CNU Journal of Agricultural Science Vol. 38, No. 1, pp. 45-50, March 2011

홀스타인종 젖소에 있어서 PCR과 ELISA기법을 이용한 BLV 감염진단

정행진[1] · 유성란[2] · 이준헌[2] · 도창희[1] · 서국현[3] · 류승희[4] · 상병찬[1]*

[1]충남대학교 동물바이오시스템과학과, [2]충남대학교 동물자원생명과학과, [3]전남대학교 수의과대학, [4]충남 축산기술연구소

Diagnosis of Bovine Leukemia Virus (BLV) infection using PCR and ELISA techniques in Holstein dairy cattle

Hang-Jin Jeong[1], Seong-Lan Yu[2], Jun-Heon Lee[2], Chang-Hee Do[1], Guk-Hyun Shu[3], Seung-Heui Ryoo[4], Byung-Chan Sang[1]*

[1]Dept. of Animal Biosystem Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
[2]Dept. of Animal Science and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
[3]College of Veterinary Medicine, Cheunnam National University, Gwangju 305-746, Korea
[4]Government of Changcheongnam-Do, Livestock Research Institute, Cheongyang 345-811, Korea

Received on 10 February 2011, revised on 2 March 2011, accepted on 9 March 2011

Abstract : This study was conducted to investigate the farm situation about bovine leukemia virus(BLV) infection that greatly influence productivity in dairy cattle and compare the accuracy of diagnosis for BLV infection between PCR and ELISA techniques. Blood samples of 193 heads from 5 herds in Chungnam and Chungbuk area were used to analyze BLV gene and serum, and the results were obtained as follows. The amplified BLV gene in dairy cattle by PCR technique resulted in 226 bp, 596 bp and 434 bp, respectively, for gag, pol and env, which were well amplified. The infection rates of BLV virus diagnosed by PCR and ELISA techniques ranged from 80.55 to 100% and from 22.22 to 86.95%, respectively, and the infection rates among 5 herds were significantly different in both methods ($P<0.05$). Further, the average infection rates of 5 herds were 87.05 and 63.21%, respectively, for PCR and ELISA techniques. Kappa statistics for examining consistency of diagnosis by PCR and ELISA techniques showed 0.246, which represents low consistency. Consequently, PCR based BLV technique was considered as a corrective measure for diagnosis of BLV infection in Holstein dairy cattle.

Key words **:** Holstein, PCR, ELISA, BLV, Kappa statistics

I. 서 론

젖소의 유전능력이 우수하여도 생산능력에 치명적인 영향을 미치는 질병에 걸렸을 경우 생산성 향상은 기대하기란 어렵다. 젖소의 생산능력에 지대한 영향을 미치는 소백혈병(bovine leukosis, BL)은 전 세계적으로 발병하고 있는 혈액 종양성 질병이다. 이는 BLV(bovine leukemia virus)감염이 원인이 되어 림프세포에 이상증상을 일으키며 우군에 감염되면 근절하기가 매우 어려운 낙농산업에 치명적인 손실을 초래하는 전염성 질병이다. 중남미의 경우 젖소의 30~50% 정도가 BLV에 감염되어 있으며 이중 젖소의 20~30%는 백혈병(BL) 즉 지속성 림프증후군(persistent lymphocytosis, PL)으로 진행되고, 1~5%가 림프종양(lymphosarcoma)으로 발전하는 것으로 보고되고 있다(Xu 등, 1993; Mirsky 등, 1998). 젖소에 BLV가 감염되어 PL으로 발전하면 이의 지속기간이 증가함에 비례하여 림프증후군의 상태가 악화되고 유량과 유지량은 현저히 감소한다(Da 등, 1993). 젖소의 생산성에 지대한 영향을 주는 백혈병을 근절하기 위해서는 BLV의 조기진단에 의한 감염된 소의 격리사육과 목장관리에 있어서 철저한 방역 및 위생관리가 이루어 져야 한다.

