhole limpet hemocyanin. *Front Vet Sci* 4: 112. doi: 10.3389/fvets.2017.00112
53. **Fukuyama S, Kodama K, Hirahara T, Nakajima N, Takamura K, Sasaki O, Imanishi J. 1993.** Protection against bovine leukemia virus infection by use of inactivated vaccines in cattle. *J Vet Med Sci* 55: 99-106. doi: 10.1292/jvms.55.99
54. **Ghezzi PC, Dolcini GL, Gutiérrez SE, Bani PC, Torres JO, Arroyo GH, Esteban EN. 1997.** Bovine leukemia virus (BLV): prevalence in the Cuenca Lechera Mar y Sierras from 1994 to 1995. *Rev Argent Microbiol* 29: 137-146.
55. **Gillet N, Vandermeers F, de Brogniez A, Florins A, Nigro A, Francois C, Bouzar AB, et al. 2012.** Chemoresistance to valproate treatment of bovine leukemia virus-infected sheep; identification of improved HDAC inhibitors. *Pathogens* 1: 65-82. doi: 10.3390/pathogens1020065
56. **Gillet NA, Gutierrez G, Rodriguez SM, de Brogniez A, Renotte N, Alvarez I, Trono K, et al. 2013.** Massive depletion of bovine leukemia virus proviral clones located in genomic transcriptionally active sites during primary infection. *PLoS Pathog* 9: e1003687. doi: 10.1371/journal.ppat.1003687
57. **Gillet NA, Hamaidia M, de Brogniez A, Gutierrez G, Renotte N, Reichert M, Trono K, et al. 2016.** Bovine leukemia virus small noncoding RNAs are functional elements that regulate replication and contribute to oncogenesis *in vivo*. *PLoS Pathog* 12: e1005588. doi: 10.1371/journal.ppat.1005588
58. **Gillet NA, Willems L. 2016.** Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. *Retrovirology* 13: 75. doi: 10.1186/s12977-016-0308-3

59. **Gupta P, Ferrer JF. 1981.** Comparison of various serological and direct methods for the diagnosis of BLV infection in cattle. *Int J Cancer* 28: 179-184. doi: 10.1002/ijc.2910280211
60. **Gutierrez G, Rodriguez SM, de Brogniez A, Gillet N, Golime R, Burny A, Jaworski JP, et al. 2014.** Vaccination against α -retroviruses: the bovine leukemia virus paradigm. *Viruses* 6: 2416-2427. doi: 10.3390/v6062416
61. **Gutierrez SE, Dolcini GL, Arroyo GH, Rodriguez Dubra C, Ferrer JF, Esteban EN. 2001.** Development and evaluation of a highly sensitive and specific blocking enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction assay for diagnosis of bovine leukemia virus infection in cattle. *Am J Vet Res* 62: 1571-1577. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.1571
62. **Gutiérrez SE, Esteban EN, Lützelshwab CM, Juliarena MA. 2017.** Major histocompatibility complex-associated resistance to infectious diseases: the case of bovine leukemia virus infection. In: Abubakar M (ed). *Trends and advances in veterinary genetics*. InTech. p 101-126.
63. **Gutiérrez SE, Forletti A. 2016.** Bovine leukemia virus. In: Liu D (ed), editor. *Molecular detection of animal viral pathogens*. CRC Press. p 157-166.
