

젖소에서 소 백혈병 진단법의 효과적 활용

윤충근 · 정호경 · 선우선영 · 류영수¹

건국대학교 수의과대학

(게재승인: 2010년 5월 25일)

Effective Application of Diagnostics for Bovine Leukemia Virus in Dairy Cattle

Choong-Keun Youn, Ho-Kyoung Jung, Sun-Young Sunwoo and Young S. Lyoo¹

College of Veterinary Medicine, Konkuk Unoversity, Seoul 143-701

Abstract : Bovine leukemia virus (BLV) is a delta-retrovirus which causes chronic lymphocytosis in cattle. BLV infections have been divided into two groups such as enzootic bovine leukosis (EBL) and sporadic bovine leukosis (SBL) according to the clinical symptoms in infected cattle. The conventional detection method of BLV was hematological procedure which is determining lymphocytosis in the suspected animals. Recently several sensitive methods were developed to detect antibody to BLV and nucleic acid of the BLV from infected cattle. In this study we have compared the difference of positive rates between agar gel immunodiffusion (AGID) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) which are using for BLV antibody detection methods. The positive detection rate of ELISA test was 7.4% greater than the positive rate of AGID. The discrepancy of the positive rate between ELISA and AGID were showed in the group of age over one year old to under three year old group. The result from each test agreed very well in the group of over 5 year old cattles. The serological test is very useful method to select the infected cattle for the eradication or control of the disease in the infected herd. But it has a limit by interference of the maternal antibody from the cow of under 6 month old. This study shows that 16.2% of these ages group showed BLV gene positive by polymerase chain reaction (PCR) method. The result suggests that ELISA test need to be used with PCR to clarify misinterpretation of positive animals by antibody response due to the natural infection from maternally derived antibody in calves of under 6 months old.

Key words : Enzootic bovine leukosis, bovine leukemia virus (BLV), agar gel immunodiffusion test (AGID), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

서 론

소백혈병바이러스(Bovine leukemia virus, BLV)는 소에서 만성림프구 증가증을 일으키는 Retrovirinae과의 Deltaretrovirinae속의 C형 retrovirus이다. BLV는 사람에서 만성림프구 증가증을 보이는 T-림프구친화성바이러스(Human T-lymphotrophic virus, HTLV)와 비슷한 바이러스이다(22). BLV 감염에 의한 병증의 진행은 지방병성소백혈병(Enzootic bovine leukosis, EBL)과 산발성소백혈병(Sporadic bovine leukosis, SBL)으로 나타난다(26).

초기 BLV의 진단은 부검을 통한 종양확인 과 혈액내 림프구 증가로 인한 백혈구 수치의 상승을 확인하는 혈액학적 진단법이 이용되었으나(5), 1976년 Onuma 등(27)에 의해 BLV와 관련된 항원이 구명되면서부터 한천겔면역확산법(AGID)

(27), 보체결합반응법(CF) (24), 간접형광항체법(IFA) (12), 효소면역법(ELISA) (8,14), syncytium inhibition test (25) 등의 혈청학적 진단법이 보고되었다. 최근에는 BLV의 유전자를 진단하는 PCR법이 일반적으로 이용되고 있으며, real-time PCR을 이용한 진단 기법의 보고도 늘어가고 있다(4,19,20,33).

국내에서 BLV에 대한 조사는 손 등(2)이 1967년에 Goetze key, Bendixen key에 근거하여 감염우가 감염증상을 나타내기 전 림프구증다증이 먼저 온다는 혈액학적 검사법을 통해 6.3~8.3%가 양성임을 보고하였다. 1982년 최(7)는 AGID법을 이용한 혈청학적 조사를 실시하였으며, 젖소의 양성률이 28.3%, 한우의 양성률이 2.4%로 보고하였다. BLV 진단에 있어 혈청학적 검사(AGID)는 과거 혈액학적 진단과 비교하여 민감도 및 특이도가 높아 현재까지 공식적인 BLV 진단 및 방역에 활용되고 있다(9,13). 2003년 서 등(1)에 의해 ELISA법을 이용한 국내 BLV 항체 분포 조사결과 한우의 항체 양성률은 0.14%, 젖소의 항체 양성률은 54.2%로 보고되었다.

