

PCR en tiempo real (qPCR): una herramienta útil en el control del virus de la leucosis bovina (BLV)

Real-time PCR (qPCR): a useful tool in the control of bovine leukosis virus (BLV)

DOI: 10.34188/bjaerv5n1-072

Recebimento dos originais: 25/11/2021

Aceitação para publicação: 03/01/2022

Marla Eliana Ladera Gómez

Lic. en Biología de la Universidad Central de Venezuela

Institución: Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN, CONICET/CICPBA/UNCPBA)

Dirección: Campus Universitario, Pje. Arroyo Seco s/n, (7000) Tandil, Pcia. de Buenos Aires, Argentina

Correo electrónico: mladera@vet.unicen.edu.ar

Pamela Anahí Lendez

Dra. en Ciencia Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA)

Institución: Laboratorio de Virología, FCV-UNCPBA, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN, CONICET/CICPBA/UNCPBA)

Dirección: Campus Universitario, Pje. Arroyo Seco s/n, (7000) Tandil, Pcia. de Buenos Aires, Argentina

Correo electrónico: palendez@vet.unicen.edu.ar

María Victoria Nieto Farias

Dra. en Ciencia Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA)

Institución: Laboratorio de Virología, FCV-UNCPBA, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN, CONICET/CICPBA/UNCPBA)

Dirección: Campus Universitario, Pje. Arroyo Seco s/n, (7000) Tandil, Pcia. de Buenos Aires, Argentina

Correo electrónico: vnieto@vet.unicen.edu.ar

María Carolina Ceriani

Dra. de la Universidad Buenos Aires, Orientación Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN-UBA)

Institución: Laboratorio de Virología, FCV-UNCPBA, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN, CONICET/CICPBA/UNCPBA)

Dirección: Campus Universitario, Pje. Arroyo Seco s/n, (7000) Tandil, Pcia. de Buenos Aires, Argentina

Correo electrónico: cceriani@vet.unicen.edu.ar

Guillermina Laura Dolcini

Dra. en Ciencia Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA)

Institución: Laboratorio de Virología, FCV-UNCPBA, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN, CONICET/CICPBA/UNCPBA)

Dirección: Campus Universitario, Pje. Arroyo Seco s/n, (7000) Tandil, Pcia. de Buenos Aires, Argentina

Correo electrónico: gdolcini@vet.unicen.edu.ar

RESUMEN

El virus de la leucosis bovina (BLV) es el agente etiológico de la leucosis enzoótica bovina (LEB), la enfermedad neoplásica más común del ganado bovino, caracterizada por presentar una expansión policlonal benigna de linfocitos B circulantes en sangre periférica durante los primeros años post-infección que puede progresar a un estado tumoral causando la muerte del animal, o mantenerse este estado pre-leucémico durante toda la vida del animal, generando una función inmunológica anormal. BLV infecta al ganado en todo el mundo, generando un impacto económico importante en la industria del ganado lechero. Desde principios de los '90, haciendo uso de técnicas hematológicas, se han clasificado los animales infectados con BLV en linfocitóticos (LP) o asintomáticos. Sin embargo, a partir de técnicas moleculares como la PCR, en las últimas décadas se han clasificado los animales infectados según su carga proviral, permitiendo distinguir dos grupos bien definidos donde todos los animales LP presentan alta carga proviral (ACPV), mientras que los animales asintomáticos pueden presentar ACPV o baja carga proviral (BCPV). Actualmente, diferentes variantes de PCR en tiempo real (qPCR) se han utilizado para determinar la carga proviral (cuantificación absoluta), así como también realizar estudios de expresión de genes involucrados en la respuesta inmune (cuantificación relativa) en los animales infectados. Haciendo uso de estas herramientas, hemos construido un perfil inmunológico de los animales de BCPV, a los que denominamos “controladores”, ya que logran controlar la infección a nivel sistémico y de glándula mamaria, siendo menos eficientes para transmitir el virus, y cuyas células presentan un estado pro-apoptótico y anti-proliferativo. Nuestros resultados sugieren que la determinación de la carga proviral del BLV por qPCR es una herramienta útil para monitorear la propagación de la infección, a ser utilizada como una medida de control eficiente y factible, reemplazando a los animales infectados que desarrollan ACPV por animales “controladores”.

Palabras clave: BLV, qPCR, carga proviral, citoquinas, control.

ABSTRACT

Bovine leukosis virus (BLV) is the etiological agent of enzootic bovine leukosis (EBL), the most common neoplastic disease of cattle, characterized by a benign polyclonal expansion of circulating B lymphocytes in peripheral blood during the early years post-infection that can progress to a tumor state causing the death of the animal or maintain this pre-leukemic state throughout the life of the animal, generating an abnormal immune function. BLV infects cattle worldwide, generating a significant economic impact on the dairy cattle industry. Since the early 1990s, using hematological techniques, BLV-infected animals have been classified as lymphocytotic (LP) or asymptomatic. However, based on molecular techniques such as PCR, infected animals have been classified according to their proviral load in recent decades, allowing two well-defined groups to be distinguished where all LP animals have a high proviral load (ACPV). In contrast, asymptomatic animals may have ACPV or low proviral load (BCPV). Currently, different variants of real-time PCR (qPCR) have been used to determine the proviral load (absolute quantification), as well as to perform genes expression studies involved in the immune response (relative quantification) in infected animals. Using these tools, we have built an immunological profile of the BCPV animals, which we call “controllers,” since they manage to control the infection at the systemic and mammary

gland level, being less efficient to transmit the virus, and whose cells present a pro-apoptotic and anti-proliferative state. Our results suggest that the determination of BLV proviral load by qPCR is an useful tool to monitor the spread of the infection, to be used as an efficient and feasible control measure, replacing infected animals that develop ACPV by “controller” animals.

Keywords: BLV, qPCR, proviral load, cytokines, control.

1 INTRODUCCIÓN

EL VIRUS Y SU RANGO DE HOSPEDADORES

El virus de la leucosis bovina (BLV) es el prototipo del género Deltaretrovirus dentro de la familia *Retroviridae*. Los viriones están envueltos por una capa lipídica derivada de la célula huésped, en la cual se insertan complejos de glicoproteínas virales de unión al receptor (gp51) y de transmembrana (gp30). En el interior presentan una cápside icosaédrica formada por la proteína p24, la cual está rodeada por una matriz proteica (p15). Hacia el interior de la cápside se encuentra el genoma viral, compuesto por dos hebras de ARN monocatenario de sentido positivo que contiene los genes característicos de los retrovirus (*gag*, *pro*, *pol*, *env*), junto a dos enzimas: la transcriptasa reversa y la integrasa, que catalizan dos pasos fundamentales en la replicación del genoma del BLV. Además, a partir de genes accesorios los Deltaretrovirus también codifican, otras proteínas reguladoras, como las proteínas Tax y Rex (Gillet et al., 2007). La proteína transactivante (Tax) juega un rol esencial en la replicación viral dado que mejora la transcripción del promotor viral vinculando sitios únicos en la región U3 del LTR (elementos de respuesta a Tax o TRE) (Durkin et al., 2016); además, interactúa con otros genes celulares participando en la oncogénesis celular. La proteína Rex facilita el transporte del ARN viral *spliced* y *unspliced* desde el núcleo hacia el citoplasma (Gillet et al., 2007; MacLachlan & Dubovi, 2011). Más recientemente se ha descubierto que además el BLV codifica para miRNA esenciales en su replicación, que regulan genes celulares e intervienen en la oncogénesis (Gillet, 2016).

