

## Eficacia de la pasteurización y la congelación sobre la inactivación del virus de la leucosis bovina presente en leche

### Efficacy of pasteurization and freezing on the inactivation of bovine leukosis virus present in milk

Rocío Silvia Sandoval Monzón<sup>1,2,4</sup>, Irma Arévalo Rodríguez<sup>1</sup>, Aldo Carrillo Torres<sup>1</sup>, Luis Felipe Ruiz García<sup>1,3</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficacia de la pasteurización y la congelación sobre la inactivación del virus de la leucosis bovina presente en leche. Se realizó un bioensayo con 16 ovinos que recibieron, por vía intraperitoneal, un inóculo de leucocitos proveniente de leche bovina con células infectadas por el virus de leucosis bovina (VLB) previamente tratada con uno de los métodos de inactivación del virus. Se evaluaron cuatro grupos de estudio: a) grupo control: leche sin tratamiento previo, b) grupo pasteurización: leche tratada por pasteurización, c) grupo congelación 12 h: leche tratada por congelación durante 12 horas, d) grupo congelación 36 h: leche tratada por congelación durante 36 horas. En la semana 10 de la inoculación, todos los animales (4/4) del grupo control y 3/4 de los animales del grupo congelación 12 h fueron seropositivos al VLB, mientras que ningún animal fue seropositivo (0/4) al VLB en los grupos pasteurización y congelación 36 h. Se encontró diferencias significativas entre los grupos pasteurización y congelación 36 h con respecto al control ( $p=0.029$ ). Los resultados indican que el proceso de pasteurización o congelación por 36 horas es eficiente para inactivar el virus de leucosis bovina.

**Palabras clave:** pasterización, congelación, leche, leucosis bovina enzoótica, terneros

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Reproducción y Sanidad Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

<sup>2</sup> Clínica de Animales Mayores, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

<sup>4</sup> E-mail: [rocio.sandoval@unmsm.edu.pe](mailto:rocio.sandoval@unmsm.edu.pe)

Recibido: 10 de octubre de 2019

Aceptado para publicación: 10 de julio de 2020

Publicado: 29 de septiembre de 2020

## ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the efficacy of pasteurization and freezing on the inactivation of the bovine leukosis virus present in milk. A bioassay was carried out using 16 sheep. The animals received an intraperitoneal leukocytes inoculum from cow milk with cells infected with bovine leukosis virus (BVL) previously treated with one of the virus inactivation methods. Four study groups were evaluated: a) control group: milk without prior treatment, b) pasteurization group: milk treated by pasteurization, c) 12-hour freezing group: milk treated by freezing for 12 hours, d) 36-hour freezing group: milk treated by freezing for 36 hours. In the week 10 of the inoculation, all animals (4/4) in the control group and 3/4 of the animals in the 12 h freezing group were seropositive for VLB, while no animal was seropositive (0/4) for VLB in the pasteurization and 36-hour freezing groups. Significant differences were found between the pasteurization and 36-hour freezing groups with respect to the control ( $p=0.029$ ). The results indicate that the 36-hour freezing or pasteurization process is efficient in inactivating the bovine leukosis virus.

**Key words:** pasteurization, freezing, milk, enzootic bovine leukosis, calves

## INTRODUCCIÓN

La Leucosis Bovina Enzoótica (LEB) es una enfermedad de gran importancia económica y sanitaria en la ganadería lechera (Nekouei *et al.*, 2015), además de poseer un importante potencial zoonótico (Buehring *et al.* 2015, 2019). Varias investigaciones han demostrado que esta enfermedad afecta negativamente la cantidad (Bartlett *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016) y calidad de la leche producida e incrementa el número de células somáticas (Yang *et al.*, 2016). Asimismo, las vacas seropositivas presentan más problemas reproductivos y tienen mayor riesgo de descartar prematuro en comparación con las negativas (Romero *et al.*, 2015). La LEB amenaza silenciosamente a la respuesta inmune, incrementando los casos de mastitis clínicas, neumonías y otras enfermedades infecciosas en los animales infectados con el virus (Emanuelson *et al.*, 1992; Trainin *et al.*, 1996; Erskine *et al.*, 2011; Frie y Coussens, 2015; Yang *et al.*, 2016).

