مقایسه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و الیزای تجاری به‌منظور شناسایی عفونت با ویروس لکوز در گاوهای شیری

رضی‌اله جعفری‌جوزانی[1*]، غلامعلی مقدم[2]، محسن آسمند[3]

۱- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۳- دانش‌آموخته دامپزشکی، شرکت سوا، تهران، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: rjoozani@tabrizu.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹٤/٦/۲۹ پذیرش نهایی: ۹٤/۹/۳۰)

Archive of SID

چکیده

ویروس لوسمی گاوی (BLV) یک رتروویروس است که باعث لکوز انزوتیک گاوی می‌شود. روش متداول برای شناسایی وجود عفونت با BLV غربالگری آنتی‌بادی‌ها است. آگار ژل ایمونودیفیوژن و الیزا به‌طور گسترده‌ای برای شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد BLV استفاده می‌شود. تکثیر و شناسایی DNA پرووویروس لکوز گاو به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) روش توانمندی است که قادر به تشخیص مستقیم عفونت می‌باشد. با این حال، استفاده گسترده از این روش به منظور تشخیص آزمایشگاهی بیماری محدودیت‌هایی داشته و نیاز به مطالعات بیشتری دارد. هدف از این مطالعه مقایسه نتایج آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و یک الیزای تجاری در شناسایی پرووویروس لکوز گاو و آنتی‌بادی‌های ضد این ویروس در خون گاوهای شیری بود. بدین منظور حساسیت و ویژگی نسبی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در مقایسه با یک الیزای تجاری مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های خونی از ۱۷۳ رأس گاو شیری از گاوداری‌های اطراف تبریز تهیه شد و توسط یک الیزای تجاری به منظور تشخیص آنتی‌بادی ضد لکوز ویروس گاو و نیز توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد ارزیابی قرار گرفتند. حساسیت و ویژگی نسبی آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در مقایسه با الیزای تجاری به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۸/٦٪ محاسبه شد. فراوانی حضور بخش هدف از ژن gag در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۱۳/۳٪ و فراوانی پاسخ سرمی مثبت با الیزای تجاری ۱۲/۱٪ به‌دست آمد. نتایج حاکی از آن است که امکان استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در تشخیص آزمایشگاهی بیماری وجود دارد.

کلید واژه‌ها: لکوز گاو، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)، الیزای تجاری.

www.SID.ir

مقدمه

ویروس لوسمی گاوی (BLV) یک رتروویروس اگزوژنی بوده که باعث لکوز انزوتیک گاوی می‌شود. در شرایط طبیعی این بیماری در گاو رخ می دهد اما گوسفند نیز به عفونت آزمایشگاهی حساس است. ویروس عمدتاً لنفوسیت‌های B را آلوده می‌کند ولی همچنین در لنفوسیت‌های T، مونوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها نیز یافت می‌شود (Fechner *et al.*, 1996; Poon *et al.*, 1993). عفونت ایجادشده توسط BLV می‌تواند منجر به سه وضعیت متفاوت شود: بروز عفونت و تولید پادتن، بروز عفونت و تولید پادتن به‌علاوه رخداد لنفوسیتوز پایدار و بروز عفونت پایدار و تولید پادتن به‌علاوه لنفوسارکوم (Jafari Jozani *et al.*, 2010). اولین وسیله برای شناسایی وجود عفونت BLV غربالگری آنتی‌بادی‌ها است. آگار ژل ایمونودیفیوژن و الایزا به‌طور گسترده‌ای برای شناسایی آنتی‌بادی‌های BLV استفاده می‌شود (Johnson and Kaneene, 1991). با این وجود، روش‌های مذکور در شناسایی گاوهای مبتلا به BLV که فاقد آنتی‌بادی بوده و یا تیتر آنتی‌بادی آنها ناچیز است، مفید و کارآمد نخواهد بود (Brandon *et al.*, 1991). از این‌رو، مهم است که وجود عفونت را با تشخیص مستقیم ویروس تعیین نمود. تکثیر و شناسایی DNA پرووایروسی BLV و سکانس‌های RNA آن به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) نشان داده شده است که یک روش مناسب در تشخیص مستقیم عفونت BLV می‌باشد (Kittelberger *et al.*, 1996; Poon *et al.*, 1993).