64. **Hayashi T, Mekata H, Sekiguchi S, Kirino Y, Mitoma S, Honkawa K, Horii Y, et al. 2017.** Cattle with the BoLA class II DRB3*0902 allele have significantly lower bovine leukemia proviral loads. *J Vet Med Sci* 79: 1552-1555. doi: 10.1292/jvms.16-0601
65. **Heenemann K, Lapp S, Teifke JP, Fichtner D, Mettenleiter TC, Vahlenkamp TW. 2012.** Development of a bovine leukemia virus polymerase gene-based real-time polymerase chain reaction and comparison with an envelope gene-based assay. *J Vet Diagn Invest* 24: 649-655. doi: 10.1177/1040-638712447524
66. **Hernandez D, Montes D, Ossa-V JDL. 2018.** The proviral load of the bovine leukemia virus is associated with the polymorphisms of the BOLA-DRB3 gene in the Harton del Valle breed. *Indian J Sci Technol* 11: 1-7. doi: 10.17485/ijst/2018/v11i43/132506
67. **Hopkins SG, DiGiacomo RF. 1997.** Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13:107-128. doi: 10.1016/s0749-0720(15)30367-4
68. **Iwan E, Szczotka M, Kocki J. 2017.** Cytokine profiles of dendritic cells (DCs) during infection with bovine leukaemia virus (BLV). *Pol J Vet Sci* 20: 221-231. doi: 10.1515/pjvs-2017-0027
69. **Jacobs RM, Heeney JL, Godkin MA, Leslie KE, Taylor JA, Davies C, Valli VE. 1991.** Production and related variables in bovine leukaemia virus-infected cows. *Vet Res Commun* 15: 463-474. doi: 10.1007/BF00346546
70. **Jacobsen KL, Kaneene JB, Miller JM, Bull RW. 1985.** Comparison of the commercial agar-gel immunodiffusion test and radioimmunoprecipitation assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus. *Am J Vet Res* 46: 1430-1433.
71. **Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. 2001.** The major histocompatibility complex and its functions. In: *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5th ed. New York, USA: Garland Science.
72. **Juliarena M. 2008.** Aportes al estudio del rol del virus y del hospedador en el perfil de infección causado por el virus de la leucosis bovina. Tesis Doctoral. Argentina: Univ. Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 180 p.
73. **Juliarena MA, Barrios CN, Banni PC, Esteban EN. 2017a.** Disminución de la carga proviral del virus de la leucosis bovina (BLV) en una población bovina

- modelo. Un avance hacia la erradicación del BLV. En: 40° Congreso Argentino de Producción Animal. Córdoba, Argentina.
74. **Juliarena MA, Barrios CN, Ceriani MC, Esteban EN. 2016.** Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *J Dairy Sci* 99: 4586-4589. doi: 10.3168/jds.2015-10480
 75. **Juliarena MA, Barrios CN, Lützelshwab CM, Esteban EN, Gutiérrez SE. 2017b.** Bovine leukemia virus: current perspectives. *Virus Adaptation and treatment* 9: 13-26. doi: 10.2147/VAAT.S113947
 76. **Juliarena MA, Gutierrez SE, Ceriani C. 2007.** Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. *Am J Vet Res* 68: 1220-1225. doi: 10.2460/ajvr.68.11.1220
 77. **Juliarena MA, Poli M, Ceriani C, Sala L, Rodriguez E, Gutierrez S, Dolcini G, et al. 2009.** Antibody response against three widespread bovine viruses is not impaired in Holstein cattle carrying bovine leukocyte antigen DRB3.2 alleles associated with bovine leukemia virus resistance. *J Dairy Sci* 92:375-381. doi: 10.3168/jds.2008-1143
 78. **Juliarena MA, Poli M, Sala L, Ceriani C, Gutierrez S, Dolcini G, Rodriguez EM, et al. 2008.** Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Anim Genet* 39: 432-438. doi: 10.1111/j.1365-2052.2008.01750.x