La LEB es una enfermedad considerada dentro de la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2012), con alta prevalencia en muchos países, habiéndose logrado eliminar la enfermedad en 22 países (Nuotio *et al.*, 2003; Acaite *et al.*, 2007; Polat *et al.*, 2017). En Perú se han reportado prevalencias entre 12 y 20% (Díaz *et al.*, 1999; Flores y Rivera, 2000; Barrera, 2010); sin embargo, en un estudio más reciente se determinó una prevalencia de 93% en un estable de Lima (Sandoval *et al.*, 2015), posiblemente debido a la falta de medidas de control (Ruiz *et al.*, 2018), dado que la mayoría de los animales infectados son portadores asintomáticos de la enfermedad y no son separados del hato (Kabeya *et al.*, 2001; Juliarena *et al.*, 2007).

El virus de leucosis bovina (VLB) se transmite principalmente a través de sangre, calostro y leche que contienen leucocitos infectados (Burny *et al.*, 1978; Miller y Van Der Maaten, 1979). La transmisión iatrogénica

del virus es muy importante, pero la transmisión a través de la leche y el calostro no dejan de serlo. Romero *et al.* (1983) encontró que el 9 y 27% de los terneros resultaban positivos al ser alimentados con leche de madres negativas y positivas, respectivamente. La alimentación con leche infectada reduce tempranamente la población de terneros seronegativos al virus (Erskine *et al.*, 2012; Juliarena *et al.*, 2017).

Si bien la mejor manera de erradicar la LEB es mediante un programa de detección y descarte, es prácticamente imposible realizarlo en casos de prevalencias elevadas, donde el ganadero no tiene algún tipo de compensación por las pérdidas (Rodríguez *et al.*, 2011). La implementación de tratamientos que permitan la eliminación del VLB presente en la leche y el calostro es necesaria (Foley y Otterby, 1978; McGuirk y Collins, 2004). Se tiene evidencia que los tratamientos de pasteurización y congelación aplicados a la leche materna de mujeres infectadas por citomegalovirus y virus linfotrópico humano (Ando *et al.*, 2004; Forsgren, 2004) reducen las posibilidades de infección de neonatos que consumen la leche de sus madres.

Baumgartener *et al.* (1976) demostró que leche llevada a altas temperaturas por cortos periodos de tiempo elimina el VLB, en tanto que Johnson *et al.* (2007) demostró que la pasteurización del calostro permite mantener una adecuada concentración de inmunoglobulinas y mantiene las propiedades nutricionales del calostro. Así mismo, se ha reportado que la congelación del calostro permite la inactivación del VLB (Kanno *et al.*, 2014). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de la pasteurización y la congelación sobre la inactivación del virus de la leucosis bovina presente en leche como una posible estrategia de control en terneros lactantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar y Animales

El presente estudio se realizó en la Clínica de Animales Mayores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima, Perú). Se trabajó con 16 ovinos machos criollos, clínicamente sanos, de cuatro meses de edad. Se comprobó que los ovinos fueron seronegativos al VLB mediante el kit comercial INgezim BLV Compac 2.0 (Eurofins Technologies, España). Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una ración completa.

### Diseño Experimental

Los ovinos proporcionan un medio alternativo para estudiar la transmisión del VLB (Miller y Van Der Maaten, 1979; Murakami *et al.*, 2011; Kanno *et al.*, 2014), al ser una especie altamente susceptible a la infección experimental por el VLB y sin presentar transmisión horizontal (Kenyon *et al.*, 1981). El tamaño de muestra se determinó utilizando el procedimiento para variables dicotómicas del software PS: Power and Sample Size Calculation 3.1.6 (Dupont y Plummer, 1997). Se calculó un tamaño de muestra de cuatro ovinos por grupo, considerando que el 100% de los ovinos seroconvierten luego de la inoculación con el VLB (Kenyon *et al.*, 1981) y que los tratamientos (pasteurización y congelación) evitan el 100% de la transmisión del VLB (Baumgartener *et al.*, 1976; Kanno *et al.*, 2014). Se utilizó un poder de prueba del 80% y un error tipo I de 5%.