본 연구는 최근까지 소개된 다양한 BLV 진단법 가운데

¹Corresponding author.
E-mail : lyoo@konkuk.ac.kr

AGID, ELISA, PCR 진단법을 비교하고, BLV 감염군의 청정화를 위해 우선 선택해야 할 검사법을 확립하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

공시 우

충북 음성지방의 1개 목장에서 사육중인 홀스타인 젖소 164두를 연령에 관계없이 공시하였다.

혈액 채취 및 전처리

공시우를 보정한 후 꼬리정맥 또는 목정맥(Jugular vein)에서 채혈을 실시하고 혈액은 항응고제(K2 EDTA)가 포함된 vacutainer(Becton Dickinson, BD 367844, California, USA)와 혈청분리용 vacutainer(BD 367820)에 각각 3 ml씩 분주하였다. 채취 혈액은 신속히 실험실로 운송직후 항응고제가 포함된 vacutainer의 혈액은 DNA를 추출하여 효소중합연쇄반응(PCR)을 실시하였으며, 혈청분리용 vacutainer의 혈액은 혈청분리 후 AGID와 ELISA를 실시하였다.

항체검사

BLV 항체 검사는 AGID kit(BLV AGID Jenobitech, Korea)와 ELISA kit(CHEKIT Leucose serum, IDEXX, Switzerland)를 이용하였다.

AGID kit는 p24, gp51에 대한 항체를 검출할 수 있으며, 검사법은 제조사의 protocol에 따라 수행하였다. 지름 90 mm petri-dish에 2.6 mm 두께로 만든 겔에 7 well agar cutter를 사용하여 구멍을 뚫어 주변 4개 well에 혈청샘플 73 μ l를 넣고, 대각선상의 2개 well에 73 μ l의 양성대조 혈청을 넣었다. 중심 well에 항원액 32 μ l를 넣어 72시간 동안 실온의 항습상자에서 반응시킨 후 결과를 판독하였다.

ELISA kit에 의한 항체검사는 불활화된 BLV 항원이 코팅된 96well microplate에 제조사에서 제공한 표준양성혈청, 음성혈청, 공시 혈청을 각각 1/10희석하여 100 μ l씩 분주하고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 내용물을 버리고 300 μ l의 CHEKIT washing solution으로 3회 세척하고 100 μ l CHEKIT-anti-ruminant-IgG-PO conjugate를 각 well에 분주하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 내용물을 버리고 동일한 세척과정을 완료한 후 발색을 위해 100 μ l CHEKIT-TMB substrate를 넣고 실온에서 15분간 반응하고 추가로 100 μ l의 CHEKIT-Stop solution을 넣어 발색 반응을 중지시켰다. 결과 측정을 위해 ELISA reader (Sunrise, TECAN, Switzerland)의 450 nm 파장에서 optical density(OD)를 측정하였다.

ELISA 결과 판정은 제조사의 계산식($OD_{\text{sample}} - OD_{\text{negative}} / OD_{\text{positive}} - OD_{\text{negative}} \times 100$)에 따라 Value(%)값을 얻었다. BLV 항체 보유 유무의 판정은 <30%일 때 음성, $\geq 30\% \sim < 40\%$ 의 양성, $\geq 40\%$ 일 때 양성으로 판정하였다.

항원검사

6개월령 이하의 공시우를 대상으로 혈액 중 BLV proviral DNA 검사를 실시하였다. 혈액 중 DNA추출은 viral gene spin(Intron, Korea)을 이용하여 제조사의 방식에 따라 진행하였다. PCR primer(33)는 BLV genome의 long terminal repeat(TLR) region을 증폭할 수 있는 BLV-LTR256 (5'-GAGCTCTCTTGTCTCCCGAGAC-3'), BLV-LTR453 (5'-GAAACAAACGCGGGTGCAAGCCAG-3') 각 20 pmol, PCR master mix(i-taq polymerase, Intron, Korea)와 혼합하여 PCR기계에서 95°C 5분간 예비 denature 시킨 후, 96°C 30초 denature, 60°C 40초 annealing, 72°C 1분 extension 반응을 35회 실시하고, 최종적으로 72°C 5분 final extension 반응을 실시하였다. PCR 증폭을 완료한 산물 10 μ l를 1.5% agar gel에 전기영동(100v, 25분)한 후 Ethidium bromide로 염색하여 197bp의 증폭 DNA를 확인하였다.