 79. **Kabeya H, Ohashi K, Onuma M. 2001.** Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. *Vet Med Sci* 63: 703-708. doi: 10.1292/jvms.63.703
 80. **Kabeya H, Ohashi K, Oyunbileg N, Nagaoka Y, Aida Y, Sugimoto C, Yokomizo Y, et al. 1999.** Up-regulation of tumor necrosis factor alpha mRNA is associated with bovine-leukemia virus (BLV) elimination in the early phase of infection. *Vet Immunol Immunopathol* 68: 255-265. doi: 10.1016/s0165-2427(99)-00029-x
 81. **Kale M, Bulut O, Yapk O, Gulay MS, Pehlivanoglu F, Ata A, Yavru S. 2007.** Effects of subclinical bovine leukemia virus infection on some production parameters in a dairy farm in southern Turkey. *J S Afr Vet Assoc* 78: 130-132. doi: 10.4102/jsava.v78i3.303
 82. **Kerkhofs P, Heremans H, Burny A, Kettmann R, Willems L. 1998.** *In vitro* and *in vivo* oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein. *J Virol* 72: 2554-2559. doi: 10.1016/0378-1135(94)-90018-3
 83. **Klintevall K, Ballagi-Pordany A, Naslund K, Belak S. 1994.** Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet Microbiol* 42: 191-204. doi: 10.1016/0378-1135(94)90018-3
 84. **Klintevall K, Fuxler L, Fossum C. 1997.** Bovine leukemia virus: early reflections in blood after an experimental infection of calves. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 20 :119-130. doi: 10.1016/S0147-9571(96)00043-4
 85. **Klintevall K, Naslund K, Svedlund G, Hajdu L, Linde N, Klingeborn B. 1991.** Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. *J Virol Methods* 33: 319-333. doi: 10.1016/0166-0934(91)90032-u
 86. **Kobayashi S, Hidano A, Tsutsui T, Yamamoto T, Hayama Y, Nishida T, Muroga N, et al. 2014.** Analysis of risk factors associated with bovine leukemia virus seropositivity within dairy and beef breeding farms in Japan: a nationwide survey. *Res Vet Sci* 96: 47-53. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.11.014
 87. **Kobayashi S, Tsutsui T, Yamamoto T, Hayama Y, Muroga N, Konishi M, Kameyama K, et al. 2015.** The role of neighboring infected cattle in bovine leukemia virus transmission risk. *J Vet Med Sci* 77: 861-863. doi: 10.1292/jvms.15-0007

88. **Kohara J, Takeuchi M, Hirano Y, Sakurai Y, Takahashi T. 2018.** Vector control efficacy of fly nets on preventing bovine leukemia virus transmission. *J Vet Med Sci* 80: 1524-1527. doi: 10.1292/jvms.18-0199
89. **Komiyama C, Suzuki K, Miura Y, Sentsui H. 2009.** Development of loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of bovine leukemia virus infection. *J Virol Methods* 157: 175-179. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.12.015
90. **Konnai S, Usui T, Ikeda M, Kohara J, Hirata T, Okada K, Ohashi K, et al. 2006.** Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. *Microbes Infect* 8: 2163-2171. doi: 10.1016/j.micinf.2006.04.017
91. **Kuckleburg CJ, Chase CC, Nelson EA, Marras SA, Dammen MA, Christopher-Hennings J. 2003.** Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions. *J Vet Diagn Invest* 15: 72-76. doi: 10.1177/104063-8703015-00117
92. **Lassauzet ML, Thurmond MC, Johnson WO, Holmberg CA. 1991.** Factors associated with in utero or periparturient transmission of bovine leukemia virus in calves on a California dairy. *Can J Vet Res* 55: 264-268.
