



شماره ۹۱، تابستان ۱۳۹۰

نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)

تشخیص عفونت ویروسی لوسمی گاو با استفاده از روش Nested-PCR

• غلامرضا نیکبخت بروجنی

گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران (نویسنده مسئول)

• سید مهدی امام

گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

• حسین رضائی

گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: مهر ماه ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: فروردین ماه ۱۳۹۰

تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۲۱ ۶۱۱۱۷۰۵۷

Email: nikbakht@ut.ac.ir

چکیده

ویروس لکوز گاو (BLV) رترو ویروسی است که موجب لکوز یا لمفوما می‌شود. الیزا اولین روش تشخیصی برای غربالگری حضور پادتن‌ها بر علیه ویروس لکوز گاوی است. تا کنون روشن نشده است که آیا این روش پادتن‌ها را در زمان آلودگی به ویروس لوسمی گاو شناسایی می‌کند یا خیر. واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) برای توالی‌های اختصاصی DNA پروویروس هدف، در سلول‌های تک هسته ای خون محیطی (PBML) استفاده شده است. به منظور یافتن روشی حساس و کارا برای تشخیص آلودگی به ویروس BLV در نمونه‌های خون و بافت‌ها یا محتوای مختلف، روش آشیانه‌ای واکنش زنجیره ای پلی مرز (Nested-PCR) بر اساس شناسایی ژن BLV-gag طراحی گردید. آزمون آشیانه ای PCR بر روی نمونه‌های اخذ شده از گاوهایی که به صورت طبیعی آلوده شده‌اند (۲۸۱ نمونه)، نمونه‌های بافتی پارافینی (۳ نمونه) و DNA تخریب شده (۱۰ نمونه عقده لمفاوی سونیکه) انجام شد. حساسیت و ویژگی آزمون PCR به ترتیب ۰/۸۵ و ۰/۸۴ محاسبه گردید. درجه توافق بین دو آزمون (کاپا) مقدار ۰/۶۹۳ محاسبه گردید که قابل توجه است. ارزش پیشگویی مثبت آزمون (دقت) ۰/۸۲ و ارزش پیشگویی منفی آن ۰/۸۶ بود. در نهایت صحت آزمون ۰/۸۵ محاسبه شد. این مطالعه نشان داد که روش واکنش زنجیره ای پلی مرز آشیانه‌ای در مقایسه با روش‌های PCR معمولی استفاده شده در آزمایش‌های متفاوت از حساسیت بیشتری برخوردار است. این تکنیک برای غربالگری انبوه و همچنین تشخیص DNA پروویروس در نمونه‌های بافتی خاص اعم از پارافینه یا نمونه‌های قدیمی مفید خواهد بود.

کلمات کلیدی: ویروس لکوز گاو، ردیابی ملکولی، واکنش زنجیره ای پلی مرز آشیانه‌ای، الیزا

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 91 pp: 1-8

Detection of bovine leukemia virus infection by Nested-PCR analysis

By: Gh. Nikbakht Brouje, Microbiology Department, Veterinary Faculty of Tehran University (Corresponding Author; Tel: +982161117057), Emam, S.M. and Rezaei H. Microbiology Department, Veterinary Faculty of Tehran University

Bovine leukemia virus (BLV) is a retrovirus causing a chronic leukemia/lymphoma in cattle in many countries around the world. Screening for antibodies by Elisa has been the primary means of detecting the presence of this virus. It is not yet known if this assay will detect antibodies in all cattle during a concomitant bovine leukemia virus infection. The polymerase chain reaction (PCR) of the target proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells (PBML). In order to find a highly sensitive and efficient method for the diagnosis of BLV infection in different matrices as well as blood samples, we have designed a Nested-PCR method to detect BLV-gag proviral DNA in naturally infected cattle together with paraffin embedded blocks and degraded DNAs. Samples of natural infected cows (n=281), paraffin embedded (n=3) and degraded DNA (n=10) were examined. When using ELISA as a reference test, sensitivity and specificity for nested PCR were 0.85 and 0.84, respectively. Interpretation of kappa scores for two methods was substantial (0.693). Predictive value of a positive test was 0.82, and predictive value of a negative test was 0.86. The percentage of cows correctly classified by nested PCR assay was 85%. This strategy have shown to allow detection at different experiments and had higher sensitivity in comparison with normal PCR. This latter technique is useful for mass screening and could be useful to detect proviral DNA in paraffin embedded or old samples.

