

< Short Communication >

## 경기도 북부지역 젖소 사육농장의 bovine leukemia virus 감염 실태 조사

정 광\* · 심항섭 · 백진주

경기도북부축산위생연구소

### Investigation of bovine leukemia virus infection in dairy farms of northern Gyeonggi province, Korea

Kwang Jung\*, Hang-Sub Shim, Jin-Joo Baek

Gyeonggi Province Northern Livestock & Veterinary Service, Yangju 482-020, Korea

(Received 27 August 2012; revised 4 December 2012; accepted 7 December 2012)

#### Abstract

This study was carried out to investigate the prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection and to compare the results of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nested polymerase chain reaction (nPCR) in dairy farms in northern Gyeonggi province from August through December 2011. A total of 625 dairy cattle from 14 dairy farms were tested for antibodies against BLV using commercially available ELISA test kit. The overall seroprevalence of BLV infection was 76.3%. The seroprevalence of dairy cattle according to age was the highest at 61~72 months (88.0%,  $P<0.001$ ). Two hundred fifty one dairy cattle from 7 dairy farms were tested ELISA and nPCR. The kappa value of BLV between ELISA and nPCR was 0.765. The results indicate that BLV infection spread widely in dairy farms and the nPCR is rapid method for the early detection of BLV infection.

**Key words :** Bovine leukemia virus (BLV), Dairy cattle, ELISA, PCR

#### 서 론

소 류코시스병(Enzootic bovine leukosis, EBL)의 원 인체는 bovine leukemia virus (BLV)이며, 주로 성우에 서 발생하는 혈액종양성 질병이다(Levkut 등, 1994). BLV에 감염된 소는 대부분 무증상형으로 진행된다. BLV에 감염 후 30~70%의 소가 지속적 림프구 증가 증(persistent lymphocytosis, PL)을 일으키고, 1~5%는 림프육종을 유발한다(Schwartz와 Lévy, 1994; Burny 등, 1985). 임상형인 림프육종은 3세 이상의 소에서 특히 5~8세의 소에서 주로 나타난다(Marchak 등, 1962).

BLV의 진단법에는 agar gel immunodiffusion (AGID)

(Kono 등, 1982; Trono 등, 2001), enzyme-linked immu- nosorbent assay (ELISA)(Asfaw 등, 2005; Martin 등, 2001), polymerase chain reaction (PCR) (Klintevall 등, 1994; Kuckleburg 등, 2003) 등이 이용되고 있다. 혈청학적 검사 에서 ELISA가 AGID보다 민감도 더 높은 것으로 보고되 고 있으며(Wang, 1991; Simard 등, 2000), PCR은 감염 초 기 항체가 형성되기 이전에 항원을 검출하는데 효과적이 다(Klintevall 등, 1994; Kuckleburg 등, 2003).

국내에서 Chu 등(2007)은 ELISA를 사용하여 전북 익산지역의 젖소 항체 양성률을 89.6%로 보고하였고, Suh 등(2003)은 ELISA를 이용하여 전국적인 젖소의 항체 양성률을 54.2%로 보고하였으며, Shim 등(1998) 은 AGID를 사용하여 경기도 젖소의 항체 양성률을 28.2%로 보고하였다. 이처럼 전국적 또는 지역적 BLV 조사에서 높은 항체 양성률을 보이고 있다. 따

\*Corresponding author: Kwang Jung, Tel. +82-31-8008-6463, Fax. +82-31-8008-6405, E-mail. [vetjk@gg.go.kr](mailto:vetjk@gg.go.kr)

라서 이번 연구에서는 BLV 감염농장의 동거축 검사를 통하여 농장 내 감염상태를 파악하고, ELISA와 nested PCR (nPCR)의 검사방법에 따른 결과를 비교하여 BLV 방역대책에 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 공시동물

2011년 8월부터 12월까지 경기도 북부지역 4개 시·군 젖소 사육농가의 도축장 출하축에 대한 류코시스병 조사 및 농가 질병검사에서 양성으로 판정되어 동거축 검사를 한 연천군, 양주시, 파주시, 고양시 소재 14농가 625두의 혈액을 항체검사에 사용하였고, 혈액 중 7농가 251두는 항체검사와 항원검사를 병행 시행하였다.

### 혈액시료 및 DNA 분리

공시동물로부터 항체검사를 위하여 미정맥에서 혈액 4 ml을 채취하여 혈청 분리 후 검사 전까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 보관하였다가 사용하였고, 항원검사를 위하여 따로 4 ml을 sodium heparin (BD Vacutainer<sup>®</sup>, USA)이 들어 있는 튜브에 채취하여 아이스박스에 넣은 후 실험실로 이동하였고, Viral gene-spin<sup>™</sup> viral DNA/RNA extraction kit (Intron Biotechnology, Korea)를 사용하여 전혈에서 DNA를 분리하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 보관 후 사용하였다.