93. **Lehrman G, Hogue IB, Palmer S, Jennings C, Spina CA, Wiegand A, Landay AL, et al. 2005.** Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. *Lancet* 366: 549-555. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67098-
94. **Levy D, Deshayes L, Parodi AL, Levy JP, Stephenson JR, Devare SG, Gilden RV. 1977.** Bovine leukemia virus specific antibodies among French cattle. II. Radioimmunoassay with the major structural protein (BLV p24). *Int J Cancer* 20: 543-550. doi: 10.1002/ijc.2910200411
95. **Levy D, Deshayes L, Parodi AL, Levy JP. 1980.** Bovine leukemia virus-specific antibodies in French cattle. III. Prevalence of the BLV-gp 51 radioimmunoassay for the detection of BLV-infected animals. *Int J Cancer* 25: 147-152. doi: 10.1002/ijc.2910250120
96. **Lew AE, Bock RE, Molloy JB, Minchin CM, Robinson SJ, Steer P. 2004.** Sensitive and specific detection of proviral bovine leukemia virus by 5' Taq nuclease PCR using a 3' minor groove binder fluorogenic probe. *J Virol Methods* 115: 167-175. doi: 10.1016/j.jviromet.2003.09.029
97. **Lezin A, Gillet N, Olindo S, Signate A, Grandvaux N, Verlaeten O, Belrose G, et al. 2007.** Histone deacetylase mediated transcriptional activation reduces proviral loads in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *Blood* 110: 3722-3728. doi: 10.1182/blood-2007-04-085076
98. **Lützel Schwab CM, Forletti A, Cepeda R, Esteban EN, Confalonieri O, Gutiérrez SE. 2016.** Co-infection with *Mycobacterium bovis* does not alter the response to bovine leukemia virus in BoLADR3*0902, genetically resistant cattle. *Res Vet Sci* 109: 10-16. doi: 10.1016/j.rvsc.2016.09.002
99. **Mammerickx M, Portetelle D, Burny A. 1985.** The diagnosis of enzootic bovine leukosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 8: 305-309. doi: 10.1016/0147-9571(85)90009-8
100. **Mammerickx M, Portetelle D, de Clercq K, Burny A. 1987.** Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. *Leuk Res* 11: 353-358. doi: 10.1016/0145-2126(87)90180-9
101. **Mariño B, Nogues M, Iguzquiza I, Gutierrez S, Rodriguez N, Esteban EN, Occhi H. 2003.** Prevalencia de tambos infectados con el virus de la Leucosis Bovina (BLV) mediante determinación de anticuerpos en leche por el ELISA 108. *FAVE Sec Cienc Vet* 2: 117-121. doi: 10.14409/favecv.v2i2.1393

- 102. Meiroum R, Brenner J, Trainin Z. 1993.** BLV-infected lymphocytes exhibit two patterns of expression as determined by Ig and CD5 markers. *Vet Immunol Immunopathol* 36: 179-186. doi: 10.1016/0165-2427(93)90106-E
- 103. Mekata H, Sekiguchi S, Konnai S, Kirino Y, Honkawa K, Nonaka N, Horii Y, et al. 2014.** Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus. *Vet Rec* 176: 254. doi: 10.1136/vr.102464.
- 104. Miller JM, Schmerr MJ, Van Der Maaten MJ. 1981.** Comparison of four serologic tests for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. *Am J Vet Res* 42: 5-8.
- 105. Miller JM, Van Der Maaten MJ. 1977.** Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Eur J Cancer* 13: 1369-1375. doi: 10.1016/0014-2964(77)90149-9
- 106. Miller JM, Van Der Maaten MJ. 1978.** Evaluation of an inactivated bovine leukemia virus preparation as an immunogen in cattle. *Ann Rech Vet* 9: 871-877.