소에 감염된 BLV을 조기 진단하는 방법으로 혈청학적 방법이 개발되었고 주로 BLV glycoprotein antigen과 core antigene을 BLV persistently infected fetal lamb

***Corresponding author:** Tel: +82-42-821-5788
E-mail address: bcsang@cnu.ac.kr

kidney (BLV-FLK) 세포를 이용하여 생산된 항원을 사용하는 Aga Gel immunodiffusion(AGID)방법이 이용되었으며(Hoff-Jorgensen, 1989), AGID기법에 의한 BLV 감염진단은 BLV가 감염되어 BLV provirus가 양성이지만 혈청학적으로는 음성인 경우가 나타나 진단에 대한 정확도가 많이 떨어진다(Eaves 등, 1994). 따라서 근래에는 BLV 감염진단에 대한 혈청학적 방법 중 AGID법 보다 정확성 및 민감도가 높은 ELISA기법이 주로 사용되고 있다(Molloy 등, 1990; Klintevall 등, 1991; Gibson, 1995). 이 기법은 BLV항체 생성유무에 의한 진단기법으로 BLV가 감염된 후 일정기간의 잠복기가 지나야만 항체가 생성되기 때문에 BLV에 감염되었어도 일정기간이 지나지 않은 경우에는 항체가 생성되지 않아 BLV음성(-)으로 판정될 수 있다. 그러나 최근에는 소에 감염된 BLV 유전자를 증폭시켜 진단하는 PCR기법은 ELISA기법으로는 진단하기 어려운 BLV 감염 초기에도 진단이 가능하여 비교적 빠른 시간과 높은 정확성으로 감염우를 진단할 수 있다(Jacobs 등, 1992; Fechner 등, 1996). 우리나라에서는 젖소의 생산성에 지대한 영향을 미치는 것으로 알려진 소 백혈병의 원인균인 BLV 조기진단방법으로 ELISA kit을 활용하고 있으나, PCR기법에 의한 BLV 감염에 대한 진단보고는 별로 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 젖소의 생산성에 지대한 영향을 미치는 것으로 알려진 백혈병의 원인균인 BLV 감염에 대한 젖소목장별 실태를 파악하고, PCR기법과 ELISA기법간의 BLV 진단에 대한 정확도를 비교 검토하여 이들 기법에 대한 진단정보를 제공하는데 필요한 기초자료를 얻고자 하는데 있다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물 및 재료

본 연구에 이용된 공시동물은 충청남북도 소재 5개 목장(U, S, T, C, 및 D)의 1산 이상의 홀스타인종 젖소 총 193두를 이용하였다. 혈액채취는 젖소의 경정맥에서 3 ㎖의 혈액을 EDTA가 함유된 진공채혈관 (Vacumtainer tube with EDTA)에 채취하였다. Genomic DNA 추출은 DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN, Germany)를 이용하였으며 추출된 DNA는 4℃에 보관하여 사용하였다.

2. PCR 및 ELISA기법을 이용한 BLV감염진단 방법

1) PCR 기법을 이용한 BLV 감염진단방법

젖소의 BLV 감염여부를 확인하기위한 BLV provirus의 gag, pol 및 env gene의 PCR 증폭은 Sagata 등(1985)이 보고한 primer를 사용하였으며 DNA의 확인을 위해 internal control로 GAPDH를 사용하였다(Table 1).

Table 1. Oligonucleotide primers used for amplification of BLV genes and GAPDH gene.

Genes	Primer sequence	Product size(bp)
gag	CTGACCTAGAACAACTTTGC	226
	GACGAGTAGGGAGATTTTTCC	
pol	GTGTCCTATATGGACGATATCC	596
	AGTCTGCAGGTATTGGCATCC	
env	GTCTCCCAGATACACCTTGG	434
	GAAGGTTCCCAACATATAGC	
GAPDH	CATGTTTGTGATGGGCGTGA	504
	TGATATTCTGGGCAGCCCCT	

BLV 각 유전자들의 PCR 증폭은 50 ng genomic DNA에 1× buffer, 1.5 mM MgCl2 buffer, 0.2 mM dNTP, 각 gene의 forward와 reverse oligonucleotide primer 각각 10 pmol, 1.5 units AmpliTaq Gold DNA polymerase(Applied Biosystems, USA)와 멸균수를 첨가하여 총 25 μl 용량으로 반응하였다. PCR 반응조건은 최초 denaturation으로 95℃에서 10분간 반응시킨 후, 95℃에서 1분, 61℃에서 30초, 72℃에서 30초를 34회 반복하였으며, 각 cycle마다 2초씩 증가하였고 마지막으로 55℃에서 2분, 72℃에서 4분간 반응한 후 4℃에서 종료하였다. 증폭된 각각의 PCR product들은 2% agarose gel에 전기 영동하여 증폭여부 및 크기를 확인하였다.