통계분석

혈청검사 결과에 대한 통계학적 분석은 과거부터 사용한 AGID 검사 결과를 표준으로 하여 ELISA 검사법의 결과 사이의 민감도와 특이도를 피셔분석(Fisher analysis)을 통해 계산하였고, 두 검사법의 결과에 대한 동일성 분석은 계수형 kappa 통계량을 계산하였다. 모든 통계분석은 Excel(version 2007, Microsoft, USA)과 SPSS(version 10.0.7, SPSS INC., USA)를 사용하였다.

결 과

162두의 혈청을 AGID와 ELISA법을 이용하여 검사한 결과 AGID 검사에서 BLV 항체 양성 102두, 음성 60두로 양성률은 63.0%를 나타내었으며, ELISA 검사에서 BLV 항체 양성 114두, 음성 37두, 의양성 11두로 양성률은 70.4%(의양성은 음성으로 판정)로 나타났다. AGID와 ELISA검사법에 ELISA 항체 진단법의 양성 진단율이 7.4% 더 높게 나타났다.

공시우의 연령이 생후 1년 이상 3년 미만인 개체에서 AGID와 ELISA 검사간의 항체 양성률에 큰 차이를 보였다. 공시우의 연령에 따른 항체 양성률 비교에서 생후 1년 이상 2년 미만인 그룹에서 30%, 생후 2년부터 3년 미만의 그룹에서 9.6%로 ELISA 진단법의 양성률이 더 높게 나타났다. PCR 진단법을 이용한 BLV 유전자 진단율은 공시우 평균 25.3%의 양성률을 보였으며, 생후 1년 미만에서 14.5%, 생후 1년 이상부터 4년 미만까지 30%이상의 양성률을 보였으며 생후 4년 이상부터 양성률이 감소하였다(Table 1).

AGID와 비교한 ELISA kit의 특이도와 민감도를 ELISA 결과 의양성 수치를 나타내는 개체값을 제외하고 분석한 결과 AGID에서 BLV 항체 음성을 보였지만 ELISA에서 양성을 보인 경우가 13.9%로 나타났다. BLV-AGID(JENO.)항체 검사 결과와 비교한 BLV-ELISA(IDEXX)의 민감도는 93.9%, 특이도 59.6%, 양성예측도 81.6%, 음성예측도 83.8%로 나타

Table 1. Prevalence of BLV antibody and antigen positive cattle according to age

Age	Heads	AGID pos.(%)	ELISA pos.(%)	PCR pos.(%)
0 ~ < 1	55	25(45.5)	28(50.9)	8(14.5)*
1 ~ < 2	20	10(50.0)	16(80.0)	6(30.0)
2 ~ < 3	21	15(71.4)	17(81.0)	7(33.3)
3 ~ < 4	25	17(68.0)	17(68.0)	9(36.0)
4 ~ < 5	17	14(82.4)	15(88.2)	5(29.4)
5 ~ < 9	24	21(87.5)	21(87.5)	6(25.0)
Total	162	102(63.0)	114(70.4)	41(25.3)

*Under 6 months of age group: 16.2%.

Table 2. Relationship between the result of ELISA and AGID (except the serum suspect result in ELISA)

ELISA kit	AGID test		Total
	Positive	Negative	
Positive	93	21	114
Negative	6	31	37
Total	99	52	151

났다(Table 2).