- 107. Mirsky ML, Da Y, Lewin HA. 1993.** Detection of bovine leukemia virus proviral DNA in individual cells. *PCR Methods Appl* 2: 333-340. doi: 10.1101/gr.2.4.333
- 108. Miyasaka T, Takeshima SN, Jimba M, Matsumoto Y, Kobayashi N, Matsushashi T, Sentsui H, et al. 2013.** Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. *Tissue Antigens* 81: 72-82. doi: 10.1111/tan.12041
- 109. Murtaugh MP, Lin GF, Haggard DL, Weber AF, Meiske JC. 1991.** Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 33: 73-85. doi: 10.1016/0166-0934(91)90009-O
- 110. Naif HM, Daniel RC, Cogle WG, Lavin MF. 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: 675-679. doi: 10.1128/JCM.30.3.675-679.1992
- 111. Nekouei O, VanLeeuwen J, Sanchez J, Kelton D, Tiwari A, Keefe G. 2015.** Herd-level risk factors for infection with bovine leukemia virus in Canadian dairy herds. *Prev Vet Med* 119: 105-113. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.02.025
- 112. Nekouei O, VanLeeuwen J, Stryhn H, Kelton D, Keefe G. 2016.** Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows. *Prev Vet Med* 133: 1-9. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.09.011
- 113. Nikbakht Brujeni G, Ghorbanpour R, Esmailnejad A. 2016.** Association of BoLA-DRB3.2 alleles with BLV infection profiles (persistent lymphocytosis/lymphosarcoma) and lymphocyte subsets in Iranian Holstein cattle. *Biochem Genet* 54: 194-207. doi: 10.1007/s10528-016-9712-6
- 114. Norby B, Bartlett PC, Byrem TM, Erskine RJ. 2016.** Effect of infection with bovine leukemia virus on milk production in Michigan dairy cows. *J Dairy Sci* 99: 2043-2052. doi: 10.3168/jds.2015-10089
- 115. Ohishi K, Kabeya H, Amanuma H, Onuma M. 1996.** Induction of bovine leukaemia virus Env-specific Th-1 type immunity in mice by vaccination with short synthesized peptide-liposome. *Vaccine* 14: 1143-1148. doi: 10.1016/0264-410x(96)00033-3
- 116. Ohishi K, Suzuki H, Yamamoto T, Maruyama T, Miki K, Ikawa Y, Numakunai S, et al. 1991.** Protective immunity against bovine leukaemia virus (BLV) induced in carrier sheep by inoculation with a vaccinia virus-BLV env recombinant: association with cell-mediated immunity. *J Gen Virol* 72: 1887-1892. doi: 10.1099/0022-1317-72-8-1887

117. **Ohishi K, Suzuki H, Yasutomi Y, Onuma M, Okada K, Numakunai S, Ohshima K, et al. 1992.** Augmentation of bovine leukemia virus (BLV)-specific lymphocyte proliferation responses in ruminants by inoculation with BLV env-recombinant vaccinia virus: their role in the suppression of BLV replication. *Microbiol Immunol* 36: 1317-1323. doi: 10.1111/j.1348-0421.1992.tb02133.x
118. **Ohshima K, Okada K, Numakunai S, Yoneyama Y, Sato S, Takahashi K. 1981.** Evidence on horizontal transmission of bovine leukemia virus due to blood-sucking tabanid flies. *Nihon Juigaku Zasshi* 43: 79-81. doi: 10.1292/jvms1939.43.79
119. **[OIE] World Organisation for Animal Health. 2018.** Enzootic bovine leukosis. OIE Terrestrial Manual. OIE. [Internet]. Available in: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.09_-EBL.pdf
120. **Okuwa Y, Miyamoto-Hayashi M, Tanaka T, Hayakawa Y, Inoshima Y. 2017.** Simple and rapid method for routine screening of bovine leukemia virus by loop-mediated isothermal amplification assay. *J Vet Med Sci* 79: 137-140. doi: 10.1292/jvms.16-0328
121. **Ooshiro M, Konnai S, Katagiri Y, Afuso M, Arakaki N, Tsuha O, Murata S, Ohashi K. 2013.** Horizontal transmission of bovine leukemia virus from lymphocytotic cattle, and beneficial effects of insect vector control. *Vet Rec* 173: 527. doi: 10.1136/vr.101833
122. **Ott SL, Johnson R, Wells SJ. 2003.** Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. *Prev Vet Med* 61 :249-262. doi: 10.1016/j.prevetmed.2003.08.003
123. **Pomier C, Alcaraz MT, Debaq C, Lancon A, Kerkhofs P, Willems L, Wattel E, et al. 2008.** Early and transient reverse transcription during primary deltaretroviral infection of sheep. *Retrovirology* 5: 16. doi: 10.1186/1742-4690-5-16
124. **Portetelle D, Mammerickx M, Burny A. 1989.** Use of two monoclonal antibodies in an ELISA test for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus envelope protein gp51. *J Virol Methods* 23: 211-222. doi: 10.1016/0166-0934-(89)90135-3
125. **Puentes R, De Brun L, Algorta A, Da Silva V, Mansilla F, Sacco G, Llambi S, et al. 2016.** Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC Vet Res* 12: 119. doi: 10.1186/s12917-016-0749-x
126. **Radostitis O, Gay C, K. H, Constable P. 2007.** Disease associated with viruses and chlamydia I. In: *Veterinary medicine*. 10th edition. Elsevier. p 1209-1221.