El huésped natural del BLV es el bovino, tanto *Bos taurus* como *Bos indicus*; también se han reportado infecciones naturales en otras especies (búfalos de agua, carpinchos y ovejas) (del Fava et al., 2010; Meas et al., 2000; Molnár et al., 2000; Nekoei et al., 2015). Los ovinos son particularmente susceptibles a la infección experimental y han sido utilizados ampliamente como modelo de estudio de la oncopatogénesis por BLV, dado que desarrollan tumores mucho más frecuentemente y en menor tiempo que los bovinos. En otras especies también puede ser detectada una persistente respuesta de anticuerpos luego de una infección experimental, como en ciervos, conejos, ratas, cobayas, gatos, perros, monos Rhesus, chimpancés, antílopes, cerdos, cabras y búfalos (EFSA AHAW Panel, 2017; OIE, 2021).

2 LA INFECCIÓN Y SUS CONSECUENCIAS CLÍNICAS

La enfermedad se denomina leucosis enzoótica bovina (LEB) o linfosarcoma asociado al BLV y es responsable de diferentes desórdenes linfoproliferativos. El cuadro clínico se caracteriza por agrandamiento de linfonodos, pérdida de peso, emaciación; compromiso funcional según el órgano afectado (bazo, hígado, corazón, riñones, útero, ojo, piel, abomaso, vejiga, médula ósea, pulmones). Esto es consecuencia de una transformación tumoral de linfocitos B que proliferan e infiltran los distintos órganos, dando lugar a los tumores. La enfermedad tumoral es fatal en el 100% de los casos. Suele ocurrir muerte súbita por estallido de bazo (Chamizo Pestana, 2005).

El examen clínico del animal vivo generalmente arroja pocos datos ya que depende de la localización del proceso neoplásico y grado de afección de los órganos implicados. Los signos más frecuentes son: agrandamiento bilateral más o menos simétrico de los linfonodos (Chamizo Pestana, 2005) que pueden visualizarse o palpase, exoftalmia por degeneración del tejido retroocular y/o estructuras internas del ojo, así como también la presencia de deformaciones o masas tumorales subcutáneas en varias partes del cuerpo (Gatti, 2008). En la necropsia se pueden encontrar estos linfonodos aumentados de tamaño. En el pericardio suelen encontrarse formaciones de aspecto nodular blanquecinas y aurículas aumentadas de tamaño. Los riñones también suelen encontrarse aumentados de tamaño, con placas blanquecinas de distribución difusa en la cápsula renal, edema sero-sanguinolento sub-capsular y presencia de tejido anormal de color blanquecino que resultan en la atrofia del parénquima renal (Chamizo Pestana, 2005).

3 LA INFECCIÓN Y SUS CONSECUENCIAS SUBCLÍNICAS

La infección por BLV cumple con lo que en virología se conoce como fenómeno *iceberg*, donde la patología es evidente en pocos animales infectados. La mayoría de los animales infectados (aproximadamente el 60-70%) permanecen asintomáticos presentando sólo anticuerpos contra las proteínas estructurales gp51 y p24 (Gillet et al., 2007). Un 30% desarrolla linfocitosis persistente (LP), una expansión policlonal benigna de linfocitos B circulantes en sangre periférica, sin alteraciones morfológicas ni funcionales, que se mantiene durante toda la vida del animal. Este estado de linfocitosis es usualmente estable durante varios años, pero puede progresar a la fase tumoral, es por esto que algunos autores lo consideran como un estado pre-leucémico. Solo un 5-10% mueren por linfosarcoma luego de un extenso período de latencia (Florins et al., 2007; Gillet et al., 2007; Rodríguez et al., 2011). Los síntomas se aprecian mayoritariamente después de los dos años de edad siendo más frecuentes entre los 5 y 8 años (Chamizo Pestana, 2005), de allí la importancia de realizar un diagnóstico prematuro de la infección.

La mayoría de los animales infectados permanecen asintomáticos; sin embargo, se ha evidenciado que la infección por BLV tiene consecuencias negativas sobre el sistema inmune (Erskine et al., 2012; Frie & Coussens, 2015; Della Libera et al., 2015), aumentando la susceptibilidad a otros agentes etiológicos además de afectar los índices productivos y reproductivos (Bojarójc-Nosowicz & Kaczmarczyk, 2006; Rupp et al., 2007; Sandev et al., 2004; VanLeeuwen et al., 2010). Asimismo, las células del sistema inmune de los animales infectados presentan fenotipos y respuestas anormales frente a la estimulación antigénica y mitogénica *in vitro* (Frie et al., 2016), así como también una respuesta reducida a las vacunas (Erskine et al., 2011; Puentes et al., 2016). Por lo tanto, a pesar de no evidenciarse signos clínicos durante un largo período de tiempo, la infección persistente por BLV pueden generar grandes pérdidas económicas (OIE, 2021).

4 EPIDEMIOLOGÍA

La infección por BLV está mundialmente distribuida; gracias al éxito en sus campañas de control y erradicación implementadas desde los años 1960s, la infección está actualmente erradicada en 20 países, principalmente del norte y oeste de Europa y en Nueva Zelanda, y en otros países como Italia, Portugal y Australia la infección está restringida a áreas pequeñas (Chethanond, 1999; EFSA AHAW Panel, 2017).

En el territorio argentino, el BLV se encuentra ampliamente distribuido (Trono, K. G. et al., 2001), con prevalencias mayores al 80% en las cuencas lecheras (Barrios et al., 2012; Gutiérrez et al., 2012). A pesar de los intentos de inmunización, hasta la fecha no existe en el mercado una vacuna capaz de controlar esta enfermedad (Abdala et al., 2019); por consiguiente, la única manera de eliminar el virus en los rodeos es descartando los animales infectados. Esto resulta impracticable en muchos países, incluso en Argentina, debido a la alta prevalencia de la infección (Polat et al., 2017), y la ausencia de una política de resarcimiento económico para el productor que estimule el recambio de animales infectados por animales no infectados con BLV.

El costo económico generalmente se subestima debido a que los signos clínicos son vagos y la muerte por linfosarcoma/leucemia es fácilmente subdiagnosticada. Estudios realizados en EE.UU. encontraron una asociación lineal entre una mayor prevalencia de BLV y una disminución en la producción de leche a nivel de rebaño: entre 2.7% y 1% de producción de pérdida/vaca/año, por cada 10% de aumento en la prevalencia de infección por BLV (Erskine et al., 2012; Norby et al., 2016). Las pérdidas económicas se calcularon en U\$285 millones/año, considerando también los animales asintomáticos, al tener en cuenta las pérdidas reproductivas y en las tasas de natalidad (Erskine et al., 2012; Bartlett et al., 2014). Un trabajo realizado en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Argentina) en 2013 calculó pérdidas por U\$5300/animal muerto,

considerando falta de partos, reposición de terneras, producción de leche y kilos de carne vendidos para consumo (Castellano & Goizueta, 2014)

Por otro lado, los países libres de BLV han comenzado a aplicar barreras comerciales a la importación de ganado infectado, lo que tiene un gran impacto en la industria láctea (VanLeeuwen, 2005; VanLeeuwen et al., 2010).

Para que la transmisión del BLV ocurra es necesario el contacto célula-célula ya que el virión es muy inestable (Johnston et al., 1996; Igakura et al., 2003; Vonèche, 1992) y poco resistente a las influencias del medio exterior (Baruta et al., 2011). Es por esto que la transmisión ocurre fundamentalmente por el traspaso de linfocitos infectados (Marcovecchio et al., 2006). Esto significa que cualquier secreción o fluido biológico que contenga linfocitos infectados puede ser una potencial fuente de contagio (Gatti, 2008; Trono, 2011). Se ha reportado transmisión vertical, la cual incluye transmisión transplacentaria (Andoh et al., 2020), periparto (en el canal de parto) y postparto (vía lactógena, que es la principal para BLV) (Hopkins & DiGiacomo, 1997; Marcovecchio et al., 2006). La transmisión horizontal es la más importante y la que produce el mayor número de infectados (Trono et al., 2001). Esta ocurre por contacto directo entre un animal infectado y uno susceptible (Kono et al., 1983), la cual puede darse por transmisión mecánica a través de vectores hematófagos (Gatti, 2008; Gillet et al., 2007), transmisión directa por secreciones, y transmisión iatrogénica, siendo esta última la principal vía de transmisión del BLV (Gatti, 2008). Esto explica por qué los bovinos más afectados son los de tambo: el hacinamiento de los animales en las salas de ordeño, el descorne, el tacto y las vacunaciones sin desinfección del material utilizado y toda práctica que se desarrolle sin tomar las medidas higiénico-sanitarias correspondientes son una importante forma de diseminación de la enfermedad (Gatti, 2008; Hopkins & DiGiacomo, 1997; Monti, 2005; Toma et al., 1990).