Los ovinos fueron inoculados por vía intraperitoneal con el inóculo conteniendo  $3 \times 10^8$  leucocitos, procedente de muestras de leche con células infectadas por el VLB para evaluar si el procesamiento de la leche lograba la inactivación del VLB presente en le-

che. Un tratamiento fue considerado como eficaz cuando no existió seroconversión contra el VLB (Ferrer *et al.*, 1981; Kanno *et al.*, 2014).

Cada grupo experimental estuvo conformado por cuatro ovinos. Los grupos fueron:

- a) Grupo Control: Inóculo de leche sin tratamiento previo.
- b) Grupo Pasteurización: Inóculo de leche tratada por pasteurización.
- c) Grupo Congelación 12 horas: Inóculo de leche congelada durante 12 horas.
- b) Grupo Congelación 36 horas: Inóculo de leche congelada durante 36 horas.

Se realizaron cuatro repeticiones. Para esto, se preparó una mezcla de leche contaminada con leucocitos infectados como fue descrito por Roberts *et al.* (1983). Para cada repetición se trabajó con 4 L de leche proveniente de una vaca seronegativa al VLB y 120 ml de sangre de una vaca seropositiva con linfocitosis persistente. El estado sanitario de las vacas fue identificado empleando el kit comercial INgezim BLV Compac 2.0 y con dos hemogramas a intervalo de 72 días. En cada ensayo fue inoculado un ovino de cada grupo experimental. Para cada tratamiento, la leche y la sangre previamente mezclada fue dividida en cuatro alícuotas de 1 L c/u. Cada litro de leche contaminada contenía al menos  $3 \times 10^8$  leucocitos.

El procedimiento de cada grupo experimental consistió en: a) pasteurización: se calentó a 63 °C durante 30 minutos para la inactivación del VLB (Baumgartener *et al.*, 1976), b) congelación 12 horas: la leche fue almacenada a -23 °C durante 12 horas (Kanno *et al.*, 2014) y c) congelación 36 horas: la leche fue almacenada a -23 °C durante 36 horas.

### Obtención del Inóculo

Luego de realizar los tratamientos para inactivación del VLB, las alícuotas de leche (1 L) conteniendo las células infectadas fue-

ron centrifugadas a 2800 g durante 15 minutos (distribuido en cuatro envases de 250 ml) para luego proceder a eliminar la grasa de la leche y el sobrenadante. El sedimento (fracción celular) se diluyó en solución buffer fosfato salino (PBS), cantidad suficiente para 5 ml, que fue colocado en jeringas para inocular a los ovinos. Se corroboró que el número de células leucocitarias obtenidas de cada inóculo alcance una concentración mínima  $3 \times 10^8$  leucocitos empleando un hemocitómetro (Kanno *et al.*, 2014). Este procedimiento se repitió para cada tratamiento.

### Inoculación

Los ovinos fueron inoculados por vía intraperitoneal a través de la fosa paralumbar derecha. Para esto, los animales fueron sedados con xilacina a dosis de 0.3 mg/kg. El inóculo (5 ml) fue introducido empleando un catéter endovenoso (Abbocat) de 16G x 2.5 pulgadas (Kanno *et al.*, 2014). Finalmente, se utilizó yohimbina a una dosis de 0.2 mg/kg, para revertir el efecto de la xilacina.

Se les tomó muestras de sangre semanal durante 10 semanas para determinar la seropositividad al VLB empleando el kit comercial INgezim BLV Compac 2.0, según las indicaciones de la casa comercial. Esta es una prueba de inmunoensayo enzimático de competición basado en la utilización de anticuerpos monoclonales específicos de la gp51 del VLB. El kit diagnóstico tiene una sensibilidad de 100% y especificidad de 100%, requerida por la OIE (2018). Un ovino fue considerado positivo al VLB cuando después de la inoculación se incrementan los títulos se anticuerpos y se mantienen elevados durante las 10 semanas pos-inoculación.