### ELISA

소류코시스병에 대한 항체검사는 Bovine Leucosis virus Antibody Test Kit (IDEXX, Switzerland)를 이용하여 제조회사에서 공급하는 실험방법에 따라 실시하였다. ELISA reader (Sunrise, TECAN, Switzerland)를 이용하여 450 nm의 파장에서 optical density (OD) 값을 측정하였다.

### nPCR

유전자 증폭기는 PTC-220 (Bio-rad, USA)를 사용하였다. 혈액 내 DNA 확인을 위한 PCR의 primer는 OBLV1A 5'-CCTGTGTGCCAAGTCTCCAGATACA-3'

와 OBLV6A 5'-CCAACATATAGCACAGTCTGGGAAGGC-3'를 사용하였고, nPCR의 primer는 OBLV3 5'-CTGTAAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGC-3'와 OBLV5 5'-GACAGAGGGAACCCAGTCACTGTTCAA CTG-3'를 사용하였다(OIE, 2008). PCR 반응은 Accu-Power<sup>®</sup> PCR Premix Kit (Bioneer, Korea)를 사용하였다. PCR의 예상증폭 크기는 440 bp이며 조건은 pre-denaturation은  $95^{\circ}\text{C}$  5분간 실시 후  $94^{\circ}\text{C}$  45초,  $60^{\circ}\text{C}$  60초,  $72^{\circ}\text{C}$  90초 총 5회 반응하고  $94^{\circ}\text{C}$  45초,  $55^{\circ}\text{C}$  60초,  $72^{\circ}\text{C}$  90초 총 30회 증폭시킨 후 post-polymerization은  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 실시하였다. PCR product를 DNA로 사용하여 nPCR을 수행하였다. nPCR의 예상증폭 크기는 341 bp이며 조건은 pre-denaturation은  $95^{\circ}\text{C}$  5분간 실시 후  $94^{\circ}\text{C}$  45초,  $58^{\circ}\text{C}$  60초,  $72^{\circ}\text{C}$  90초 총 5회 반응하고  $94^{\circ}\text{C}$  45초,  $53^{\circ}\text{C}$  60초,  $72^{\circ}\text{C}$  90초 총 30회 증폭시킨 후 post-polymerization은  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 실시하였다. 증폭된 nPCR 산물은 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ethidium bromide (Bioneer, Korea)가 함유된 2% agarose gel로 전기영동하여 UV transilluminator로 특이 밴드 증폭 유무를 확인하였다.

### 통계 분석

통계분석은 SPSS (statistical package for the social sciences, V.20.0)을 이용하였다. BLV 연령별 항체 양성률의 유의성을 검정하기 위하여 Chi-square test를 실시하였다.

소 혈액을 대상으로 한 ELISA와 nPCR의 민감도와 특이도를 비교하였다. 이들 두 검사 사이의 일치도는 Cohen's Kappa 분석을 실시하였다(Fleiss와 Cohen, 1973).

## 결 과

### 항체 양성률

경기도 북부지역 도축장 출하축 및 농장 질병 검사에서 소류코시스병 양성 판정된 젖소 사육농장의 동거축 감염상태를 조사하기 위하여 총 14농가 625두를 대상으로 검사를 한 결과, 477두에서 양성인 것이 평균 76.3%의 항체 양성률이 관찰되었다. 연령에 따른 BLV 항체 양성률은 유의성 있는 차이가 있었다( $P < 0.001$ ). 61~72개월령에서 88.0%로 가장 높았

**Table 1.** Seroprevalence of bovine leukosis in dairy cows according to age

Age (month)	No. of serum	No. of positive	Prevalence (%)
13~24	21	17	80.9*
25~36	139	80	57.5*
37~48	147	109	74.1*
49~60	123	104	84.5*
61~72	75	66	88.0*
73~84	64	55	85.9*
85~96	34	28	82.3*
≥97	22	18	81.8*
Total	625	477	76.3

\*Significant statistical difference ( $P < 0.001$ ).

고 25~36개월령에서 57.5%로 가장 낮았다(Table 1).

### ELISA와 nPCR 결과 비교

7농가 251두의 ELISA와 nPCR 검사결과는 Table 2와 같았다. ELISA에서 양성인 시료 196개 중 nPCR 검사 결과 178개 시료에서 양성으로 확인되어 민감도는 90.8%이었으며, ELISA에서 음성인 55개 시료에 대한 nPCR을 적용한 결과 51개 시료에서 음성으로 확인되어 특이도는 92.7%이었다. 그리고 ELISA에서 확인된 양성과 음성 시료에 대한 nPCR의 정확도는 91.2%이었다. ELISA와 nPCR의 검사 일치도(Kappa)는 0.765이었다.