2) ELISA 기법을 이용한 BLV 감염진단방법

ELISA 기법을 이용한 BLV 감염을 진단하기 위한 BLV 항체는 혈청 및 혈장용 CHEKIT-Leucotest kit(Dr. Bommeli AG., Switzerland)를 사용하여 측정하였다. 불활성화 된 BLV 항원(+Ag)과 대조항원(-Ag)이 교대로 코팅된 96 well plate에 10배 희석한 (pH 5.5~6.0) 세척·희석액 (CHEKIT-washing & dilution solution, CWDs) 180 μl를 분주한 후 가검 혈청과 양성 및 음성대조혈청을 각각

well에 20 μl씩 첨가하여 10배 희석하였다. CWDs와 혈청을 잘 혼합한 후 plate를 덮어 항습배양기에서 90분 동안 실온(18~20℃)에서 배양한 후 내용물을 버리고 well당 300 μl CWDs를 넣어 3회 세척하였다. Peroxidase로 표지한 anti-ruminant IgG conjugate를 CWDs로 1:400으로 희석한 후 200 μl씩 넣고 실온의 항습배양기에서 30분 동안 배양한 후 300 μl의 CWDs로 3회 세척하였다. 발색을 위해 chromogen substrate를 200 μl씩 분주하고 실온에서 10~30분간 정치한 후 spectrophotometer(Spectra Rainbow, Teacan, USA)로 405 nm 파장에서 optical density (OD) 값을 측정하여 양성대조혈청의 순흡광도(Net extinction, NE)가 0.4이상일 때 stop solution을 50 μl씩 분주하여 반응을 중지시킨 후 OD값을 측정하였다. 양성 및 음성대조구와 가검재료의 NE 값은 각각 +Ag이 코팅된 well에서 얻은 OD값으로부터 -Ag이 코팅된 well에서 얻은 OD값을 빼서 계산하였다. 재료내의 BLV에 대한 항체 유무는 다음과 같은 계산식으로 산출하여 얻은 값으로 판정하였다. BLV 항체의 유무는 S/P 값이 30% 이하 일 때 음성, 30% 이상일 때 양성으로 판정하였으며, S/P Value 값의 계산식은 아래와 같다.

$$\text{S/P Value}(\%) = \frac{NE_{sample} - NE_{neg}}{NE_{pos} - NE_{neg}} \times 100$$

여기서,

Net extinction(NE) = (OD+Ag) - (OD-Ag)

NEsample : 혈청시료의 NE

NEpos. : 양성표준혈청(control-serum positive)의 NE

NEneg. : 음성표준혈청(control-serum negative)의 NE

3. PCR과 ELISA 기법간 BLV 진단율의 일치도 검정

PCR과 ELISA 기법간의 BLV 진단율의 일치의 정도를 알아보기 위해 Kappa통계량을 사용하였으며, 두 BLV 진단기법에 대한 일치의 정도인 Kappa치는 -1.0(완전불일치), 0.0(우연일치) 그리고 +1.0(완전일치)까지의 범주를 갖는다. 검사법사이의 kappa치는 0.0-0.2는 미약한 일치, 0.2-0.4는 약간의 일치, 0.4-0.6은 중등의 일치, 0.6-0.8은 상당한 일치, 그리고 0.8-1.0은 거의 완전한 일치로 판단하며 이의 계산식은 아래와 같다(Cohen, 1960; Carletta, 1996).

$$k = \frac{\Pr(a) - \Pr(e)}{1 - \Pr(e)}$$

여기서,

Pr(a) : ELISA 진단과 PCR 진단 결과 BLV 양성인 sample의 비율

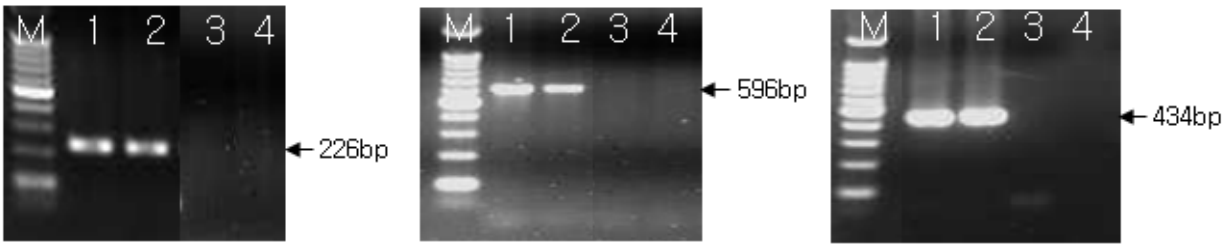
Pr(e) : ELISA 진단과 PCR 진단 결과 음성인 sample의 비율