5 PATOGENIA

El BLV infecta principalmente linfocitos B $CD5^+IgM^+CD11^+$. Ingresa a la célula huésped por fusión de la gp51 con el receptor celular, luego en el citoplasma celular el virión se decapsida (De Brogniez et al., 2016; Tajima et al., 1998), y a partir del ARN viral la transcriptasa reversa sintetiza, una copia de ADN complementario el cual es transportado al núcleo e integrado por la integrasa p80 al genoma del huésped, bajo la forma de provirus (Kettmann et al., 1982; Masuda et al., 1998). El provirus está integrado al azar en el genoma celular (Miyasaka et al., 2015; Murakami et al., 2011); pero se ha observado una preferencia a integrarse en los intrones aleatoriamente; ubicarse en estas regiones sugeriría una relación con la supresión a la expresión de los genes virales, favoreciendo la evasión del sistema inmune del huésped (Murakami et al., 2011).

Inmediatamente después de la integración del genoma viral al genoma de la célula huésped, la expresión genética y la producción de viriones maduros se activa siendo posible detectar una viremia pasajera que dura entre 10 a 12 días post-infección (Schwartz & Lévy, 1994). Al mismo tiempo, se produce una expansión policlonal de linfocitos, donde menos del 5% de ellos son portadores de 1 a 2 copias del provirus (Kettmann et al., 1980). Dentro de las 8 semanas posteriores a la infección aparece una respuesta inmune humoral contra las proteínas virales gp51 y p24, y una respuesta inmune citotóxica para los epítopes *Tax* y *Env* en sangre periférica (Florins et al., 2007). A partir de este momento ya no es posible detectar viriones activos en los animales infectados. La respuesta inmune persiste y se amplifica durante toda la vida del animal indicando que el sistema inmune es estimulado permanentemente por el virus (Gillet et al., 2007). Se sabe que existe supresión de la expresión viral efectiva en una proporción de las células por actividad humoral y citotóxica eliminando aquellas células donde hay transcripción viral activa, lo que permite una expansión mitótica sólo de las células que portan el provirus (Florins et al., 2007). El resultado final de esta presión de selección del sistema inmune sería que sólo aquellas células en las que el virus se encuentra silenciado transcripcionalmente sobreviven y acumulan, llevando a una LP; mientras que las que expresan genes virales serían eliminadas y mantendrían estimulado al sistema inmune del animal durante toda su vida. Existe entonces una interacción dinámica entre BLV y la respuesta inmune del huésped: un equilibrio complejo entre la expresión viral que conduce o favorece la proliferación y el silenciamiento viral que evita la apoptosis.

6 DIAGNÓSTICO

Después de su infección, la expresión de BLV en el ganado se bloquea a nivel transcripcional durante el período de latencia (Tajima & Aida, 2005). Las proteínas virales gp51 y p24, son responsables de la antigenicidad de la partícula viral durante este período (Gillet et al., 2007), por lo tanto, el diagnóstico de rutina de la infección por BLV se realiza mediante la determinación de anticuerpos fundamentalmente contra la gp51 ya que aparecen más temprano en la infección. El método más ampliamente utilizado es la inmunodifusión en gel de agar (IDGA) debido a su especificidad, sensibilidad suficiente y sencilla realización; se estima que logra detectar anticuerpos de 3 a 12 semanas post-infección. Además, el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) se ha utilizado más recientemente dada su mayor sensibilidad (detección de anticuerpos de 2 a 3 semanas post-infección) y su capacidad para usarse con otro tipo de muestras como en leche, siendo adaptada para pool de muestras (testeo en el tanque de leche, hasta de 100 vacas) (EFSA AHAW Panel, 2017). Debido a estas características, gradualmente ha reemplazado a la IDGA. En Argentina,

el Servicio de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria (SENASA) ha aprobado ambos métodos serológicos para la lucha contra la infección por BLV (SENASA, 2005).

Si bien los métodos serológicos son los más adecuados para exámenes de detección a gran escala, no pueden identificar a las vacas infectadas antes del inicio de la formación de anticuerpos y no pueden distinguir entre los anticuerpos calostrales y los anticuerpos generados en respuesta a la infección por BLV (OIE, 2021). Debido a que el provirus BLV permanece integrado en los genomas celulares (Kettmann et al., 1982), incluso en ausencia de viremia y/o anticuerpos BLV detectables, las técnicas basadas en métodos de amplificación del ADN, a saber, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han ido en auge, ya que permiten la detección directa del genoma del BLV integrado dentro del genoma del huésped. La prueba de PCR amplía las posibilidades de diagnóstico al permitir: detectar infecciones tempranas en determinados animales (transmisión vertical en terneros recién nacidos o con anticuerpos calostrales, o nuevas infecciones antes del desarrollo de anticuerpos), verificar resultados de pruebas serológicas no concluyentes (resultados positivos débiles o inciertos), determinar la presencia del genoma viral en linfomas o tejidos tumorales para confirmar/descartar el diagnóstico presuntivo de LBE o frente a casos sospechosos en medias reses provenientes de mataderos, además permite certificar el estado de libres de BLV en bovinos antes de su introducción en centros de inseminación artificial o en ensayos de producción de vacunas (EFSA AHAW Panel, 2017; OIE, 2021).

7 VENTAJAS DE LA QPCR FRENTE A OTRAS VARIANTES

La PCR cuantitativa (qPCR) es un método revolucionario basado en la PCR convencional desarrollada por Kary Mullis en los años 80 que permite detectar ADN/ADNc a partir de pequeñas cantidades, amplificándolas hasta más de un billón de veces (Mullis 1990).

Esta técnica combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia (fluoróforo) (Brechtbuehl, 2001). Presenta ventajas importantes frente a la PCR convencional como son: reproducibilidad, alta especificidad, detección de productos inespecíficos a partir de un software provisto por el equipo, mediante la gráfica de la curva de disociación o curva de *melting* (Tamay de Dios L et al., 2013), amplio rango de detección (Brechtbuehl K. et al., 2001; Wong & Medrano, 2005) y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior, evitando la contaminación con amplicones. Además, su alta sensibilidad permite detectar diferencias de una sola copia de ADN (Wong & Medrano, 2005).

Existen dos tipos de cuantificaciones: a) la cuantificación absoluta mediante qPCR permite determinar el número exacto de moléculas de ADN o ARN en una muestra y se utiliza para

determinar carga virales, o presencia o ausencia de secuencias de ácidos nucleicos específicas de agentes patógenos y transgénicos; y b) la cuantificación relativa mediante PCR con transcripción reversa cuantitativa (RT-qPCR) utilizada principalmente para los ensayos de expresión génica, en los que se mide los cambios en el estado basal de un gen de interés *versus* un gen endógeno o *housekeeping*, por ejemplo: genes de expresión constitutiva, genes del ARN ribosomal (Spanakis, 1993), ARN total (Bustin, 2000) o ARNm múltiples (Pfaffl, 2004).

La estandarización y aplicación de estas técnicas implican una comprensión clara de las muchas opciones disponibles (Wong & Medrano, 2005) así como también la disponibilidad de recursos técnicos, de costosos equipamientos y reactivos. La elección de los genes endógenos también constituye un punto crítico en la utilización de esta metodología (Bustin et al., 2009). Sin embargo, las ventajas descritas previamente que ofrece esta técnica frente a las demás, sumado a la posibilidad de desarrollo y aplicación de nuevos protocolos experimentales, más precisos, confiables y reproducibles hacen de esta metodología uno de los métodos de cuantificación más utilizados.