Key words: BLV, Nested PCR, Molecular detection, Gag, ELISA

مقدمه

ویروس لوسمی گاو (BLV)^۱ عامل شایع ترین بیماری نئوپلاستیک یا لکوز آنژئوتیک در گاو (EBL)^۲ است. این ویروس در خانواده رتروویرسیده و جنس دلتا رتروویرس قرار داشته و از نظر ردیف های اسیدهای نوکلئیک و توالی اسیدهای آمینه در پروتئین های ساختاری و غیر ساختاری ارتباط نزدیکی با ویروس های لمفوتروپیک انسان^۳ (HTLV - ۱، ۲) و میمون^۴ (STLV - ۱) دارد (۱۰، ۹، ۸، ۳).

در بررسی های بالینی آلودگی به BLV با دوره ی کمون طولانی و پاسخ ایمنی مداوم مشخص می شود. پاسخ ایمنی مداوم، نتیجه ی بیان ناچیز یا موقتی ویروس است. حدود ۶۵ درصد از گاوهای آلوده، هیچ گونه علامت بالینی یا هماتولوژیک را نشان نمی دهند، در حدود ۳۰ درصد تکثیر غیرنئوپلاستیک (پلی کلنال) و مداوم لنفوسیت های B (PL)^۵ را نشان داده و کمتر از ۵ درصد به تغییرات کشنده، منوکلونال و نئوپلاستیک لنفوسیت های B یا لنفومای بدخیم (ML)^۶ دچار می شوند. PL معمولاً قبل از سن ۵ سالگی رخ می دهد در حالیکه حداکثر سن بروز لنفوما بین ۵-۸ سالگی است (۲۴، ۱۹، ۷).

روش های متعددی برای تشخیص EBL بکار گرفته شده است که شامل خنثی سازی سرم^۷، تثبیت عامل مکمل، سنجش ایمنی با مواد رادیو اکتیو^۸، ایمونو دیفیوژن روی ژل آگارز^۹، الیزا، بررسی عفونت سنسیشیال^{۱۰}، واکنش زنجیره ای پلیمرز^{۱۱} و وسترن بلاتینگ^{۱۲} می شود (۲۲، ۲۱، ۱۵). تشخیص آلودگی به ویروس BLV در هر یک از مراحل بیماری و با هر یک از روش های فوق با مشکلاتی مواجه است. در سنین پائین بدلیل وجود پادتن های مادری و یا ضعف سیستم ایمنی تشخیص حضور پادتن ها امکان پذیر نیست. در حیوانات واجد شکل الحاقی ویروس به ژنوم (پروویروس)^{۱۳} نیز، غلظت پایین، موقتی یا غیر قابل شناسایی

پادتن، تشخیص بوسیله ی آزمون های سرولوژیک را مشکل می سازد. در تشخیص با پادتن های منوکلنال که بر علیه بخش های خاصی از ساختارهای گلیکوپروتئینی پوششی (gp۵۱) یا پروتئین های مرکزی (p۲۴) طراحی شده اند مواردی مشاهده می شود که حاکی از تنوع پاسخ سرمی علیه ویروس است و نمی توان هیچ یک از آنها را به تنهایی برای تشخیص آلودگی به کار برد (۱۵، ۲۶).

در مطالعات گله ای، واکنش زنجیره ای پلی مرز مفید است و حساسیتی بیش از الیزا دارد. این روش برای ریشه کنی BLV، در گله های مبتلا به بروز پایین یا شیوع بیماری در گله هایی که برای مدت طولانی از BLV پاک بوده اند و همین طور مطالعات اصلاح نژادی کاربرد دارد (۱۴).

هدف از تحقیق حاضر طراحی و ارزیابی روش واکنش زنجیره ای پلی مرز آشیانه ای^{۱۴} برای تشخیص ویروس لوسمی گاوان بوده است. استفاده از روش مذکور حساسیت و ویژگی تشخیص را در آزمایش موارد آلوده افزایش خواهد داد.

مواد و روش ها

در مجموع تعداد ۲۱ نمونه عقده ی لنفاوی شامل ۸ نمونه منجمد، ۳ نمونه پارافینه، ۱۰ نمونه عقده لمفاوی سونیکه (واجد DNA ژنومی تخریب شده) و ۲۶۰ نمونه خون کامل گاو (که در طی سال های ۱۳۸۱ تا ۱۳۸۵ جهت تشخیص به آزمایشگاه ارسال شده بودند)، متعلق به گاوهای مبتلا به لکوز در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. ابتلا یا عدم ابتلا به لکوز گاوهایی که نمونه ها از آنها اخذ شده بود با استفاده از روش ایمونودیفیوژن و الیزا به اثبات رسیده بود. تخریب ژنومی با الکتروفورز DNA ژنومی بر روی ژل آگارز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بر مابند مشخص