## 고 찰

이번 연구에서 젖소 사육 14농가 625두의 BLV의 항체 양성률은 76.3%였는데 이는 Suh 등(2003)의 전국적인 개체별 항체 양성률 36.7~67.9%보다는 높았고, Chu 등(2007)의 전라북도 익산, 군산지역 개체별 항체 양성률 89.6%보다는 낮았다.

연령에 따른 항체 양성률의 차이는 연구자에 따라 차이가 있다. Murakami 등(2011)은 일본의 젖소에서 연령에 따라 BLV 항체 양성률의 차이가 있다고 보고하였고, Suh 등(2003)은 국내 젖소의 연령에 따른 항체 양성률 차이가 없다고 보고하였다. 이번 연구에서는 연령에 따라 BLV 항체 양성률의 차이가 있는 것으로 확인되었다. BLV 양성축의 초유를 통한 송아지의 모체이행항체는 6개월까지 지속하며(Burridge 등, 1982), BLV 감염 위험으로부터 송아지를 보호해준다(Nagy 등, 2007). BLV 감염률이 높은 농장에서 모체

**Table 2.** Relationship between the results of the ELISA and nPCR of 251 dairy cows

ELISA results	nPCR results		Total	Kappa index
	Positive	Negative		
Positive	178	18	196	0.765
Negative	4	51	55	
Total	182	69	251	

이행항체가 소실되는 6개월령 이후 송아지는 감염에 쉽게 노출될 수 있다. 이 연구의 13~24개월령에서 80.9%의 높은 항체 양성률을 보이는 것은 BLV 감염률이 높은 농장에서 모체이행항체가 소실된 이후 감염된 것으로 추정된다. Emanuelson 등(1992)은 BLV 감염축은 음성축보다 질병 발생률과 도태율이 높다고 보고하였고, Thurmond 등(1985)은 BLV 항체 음성축은 항체 양성축보다 3.5년 더 오래 생존한다고 보고하였다. 이 연구에서 61~72개월령 88.0%, 73~84개월령 85.9%, 85~96개월령 82.3%, 97개월령 이상 81.8%로 연령이 증가함에 따라 항체 양성률이 조금씩 감소하는 이유는 BLV 감염축이 도태되기 때문이라고 추정된다.

검사 일치도(Kappa)의 해석은 0.41~0.60은 일치도 보통(moderate agreement), 0.61~0.80은 일치도 높음(substantial agreement), 0.81~1.00은 일치도 매우 높음(almost perfect agreement)으로 판정한다(Landis와 Koch, 1977). 이번 연구의 ELISA와 nPCR의 결과 비교에서 검사 일치도(Kappa)는 0.765로 높은 일치도를 확인할 수 있었다.

BLV 감염초기에 혈청검사와 PCR 진단 비교연구에서 Klintevall 등(1994)은 BLV를 실험적으로 감염시킨 후 7일에 PCR에서 첫 검출, 26일에 항체가 검출된다고 보고하였고, Kelly 등(1993)은 실험적 감염에서 BLV를 혈청검사보다 PCR에서 2~4주 일찍 검출할 수 있다고 보고하였다. 이번 연구의 nPCR 양성, ELISA 음성 4두는 감염초기라서 혈액 내에서 BLV가 검출되었지만, 항체는 검출되지 않은 것으로 판단된다.

이 연구의 ELISA와 nPCR의 결과 비교에서 ELISA 양성, nPCR 음성 개체는 18두로 관찰되었다. 혈액에서 BLV PCR 진단을 위한 DNA 추출 재료는 peripheral blood mononuclear cells (PBMC), buffy coat, 전혈을 사용할 수 있다(OIE, 2008). BLV는 감염축의 림프구에 provirus 형태로 존재하므로(Mirsky 등, 1996), 여러 연구자가 PBMC에서 DNA를 추출하여 PCR 검사

를 하였다(Asfaw 등, 2005; Kuckleburg 등, 2003; Martin 등, 2001; Klintevall 등, 1994). 이번 연구에서는 전혈에서 DNA를 추출하여 nPCR 검사를 하였으나, 전혈에서 PBMC를 추출하고 DNA를 분리한 후 nPCR 검사를 할 경우 BLV의 nPCR 진단율이 더 높을 것으로 판단된다.

## 결 론

이번 연구는 2011년 8~12월까지 도축장 출하축 조사와 농가 질병검사서에서 양성으로 판정되어 동거축 검사를 한 경기도 북부지역 14농가 625두에 관한 결과이며, 76.3%의 항체 양성률이 관찰되었다. 연령별 항체 양성률은 37개월령 이상에서 74.1~88.0%로 관찰되었고, 61~72개월령에서 88.0%로 가장 높게 관찰되었다. 7농가 251두의 ELISA 및 nPCR 결과 비교에서 정확도는 91.2% (229/251)이었고, 검사 일치도 (Kappa)는 0.765로 높은 일치도를 확인할 수 있었다. 항체가 형성되지 않은 감염초기 개체를 검출하기 위해 발생농장 검사 시 항체검사와 nPCR 검사를 병행 시행해야 할 것으로 생각한다.