### Consideraciones Éticas

La presente investigación fue aprobada por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, según Constancia de Autorización N.º 2019-5. Los ensayos respetaron los principios directrices internacionales para

Cuadro 1. Resultados semanales de positividad a la prueba de ELISA de ovinos (4 meses de edad) que fueron inoculados vía intraperitoneal con un inóculo proveniente de leche con células infectadas por el virus de leucosis bovina (VLB) y tratada con tres métodos de inactivación

Semana	Control (pos/total)	Congelación 12 h (pos/total)	Congelación 36 h (pos/total)	Pasteurización (pos/total)
0	0/4 <sup>a</sup>	0/4 <sup>a</sup>	0/4 <sup>a</sup>	0/4 <sup>a</sup>
1	1/4 <sup>a</sup>	0/4 <sup>a</sup>	0/4 <sup>a</sup>	0/4 <sup>a</sup>
2	4/4 <sup>a</sup>	0/4 <sup>ab</sup>	0/4 <sup>b</sup>	0/4 <sup>b</sup>
3	4/4 <sup>a</sup>	3/4 <sup>ab</sup>	0/4 <sup>b</sup>	0/4 <sup>b</sup>
4	4/4 <sup>a</sup>	3/4 <sup>ab</sup>	0/4 <sup>b</sup>	0/4 <sup>b</sup>
5	4/4 <sup>a</sup>	3/4 <sup>ab</sup>	0/4 <sup>b</sup>	0/4 <sup>b</sup>
6	4/4 <sup>a</sup>	3/4 <sup>ab</sup>	0/4 <sup>b</sup>	0/4 <sup>b</sup>
7	4/4 <sup>a</sup>	3/4 <sup>ab</sup>	0/4 <sup>b</sup>	0/4 <sup>b</sup>
8	4/4 <sup>a</sup>	3/4 <sup>ab</sup>	0/4 <sup>b</sup>	0/4 <sup>b</sup>
9	4/4 <sup>a</sup>	3/4 <sup>ab</sup>	0/4 <sup>b</sup>	0/4 <sup>b</sup>
10	4/4 <sup>a</sup>	3/4 <sup>ab</sup>	0/4 <sup>b</sup>	0/4 <sup>b</sup>

Pos: animales seropositivos

<sup>a,b</sup> Letras diferentes dentro de filas indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

la investigación biomédica que implica el uso de animales aprobado por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, Ginebra, 1985 (CIOMS).

### Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el software IBM SPSS Statistics 22. Se calculó semanalmente el porcentaje de ovinos seropositivos a gp51. Se empleó la prueba exacta de Fisher para determinar si los tratamientos tuvieron un efecto significativo. Todos los análisis fueron realizados con un nivel de significancia del 5%.

que el proceso de congelación por 12 horas no logró inactivar el virus. En el Cuadro 1 se puede observar que durante la semana 10 pos-inoculación todos los animales del grupo control y el 75% de los animales del grupo congelación por 12 horas fueron seropositivos al VLB, mientras que ningún animal fue seropositivo al VLB en el grupo pasteurización y congelación por 36 horas. También se puede observar que los animales del grupo control mostraron positividad a partir de la primera semana pos-inoculación y que los animales del grupo congelación por 12 horas mostraron positividad a partir de la tercera semana de la inoculación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso de pasteurización y el de congelación por 36 horas fueron eficientes para inactivar el virus de leucosis bovina, mientras

Las variables críticas para el proceso de pasteurización incluyen la temperatura, el tiempo y la composición del producto (Gröner *et al.*, 2018). Los tratamientos que emplean el calor para inactivar virus desestabilizan térmicamente las interacciones intermole-

culares entre las proteínas de la cápside del virus y la integridad de la envoltura del virus. Esta desestabilización térmica produce una pérdida de la integridad estructural de la cápside del virión y, por tanto, la efectividad de los virus (Boschetti *et al.*, 2004). En el presente trabajo las variables consideradas en el proceso de pasteurización fueron una temperatura de 60 °C, durante 30 minutos.