افزوده سازی بخشی از ژن gag با روش آشیانه‌ای PCR

در دور اول افزوده سازی ژن gag ویروس لوسمی گاو صورت گرفت. این ژن در ویروس لکوز گاوی حراست شده است و در تشخیص سویه های مختلف ویروس اختلالی ایجاد نخواهد کرد (۱۷). برای افزوده سازی ژن gag از آغازگرهایی استفاده شد که تمامی طول ژن را افزوده می ساختند:

gag F: nt ۶۲۸-۶۴۸: ۵'-ATGGGAAATTCCTCCCTCTAT۳'

gag R: nt ۱۸۰۳-۱۷۸۳: ۵'-GTTTTTTGATTTGAGGGTTGG۳'

در دور بعدی از آغازگرهای داخلی برای افزوده سازی بخش داخلی ژن gag استفاده شد. توالی آغازگرها به شرح زیر است:

Int gag F: nt ۱۰۶۸-۱۰۸۷: ۵'-AACACTACGACTTGCAATCC ۳'

Intgag R: nt ۱۴۵۲-۱۴۳۴: ۵'-GTTCTTAGGACTCCGTCG ۳'

طراحی پرایمرهای خارجی و داخلی بر اساس ردیف های نوکلئوتیدی مشخص شده در ژنوم ویروس لوسمی گاو صورت گرفت. (BLV genome, GenBank K۰۲۱۲۰) از کشت سلول کلیه بره که به طور پایدار به ویروس BLV آلوده بود (Fetal lamb kidney) (BLV infected, FLK-BLV) به عنوان کنترل مثبت و از نمونه های عقده لمفاوی گاو های سالم مشخص شده با آزمایش های الیزا، آگار ژل

دیفوزیون و بررسی کالبد گشایی به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای هر دو مرحله، اجزای واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرو مولار dNTP، ۰/۴ میلی مولار از آغازگرهای اختصاصی، ۱ واحد Taq DNA Polymerase (شرکت سینا ژن) و یک میکرو لیتر از DNA استخراج شده از عقده های لمفاوی یا ۳ میکرولیتر از DNA استخراج شده از خون (حدود ۱۰۰ نانوگرم DNA) استفاده گردید. چرخه های حرارتی برای دور اول شامل یک چرخه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه سه مرحله ای شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه (Bio-Rad, Mini-MJ) بود. در دور دوم افزوده سازی با ۲ میکرولیتر از محصول مرحله اول و با غلظت های مشابه واکنش قبل ادامه یافت. چرخه های حرارتی برای دور دوم شامل یک چرخه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه سه مرحله ای شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. و در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول مرحله دوم روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شد. نتایج آزمایش با دستگاه تصویر برداری از ژل (Sony XC-۷۵ CE camera, Vilber Lourmat Inc. Cedex, France) رویت و برای آنالیز نهایی عکس برداری شد.

آزمون الیزا

آزمون الیزا با روش غیر مستقیم و با استفاده از کیت های تشخیص سرمی BLV (BioX ELISA kit Belgium BLB) و تشخیص سرمی آنتی بادی های اختصاصی ضد (BLV-gp۵۱ BLV-gp۵۱-))

شده بود. در دو مورد سایر اعضای بدن مثل کبد، کلیه و طحال هم مورد آزمایش قرار گرفتند.

استخراج DNA از نمونه های عقده لمفاوی

برای استخراج DNA از نسج عقده های لمفاوی از کیت High Pure (PCR Template (Roche Molecular Biochemicals, Germany) استفاده شد. تمامی مراحل استخراج بر اساس روش پیشنهادی شرکت سازنده صورت گرفت. جدا سازی DNA از مقاطع بافتی پارافینه نیز با کیت فوق و با روشی مشابه صورت گرفت با این تفاوت که مراحل دیگری جهت جداسازی پارافین اضافه شد. به طور خلاصه مقاطع پارافینه به مدت ۳۰ دقیقه در گزیلول قرار داده شدند و سپس به مدت ۱۰ ثانیه به ترتیب در اتانول ۱۰۰ درصد (دهیدراتاسیون)، اتانول ۸۰ درصد، اتانول ۶۰ درصد، اتانول ۴۰ درصد و آب دوبار تقطیر (رهیدراتاسیون) قرار گرفتند. سایر مراحل استخراج مشابه با مراحل استخراج DNA از نسج عقده های لمفاوی غیر پارافینه بود. پس از اتمام مراحل استخراج، نمونه ها تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA از نمونه های خون