## 참 고 문 헌

- Asfaw Y, Tsuduku S, Konishi M, Murakami K, Tsuboi T, Wu D, Sentsui H. 2005. Distribution and superinfection of bovine leukemia virus genotypes in Japan. *Arch Virol* 150: 493-505.
- Burny A, Bruck C, Cleuter Y, Couez D, Deschamps J, Gregoire D, Ghysdael J, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D. 1985. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Onderstepoort J Vet Res* 52: 133-144.
- Burridge MJ, Thurmond MC, Miller JM, Schmerr MJ, Van Der Maaten MJ. 1982. Duration of colostral antibodies to bovine leukemia virus by two serologic tests. *Am J Vet Res* 43: 1866-1867.
- Chu KS, Hyong SG, Im JC, Seo LW. 2007. Seroprevalence of infection with *Neospora caninum*, *Mycobacterium paratuberculosis*, bovine leukosis and *Brucella abortus* of dairy cattle in Jeonbuk-Iksan area. *Korean J Vet Serv* 30: 95-102.
- 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.
- Fleiss JL, Cohen J. 1973. The equivalence of weighted kappa and the intraclass correlation coefficient as measures of reliability. *Educational and Psychological Measurement* 33: 613-619.
- Kelly EJ, Jackson MK, Marsolais G, Morrey JD, Callan RJ. 1993. Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. *Am J Vet Res* 54: 205-209.
- Klintevall K, Ballagi-Pordány A, Näslund K, Belák S. 1994. Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet Microbiol* 42: 191-204.
- Kono Y, Sentsui H, Miyamoto T, Morozumi K, Sakamoto Y. 1982. Changes in antibody titers in cattle infected clinically and subclinically with bovine leukemia virus. *Int J Cancer* 30: 655-657.
- Kuckleburg CJ, Chase CC, Nelson EA, Marras SA, Dammen MA, Christopher-Hennings J. 2003. Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions. *J Vet Diagn Invest* 15: 72-76.
- Landis JP, Koch GG. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174.
- Levkut M, Plank L, Levkutova M, Konrád V. 1994. Monoclonal cytoplasmic immunoglobulin and pathomorphological reactions in lymph nodes in spontaneous bovine leukemia virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 40: 163-170.
- Marchak RR, Coriell LL, Lawrence WC, Croshaw JE Jr, Schryver HF, Altera KP, Nichols WW. 1962. Studies on bovine lymphosarcoma. I. Clinical aspects, pathological alterations, and herd studies. *Cancer Res* 22: 202-217.
- Martin D, Arjona A, Soto I, Barquero N, Viana M, Gómez-Lucía E. 2001. Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48: 97-106.
- Mirsky ML, Olmstead CA, Da Y, Lewin HA. 1996. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. *J Virol* 70: 2178-2183.
- 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.
- Nagy DW, Tyler JW, Kleiboeker SB. 2007. Decreased periparturient transmission of bovine leukosis virus in colostrum-fed calves. *J Vet Intern Med* 21: 1104-1107.
- OIE. 2008. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animal. Chapter 2.4.11. Enzootic bovine leukosis. <http://www.oie.int>.
- Schwartz I, Lévy D. 1994. Pathobiology of bovine leukemia virus. *Vet Res* 25: 521-536.
- Simard C, Richardson S, Dixon P, Bélanger C, Maxwell P. 2000. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel im-

- munodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. *Can J Vet Res* 64: 101-106.
- Shim HS, Kook JH, Hwang YO, Lee MR, Jung BS, Kim HY, Kang SK, Yoo SJ, Lim KA, Ko TO, Park YS. 1998. Seroepizootiological survey on bovine leukosis of dairy cattle in Kyunggi province. *Korean J Vet Serv* 21: 255-260.
- Suh GH, Lee CG, Lee CY, Hur TY, Kang SJ, Son DS, Ryu IS, Ahn BS, Kim NC, Joo YS. 2003. Prevalence of anti-bovine leukemia virus antibodies in dairy and Korean native cattle. *J Vet Clin* 20: 172-176.
- Thurmond MC, Maden CB, Carter RL. 1985. Cull rates of dairy cattle with antibodies to bovine leukemia virus. *Cancer Res* 45: 1987-1989.
- Trono KG, Pérez-Filgueira DM, Duffy S, Borca MV, Carrillo C. 2001. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol* 83: 235-248.
- Wang CT. 1991. Bovine leukemia virus infection in Taiwan: evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion test. *Jpn J Vet Res* 39: 107-115.