III. 결과 및 고찰

1. PCR기법을 이용한 BLV 유전자의 전기영동양상

홀스타인종 젖소 BLV 유전자의 증폭 및 감염유무를 확인하기 위하여 BLV gag, pol 및 env 유전자를 PCR 기법을 이용하여 증폭한 결과는 Fig. 1에 나타낸 바와 같다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 BLV gag, pol 및 env 유전자의 증폭산물이 lane 1과 2에서 각각 226 bp, 596 bp 및 434 bp의 크기로 잘 증폭되었음을 확인할 수 있었다. 이는



1) Gag 2) Pol 3) Env

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis patterns of BLV gag, pol and env gene products using PCR in Korean Holsteins. M: 100 bp DNA ladder marker (ELPIS, Korea), lane 1, 2 : BLV positive samples, lane 3, 4 : BLV negative samples, panel 1: gag gene; panel 2: pol gene; panel 3: env gene.

Sagata 등(1985)이 보고한 BLV gag, pol 및 env 유전자의 증폭양상이 각각 226 bp, 596 bp 및 434 bp라고 보고한 결과와 잘 일치하였다. 또한, 이들 유전자의 증폭산물이 BLV 유전자와 일치되는 것인지를 확인하기 위해 BLV 각 유전자를 sequencing하여 NCBI에 보고된 BLV sequence와 비교한 결과 BLV gag, pol 및 env 유전자의 sequence와 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 젖소의 BLV 감염 여부의 진단은 PCR기법에 의한 이들 유전자의 증폭과 전기영동양상에 의거 BLV 유전자의 종류와 신속한 BLV 감염여부의 확인이 가능함을 알 수 있었다.

2. PCR과 ELISA 기법의 목장별 BLV 감염분포

충청남북도 소재 5개 젖소목장(U, S, T, C, 및 D)에서 사육중인 193두의 홀스타인종 젖소에 대한 BLV감염유무를 확인하기위하여 PCR과 ELISA 기법에 의한 진단 결과는 Table 2와 같다.

5개 목장(U, S, T, C 및 D) 193두에 대한 PCR 기법에 의한 BLV 감염여부를 진단한 결과 168두의 젖소가 BLV에 감염된 것으로 확인되어 평균 87.05%의 매우 높은 감염률을 보였다. 한편, ELISA 기법에 의한 BLV 감염여부의 진단결과는 5개 목장 총 193두 중 BLV 양성(+)이 122두이고 음성(−)이 71두로 BLV 양성률은 63.21%로 이는 PCR 기법의 BLV 감염률 87.05%보다 낮은 수치를 보였다.

이와 같은 결과는 ELISA 기법에 의한 BLV 진단결과 우리나라 젖소의 전국 평균 감염률은 54.2%, 지역별 BLV 감염률의 범위 50~70% 보다는 PCR기법의 경우에는 아주 높은 감염률을 보인 반면 ELISA 기법은 다소 높은 수치를 보였다(서, 2004). PCR기법에 의한 젖소목장별로 BLV 감염진단 결과를 살펴보면 U, S, T, C 및 D 목장의 BLV 감염률은 각각 100, 80.55, 84.46, 91.30 및 84.84%로 각 목장의 BLV 감염률은 대체로 높은 수준을 보였다. 한편, 젖소 목장별로 BLV 감염률을 비교하여 보면 S목장이 조사두수 36두 중 29두가 BLV에 감염되어 80.55%로 가장 낮은 감염률을 보여 U목장의 100% 간에는 유의적인 차이($P<0.05$)를 보였으나 T, C 및 D목장의 BLV 감염률의 범위는 84.84~91.30%로 이들 젖소목장 간에는 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 그리고 ELISA 기법에 의한 젖소목장별 BLV 감염진단 결과를 살펴보면 U, S, T, C, 및 D목장의 BLV 양성률은 각각 75.00, 22.22, 59.61, 86.95 및 77.27%로 S목장을 제외하고 다른 목장들은 대체로 높은 수준의 BLV 양성률을 보였다. 한편, 젖소 목장별 BLV 양성률을 비교하여 보면 S목장은 조사두수 36두 중 8두가 BLV 양성으로 22.22%의 양성률을 보여 다른 목장들과는 유의적인 차이($P<0.05$)로 낮은 양성률을 보였다. 그러나 T목장의 BLV 양성률은 59.61%로 C목장의 86.95%간 에는 유의적인 차이($P<0.05$)를 보였으나, U 및 D목장의 BLV 양성률 75.00 및 77.27% 간 에는 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이와 같이 젖소목장 간에 BLV 감염률에 차이를 보이는 것은 목장관리에 있어서 목장주의 질병에 대한 방역 및 위생관리 등과 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다. 또한, PCR 기법과 ELISA 기법에 의한 BLV 진단 결과는 조사된 5개 목장 총 193두에 대한 BLV 감염진단 분포에 있어서 BLV 양성우 두수는 각각 168두와 122두로 양성률은 각각 87.05%와 63.21%로서 두 기법 간에 23.84%의 차이를 보였다. 이와 같은 결과는 ELISA 기법의 경우 젖소에서 BLV가 감염된 후 일정기간의 잠복기가 지나야만 생성되는 항체의 유무로 판단하기 때문에 BLV에 감염되었어도 일정기간이 지나지 않은 경우에는 항체가 생성되지 않아 BLV 음성(−)으로 판정될 수 있다. 그러나 PCR 기법에 의한 BLV 감염진단