8 USO DE PCR EN ESTUDIOS DE SEGUIMIENTO DE ANIMALES INFECTADOS

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de la enfermedad varía entre los bovinos infectados por BLV y se ajusta al fenómeno *iceberg* de las infecciones, como consecuencia de la interacción dinámica entre el virus y el sistema inmune. A fin de dilucidar el potencial de transmisión del BLV en animales linfocitóticos, en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), en colaboración con establecimientos lecheros de diferentes cuencas lecheras de Argentina, se llevaron a cabo estudios de respuesta inmune humoral mediante ELISA y carga proviral (CPV) mediante PCR convencional semicuantitativa, diferenciando dos perfiles de infección (Juliarena et al., 2007). Un perfil característico de los animales LP, los cuales presentan una fuerte respuesta inmune contra dos proteínas estructurales de la cápside y la envoltura viral, la p24 y la gp51 respectivamente, y un número de copias de provirus integrado por ug de ADN mayor a 100.000; estos animales constituyen el perfil de alta carga proviral (ACPV). Por otro lado, se caracterizó el perfil de animales con baja carga proviral (BCPV), con exiguo número de linfocitos infectados en sangre periférica, una carga proviral prácticamente indetectable (menor a 100 copias de provirus integrado por ug de ADN) y un bajo título de anticuerpos contra gp51 y p24. Lo llamativo fue que dentro del grupo de animales no LP, se pudieron identificar dos subgrupos: un 40% de los bovinos presentaron perfil de ACPV y un 60% de BCPV. En conclusión, el perfil de BCPV representa el 15-25% de los animales infectados y son siempre asintomáticos; mientras que

el perfil de ACPV está compuesto por un 60% de animales hematológicamente normales y todos los animales que desarrollan LP y/o linfossarcoma.

9 ESTANDARIZACIÓN DE UNA QPCR: NUESTRA HERRAMIENTA MÁS ÚTIL

El uso de la PCR para determinar la carga proviral es crucial para clasificar a los animales dentro de un establecimiento lechero de acuerdo con el riesgo de transmisión y a su pronóstico. En el laboratorio hemos estandarizado y perfeccionado en los últimos años esta herramienta útil para detectar la CPV, utilizando el método de cuantificación absoluta por qPCR (Farias et al., 2016). Para ello se construyó una curva estándar, utilizando un plásmido que lleva integrada una copia del genoma completo de BLV bajo el control de su propio promotor LTR (gentilmente cedido por la Dra. Buehring, UCLA, Berkeley, USA). Para la obtención del plásmido se transformaron las bacterias TOPO10 con el plásmido y luego se purificó y cuantificó la concentración de ADN plasmídico. Posteriormente, se realizó una curva estándar de 6 diluciones (por triplicado) en base 10 con un rango dinámico de 1×10^6 a 10 copias de BLV, incluyendo un control sin templado en cada experimento. Se amplificó el gen *pol* del BLV, ya que es una región altamente conservada, y los *primers* utilizados para la amplificación se diseñaron sobre la base de datos de secuencias ya publicadas, disponibles en el *GenBank*, utilizando el programa *Primer Express*®.

Para validar este tipo de reacciones, se debe tener en cuenta: (I) la pendiente de la recta de amplificación (*slope*) la cual debe estar entre -3.58 y -3.10, siendo óptima una pendiente de -3.3 y (II) el coeficiente de correlación (R^2) que refleja la linealidad de la curva e indica cuán bien los datos se ajustan a la misma. La eficiencia se calcula a partir de la pendiente de la curva estándar, de acuerdo a la ecuación de Pfaffl $E=10^{[-1/slope]}$ (Pfaffl, 2001).

De acuerdo a la pendiente de la curva estándar (pendiente típica -3,376 y un $R^2 = 0,974$), se calcularon las eficiencias de las reacciones las cuales oscilaron entre 99,1 y 99,8 % (Farias et al., 2016).

Utilizando esta qPCR, analizamos la carga proviral en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y las células somáticas (CS) de la leche (Ladera et al., en preparación) de los animales positivos para BLV. Se clasificaron como de ACPV cuando poseían más de 1000 copias de BLV por reacción de 30 ng de ADN, y de BCPV cuando presentaban menos de 100 copias de BLV por reacción de 30 ng de ADN (Farias et al., 2016). En nuestra experiencia, trabajando con diferentes rodeos lecheros durante más de 10 años, el perfil de ACPV y BCPV de un animal está bien definido; si algún animal presenta una carga proviral entre 100 y 1000 copias, generalmente es circunstancial y se debe volver a analizar en un muestreo posterior. Por eso, es importante destacar

que la carga proviral se debe evaluar al menos 2 veces con un intervalo de 6 meses, antes de clasificar cada animal en uno u otro grupo (Juliarena et al., 2007).

En la literatura se describen diferentes maneras de medir y expresar la carga proviral por qPCR (Sajiki et al., 2017; Benitez et al., 2019; Mekata et al., 2018; Ruggiero, 2019; Kobayashi et al., 2019). A pesar de las diferencias en las metodologías, parece claro que los animales que portan menos cantidad de provirus son menos susceptibles de infectar a otros animales (Kuczewski et al., 2021; Lohr et al., 2022).

10 CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE LAS PBMC PROVENIENTES DE ANIMALES CON DISTINTOS PERFILES DE INFECCIÓN UTILIZANDO LA TÉCNICA DE QPCR

Varios estudios han demostrado que la infección por BLV conduce a una alteración en la producción de citoquinas, la proliferación de células inmunes y la apoptosis, evidenciada en animales linfocíticos (Debacq et al., 2003); esta función anormal del sistema inmune se ha asociado con una mayor susceptibilidad al desarrollo de otras enfermedades infecciosas (Frie & Coussens, 2015). En nuestro laboratorio hemos llevado a cabo diferentes estudios con el fin de caracterizar inmunológicamente a los animales con distintos perfiles de infección. Por un lado, encontramos que los animales de BCPV presentaron bajo porcentaje de células B, mayor porcentaje de linfocitos T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺, mayor apoptosis temprana y tardía de los linfocitos B (CD21⁺) CD11⁺CD5⁺ y menor viabilidad en comparación a los animales de ACPV (Nieto Farias et al., 2018).

Por otro lado, caracterizamos el perfil de expresión de citoquinas en los animales infectados. Para ello estandarizamos una RT-qPCR para la cuantificación relativa de genes de algunas citoquinas. Encontramos que las PBMC de los animales infectados con BLV expresaban niveles significativamente mayores de ARNm de interleuquina (IL)-12 respecto a los animales no infectados; esta citoquina es fundamental para la inducción de la respuesta de tipo T-helper 1 (Th1). Al analizar las células provenientes de animales con ambos perfiles de infección, se evidenció que no había diferencias significativas en la expresión de IL-12; sin embargo, los animales con BCPV mostraron una expresión significativamente mayor de interferón-gamma (IFN- γ), citoquina Th1 clave en la respuesta celular antiviral (Farias et al., 2016).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), citoquina fundamental en la respuesta de los animales frente a las infecciones virales, junto a sus receptores TNFR1 y TNFR2 integran un complejo sistema en el cual las señales apoptóticas y anti-apoptóticas activadas por el TNF- α determinan si la salida final será la muerte (involucrado fundamentalmente TNFR1) o la supervivencia/proliferación celular (involucrado fundamentalmente TNFR2) (Cabal-Hierro &

Lazo, 2012). Es importante tener en cuenta que los TNFRs pueden actuar independiente o en forma cooperativa, dependiendo de las concentraciones del ligando, el tipo de ligando (de membrana o soluble) y la cantidad de señales apoptóticas y anti-apoptóticas; vale decir, entonces, que se trata de un delicado equilibrio entre ambos receptores y los factores influyentes que hacen que el destino final de la célula sea la muerte o la proliferación. Utilizando la cuantificación relativa por RT-qPCR, se evidenció que las PBMC de los animales con BCPV presentaban una menor expresión de ARNm de TNF- α y una mayor expresión ARNm de TNFRI respecto al grupo no infectado; mientras que los animales de ACPV presentaban una disminución significativa en la expresión de ARNm de TNF- α y TNFRII respecto al mismo grupo (Lendez et al., 2021).