127. **Reichel MP, Tham KM, Barnes S, Kittelberger R. 1998.** Evaluation of alternative methods for the detection of bovine leukaemia virus in cattle. *NZ Vet J* 46: 140-146. doi: 10.1080/00480169-1998.36078
128. **Revelli GR, Sbodio OA, Tercero EJ. 2004.** Prevalencia de leucosis enzoótica bovina en la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero, Argentina. *Rev Med Vet (B Aires)* 85: 135-139.
129. **Rhodes JK, Pelzer KD, Johnson YJ. 2003.** Economic implications of bovine leukemia virus infection in mid-Atlantic dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 223: 346-352. doi: 10.2460/javma.2003.-223.346
130. **Rodriguez SM, Florins A, Gillet N, de Brogniez A, Sanchez-Alcaraz MT, Boxus M, et al. 2011.** Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses* 3: 1210-1248. doi: 10.3390/v3071210
131. **Rola M, Kuzmak J. 2002.** The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. *J Virol Methods* 99: 33-40. doi: 10.1016/s0166-0934(01)00384-6

- 132. Rola-Luszczak M, Finnegan C, Olech M, Choudhury B, Kuzmak J. 2013.** Development of an improved real time PCR for the detection of bovine leukaemia provirus nucleic acid and its use in the clarification of inconclusive serological test results. *J Virol Methods* 189: 258-264. doi: 10.1016/j.jviromet.-2013.02.014.
- 133. Romero CH, Cruz GB, Rowe CA. 1983.** Transmission of bovine leukaemia virus in milk. *Trop Anim Health Prod* 15: 215-218. doi: 10.1007/BF02242060
- 134. Romero JJ, Dávila G, Beita G, Dolz G. 2015.** Relación entre el estado serológico a leucosis bovina enzoótica y parámetros reproductivos en hatos lecheros especializados de Costa Rica. *Agron Costarricense* 39: 7-18.
- 135. Rosewick N, Durkin K, Artesi M, Marcais A, Hahaut V, Griebel P, Arsic N, et al. 2017.** Cis-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis. *Nat Commun* 8: 15264. doi: 10.1038/ncomms15264
- 136. Rupp R, Hernandez A, Mallard BA. 2007.** Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *J Dairy Sci* 90: 1029-1038. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(07)71589-8
- 137. Sajiki Y, Konnai S, Okagawa T. 2019.** Prostaglandin E(2)-induced immune exhaustion and enhancement of antiviral effects by anti-PD-L1 antibody combined with COX-2 inhibitor in bovine leukemia virus infection. *J Immunol* 203: 1313-1324. doi: 10.4049/jimmunol.-1900342
- 138. Schwingel D, Andreolla AP, Erpen LMS, Frandoloso R, Kreutz LC. 2019.** Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. *Sci Rep* 9: 2949. doi: 10.1038/s41598-019-39834-7
- 139. [SENASA] Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. 2005.** Manual de procedimientos Leucosis bovina enzoótica. Buenos Aires, Argentin: SENASA. 34 p.
- 140. Shettigara PT, Samagh BS, Lobinowich EM. 1989.** Control of bovine leukemia virus infection in dairy herds by agar gel immunodiffusion test and segregation of reactors. *Can J Vet Res* 53: 108-110.
- 141. Siegrist C-A. 2013.** Vaccine immunology. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P (eds). *Vaccines Expert consult*. 6th ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier-Saunders. p 14-34.