استخراج DNA از نمونه های خون با روشی نوین انجام گرفت. ابتدا ۱ میلی لیتر بافر لیزکننده گلبول قرمز (۱۰ میلی مولار Tris-HCl با $pH=۷/۵$ ، ۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۱۵ مولار NaCl و ۰/۷۵ درصد Triton X ۱۰۰) به ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه خون اضافه شده و سپس به مدت ۶ دقیقه با نیروی ۲۰۰۰ g سانتریفیوژ می شد. مایع رویی دور ریخته شده و ۱ میلی لیتر از بافر مذکور دوباره به نمونه اضافه شده و به مدت ۳ دقیقه با نیروی ۲۰۰۰ g سانتریفیوژ می شد. این مرحله تا زمان لیز کامل گلبول های قرمز و مشاهده یک پلت کاملاً سفید در ته لوله تکرار می شد.

پلت نهایی با ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیزه کننده گلبول سفید (۱۰ میلی مولار Tris-HCl، ۰/۱ مولار NaCl، ۲۵ میلی مولار EDTA با $pH=۸$ و ۰/۵ درصد SDS) مخلوط و یکنواخت می گردید. ۳۰۰ میکرولیتر بافر دناتوره کننده (۴ مولار گوانیدیم تیوسیانات، ۲۵ میلی مولار سیترات سدیم و ۰/۵ درصد سارکوزیل) به مخلوط قبلی اضافه شده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری می شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم (۳ مولار استات پتاسیم و ۱۱/۵ درصد اسید استیک گلاسیال) به مخلوط قبلی اضافه می شد.

پس از یکنواخت کردن محلول و به منظور رسوب دادن پروتئین های موجود، نمونه به مدت ۵ دقیقه با نیروی ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ می شد. ۱ میلی لیتر از مایع رویی به یک تیوب جدید منتقل شده و ۷۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل به آن اضافه و به مدت ۳ دقیقه با نیروی ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ می شد تا رسوب DNA بدست آید. مایع رویی کاملاً از تیوب خارج شده و پلت DNA با ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو داده می شد. پلت به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده می شد تا الکل باقیمانده تبخیر گردد. در نهایت پلت در ۱۰۰ میکرو لیتر بافر TE (Tris-EDTA) حل شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان آزمایش نگهداری می شد.

از گله هایی را که با الیزا تایید شده‌اند را مثبت اعلام می‌کند. واکنش زنجیره ای پلیمرز نسبت به روش‌های سرمی جهت تشخیص مستقیم آلودگی روشی حساس تر بوده و حتی قبل از ظهور پاد تن در خون قابل استفاده می‌باشد (۱۸).

Fechner و همکاران (۱۹۹۶) به مقایسه روش های PCR و ایمونودیفوزیون پرداخته‌اند. آنها نشان داده‌اند که حساسیت این روش ۱۰ درصد بیش از ELISA و ۱۷/۷ درصد بیش از AGID است (۱۲). در سال ۲۰۰۱، Martin و همکاران نیز یک مطالعه مقایسه‌ای بین PCR به عنوان روش مستقیم و ELISA و AGID به عنوان روش غیرمستقیم، انجام داده اند (۱۸).

در این بررسی از پرایمرهای اختصاصی برای ژن های env pol و tax₂ استفاده شده است و PCR بر روی DNA استخراج شده از منوسیت های خون محیطی و یا لکوسیت های شیر صورت گرفته است. بالاترین پاسخ مثبت با PCR و پرایمرهای env یا pol و بعد از آن با پرایمر tax و نهایتاً با ELISA و AGID به دست آمده است (۱۸).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۳ توسط Nagy و همکاران انجام شده، کاربرد روش PCR در تشخیص بیماری در گاو های شیری بالغ مورد ارزیابی قرار گرفته است. این محققین حساسیت و ویژگی این آزمون را بترتیب ۰/۶۷ و ۱ ذکر کرده اند. ارزش پیشگویی مثبت تست ۱ و ارزش پیشگویی منفی آن ۰/۴۲ بوده است. درصد گاوهایی که بدرستی بوسیله ی این روش تشخیص داده شدند ۷۳/۵ درصد ذکر شده است. اما در کل، حساسیت و ارزش پیشگویی منفی این تست، پایین است. در نتیجه، در تشخیص ویروس در گله های با شیوع بالای بیماری، استفاده از PCR به تنهایی، توصیه نمی‌شود (۲۵).