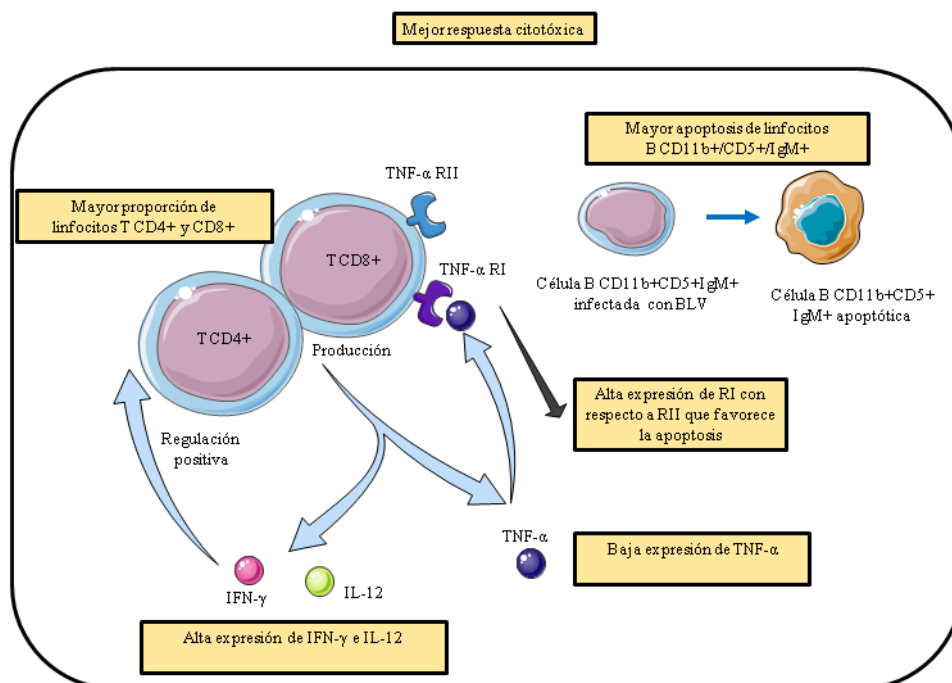
Es importante tener en cuenta que la respuesta inmune puede verse alterada por diferentes factores, principalmente en animales de alta producción lechera. Se ha demostrado que el estrés por calor inhibe la expresión de genes involucrados en la activación de células T, influyendo en el equilibrio de células de perfil Th1/Th2 y la producción de citoquinas (Caroprese et al., 2012; Elenkov et al., 2000; Park et al., 2005). En concordancia con estudios realizados por do Amaral y colaboradores, hemos observado que el estrés por calor afecta el patrón de expresión de TNF- α y sus receptores en vacas lecheras de alta producción residentes en una región caracterizada por una extrema estacionalidad climática, disminuyendo la expresión de ARNm de dichos mediadores en animales expuestos a Índices de Temperatura y Humedad (ITH) mayores a 68 (do Amaral et al., 2010; Lendez et al., 2021). Resultados preliminares de nuestro grupo de investigación han demostrado que el estrés por calor afecta la expresión del TNF- α y sus receptores en animales infectados por BLV, pero de una manera diferentes según el perfil de infección de dichos animales, y apoyan la hipótesis de que aquellos que desarrollan ACPV presentan una alteración en su homeostasis lo cual se traduce en una deficiencia de su sistema inmune (Lendez et al., en preparación).

Los resultados aquí presentados constituyen un aporte más para la comprensión de la patogénesis de la LEB y de la dinámica viral de un agente etiológico que ocasiona importantes pérdidas económicas. La infección por BLV evoluciona de manera diferente según las características del huésped, el desarrollo de uno u otro perfil de infección depende de variables genéticas, epigenéticas, inmunológicas y virales, ensayos preliminares proponen al estrés por calor como una nueva variable que podría influir en el progreso de la infección y, en consecuencia, de la enfermedad.

Las técnicas de qPCR estandarizadas y perfeccionadas en nuestro laboratorio nos han permitido determinar el número exacto de copias de provirus integrado en el ADN de las PBMC, incluso en aquellos animales en los cuales dicho número era mínimo (10 copias). Esto constituye

un importante avance en la caracterización de los animales infectados con el BLV frente a las técnicas aplicadas con anterioridad. Por otra parte, la cuantificación relativa de ARNm por RT-qPCR han permitido profundizar el estudio del sistema inmune de estos animales; nuestros estudios indican que los animales que desarrollan BCPV son más eficientes para controlar la infección por BLV ya que sus PBMC mantienen un estado pro-apoptótico y anti-proliferativo (Farias et al., 2016; Lendez, 2020; Nieto Farias et al., 2018; Lendez et al., en preparación), junto con una mayor expresión de citoquinas del perfil Th1, logrando mantener un sistema inmune competente, es por ello que a estos animales los llamamos “controladores” (Figura 1).

Figura 1. Representación esquemática de la respuesta inmune frente al BLV en los animales “controladores” de la infección.



11 CARGA PROVIRAL EN GLÁNDULA MAMARIA

Por último, algunos autores relacionan a la infección con BLV con una mayor susceptibilidad a desarrollar mastitis (Motton & Buehring, 2003; Sandev et al., 2004; Martínez Cuesta et al., 2018). Por lo tanto, nos propusimos realizar determinaciones de carga proviral mediante qPCR a partir del ADN obtenido de las CS de la glándula mamaria bovina. En las CS de todos los animales infectados con BLV evaluados se detectó el genoma viral, aunque con menor carga proviral en ese órgano y sin correlación con la detectada en sangre periférica. Además, se realizaron estudios preliminares de expresión de citoquinas y se observó una menor expresión de IL-6 e IL-10 en glándula mamaria en los animales infectados. Esto implicaría una reducida respuesta de tipo Th2 frente al virus en este compartimento (Ladera et al., en preparación).

12 USO DE LA QPCR PARA EL CONTROL DEL BLV

En regiones o países con bajas prevalencias de infección, las medidas de control oficiales del BLV incluyen el monitoreo continuo, la supervisión en el ingreso y egreso de animales en las fronteras, el control de los movimientos dentro del país y la detección y eliminación de animales positivos (Rhodes et al., 2003; SENASA, 2005; OIE, 2021). Sin embargo, tanto en nuestro país como en otros, con altas prevalencias de infección, este tipo de prácticas no son factibles debido a los costos elevados, a las dificultades para su gestión logística y la falta de resarcimiento económico para los productores. Se han evaluado y se están ensayando modelos de vacunas contra el BLV, pero aún no existe una vacuna comercial disponible (Gutiérrez et al., 2014; Abdala et al., 2019).

Numerosos estudios sugieren que los animales con ACPV representan un mayor riesgo para la transmisión tanto horizontal como vertical (Gutiérrez et al., 2014; Hopkins & DiGiacomo, 1997; Juliarena et al., 2007). Por lo tanto, cuantificar la carga proviral del BLV en diferentes tipos de muestras es primordial a fin de poder identificar las mayores fuentes de infección en un rodeo. Actualmente, cada vez más grupos de investigación enfocan sus esfuerzos en emplear y/o desarrollar nuevas variantes de la técnica de qPCR para detectar el genoma proviral a partir de diferentes tipos celulares obteniendo resultados altamente sensibles, específicos y eficientes tanto para realizar cuantificaciones absolutas o cuantificaciones relativas en muestras difíciles de purificar o con bajas concentraciones de material genético viral, como son muestras de saliva, secreciones nasales y leche (Jaworski et al., 2016; Watanabe et al., 2019; Watanuki et al., 2019; Yuan et al., 2015). Por lo tanto, la qPCR es una técnica altamente sensible y útil para detectar y cuantificar el genoma proviral de los BLV endémicos en diferentes países, siendo una herramienta disponible en diferentes regiones para hacer seguimiento de los animales infectados y controlar la diseminación de la infección en rodeos sanos.