BLV-AGID 항체 양성에 대한 ELISA 항체 양성률과, AGID 항체 음성에 대한 ELISA 항체 음성률의 비를 비교한 결과 두 검사법의 양성항체에 대한 동일성은 높았으나 항체 음성 샘플에 대한 동일성 낮게 나타났다. 고연령의 공시우에서는 kappa값이 1.00을 보이고 있어 두 검사법간의 결과의 차이가 없음을 나타내고 있다(Table 3).

고 찰

현재까지 BLV 감염을 판정하기 위한 다양한 진단법이 알려져 있으나 각각의 장단점이 있어 2가지 이상의 진단기법을 이용할 필요가 있다.

과거 혈액학적인 변화로 BLV의 감염을 진단하는 경우 소의 품종, 연령에 따라 백혈구 및 림프구의 정상 수치가 다소 차이가 있으므로 주의가 필요하며 다른 질병의 감염에 의한 일시적인 림프구증가와도 구별이 필요하다(28,31,34,35). 윤 등(3)이 유세포분석기(flowcyometer)와 단클론항체(Mab)를 이용하여 BLV감염우군과 비감염우군의 PBMC(Peripheral Blood Mononuclear Cells)를 분석한 결과 백혈구 증가를 보이지 않은 BLV감염우군의 경우 림프구의 변화가 없었으며, 백혈구증가증을 보이는 BLV감염우의 경우 CD5⁺과 B⁺ 림프구의 절대적 수치가 증가함을 보고하였다. 이를 다시 해석하면, 혈액세포를 이용한 BLV의 진단의 경우 백혈구증가증을 보이지 않는 BLV 감염우의 경우 확진을 하기 어렵다는 한계성이 있다.

항체 검출기법으로 AGID법은 1977년 표준 BLV 진단법

Table 3. Percentage of total negative and positive agreement between the AGID and ELISA and their corresponding kappa value according to age

Age	Percentage of total negative agreement	Percentage of total positive agreement	κ
0 ~ < 1	77.78	88.00	0.795
1 ~ < 2	22.22	100.00	0.222
2 ~ < 3	60.00	100.00	0.600
3 ~ < 4	50.00	82.35	0.607
4 ~ < 5	-	100.00	-
5 ~ < 9	100	100.00	1.000
Total	62.00	94.12	0.659

으로 제안된 이래 세계각국에서 유용하게 사용되고 있다(23). 그러나 최근에는 ELISA 및 PCR을 이용한 진단법이 많이 이용되고 있다. 일부 보고에서는 AGID법과 ELISA법의 민감도에 대해 동일한 진단결과를 보인다는 보고도 있지만(15,29,32), 본 연구 결과뿐 아니라 다른 보고에서 ELISA법이 항체 수준의 변화를 빠르게 진단하며, 적은 양의 항체를 진단하기에 더 우수하다고 평가한다(16,30). Simard 등(30)의 보고에 의하면 동일 양성 혈청에 대해 AGID 진단법의 검출 한계는 1/100 희석이었으나, ELISA검사법의 경우 1/4,000~1/20,000까지 검출이 가능하였다. 본 연구에서 생후 1년 이상 3년 미만의 그룹에서 AGID-ELISA의 양성률 차이가 발생하는 이유에 대해 감염초기 또는 낮은 항체 수준의 잠복기에 대한 검출 한계 차이로 생각된다. 민감도가 높은 ELISA 검사법은 다수의 혈청을 혼합한(pooled serum sample) 검사가 유효(17)하므로 청정우군 관리와 검사 비용의 경제적인 이득을 얻을 수 있다.

어린 송아지의 경우 AGID와 ELISA 검사법 등 혈청학적 진단을 실시할 경우 모체이행항체에 의한 혈청학적 양성 결과를 나타내므로 감별이 필요하다. BLV항체 양성우의 초유를 섭취할 경우 초유를 통한 모체이행항체 때문에 1~6개월 간 항체 양성을 보이며, BLV 감염이 없을 경우 일정 기간이 경과하면 항체 음성을 나타낸다(6,18). 따라서 6개월령 이전의 송아지에 대해서는 BLV 항원을 검출하는 진단 방법이 요구된다.