در مقایسه نتایج ذکر شده با تحقیق حاضر به نظر می رسد که روش آشیانه ای PCR از حساسیت بیشتر (۰/۸۵) و ویژگی کمتری (۰/۸۴) برخوردار است ولی ارزش پیشگویی منفی آن بسیار بالاتر است (۰/۸۶) و درصد گاوهایی که بدرستی بوسیله ی این روش تشخیص داده شده اند بیشتر است (۸۵ درصد).

تفاوت اصلی روش پیشنهادی حاضر با روش های مورد استفاده سایر محققین طراحی افزوده سازی ژن gag بوده است و با روش آشیانه ای حساسیت بیشتری را در تشخیص DNA و بررسی از خود نشان می دهد. بررسی ژن gag و ناحیه داخلی افزوده شده در بانک اطلاعاتی (GeneBank) نشان می دهد که ناحیه مذکور از تنوع کمی برخوردار بوده و در ویروس لوسمی گاو کاملاً حراست شده است (شکل ۴). بنابراین برای اولین بار می‌توان اظهار داشت که حساسیت شناسایی پروویروس، در صورت کاربرد پرایمرهای اختصاصی ژن gag بالاتر خواهد بود. باید به این نکته نیز توجه شود که انتظار پاسخ منفی در PCR حتی در صورت پاسخ سرولوژیک مثبت وجود دارد و این موضوع نیز به ویژگی بالای این روش اشاره دارد.

سلول‌های تک هسته ای خون محیطی هدف اصلی ویروس هستند. با این وجود ممکن است ویروس در بافت های لمفاوی (عقد های لمفاوی و طحال)، کبد و کلیه نیز یافت شود (۱۵). امکان تشخیص ویروس نیز در بافت های مذکور به اثبات رسید. نکته قابل توجه دیگر، امکان استفاده از این روش در تشخیص پروویروس در نمونه های پارافینه و حتی تخریب

Antibody; Svanova Biotech AB, Uppsala, Sweden
بر روی پلاسمای نمونه های خون صورت گرفت. تمامی مراحل انجام آزمایش و تفسیر نتایج بر اساس روش های پیشنهادی تهیه کنندگان کیت ها بود.

روش های تجزیه و تحلیل داده ها

میزان صحت و توافق آزمایشات بر اساس نتایج ELISA و PCR و با ترسیم جدول ۲ در ۲ محاسبه گردید. برای بررسی میزان توافق آزمون‌ها معدل کاپا (κ) محاسبه و تفسیر آن بر اساس معیارهای Landis و Koch (۱۹۷۷)

با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت. بر اساس این معیارها و با تفاوت معنادار بین مشاهدات در سطح $P < 0.05$ ، معدل ۰ تا ۰/۲۰ ناچیز، ۰/۲۱ تا ۰/۴۰ بی طرف، ۰/۴۱ تا ۰/۶۰ متوسط، ۰/۶۱ تا ۰/۸۰ قابل توجه، و ۰/۸۱ تا ۱ کامل تفسیر می گردد.

نتایج

چنانکه در شکل ۱- الف مشاهده می گردد با روش پیشنهادی در تحقیق حاضر استخراج DNA از نمونه های خون کامل با موفقیت همراه بوده و DNA به دست آمده تخریبی را نشان نمی دهد. شکل ۱- ب DNA استخراج شده از نمونه های پارافینه و سونیکه است که تخریب DNA در آنها به وضوح مشاهده می گردد. نتایج حاصل از افزوده سازی دور اول و دور دوم در تعدادی از نمونه‌های خون و بافت (واجد DNA تخریب شده) در اشکال ۲- الف و ۲- ب مشاهده می‌شوند.

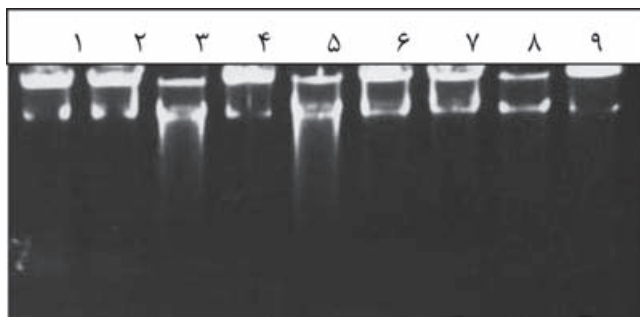
مقایسه موارد مثبت و منفی در الیزا و آزمون آشیانه ای PCR در جدول ۱ صورت گرفته است. تعداد نمونه های مثبت در الیزا ۱۳۷ و نمونه های منفی ۱۵۷ عدد بود. تعداد نمونه ها مثبت در PCR ۱۴۲ و نمونه های منفی ۱۵۲ عدد بود. حساسیت و ویژگی آزمون PCR به ترتیب ۰/۸۵ و ۰/۸۴ محاسبه گردید. درجه توافق بین دو آزمون (کاپا) مقدار ۰/۶۹۳ محاسبه گردید که قابل توجه می باشد. ارزش پیشگویی مثبت آزمون (دقت) ۰/۸۲ و ارزش پیشگویی منفی آن ۰/۸۶ بود. صحت آزمون ۰/۸۵ محاسبه شد.