Por otro lado, los resultados que hemos obtenido haciendo uso de cuantificaciones absolutas y relativas mediante qPCR permitieron consolidar la idea de que los animales de ACPV tienen una respuesta antiviral menos eficiente, mientras que los animales con BCPV poseen una respuesta más eficaz capaz de controlar al BLV mediante mecanismos de inmunidad celular, y además son menos eficientes para transmitir el virus.

Por lo tanto, en vista de todas las alteraciones que sufre el animal desde el punto de vista inmunológico, sugerimos como una medida de control del BLV más eficiente y factible, determinar la carga proviral y reemplazar a los animales infectados que desarrollan ACPV por animales “controladores”.

REFERENCIAS

- Abdala, A., Alvarez, I., Brossel, H., Calvinho, L., Carignano, H., Franco, L., Gazon, H., Gillissen, C., Hamaidia, M., Hoyos, C., Jacques, J. R., Joris, T., Laval, F., Petersen, M., Porquet, F., Porta, N., Ruiz, V., Safari, R., Suárez Archilla, G., Trono, K., & Willems, L. (2019). BLV: lessons on vaccine development. *Retrovirology*, 16(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0488-8>
- do Amaral, B. C., Connor, E. E., Tao, S., Hayen, J., Bubolz, J., & Dahl, G. E. (2010). Heat stress abatement during the dry period influences prolactin signaling in lymphocytes. *Domestic animal endocrinology*, 38(1), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2009.07.005>
- Andoh, K., Nishimori, A., Sakumoto, R., Hayashi, K. G., & Hatama, S. (2020). The chemokines CCL2 and CXCL10 produced by bovine endometrial epithelial cells induce migration of bovine B lymphocytes, contributing to transuterine transmission of BLV infection. *Veterinary microbiology*, 242, 108598. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108598>
- Bartlett, P. C., Sordillo, L. M., Byrem, T. M., Norby, B., Grooms, D. L., Swenson, C. L., Zalucha, J., & Erskine, R. J. (2014). Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244(8), 914–922. <https://doi.org/10.2460/javma.244.8.914>
- Barrios, C., Rensetti, D., Revelli, G., Ceriani, C., Trabattoni, E., Esteban, E. N., & Juliarena, M. A. (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. Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología - Asociación Argentina de Microbiología.
- Benitez, O. J., Roberts, J. N., Norby, B., Bartlett, P. C., Takeshima, S. N., Watanuki, S., Aida, Y., & Grooms, D. L. (2019). Breeding bulls as a potential source of bovine leukemia virus transmission in beef herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 254(11), 1335–1340. <https://doi.org/10.2460/javma.254.11.1335>
- Bojarojć-Nosowicz, B., & Kaczmarczyk, E. (2006). Somatic cell count and chemical composition of milk in naturally BLV-infected cows with different phenotypes of blood leukocyte acid phosphatase. *Archiv fur Tierzucht*, 49:17–28.
- Brechtbuehl, K., Whalley, S. A., Dusheiko, G. M., & Saunders, N. A. (2001). A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *Journal of virological methods*, 93(1-2), 105–113. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(01\)00260-9](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(01)00260-9)
- de Brogniez, A., Mast, J., & Willems, L. (2016). Determinants of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoproteins Involved in Infectivity, Replication and Pathogenesis. *Viruses*, 8(4), 88. <https://doi.org/10.3390/v8040088>
- Bustin S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25(2), 169–193. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cabal-Hierro, L., & Lazo, P. S. (2012). Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cellular signalling*, 24(6), 1297–1305. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.02.006>

Caroprese, M., Albenzio, M., Bruno, A., Annicchiarico, G., Marino, R., & Sevi, A. (2012). Effects of shade and flaxseed supplementation on the welfare of lactating ewes under high ambient temperatures. *Small Rumin. Res.* 102, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.07.010>

Castellano, A. & Goizueta, M. (2014). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Valor agregado Institucional: Captación de valor económico de innovaciones tecnológicas. *Asociación Argentina de Economía Agraria*. <https://inta.gov.ar/documentos/201cvalor-agregado-institucional-captacion-de-valor-economico-de-innovaciones-tecnologicas201d>

Chamizo Pestana E. G. (2005). Leucosis Bovina Enzoótica: Revisión. *REDVET. Rev. Electrónica Vet.* VI, 1–25. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63612652016>

Chethanond. (1999). Tesis Doctoral. The epidemiology of enzootic bovine leukosis in dairy cattle in New Zealand. [The epidemiology of enzootic bovine leukosis in dairy cattle in New Zealand].

Debacq, C., Asquith, B., Reichert, M., Burny, A., Kettmann, R., & Willems, L. (2003). Reduced cell turnover in bovine leukemia virus-infected, persistently lymphocytotic cattle. *Journal of virology*, 77(24), 13073–13083. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.24.13073-13083.2003>

Della Libera, A. M., de Souza, F. N., Batista, C. F., Santos, B. P., de Azevedo, L. F., Sanchez, E. M., Diniz, S. A., Silva, M. X., Haddad, J. P., & Blagitz, M. G. (2015). Effects of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. *Veterinary research*, 46(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0125-4>

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). (2007). Assessment of listing and categorisation of animal diseases within the framework of the Animal Health Law (Regulation (EU) No 2016/429): enzootic bovine leukosis (EBL). *EFSA Journal. European Food Safety Authority*, 15(8), 4956. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4956>

Elenkov, I. J., Chrousos, G. P., & Wilder, R. L. (2000). Neuroendocrine regulation of IL-12 and TNF-alpha/IL-10 balance. Clinical implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917, 94–105. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05374.x>

Erskine, R. J., Bartlett, P. C., Byrem, T. M., Render, C. L., Febvay, C., & Houseman, J. T. (2012). Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *Journal of dairy science*, 95(2), 727–734. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4760>

Erskine, R. J., Corl, C. M., Gandy, J. C., & Sordillo, L. M. (2011). Effect of infection with bovine leukosis virus on lymphocyte proliferation and apoptosis in dairy cattle. *American journal of veterinary research*, 72(8), 1059–1064. <https://doi.org/10.2460/ajvr.72.8.1059>

Farias, M., Lendez, P. A., Marin, M., Quintana, S., Martínez-Cuesta, L., Ceriani, M. C., & Dolcini, G. L. (2016). Toll-like receptors, IFN- γ and IL-12 expression in bovine leukemia virus-infected animals with low or high proviral load. *Research in veterinary science*, 107, 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.06.016>

del Fava, C., Basílio, M. de L. F., de Donato, T. M., Ribeiro, C. P., Okuda, L. H., de Stefano, E., & Pituco, E. M. (2010). Ocorrência de ovinos (*Ovis aries*) soropositivos ao vírus da leucemia bovina no Brasil. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 47, 483–487. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2010.26811>

Florins, A., Gillet, N., Asquith, B., Boxus, M., Burteau, C., Twizere, J. C., Urbain, P., Vandermeers, F., Debacq, C., Sanchez-Alcaraz, M. T., Schwartz-Cornil, I., Kerkhofs, P., Jean, G., Théwis, A., Hay, J., Mortreux, F., Wattel, E., Reichert, M., Burny, A., Kettmann, R., & Willems, L. (2007). Cell

dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 12, 1520–1531. <https://doi.org/10.2741/2165>