هدف از این مطالعه مقایسه نتایج آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و یک الیزای تجاری در شناسایی پرووایروس لکوز گاو و آنتی‌بادی‌های ضد این ویروس در خون گاوهای شیری می‌باشد که بدین منظور حساسیت و ویژگی نسبی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در مقایسه با یک الیزای تجاری مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های سرمی

نمونه‌های خونی از ۱۷۳ رأس گاو شیری هلشتاین و از گاوداری‌های اطراف تبریز تهیه شدند، تمامی حیوانات در بازه سنی ۲ تا ۵ سال قرار داشتند و در معاینه بالینی به ظاهر سالم بودند. نمونه های خونی پس از اخذ در شرایط مناسب به آزمایشگاه انتقال یافتند. جهت استخراج سرم، نمونه‌های خون در ۱۰۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و سرم‌ها جدا گردیدند. تمامی نمونه‌های سرمی در میکروتیوپ ریخته شده و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

الیزای غیر مستقیم تجاری جهت تشخیص آنتی‌بادی ضدویروس لکوز گاو تمامی نمونه‌های سرمی اخذ شده با کیت تجاری (IDEXX, USA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده جهت تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد ویروس لکوز گاو مورد آزمایش قرار گرفتند.

الیزای تجاری

نمونه‌های سرمی استحصال شده به‌منظور تشخیص آنتی‌بادی ضد لکوز ویروس گاو، توسط کیت تجاری (IDEXX,US) مورد ارزیابی قرار گرفتند. به این منظور

www.SID.ir
Archive of SID

از دستگاه الیزا ریدر (DANA 3200, IRAN) در طول موج ٤٥٠ nm بهره گرفته شد.

استخراج DNA

پس از جداسازی لوکوسیت‌ها از نمونه‌های خونی توسط گرادیانت فایکول و سه مرتبه شستشوی آن‌ها با فسفات بافر سالین (pH=٧/٤)، سلول‌ها در ٤٦٥ µl بافر لیزکننده (حاوی ١٠٠ میلی‌مولار کلرید سدیم، ٢٥ میلی‌مولار EDTA و ١٠ میلی‌مولار تریس-کلریدریک با pH=7.0 و نیم درصد سدیم دودسیل سولفات) و پروتئیناز K (١ mg/ml) تخریب شدند، سپس مطابق توصیه سازنده کیت (Bioneer, S. Korea) و با استفاده از ستون‌های سیلیکا ژل استخراج DNA انجام شد. سپس DNA خشک شده در ٢٠٠µl-١٠٠ از بافر TE (Tris-EDTA) تا رسیدن به تغلیظ ٠/٥ µg/µl حل شد.

کنترل مثبت شامل DNA استخراجی از سلول‌های رده FLK-BLV بود (هدیه از طرف دکتر فرهید همت‌زاده، دانشگاه آدلاید، استرالیا).

این سلول‌ها توسط پروتئیناز K و بافر لیزکننده هضم شدند، سپس مطابق توصیه سازنده کیت (Bioneer, S. Korea) و با استفاده از ستون‌های سیلیکا ژل استخراج DNA انجام شد.

ارزیابی کمی و کیفی به ترتیب توسط روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از دستگاه بایوفتومتر(Eppendorf, Germany) در طول موج nm ٢٦٠ و ٢٨٠nm و الکتروفورز ژل آگاروز همراه با رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید انجام گردید.

پرایمرها

از دو پرایمر

*gag*4 (5 GGTTCCTTAGGACTCCGTCG 3) و

*gag*3 (5 AACACTACGACTTCGAATCG 3)

برگرفته از قطعات ژنومی BLV، برای PCR استفاده گردید (Fechner *et al*., 1996). علت انتخاب ژن *gag* به دلیل حفاظت و مصونیت ناحیه مربوطهٔ آن می‌باشد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