بحث

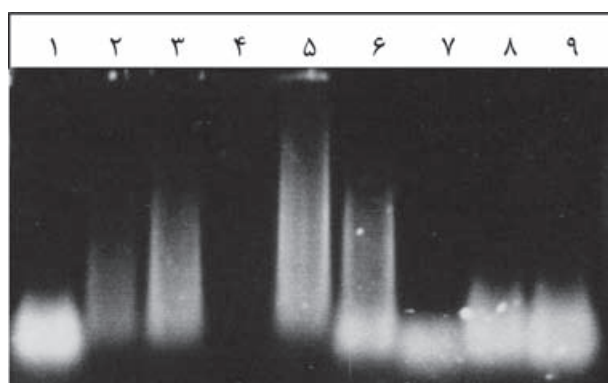
حدود ۳۰ سال است که تشخیص پادتن های ضد BLV با روش AGID صورت می گیرد. این آزمون، روشی اصولی در بیشتر کشورها بوده ولی در سال های اخیر با طراحی کیت های الیزا به عنوان یک آزمون غربالگری برای تشخیص آلودگی به صورت انفرادی در گله مورد استفاده قرار می گیرد. ویژگی این آزمون حدود ۹۸/۸ درصد و حساسیت آن ۹۸/۵ درصد بیان شده است (۱۹، ۱۸). روش تشخیص رسمی و معتبر BLV در کانادا، الیزا بر پایه ی گلیکو پروتئین gp51 است. محققین استفاده از الیزا را بدلیل حساسیت بسیار بالای آن نسبت به AGID، جهت کنترل و ریشه کنی ویروس در سطح گله توصیه می کنند (۲۵). حساسیت الیزا به حدی است که در صورتی که روی مجموعه‌ی سرم گله (Pooled) انجام شود، این امکان را میسر می سازد که پادتن‌های با شیوع کمتر از ۱ درصد در سطح گله تشخیص داده شوند، اما AGID فقط ۵۰ درصد

می سازد. از مجموع نتایج به دست آمده در این تحقیق و همچنین سایر تحقیقاتی که به تشخیص آلودگی با ویروس توجه داشته اند چنین بر می آید که در مطالعات بر روی گله ها و یا حتی نمونه های منفرد، واکنش زنجیره ای پلی مرز مفید خواهد بود و حساسیتی بیش از الیزا دارد. این روش برای ریشه کنی BLV، در گله های مبتلا به بروز پایین بیماری، یا شیوع بیماری در گله هایی که برای مدت طولانی پاک از BLV بوده اند و همین طور مطالعات اصلاح نژادی، قابل استفاده است (۱۴).

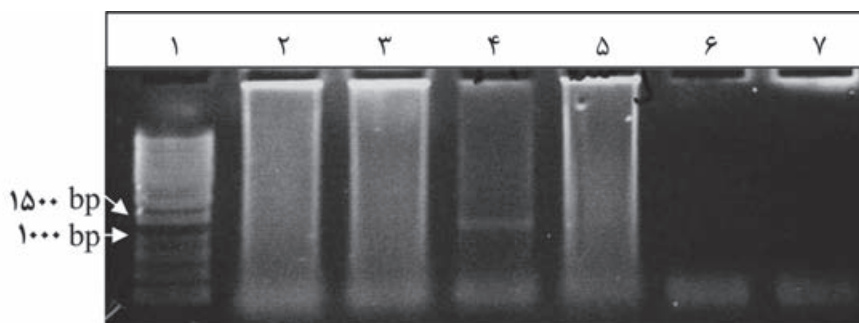
شده است که کمک زیادی به بررسی های گذشته نگر نموده و گستره تشخیص را فراتر می برد. در یک عفونت معمولی با BLV، پاسخ ایمنی، به صورت تولید پادتن بر علیه پادگن های BLV، خواهد بود. در مراحل غیرطبیعی آلودگی، غلظت پایین، موقتی یا غیر قابل شناسایی پادتن، بویژه در حیوانات واجد شکل الحاقی ویروس به ژنوم سلول (پروویروس) مشاهده شده که تشخیص و کنترل آلودگی را در گله، بوسیله ی تست های سرولوژیک مشکل