Frie, M. C., & Coussens, P. M. (2015). Bovine leukemia virus: a major silent threat to proper immune responses in cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*, 163(3-4), 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.014>

Frie, M. C., Sporer, K. R., Wallace, J. C., Maes, R. K., Sordillo, L. M., Bartlett, P. C., & Coussens, P. M. (2016). Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Veterinary immunology and immunopathology*, 182, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.10.013>

Gatti Assandri, M. (2008). Leucosis Bovina: Enfermedad de gran importancia y limitante para la exportación de ganado en pie. Artículo N°67, disponible en Sitio Argentino de Producción Animal-Producción bovina de leche-Sanidad, intoxicaciones, enfermedades metabólicas-Enfermedades infecciosas de los bovinos en general. <https://www.producción-animal.com.ar/>

Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burteau, C., Nigro, A., Vandermeers, F., Balon, H., Bouzar, A. B., Defoiche, J., Burny, A., Reichert, M., Kettmann, R., & Willems, L. (2007). Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, 4, 18. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-18>

Gillet, N. A., & Willems, L. (2016). Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. *Retrovirology*, 13(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0308-3>

Gutiérrez, G., Alvarez, I., Merlini, R., Rondelli, F., & Trono, K. (2014). Dynamics of perinatal bovine leukemia virus infection. *BMC veterinary research*, 10, 82. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-82>

Gutiérrez, G., Carignano, H., Alvarez, I., Martínez, C., Porta, N., Politzki, R., Gammella, M., Lomonaco, M., Fondevila, N., Poli, M., & Trono, K. (2012). Bovine leukemia virus p24 antibodies reflect blood proviral load. *BMC veterinary research*, 8, 187. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-187>

Hopkins, S. G., & DiGiacomo, R. F. (1997). Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 13(1), 107–128. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30367-4](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30367-4)

Igakura, T., Stinchcombe, J. C., Goon, P. K., Taylor, G. P., Weber, J. N., Griffiths, G. M., Tanaka, Y., Osame, M., & Bangham, C. R. (2003). Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5613), 1713–1716. <https://doi.org/10.1126/science.1080115>

Jaworski, J. P., Porta, N. G., Gutiérrez, G., Politzki, R. P., Álvarez, I., Galarza, R., Abdala, A., Calvino, L., & Trono, K. G. (2016). Short communication: Relationship between the level of bovine leukemia virus antibody and provirus in blood and milk of cows from a naturally infected herd. *Journal of dairy science*, 99(7), 5629–5634. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10813>

Johnston, E. R., Powers, M. A., Kidd, L. C., & Radke, K. (1996). Peripheral blood mononuclear cells from sheep infected with a variant of bovine leukemia virus synthesize envelope glycoproteins but fail to induce syncytia in culture. *Journal of virology*, 70(9), 6296–6303. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.9.6296-6303.1996>

Juliarena, M. A., Gutiérrez, S. E., & Ceriani, C. (2007). Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. *American journal of veterinary research*, 68(11), 1220–1225. <https://doi.org/10.2460/ajvr.68.11.1220>

Kettmann, R., Deschamps, J., Cleuter, Y., Couez, D., Burny, A., & Marbaix, G. (1982). Leukemogenesis by bovine leukemia virus: proviral DNA integration and lack of RNA expression of viral long terminal repeat and 3' proximate cellular sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(8), 2465–2469. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.8.2465>

Kettmann, R., Marbaix, G., Cleuter, Y., Portetelle, D., Mammerickx, M., & Burny, A. (1980). Genomic integration of bovine leukemia provirus and lack of viral RNA expression in the target cells of cattle with different responses to BLV infection. *Leukemia research*, 4(6), 509–519. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(80\)90062-4](https://doi.org/10.1016/0145-2126(80)90062-4)

Kobayashi, T., Inagaki, Y., Ohnuki, N., Sato, R., Murakami, S., & Imakawa, K. (2019). Increasing Bovine leukemia virus (BLV) proviral load is a risk factor for progression of Enzootic bovine leucosis: A prospective study in Japan. *Preventive veterinary medicine*, S0167-5877(18)30795-5. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.04.009>

Kono, Y., Sentsui, H., Arai, K., Ishida, H., & Irishio, W. (1983). Contact transmission of bovine leukemia virus under insect-free conditions. *Nihon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science*, 45(6), 799–802. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.45.799>

Kuczewski, A., Orsel, K., Barkema, H. W., Mason, S., Erskine, R., & van der Meer, F. (2021). Invited review: Bovine leukemia virus-Transmission, control, and eradication. *Journal of dairy science*, 104(6), 6358–6375. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18925>

Lendez, PA. (2020). Tesis Doctoral. Estudio de parámetros inmunológicos y moleculares asociados al desarrollo de alta o baja carga proviral en animales infectados con el virus de la leucosis bovina (BLV).

Lendez, P. A., Martínez-Cuesta, L., Nieto Farias, M. V., Dolcini, G. L., & Ceriani, M. C. (2021). Cytokine TNF- α and its receptors TNFRI and TNFRII play a key role in the in vitro proliferative response of BLV infected animals. *Veterinary research communications*, 45(4), 431–439. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09825-z>

Lohr, C. E., Sporer, K., Brigham, K. A., Pavliscak, L. A., Mason, M. M., Borgman, A., Ruggiero, V. J., Taxis, T. M., Bartlett, P. C., & Droscha, C. J. (2022). Phenotypic Selection of Dairy Cattle Infected with Bovine Leukemia Virus Demonstrates Immunogenetic Resilience through NGS-Based Genotyping of BoLA MHC Class II Genes. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(1), 104. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010104>

MacLachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (2011). Fenner's Veterinary Virology. Vol. Fourth Edition.

Marcovecchio, S., Lützelshwab, C., Ceriani, C., Juliarena, M., Esteban, E., & Gutiérrez, S. (2006). Influencia de factores hematológicos y virológicos maternos en la transmisión prenatal del virus de la leucosis bovina (BLV). XXXIV Jornadas Uruguayas de Buitría, C.M.V.de Paysandú, ed. (Paysandú, Uruguay), pp. 184–186.

Martínez Cuesta, L., Nieto Farias, M. V., Lendez, P. A., Barone, L., Pérez, S. E., Dolcini, G. L., & Ceriani, M. C. (2018). Stable infection of a bovine mammary epithelial cell line (MAC-T) with bovine leukemia virus (BLV). *Virus research*, 256, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.07.013>

Masuda, T., Kuroda, M. J., & Harada, S. (1998). Specific and independent recognition of U3 and U5 att sites by human immunodeficiency virus type 1 integrase in vivo. *Journal of virology*, 72(10), 8396–8402. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.10.8396-8402.1998>

Meas, S., Seto, J., Sugimoto, C., Bakhsh, M., Riaz, M., Sato, T., Naeem, K., Ohashi, K., & Onuma, M. (2000). Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. *The Journal of veterinary medical science*, 62(3), 329–331. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.329>

Mekata, H., Yamamoto, M., Hayashi, T., Kirino, Y., Sekiguchi, S., Konnai, S., Horii, Y., & Norimine, J. (2018). Cattle with a low bovine leukemia virus proviral load are rarely an infectious source. *Jpn. J. Vet. Res*, 66, 157–163. <https://doi.org/10.14943/jjvr.66.3.157>

Miyasaka, T., Oguma, K., & Sentsui, H. (2015). Distribution and characteristics of bovine leukemia virus integration sites in the host genome at three different clinical stages of infection. *Archives of virology*, 160(1), 39–46. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2224-y>

Molnár, E., Molnár, L., Guedes, V. T., & de Lima, E. S. (2000). Naturally occurring bovine leukosis virus in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Brazil. *The Veterinary record*, 146(24), 705–706. <https://doi.org/10.1136/vr.146.24.705>

Monti, G.E. (2005). Epidemiology, infection dynamics and effective control of Bovine Leukemia virus within dairy herds of Argentina: a quantitative approach. *Epidemiol. Infect.*, 135, 228–237. <http://doi:10.1017/S0950268806006637>