تمام واکنش‌های PCR درحجم ٢٠µl از محلول حاوی ١µl نمونه DNA ١٠٠ ng، ٠/٤ µl از mM ٠/٢ dNTPs mix، ١/٤ µl از MgSo4 ٣/٥ mM، ٢µl از بافر PCR، ٠/١٢ µl از ٠/٦ واحد پلی‌مراز platinum Taq و ٠/٤ µl از ٠/٢ mM از هر پرایمر صورت گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دستگاه ترمال سایکلر پریموس ٩٦ (MWG, Germany)، با چرخش حرارتی به صورت دناتوراسیون اولیه برای ٥ دقیقه در ٩٥°C، سپس ٣٥ چرخش در ٩٤°C برای ١ دقیقه، ٦٥°C به مدت ١ دقیقه و ٧٢ °C برای ٢ دقیقه و در نهایت کامل‌سازی قطعات به مدت ١٠ دقیقه در ٧٢°C انجام گرفت (Fechner *et al*., 1996).

برای رویت و عکس‌برداری از محصول تکثیر یافته در PCR از الکتروفورز ژل آگارز (٢٪) در بافر تریس استات EDTA و نیز رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (٥ mg/ml) استفاده شد. در نمونه فاقد الگو (non template control) از آب مقطر دو بار تقطیر استفاده شد. به عنوان کنترل مثبت نیز از DNA استخراج شده از رده سلولی FLK-BLV (هدیه از طرف دکتر فرهید همت‌زاده، دانشگاه آدلاید، استرالیا) در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز فوق استفاده شد.

کنترل واکنش

از دو پرایمر

PRL033 (5- CGAGTCCTTATGAGCTTGATTCTT -3)

Archive of SID
www.SID.ir

و *PRL035* (5- GCCTTCCAGAAGTCGTTTGTTTTC -3) به‌منظور تکثیر بخش اگزوژن شماره ۳ ژن پرولاکتین گاوی استفاده شد.

تحلیل آماری داده‌ها

حساسیت و ویژگی نسبی آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در مقایسه با الیزای تجاری، مطابق فرمول‌های زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد حساسیت نسبی} = \frac{(\text{تعداد نمونه های مثبت در هر دو روش})}{(\text{تعداد نمونه های مثبت در هر دو روش} + \text{تعداد نمونه های مثبت با آزمایش الیزای تجاری و منفی با آزمایش واکنش ای زنجیره ای پلی مراز})} \times 100$$

$$\text{درصد ویژگی نسبی} = \frac{(\text{تعداد نمونه های منفی در هر دو روش})}{(\text{تعداد نمونه های منفی در هر دو روش} + \text{تعداد نمونه های منفی با آزمایش الیزای تجاری و مثبت با آزمایش واکنش ای زنجیره ای پلی مراز})} \times 100$$

نتایج آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و الیزای تجاری توسط آزمون بررسی توافق مثبت (آماره کاپا) و در نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ مورد مقایسه قرار گرفت و تفسیر آماره کاپا به صورت زیر انجام گردید:

آماره کاپا بین صفر (شانس) و یک (توافق کامل) متغییر می‌باشد. تفسیر آن طبق نظری است که توسط لاندیس و کچ در سال ۱۹۷۷ ارائه شده است. بدین صورت‌که مقادیر بین صفر و دو دهم معادل توافق جزئی، بین ۰/۲۱ و ۰/٤ معادل توافق اندک، بین ۰/٤۱ و ۰/٦ معادل توافق متوسط، بین ۰/٦۱ و ۰/۷ معادل توافق محکم و بین ۰/۷۱ تا یک معادل توافق بسیار کامل می باشد (Landis and Koch, 1977).