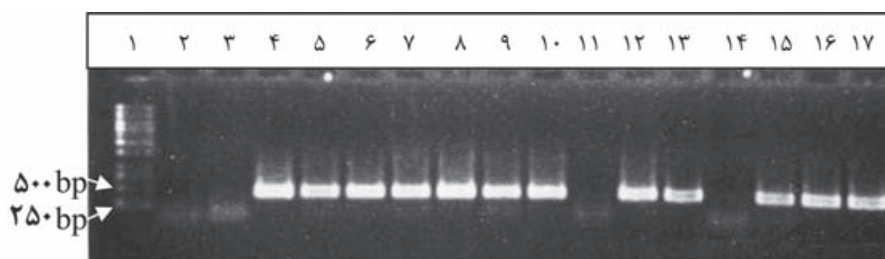
شکل ۱- الف: نتایج حاصل از استخراج DNA از نمونه های بافتی (ستون ۱ الی ۹)



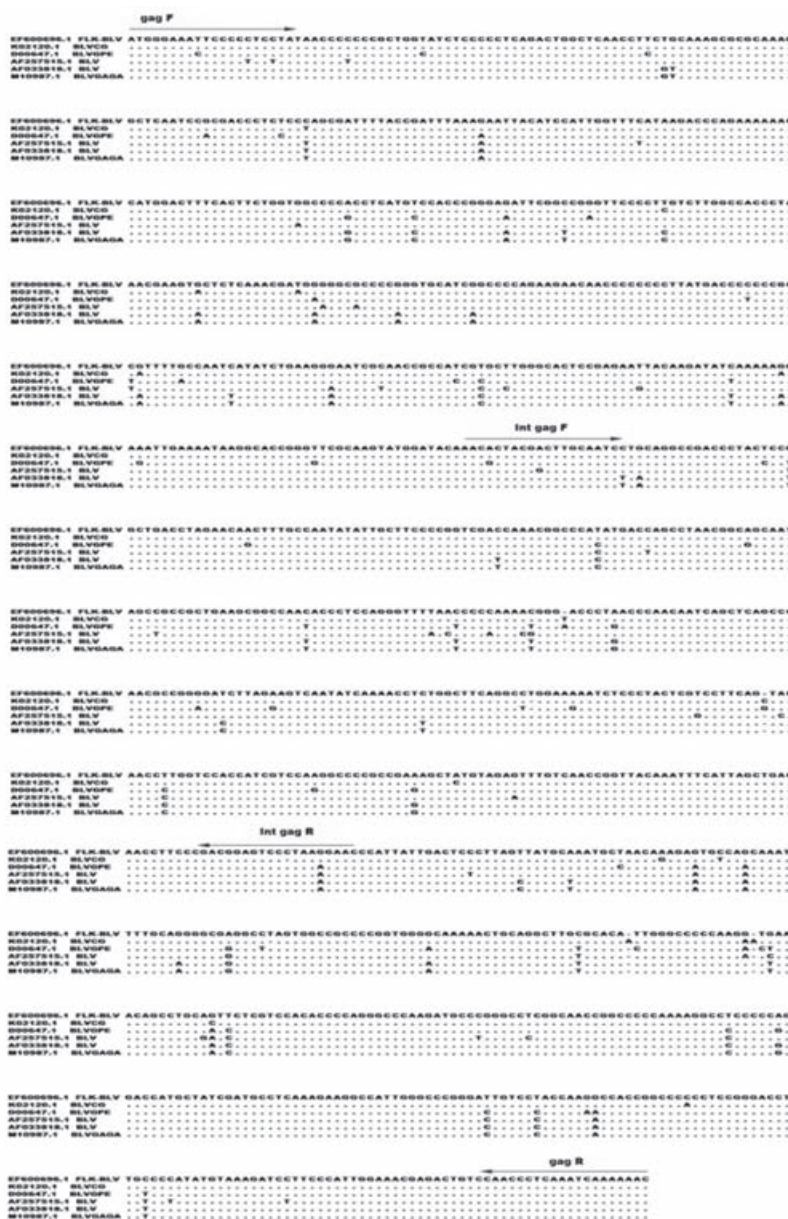
شکل ۱- ب: نتایج حاصل استخراج DNA از نمونه های بافتی پارافینه و سونیکه (ستون ۱ الی ۹)



شکل ۲- الف: نتایج حاصل افزوده سازی در مرحله اول؛ ستون ۱، مارکر (Fermentase Co) 1Kb؛ ستون ۲ الی ۶ نمونه های تحت آزمون؛ ستون ۷ شاهد منفی.