- 142. Sinha G. 2016.** Bovine Leukemia virus possibly linked to breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 108: djw020. doi: 10.1093/jnci/djw02
- 143. Sorge US, Lissemore K, Cantin R, Kelton DF. 2011.** Short communication: Milk ELISA status for bovine leukosis virus infection is not associated with milk production in dairy cows. *J Dairy Sci* 94: 5062-5064. doi: 10.3168/jds.2011-4339
- 144. Suh GH, Lee JC, Lee CY, Hur TY, Son DS, Ahn BS, Kim NC, Lee CG. 2005.** Establishment of a bovine leukemia virus-free dairy herd in Korea. *J Vet Sci* 6: 227-230.
- 145. Takeshima S-N, Aida Y. 2006.** Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Anim Sci J* 77:138-150. doi: 10.1111/j.1740-0929.2006.00332.x
- 146. Takeshima SN, Ohno A, Aida Y. 2019.** Bovine leukemia virus proviral load is more strongly associated with bovine major histocompatibility complex class II DRB3 polymorphism than with DQA1 polymorphism in Holstein cow in Japan. *Retrovirology* 16: 14. doi: 10.1186/s12977-019-0476-z
- 147. Tiwari A, VanLeeuwen JA, Dohoo IR, Keefe GP, Haddad JP, Tremblay R, Scott HM, et al. 2007.** Production

- effects of pathogens causing bovine leukemia, bovine viral diarrhea, paratuberculosis, and neosporosis. *J Dairy Sci* 90: 659-669. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(07)71548-5
- 148. Trono KG, Perez-Filgueira DM, Duffy S, Borca MV, Carrillo C. 2001.** Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol* 83: 235-248. doi: 10.1016/s0378-1135(01)00420-5
- 149. Vanleeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, Keefe GP, Tiwari A, Tremblay R. 2010.** Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in Canadian dairy cows. *Prev Vet Med* 94: 54-64. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.11.012
- 150. Vernau W, Jacobs RM, Valli VE, Heeney JL. 1997.** The immunophenotypic characterization of bovine lymphomas. *Vet Pathol* 34: 222-225. doi: 10.1177/030098589703400307
- 151. Vernau W, Valli VE, Dukes TW, Jacobs RM, Shoukri M, Heeney JL. 1992.** Classification of 1,198 cases of bovine lymphoma using the National Cancer Institute Working Formulation for human non-Hodgkin's lymphomas. *Vet Pathol* 29: 183-195. doi: 10.1177/030098589-202900301
- 152. Vogt VM. 1997.** Retroviral virions and genomes. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (eds). *Retroviruses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p 27-69.
- 153. Willems L, Burny A, Collete D, Dangoisse O, Dequiedt F, Gatot JS, Kerkhofs P, et al. 2000.** Genetic determinants of bovine leukemia virus pathogenesis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 1787-1795. doi: 10.1089/08892220050193326
- 154. Willems L, Heremans H, Chen G, Portetelle D, Billiau A, Burny A, Kettmann R. 1990.** Cooperation between bovine leukaemia virus transactivator protein and Haras oncogene product in cellular transformation. *EMBO J* 9: 1577-1581.
- 155. Xu A, van Eijk MJ, Park C, Lewin HA. 1993a.** Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J Immunol* 151: 6977-6985.
- 156. Yang Y, Fan W, Mao Y, Yang Z, Lu G, Zhang R, Zhang H, Szeto C, Wang C. 2016.** Bovine leukemia virus infection in cattle of China: Association with reduced milk production and increased somatic cell score. *J Dairy Sci* 99: 3688-3697. doi: 10.3168/jds.2015-10580
- 157. Zanotti M, Poli G, Ponti W, Polli M, Rocchi M, Bolzani E, Longeri M, et al. 1996.** Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Anim Genet* 27: 337-341.
- 158. Zhang R, Jiang J, Sun W, Zhang J, Huang K, Gu X, Yang Y, Xu X, Shi Y, Wang C. 2016.** Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients. *Breast Cancer Res* 18: 101. doi: 10.1186/s13058-016-0763-8