혈액중의 BLV 유전자 진단은 BLV 유전자의 *pol*, *env*, *tax* 등 다양한 부위에 대한 PCR 진단이 이루어지고 있고 민감도를 높이기 위한 nested PCR(nPCR) 또는 real-time PCR(rtPCR) 등 다양한 실험이 보고되고 있으며, 샘플 및 primer의 조건에 따라 검출률에 차이를 보이고 있다(4,10,11,19,21). ELISA법을 이용한 항체 진단은 감염후 항체가 형성되는 4~8주 후에 진단이 가능하지만 PCR진단법을 이용한 항원진단은 감염후 7일만에 감염을 진단할 수 있다(16). 본 연구에서 일반 PCR기법을 이용한 검출이었으나 nPCR 또는 rtPCR을 이용할 경우 BLV 유전자 양성률 진단율이 더 높게 나타날 것이다.

결론

BLV 청정화 작업을 위해서는 ELISA진단법을 이용한 혈청학적 진단과 PCR진단법을 이용한 항원진단이 병행될 필요가 있으며, 6개월령 이하의 송아지에서는 PCR 진단법을 이용한 도태우 선정이 우선되어야 한다.

참고 문헌

1. 서국현, 이정길, 이채용, 허태영, 강석진, 손동수, 류일선, 안병석, 김남철, 주이석. 우리나라 젖소 및 한우의 Bovine leukemia virus 항체 분포조사. *J Vet Clin* 2003; 20: 172-176.
2. 손제영, 김교준. Bovine lymphosarcoma (enzootic bovine leukosis)에 관한 연구: Bovine lymphosarcoma에 관한 대구 및 충남지방 유우군에 대한 혈액학적 조사. *대한수의학회지* 1968; 8: 31-38.
3. 윤순식, 배유찬, 주이석, 위성환, 이경우, 서국현, 박용호, 한홍윤. 소 백혈병 바이러스 감염 젖소 말초혈액중 림프구 아군 분포 분석. *J bacterial Virol* 2005; 35: 165-173.
4. Ballagi-Pordány A, Belák S. The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Mol Cell Probes* 1996; 10: 159-164.
5. Bendixen HJ. Bovine enzootic leukosis. *Adv Vet Sci Comp Med* 1965; 10: 129-204.
6. BurrIDGE MJ, Thurmond MC, Miller JM, Schmerr MJ, Van Der Maaten MJ. Duration of colostral antibodies to bovine leukemia virus by two serologic tests. *Am J Vet Res* 1982; 43: 1866-1867.
7. Choi WP. Survey for antibodies to bovine leukemia virus in dairy and Korean native cattle. *Korean J Vet Res* 1982; 22: 23-26.
8. De Giuseppe A, Feliziani F, Rutili D, De Mia GM. Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11: 147-151.
9. Enzootic bovine leukosis. In: *Terrestrial manual*, OIE. 2008: 729-738.
10. Eaves FW, Molloy JB, Dimmock CK, Eaves LE. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet Microbiol* 1994; 39: 313-321.
11. Fechner H, Kurg A, Geue L, Blankenstein P, Mewes G, Ebner D, Beier D. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *J Vet Med B* 1996; 43: 621-630.
12. Ferrer JF, Abt DA, Bhatt DM, Marshak RR. Studies on the relationship between infection with bovine C-virus, leukemia, and persistent lymphocytosis in cattle. *Cancer Research* 1974; 34: 893-900.
13. Jun MH, Chung UI, Lee CK. Seroepizootiological study on bovine leucosis in Korea. *Korean J Vet Res* 1982; 22: 175-185.
14. Kajikawa O, Koyama H, Sasaki T, Yohikawa T, Saito H. Studies on enzyme linked immunosolvent assay (ELISA) for detection of antibodies in cattle infected with bovine leukemia virus. *Jap J Sci* 1983; 45: 347-353.
15. Klintevall K, Näslund K, Svedlund G, Hajdu L, Linde N, Klingeborn B. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. *J Virol Methods* 1991; 33: 319-333.
16. Klintevall K, Ballagi-Pordány A, Näslund K, Belák S. Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet Microbiol* 1994; 42: 191-204.
17. Knäpen K, Kerkhofs P, Thiry E, Mammerickx M. Epidemiological evaluation of a monoclonal ELISA detecting antibodies against bovine leukaemia virus in serum pools. *Epidemiol Infect* 1994; 113: 563-569.
18. Kono Y, Sentsui H, Arai K, Fujigaki A, Enomoto C, Iwasaki H, Ishida H. Serological methods to detect calves infected in utero with bovine leukemia virus. *Jap J Vet Sci* 1983; 45: 453-461.