شکل ۲- ب: نتایج حاصل افزوده سازی در مرحله دوم؛ ستون ۱، مارکر (Fermentase Co) (1Kb)؛ ستون ۲ شاهد منفی و ستون ۳ الی ۱۷ نمونه‌های تحت آزمون



شکل ۳- تطابق توالی‌های نوکلئوتیدی آغازگرهای خارجی (دور اول)، داخلی (دور دوم) و توالی ژن gag ویروس لوسمی گاوی ثبت شده در GenBank

جدول ۱- جدول ۲ در ۲ ترسیم شده براساس نتایج بدست آمده از آزمون های PCR و الیزا بر روی نمونه های مشکوک به لکوز گاوی

جمع	منفی	مثبت	الیزا
			PCR
۱۴۲	۲۵	۱۱۷	مثبت
۱۵۲	۱۳۲	۲۰	منفی
۲۹۴	۱۵۷	۱۳۷	جمع

congress . 169

6- Bicka, L., Kuzmak, J., Kozaczynska, B., Plucienniczak, A. and Skorupska, A. (2001) Expression of bovine leukemia virus protein p24 in *Escherichia coli* and its use in the immunoblotting assay. *Acta. Biochim. Pol.* 48: 227-232

7- Blood, D. C. and Radosits, O. M., (2002) *Veterinary Medicine*. Bailliere .Tindall. London. pp.1046-1058.

8- Bunger , I., Khalaf, H. and M. Rimpler, (1996) Examination of antigen preparations from the virus of enzootic bovine leukosis with regard to suitability for immunoblotting. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 103: 516-519.

9- Burny, A., Cleuter, Y., Kettmann, R., Mammerickx, M., Marbaix, G., Portetelle, D., van den Broeke, A., Willems, L. and Thomas, R. (1988) Bovine leukaemia. facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Vet Microbiol.* 17: 197-218.

10- Choi, K., Liu, R. and Buehring, G. (2002) Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. *J. Virol. Methods.* 104: 33-39.

11- Deshayes, L., Levy, D., Parodi, A. and Levy, J. (1977) Proteins of bovine leukemia virus. I. Characterization and reactions with natural antibodies. *J. Virol.* 21: 1056-1060.

12- Fechner, H., Kurg, A., Geue, L., Blankenstein, P., Mewes, G., Ebner, D. and Beier, D. (1996) Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed B.* 43:621-630.

13- Gonzalez, E., Oliva, G., Norimine, J., Cid de la Paz, V. and Echeverr, M. (1998) Evaluation of western blotting for the diagnosis of enzootic bovine leukemia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia.* 51: 299-305.

14- Gutierrez, S. E, Dolcini, G. L., Arroyo, G. H., Rodriguez, D. C., Ferrer, J. F., and Esteban, E. N. (2001) Development and

پاورقی ها

- 1- Bovine Leukemia virus
- 2- Enzootic bovine leukosis
- 3- Human T-lymphotropic viruses 1 and 2
- 4- Simian T- lymphotropic viruses
- 5- Persistant lymphocytosis
- 6- Malignant Lymphoma
- 7- Serum Neutralization
- 8- Radio Immuno Assay (RIA)
- 9- Agav Gel Immunnodiffusion (AGID)
- 10- Syncytial Infectivity Assay
- 11- Polymerase Chain Veaction
- 12- Western Bioting
- 13- Provirus
- 14- Nested- PCR

منابع مورد استفاده

- ۱- تاج بخش، ح، (۱۳۷۴) ایمنی شناسی بنیادی. چاپ ششم. انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۶۸۰ صفحه.
- ۲- کیوانفر، ه، کریمی، ن، (مترجمین)، (۱۳۷۶) ویروس شناسی دامپزشکی (بخش بیماری ها)، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۴۵۵ صفحه.
- 3- Agresti, A., Ponti, W., Rocchi, M., Meneveri, R., Maozzi, A., Cavalli, D., Peri, E., Polli, G. and Ginelli, E. (1993) Use of polymerase chain reaction to diagnosis bovine leukemia virus infection in calves at birth. *Am. J. Vet. Res.* 54: 373-378
- 4- Barrie, K., Perez, E., Lamers, S., Farmerie, W., Dunn, B., Sleasman, J. and Goodenow, M. (1996) Natural variation in HIV-1 protease, Gag p7 and p6, and protease cleavage sites within gag/pol polyproteins: amino acid substitutions in the absence of protease inhibitors in mothers and children infected by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 219: 407-416
- 5- Bazargani, T. T., Barin, A. and Hadadzadeh, H. (1987) A survey on frequency of infection to the virus of enzootic bovine leucosis in dairies around Tehran. XXIII Veterinary world