Los resultados demuestran que la pasteurización de la leche es una estrategia factible para la inactivación del VLB, tal como ha sido demostrado por otros autores (Baumgartener *et al.*, 1976; Rubino y Donham, 1984; Lomonaco *et al.*, 2017). Así, Roberts *et al.* (1983) mostraron que la pasteurización a 50 °C durante 70 s y Chung *et al.* (1986) con tratamiento térmico de la leche a 63 °C durante 30 minutos o una pasteurización relámpago a 72-73 °C durante 15-20 s, inactivan los linfocitos infectados con VLB en la leche. Asimismo, la pasteurización relámpago también tiene el beneficio adicional de ayudar a limitar la propagación de la enfermedad de Johne (Stabel y Lambertz, 2004).

La congelación por 36 horas de la leche demostró inactivar las células infectadas con el VLB; resultados que concuerdan con Maschmann *et al.* (2006), quienes reportan que el proceso de congelación-descongelación de la leche materna evita la transmisión de citomegalovirus en humanos, y con el estudio de Forsgren (2004), quien encontró que la congelación de la leche a -20 °C durante 12 horas sólo redujo la infectividad en un 90%, mientras que la congelación durante 72 horas redujo la infectividad al 100%. Estos resultados se pueden explicar por la formación de hielo intracelular, lo que ocasiona que las células pierdan su potencial de membrana (Shi *et al.*, 2017). Normalmente los virus sobreviven al proceso de congelación; sin embargo, los virus intracelulares, como el VLB, que dependen de la célula que lo alberga, podría verse afectado por el proceso de congelación al destruirse la célula infectada.

En conclusión, los resultados del trabajo indican que la congelación por más de 36 horas y la pasteurización son métodos efectivos para inactivar el VLB y, de esa manera, reducir el riesgo de transmisión de la enfermedad a los terneros lactantes.

#### LITERATURA CITADA

1. **Acaite J, Tamosiunas V, Lukauskas K, Milius J, Pieskus J. 2007.** The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. *Prev Vet Med* 82: 83-89. doi: 10.1016/j.prevetmed.2007.05.010
2. **Ando Y, Ekuni Y, Matsumoto Y, Nakano S, Saito K, Kakimoto K, Tanigawa T, et al. 2004.** Long-term serological outcome of infants who received frozen-thawed milk from human T-lymphotropic virus type-I positive mothers. *J Obstet Gynecol Res* 30: 436-438. doi: 10.1111/j.1447-0756.2004.00227.x
3. **Barrera ML. 2010.** Seroprevalencia de leucosis viral bovina (LVB) en el Valle Viejo del distrito de Moquegua, 2010. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Tacna: Univ. Nacional Jorge Basadre Grohmann. 93 p.
4. **Bartlett PC, Sordillo LM, Byrem TM, Norby B, Grooms DL, Swenson CL, Zalucha J, et al. 2014.** Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 244: 914-922. doi: 10.2460/javma.244.8.914
5. **Baumgartener L, Olson C, Onuma M. 1976.** Effect of pasteurization and heat treatment on bovine leukemia virus. *J Am Vet Med Assoc* 169: 1189-1191.
6. **Boschetti N, Niederhauser I, Kempf C, Stühler A, Löwer J, Blümel J. 2004.** Different susceptibility of B19 virus and mice minute virus to low pH treatment. *Transfusion* 44: 1079-1086. doi: 10.1111/j.1537-2995.2004.03420.x