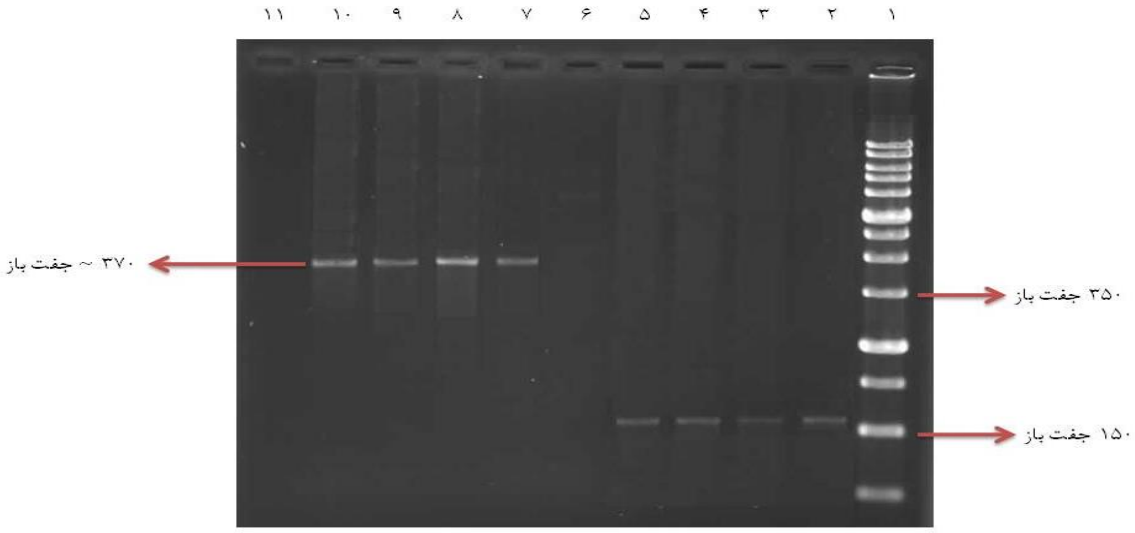
یافته‌ها

الیزای تجاری قادر به شناسایی آنتی‌بادی ضد ویروس لکوز گاو در ۲۱ مورد از نمونه های سرمی آزمایش شده بود.

در روش واکنش زنجیره‌ای بر مبنای مشاهده محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (با وزن تقریبی ۳۷۰ جفت باز) تعداد ۲۳ مورد از نمونه‌های تحت مطالعه دارای واکنش مثبت بودند (شکل ۱).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگاروز رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید؛ خط یک نردبان وزن مولکولی، خطوط دو تا پنج: بخش هدف از ژن پرولاکتین، خط شش: نمونه شاهد فاقد الگو، خط هفت: بخش هدف از ژن gag (پرووایروس لکوز گاو)، خط یازده: نمونه با واکنش پلی مراز زنجیره ای منفی.

در کلیه نمونه‌هایی که مورد استخراج DNA قرارگرفته بودند، بخش هدف از ژن پرولاکتین مورد تکثیر قرار گرفت و یک باند با وزن تقریبی ۱۵۶ جفت باز مشاهده شد (شکل ۱).

حساسیت و ویژگی نسبی آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در مقایسه با الیزای تجاری به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۸/۶٪ محاسبه شد. فراوانی حضور بخش هدف از ژن *gag* در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۱۳/۳٪ و فراوانی پاسخ سرمی مثبت با الیزای تجاری ۱۲/۱٪ محاسبه شد. نتایج مثبت و منفی هر دو واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و الیزای تجاری در جدول ۱ با یکدیگر مقایسه شده است. توافق بین دو آزمایش بر حسب آماره کاپا، ۰/۹۴ محاسبه شد که نشان از توافق محکم میان واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و الیزای تجاری وجود دارد.

جدول ۱- نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و الیزای تجاری در تشخیص موارد مثبت و منفی در سرم گاوها

	نمونه‌های سرمی دام‌ها		جمع
	الیزای تجاری (مثبت)	الیزای تجاری (منفی)	
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (مثبت)	۲۱	۲	۲۳
واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (منفی)	۰	۱۵۰	۱۵۰
جمع	۲۱	۱۵۲	۱۷۳

Archive of SID

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

برای تشخیص آزمایشگاهی عفونت ناشی از ویروس لکوز گاو روش‌های مختلفی وجود دارد که عمده آنها بر اساس پدیده اتصال آنتی‌ژن به آنتی‌بادی عمل می‌کنند. از این میان می‌توان به AGID، ELISA و Western blotting اشاره نمود (Kittelberger *et al.*, 1996; Simard *et al.*, 2000).

گرچه این روش‌ها تا حدودی ارزان قیمت بوده و انجام آنها آسان می‌باشد، اما برخی از محققین معتقد هستند که این آزمایشات به اندازه کافی برای شناسایی این عفونت حساس نیستند (Burkhardt *et al.*, 1993; Jacobs *et al.*, 1992)، به‌ویژه زمانی‌که بدانیم این آزمایشات قادر به تفکیک ایمنی مادری از عفونت فعال نبوده و حتی بلافاصله بعد از رخداد عفونت فعال قادر به شناسایی آنتی بادی‌ها نیستند.