Table 2. Distribution of BLV infections using PCR and ELISA techniques in dairy cattle farms.

Dairy cattle farm	No. of individual	PCR		ELISA	
		No. of infection	%	No.of infection	%
U	16	16	100.00±0.00a	12	75.00±0.07ab
S	36	29	80.55±0.07b	8	22.22±0.02c
T	52	46	88.46±0.04ab	31	59.61±0.07b
C	23	21	91.30±0.06ab	20	86.95±0.11a
D	66	56	84.84±0.04ab	51	77.27±0.05ab
Total	193	168	87.05±0.02	122	63.21±0.03

* Same letters in superscripts of % represent non-significant at level of $P < 0.05$.

Table 3. Kappa statistics of consistency between PCR and ELISA techniques for diagonosis of BLV infection in Holstein dairy cattle.

Dairy cattle farm	PCR+		PCR-		Kappa statistics
	ELISA+	ELISA-	ELISA+	ELISA-	
U	12	4	0	0	0.000
S	8	21	2	5	-0.005
T	31	15	3	3	0.093
C	20	1	1	1	0.452
D	51	5	2	8	0.633
Total	122	46	8	17	0.246

은 감염과 동시에 BLV 유전자에 의해 감염여부의 진단이 가능하기 때문에 ELISA 기법보다 PCR 기법에 의한 BLV 양성율이 높게 진단된 것으로 사료된다.

3. PCR과 ELISA 기법간의 BLV 진단율의 일치도

PCR 기법과 ELISA 기법 간의 BLV 진단율의 일치도를 알아보기 위한 Kappa statistics를 분석한 결과는 Table 3과 같다. PCR 기법과 ELISA 기법 간의 목장별 BLV진단 양성율에 대한 일치도인 Kappa 통계치는 S, U 및 D목장이 각각 -0.005, 0.000 및 0.093의 아주 낮은 수치로 두 BLV 진단기법 간에 극히 미약한 일치의 정도를 보였다. 그러나 C 및 D목장의 경우 Kappa 통계치는 각각 0.452 및 0.633으로 중등도의 일치와 상당한 일치를 보여 두 기법 간에 BLV 양성율 진단에 상당한 일치를 보였다. 한편, 5개 젖소목장의 Kappa 통계치의 평균은 0.246으로 PCR 기법과 ELISA 기법 간의 BLV감염진단율의 일치도는 다소 낮은 약간의 일치를 보였다. 이러한 결과는 ELISA 기법은 BLV항체 생성유무에 의한 진단기법으로 BLV가 감염된 후 일정기간의 잠복기가 지나야만 항체가 생성되기 때문에 BLV에 감염되었어도 일정기간이 지나지 않은 경우에는 항체가 생성되지 않아 BLV음성(-)으로 판정될 수 있기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 PCR기법은 젖소에 감염된 BLV 유전자를 직접 증폭시켜 진단하는 기법으로 ELISA기법으로는 진단하기 어려운 BLV 감염 초기에도 진단이 가능하여 비교적 빠른 시간과 높은 정확성으로 감염우를 진단할 수 있기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 PCR 기법과 ELISA 기법 간의 BLV감염진단율의 일치도가 낮은 것으로 판단되어 젖소의 BLV감염진단시 ELISA 기법에 비하여 PCR기법을 이용하는 것이 진단율의 정확도를 증대시킬 수 있을 것으로 사료된다.