7. **Buehring G, DeLaney A, Shen H, Chu D, Razavian N, Schwartz D, Demkovich Z, Bates M. 2019.** Bovine leukemia virus discovered in human blood. *BMC Infect Dis* 19: 297. doi: 10.1186/s12879-019-3891-9.
8. **Buehring G, Shen H, Jensen H, Jin D, 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
9. **Burny A, Bex F, Chantrenng H, Cleuter Y, Dekegel D, Ghysdael J, Portetelle D. 1978.** Bovine leukemia virus involvement in enzootic bovine leukosis. *Adv Cancer Res* 28: 251-311. doi: 10.1016/s0065-230x(08)60649-1
10. **Chung Y, Prior H, Duffy P, Rogers R, Mackenzie A. 1986.** The effect of pasteurisation on bovine leucosis virus-infected milk. *Aust Vet J* 63: 379-380. doi:10.1111/j.1751-0813.1986.tb02908.x
11. **Díaz A, Manchego A, Rivera H. 1999.** Prevalencia del virus de la leucosis bovina (VLB) en el centro poblado menor Obenteni -Gran Pajonal - Región Ucayali. *Rev Inves Vet Perú* 10: 61-67. doi: 10.15381/rivep.v10i2.6743
12. **Dupont WD, Plummer WD. 1997.** PS power and sample size program available for free on the internet. *Control Clin Trials* 18: 274. doi: 10.1016/S0197-2456(97)-00074-3
13. **Emanuelson U, Scherling K, Pettersson H. 1992.** Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev Vet Med* 12: 121-131. doi: 10.1016/0167-5877(92)90075-Q
14. **Erskine R, Bartlett P, Sabo K, Sordillo L. 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
15. **Erskine RJ, Bartlett PC, Byrem TM, Render CL, Febvay C, Houseman JT. 2012.** Herd-level determinants of bovine leukaemia virus prevalence in dairy farms. *J Dairy Res* 79: 445-450. doi: 10.1017/S0022029912000520
16. **Ferrer J, Kenyon S, Gupta P. 1981.** Milk of dairy cows frequently contains a leukemogenic virus. *Science* 213: 1014-1016. doi: 10.1126/science.6267692
17. **Flores A, Rivera H. G (2000).** Sero-prevalence of bovine leucosis virus in dairy herds of Arequipa. *Rev Inv Vet Perú*. 11:144-148. <https://doi.org/10.15381/rivep.v11i2.7353>
18. **Foley JA, Otterby DE. 1978.** Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum: a review. *J Dairy Sci* 61: 1033-1060. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(78)83686-8
19. **Forsgren M. 2004.** Cytomegalovirus in breast milk: reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatr Res* 56: 529-535. doi: 10.1203/01.PDR.-0000139483.35087.BE
20. **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
21. **Gröner A, Broumis C, Fang R, Nowak T, Popp B, Schäfer W, Roth NJ. 2018.** Effective inactivation of a wide range of viruses by pasteurization. *Transfusion* 58: 41-51. doi: 10.1111/trf.14390
22. **Johnson JL, Godden SM, Molitor T, Ames T, Hagman D. 2007.** Effects of feeding heat-treated colostrum on passive transfer of immune and nutritional parameters in neonatal dairy calves. *J Dairy Sci* 90: 5189-5198. doi: 10.3168/jds.2007-0219
23. **Juliarena M, Barrios C, Lützel Schwab C, Esteban E, Gutiérrez S. 2017.** Bovine leukemia virus: current perspectives. *VAAT* 9: 13-26. doi: 10.2147/VAAT.S113947
24. **Juliarena M, Gutierrez S, 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