19. Kuckleburg CJ, Chase CC, Nelson EA, Marras SA, Dammen MA, Christopher-Hennings J. Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reactions. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15: 72-76.
20. Lew AE, Bock RE, Molloy JB, Minchin CM, Robinson SJ, Steer P. Sensitive and specific detection of proviral bovine leukemia virus by 5' Taq nuclease PCR using a 3' minor groove binder fluorogenic probe. *J Virol Methods* 2004; 115: 167-175.
21. Martin D, Arjona A, Soto I, Barquero N, Viana M, Gómez-Lucía E. 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* 2001; 48: 97-106.
22. Maruyama K, Fukushima T, Mochizuki S. Cross-reactive antibodies to BLV and HTLV in bovine and human hosts with retrovirus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1989; 22: 265-274.
23. Meas S, Seto J, Sugimoto C, Bakhsh M, Riaz M, Sato T, Naeem K, Ohashi K, Onuma M. Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. *J Vet Med Sci* 2000; 62: 329-331.
24. Miller JM, VanDerMaaten MJ. A complement-fixation test for the bovine leukemia (C-type) virus. *J Natl Cancer Inst* 1974; 53: 1699-1702.
25. Miller JM, Schmerr MJ, Van Der Maaten MJ. Comparison of four serologic tests for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. *Am J Vet Res* 1981; 42: 5-8.
26. Olson C. Bovine lymphosarcoma (leukemia). *J Am Vet Med Assoc* 1974; 165: 630-632.
27. Onuma M, Olson C, Driscoll DM. Properties of two isolated antigens associated with bovine leukemia virus infection. *J Natl Cancer Inst* 1976; 57: 571-578.
28. Perman V, Dirks VA, Fangmann G, Snyder MM, Sorensen DK, Anderson RK, Goltz DJ, Larson VL, Stevens JB. Statistical evaluation of lymphocyte values on Minnesota dairy cattle. *Am J Vet Res* 1970; 31: 1217-1222.
29. Ressay AA, Gielkens AL, Quak J, Mastenbroek N. Studies on bovine leukosis. VII. Further experience with an ELISA for the detection of antibodies to bovine leukosis virus. *Vet Q* 1981; 3: 31-33.
30. Simard C, Richardson S, Dixon P, Bélanger C, Maxwell P. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of

- bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. *Can J Vet Res* 2000; 64: 101-106.
31. Thurmond MC, Carter RL, Picanso JP, Stralka K. Upper-normal prediction limits of lymphocyte counts for cattle not infected with bovine leukemia virus. *Am J Vet Res* 1990; 51: 466-470.
 32. Todd D, Adair BM, Wibberley G. An enzyme-linked immunosorbent assay for enzootic bovine leukosis virus antibodies. *Vet Rec* 1980; 107: 124-126.
 33. Usui T, Konnai S, Ohashi K, Onuma M. Interferon-gamma expression associated with suppression of bovine leukemia virus at the early phase of infection in sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 115: 17-23.
 34. Ungar-Waron H, Paz R, Brenner J, Yakobson B, Partosh N, Trainin Z. Experimental infection of calves with bovine leukemia virus (BLV): an applicable model of a retroviral infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 67: 195-201.
 35. Yakobson B, Brenner J, Ungar-Waron H, Trainin Z. Cellular immune response cytokine expression during the initial stage of bovine leukemia virus (BLV) infection determines the disease progression to persistent lymphocytosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2000; 23: 197-208.