IV. 결 론

본 연구는 젖소의 생산성에 지대한 영향을 미치는 것으로 알려진 소 백혈병의 원인균인 bovine leukemia virus (BLV)의 감염에 대한 목장의 실태를 파악하고, PCR기법과 ELISA기법 간의 BLV 감염진단에 대한 정확도를 비교하고자 수행하였다. 공시재료는 충청남북도 소재의 5개 젖소목장(U, S, T, C 및 D)의 홀스타인종 젖소 193두의 혈액으로부터 BLV유전자 및 혈청을 분석하여 얻어진 결과는 다음과 같다.

젖소에 감염된 BLV유전자를 PCR기법을 이용하여 증폭한 결과 gag, pol 및 env 유전자가 각각 226bp, 596bp 및 434 bp로 잘 증폭되었음을 확인할 수 있었다. PCR과 ELISA 기법에 의한 5개목장의 BLV진단 감염율의 법위는 각각 80.55~100%와 22.22~86.95%로 두 기법 모두 5개 목장 간에 유의차인 차이를 보였다($P<0.05$). 또한, PCR과 LIASA기법에 대한 5개목장의 BLV진단 감염율의 평균은 각각 87.05%와 63.21%로 PCR기법이 23.84%가 높았다. PCR과 LIASA기법간의 BLV진단 감염율에 대한 Kappa Statistics에 의한 평균 일치도는 0.246으로 두 기법간에 약간의 일치만을 보였다. 따라서 홀스타인종 젖소에 있어서 PCR기법이 ELISA기법보다 BLV감염진단의 정확도를 증대시킬 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업(과제번호:200 70404031)의 지원에 의하여 이루어진 연구결과의 일부이며 연구비지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Carletta J. 1996. Assessing agreement on classification tasks: The Kappa statistic. Computational Linguistics 22: 249-254.
2. Cohen J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. Educational and Psychological Measurement 20: 37-46.
3. Da Y, Shanks RD, Stewart JA, Lewin HA. 1993. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 6538-6541.
4. Eaves FW, Molloy JB, Dimmock CK, Eaves LE. 1994. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. Vet. Microbiol. 39: 313-321.
5. Fechner H, Kurg A, Geue L, Blankenstein P, Mewes G, Ebner D, Beier D. 1996. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. J. Vet. Med. B. 43: 621-630.
6. Gibson LA. 1995. Testing for enzootic bovine leukosis. Vet. Rec. 136: 156-159.
7. Hoff-Jorgensen R. 1989. An international comparison of different laboratory tests for the diagnosis of bovine leukosis: suggestions for international standardization. Vet. Immunol. Immunopathol. 22: 293-297.
8. Jacobs RM, Song Z, Poon H, Heeney JL, Taylor, Jefferson B, Vernau W, Valli VE. 1992. Proviral detection and serology in bovine leukemia virus-exposed normal cattle with lymphoma. Can. J. Vet. Res. 56: 339-348.
9. Klintevall K, Naslund K, Svedlund G, Hajdu L, Linde N, Klingeborn B. 1991. Evaluation of anindirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. J. Virol. Methods. 33: 319-333.
10. Mirsky ML, Olmstead C, Da Y, Lewin HA. 1998. Reduced bovine leukaemia virus proviral load in leuktically resistant cattle. Anim Genet. 29: 245-252.
11. Molloy JB, Walker PJ, Baldock FC, Rodwell BJ, Cowley JA. 1990. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine leukaemia virus p24 antibody in cattle. J. Virol. Methods. 28: 47-57.
12. Sagata N, Yasunaga T, Tsuzuku-Kawamura J, Ohishi K, Ogawa Y, Ikawa Y. 1985. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 677-681.
13. Shu GH. 2004. Establishment of a bovine leukemia virus-free dairy herd. Cheunnam National University, Ph D. Thesis.
14. Xu A, van Eijk MJ, Park C, Lewin HA. 1993. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. J. Immunol. 151: 6977-6985.