25. **Kabeya H, Ohashi K, Onuma M. 2001.** Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. *J Vet Med Sci* 63: 703-708. doi: 10.1292/jvms.63.703
26. **Kanno T, Ishihara R, Hatama S, Yasuhiro OUE, Edamatsu H, Konno Y, Tachibana S, et al. 2014.** Effect of freezing treatment on colostrum to prevent the transmission of bovine leukemia virus. *J Vet Med Sci* 76: 255-257. doi: 10.1292/jvms.13-0253
27. **Kenyon S, Ferree J, McFeely R, Graves D. 1981.** Induction of lymphosarcoma in sheep by bovine leukemia virus. *J Natl Cancer Inst* 67: 1157-1163.
28. **Lomonaco M, Sowul M, Malacari D, Gutierrez G, Ruiz V, Suarez Archilla G, et al. 2017.** Pasteurization and spray-drying heat treatment are effective to inactivate bovine leukemia virus in milk and colostrum. In: XVIII International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. Tokyo, Japan.
29. **Maschmann J, Hamprecht K, Weissbrich B, Dietz K, Jahn G, Speer C. 2006.** Freeze-thawing of breast milk does not prevent cytomegalovirus transmission to a preterm infant. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 91: F288-F290. doi: 10.1136/adc.2004.050625
30. **McGuirk SM, Collins M. 2004.** Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *Vet Clin Food Anim* 20: 593-603. doi: 10.1016/j.cvfa.2004.06.005
31. **Miller JM, Van Der Maaten MJ. 1979.** Infectivity tests of secretions and excretions from cattle infected with bovine leukemia virus. *J Natl Cancer Inst* 62: 425-428.
32. **Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K, Yamamoto T, Tsutsui T. 2011.** The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. *Vet Microbiol* 148: 84-88. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.08.001
33. **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
34. **Nuotio L, Rusanen H, Sihvonen L, Neuvonen E. 2003.** Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev Vet Med* 59: 43-49. doi: 10.1016/s0167-5877(03)00057-6
35. **[OIE] Organización Mundial de la Sanidad Animal. 2012.** Leucosis bovina enzoótica. Manual terrestre de la OIE. 7° ed. Paris: OIE. [Internet]. Disponible en: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahc/current/chapitre\\_ebl.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_ebl.pdf)
36. **[OIE] World Organisation for Animal Health. Enzootic bovine leukosis. Chapter 2.4.10.** In: OIE Terrestrial Manual. [Internet]. Available in: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.04.10\\_EBL.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.10_EBL.pdf)
37. **Polat M, Takeshima S, Aida Y. 2017.** Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virol J* 14: 209. doi 10.1186/s12985-017-0876-4
38. **Roberts D H, Lucas M H and Wibberley G. 1983.** Effect of heat on bovine leukosis virus-infected lymphocytes. *Br Vet J* 139: 291-295. doi: 10.1016/s0007-1935(17)30434-7
39. **Rodríguez S, Florins A, Gillet N, de Brogniez A, Sánchez-Alcaraz M, Boxus M, Boulanger F, et al. 2011.** Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses* 3: 1210-1248. doi: 10.3390/v3071210
40. **Romero CH, Cruz GB, Rowe CA. 1983.** Transmission of bovine leukaemia virus in milk. *Trop Anim Health Pro* 15: 215-218. doi: 10.1007/BF02242060
41. **Romero J, Dávila G, Beita G, Dolz G. 2015.** Relación entre el estado serológico a leucosis bovina enzoótica y parámetros reproductivos en hatos lecheros especia-

- lizados de Costa Rica. *Agron Costarric* 39: 7-18.
42. **Rubino MJ, Donham KJ. 1984.** Inactivation of bovine leukemia virus-infected lymphocytes in milk. *Am J Vet Res* 45: 1553-1556.
43. **Ruiz V, Porta NG, Lomónaco M, Tro- no K, Alvarez I. 2018.** Bovine leukemia virus infection in neonatal calves. Risk factors and control measures. *Front Vet Sci* 5: 267. doi: 10.3389/fvets.2018.00267
44. **Sandoval R, Delgado A, Ruiz L, Ramos O. 2015.** Determinación de la seroprevalencia del virus de la leucemia bovina en un establo lechero de Lima, Perú. *Rev Inv Vet Perú* 26: 152-158. doi: 10.15381/rivep.v26i1.10919
45. **Shi Q, Xie Y, Wang Y, Li S. 2017.** Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 7: 8538. doi: 10.1038/s41598-017-09005-7
46. **Stabel JR, Lambertz A. Efficacy of pasteurization** conditions for the inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *J Food Prot* 67: 2719-2726. doi: 10.4315/0362-028X-67.12.2719
47. **Trainin Z, Brenner J, Meirum R, Ungar-Waron H. 1996.** Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 54: 293-302. doi: 10.1016/s0165-2427(96)05706-6
48. **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