Motton, D. D., & Buehring, G. C. (2003). Bovine leukemia virus alters growth properties and casein synthesis in mammary epithelial cells. *Journal of dairy science*, 86(9), 2826–2838. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73880-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73880-6)

Murakami, H., Yamada, T., Suzuki, M., Nakahara, Y., Suzuki, K., & Sentsui, H. (2011). Bovine leukemia virus integration site selection in cattle that develop leukemia. *Virus research*, 156(1-2), 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.01.004>

Nekoei, S., Hafshejani, T. T., Doosti, A., & Khamesipour, F. (2015). Molecular detection of bovine leukemia virus in peripheral blood of Iranian cattle, camel and sheep. *Polish journal of veterinary sciences*, 18(4), 703–707. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0091>

Nieto Farias, M. V., Souza, F. N., Lendez, P. A., Martínez-Cuesta, L., Santos, K. R., Della Libera, A., Ceriani, M. C., & Dolcini, G. L. (2018). Lymphocyte proliferation and apoptosis of lymphocyte subpopulations in bovine leukemia virus-infected dairy cows with high and low proviral load. *Veterinary immunology and immunopathology*, 206, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.10.012>

Norby, B., Bartlett, P. C., Byrem, T. M., & Erskine, R. J. (2016). Effect of infection with bovine leukemia virus on milk production in Michigan dairy cows. *Journal of dairy science*, 99(3), 2043–2052. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10089>

Park, H. G., Han, S. I., Oh, S. Y., & Kang, H. S. (2005). Cellular responses to mild heat stress. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 62(1), 10–23. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4208-7>

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin S.A. Chapter 3, In: A-Z of quantitative PCR. p. 87–112.
- Polat, M., Takeshima, S. N., & Aida, Y. (2017). Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virology journal*, 14(1), 209. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0876-4>
- Puentes, R., De Brun, L., Algorta, A., Da Silva, V., Mansilla, F., Sacco, G., Llambí, S., & Capozzo, A. V. (2016). Evaluation of serological response to foot-and-mouth disease vaccination in BLV infected cows. *BMC veterinary research*, 12(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0749-x>
- Rhodes, J. K., Pelzer, K. D., & Johnson, Y. J. (2003). Economic implications of bovine leukemia virus infection in mid-Atlantic dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223(3), 346–352. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.223.346>
- Rodríguez, S. M., Florins, A., Gillet, N., de Brogniez, A., Sánchez-Alcaraz, M. T., Boxus, M., Boulanger, F., Gutiérrez, G., Trono, K., Alvarez, I., Vagnoni, L., & Willems, L. (2011). Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses*, 3(7), 1210–1248. <https://doi.org/10.3390/v3071210>
- Ruggiero, V. J., Norby, B., Benitez, O. J., Hutchinson, H., Sporer, K., Droscha, C., Swenson, C. L., & Bartlett, P. C. (2019). Controlling bovine leukemia virus in dairy herds by identifying and removing cows with the highest proviral load and lymphocyte counts. *Journal of dairy science*, 102(10), 9165–9175. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16186>
- Rupp, R., Hernandez, A., & Mallard, B. A. (2007). Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *Journal of dairy science*, 90(2), 1029–1038. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71589-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71589-8)
- Sajiki, Y., Konnai, S., Nishimori, A., Okagawa, T., Maekawa, N., Goto, S., Nagano, M., Kohara, J., Kitano, N., Takahashi, T., Tajima, M., Mekata, H., Horii, Y., Murata, S., & Ohashi, K. (2017). Intrauterine infection with bovine leukemia virus in pregnant dam with high viral load. *The Journal of veterinary medical science*, 79(12), 2036–2039. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0391>
- Sandev, N., Koleva, M., Binev, R., & Ilieva, D. (2004). Influence of enzootic bovine leukosis virus upon the incidence of subclinical mastitis in cows at a different stage of infection. *Veterinarski Arhiv*; 74(6):411–6.
- Schwartz, I., & Lévy, D. (1994). Pathobiology of bovine leukemia virus. *Veterinary research*, 25(6), 521–536.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), de la Sota, M. (2005). Manual de Procedimientos Leucosis bovina enzoótica. Dirección Nacional de Sanidad Animal. Buenos Aires, Argentina. <http://www.senasa.gov.ar>
- Spanakis E. (1993). Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls. *Nucleic acids research*, 21(16), 3809–3819. <https://doi.org/10.1093/nar/21.16.3809>
- Tajima, S., & Aida, Y. (2005). Induction of expression of bovine leukemia virus (BLV) in blood taken from BLV-infected cows without removal of plasma. *Microbes and infection*, 7(11-12), 1211–1216. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.04.010>
- Tajima, S., Ikawa, Y., & Aida, Y. (1998). Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-infected cattle throughout the course of B-cell lymphosarcoma development. *Journal of virology*, 72(9), 7569–7576. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.9.7569-7576.1998>

Tamay de Dios L, Ibarra C, & Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. 2(2):70–8. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=44427>

Toma, B., Eloit, M., & Savey, M. (1990). Animal diseases caused by retroviruses: enzootic bovine leukosis, equine infectious anaemia and caprine arthritis-encephalitis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 9(4), 983–1119.

Trono K. (2011). Leucosis Bovina, una amenaza silenciosa. Artículo N°171, disponible en Sitio Argentino de Producción Animal-Producción bovina de leche-Sanidad, intoxicaciones, enfermedades metabólicas-Enfermedades infecciosas de los bovinos en general. <https://www.produccion-animal.com.ar/>

Trono, K. G., Pérez-Filgueira, D. M., Duffy, S., Borca, M. V., & Carrillo, C. (2001). Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Veterinary microbiology*, 83(3), 235–248. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(01\)00420-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(01)00420-5)

VanLeeuwen, J. A., Forsythe, L., Tiwari, A., & Chartier, R. (2005). Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum in dairy cattle in Saskatchewan. *The Canadian veterinary journal = La revue vétérinaire canadienne*, 46(1), 56–58.

Vanleeuwen, J. A., Haddad, J. P., Dohoo, I. R., Keefe, G. P., Tiwari, A., & Tremblay, R. (2010). Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhoea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum in Canadian dairy cows. *Preventive veterinary medicine*, 94(1-2), 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.11.012>

Vonèche, V., Callebaut, I., Kettmann, R., Brasseur, R., Burny, A., & Portetelle, D. (1992). The 19–27 amino acid segment of gp51 adopts an amphiphilic structure and plays a key role in the fusion events induced by bovine leukemia virus. *The Journal of biological chemistry*, 267(21), 15193–15197.

Watanabe, A., Murakami, H., Kakinuma, S., Murao, K., Ohmae, K., Isobe, N., Akamatsu, H., Seto, T., Hashimura, S., Konda, K., Shinozuka, Y., & Kawai, K. (2019). Association between bovine leukemia virus proviral load and severity of clinical mastitis. *The Journal of veterinary medical science*, 81(10), 1431–1437. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0285>

Watanuki, S., Takeshima, S. N., Borjigin, L., Sato, H., Bai, L., Murakami, H., Sato, R., Ishizaki, H., Matsumoto, Y., & Aida, Y. (2019). Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams. *Veterinary research*, 50(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0724-1>

Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), 75–85. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>

World Organization for Animal Health (OIE). (2021). Enzootic Bovine Leukosis. In: World Organization for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 7th ed. Paris, France.

Yuan, Y., Kitamura-Muramatsu, Y., Saito, S., Ishizaki, H., Nakano, M., Haga, S., Matoba, K., Ohno, A., Murakami, H., Takeshima, S. N., & Aida, Y. (2015). Detection of the BLV provirus from nasal

secretion and saliva samples using BLV-CoCoMo-qPCR-2: Comparison with blood samples from the same cattle. *Virus research*, 210, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.08.013>