در مقابل آزمایشات مذکور که به شکل غیرمستقیم به تشخیص آزمایشگاهی عفونت می‌پردازند، روش‌های مولکولی وجود دارند که به شکل مستقیم در جستجوی ژنوم پرووویروس در نمونه می‌باشند. در میان این روش‌ها واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) به شکل روزافزونی در تشخیص آزمایشگاهی این عفونت گسترش یافته است (Poon *et al.*, 1993; Sherman *et al.*, 1992; Tani *et al.*, 1997).

در مطالعات تجربی مشاهده شده است که PCR هفت روز بعد از ایجاد عفونت قادر به تشخیص ویروس می‌باشد درحالی که آزمایشات سرولوژیک سه هفته بعد از این زمان قادر به شناسایی آنتی‌بادی‌ها هستند (Brandon *et al.*, 1991; Klintevall *et al.*, 1994).

حساسیت بالای PCR موجب شده که از آن در تجارت حیوانات و در مراکز تلقیح مصنوعی و اصلاح نژاد برای شناسایی عوامل عفونی استفاده شود. گذشته از این، می‌توان از این آزمایش در برنامه‌های ملی مبارزه با بیماری لکوز گاو به‌خصوص زمانی‌که بر اثر راهکارهای قبلی فراوانی بیماری کاهش یافته است، به منظور تایید صحت آزمایشات سرولوژیک متداول استفاده نمود. یکی از مشکلات آزمایشات سرولوژیک به‌ویژه انواع الیزا، نتایج مشکوک آنها می‌باشد که در این موارد می‌توان با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به تایید یا رد این دسته از نتایج اقدام نمود. نتایج آزمایش الیزا در این مطالعه حاکی از فراوانی نسبی ۱۲/۱٪ می‌باشد که با نتایج مطالعه قبلی جعفری جوزانی و همکاران در سال ۲۰۱۰ هماهنگ می‌باشد (Jafari Jozani *et al.*, 2010). این نتایج در مقایسه با نتایج گزارش‌های حدادزاده در سال ۱۳٦٤، کارگر موخر و همکاران در سال ۱۳۷۵ و ممتاز و همت‌زاده در سال ۱۳۷٤ حاکی از گسترش بیماری در طی سه دهه اخیر می باشد (حدادزاده، ۱۳٦٤؛ کارگر موخر و همکاران، ۱۳۷۵؛ ممتاز و همت‌زاده، ۱۳۷٤).

مسئله‌ای که باید به آن توجه نمود این است که فراوانی نسبی این عفونت در کشور دامنه وسیعی دارد و از ۰/۵٪ (حاجی حاجیکلایی و همکاران، ۱۳۷۵)، تا ۳۰٪ (کارگر موخر و همکاران ۱۳۷۵) متغیر است. بر این اساس می توان انتظار داشت که استفاده از یک روش منحصر به فرد برای تشخیص آزمایشگاهی عفونت راه حل مناسبی نمی‌باشد و با توجه به جمیع شرایط باید از روش مناسبی برای تشخیص آزمایشگاهی استفاده نمود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که می‌توان

www.SID.ir

از هر دو آزمایش الیزا و PCR برای تشخیص عفونت استفاده نمود. برخی از مطالعات قبلی حاکی از حساسیت بالاتر آزمایش PCR در مقایسه با الیزا هستند. به‌طور مثال فچنر و همکاران در سال ۱۹۹٦ با آزمایش PCR، ۱۰٪ فراوانی نسبی بالاتری را در مقایسه با الیزا مشاهده نمودند که البته گاوهای مورد مطالعه توسط ایشان دارای فراوانی بسیار پایینی از نقطه نظر این بیماری بودند. در این مطالعه آزمایش PCR قادر به شناسایی تمامی موارد مثبت شناسایی شده توسط آزمون الیزا تجاری بود (حساسیت ۱۰۰٪) ضمن اینکه، دو مورد از نتایج منفی الیزای تجاری نیز مثبت تشخیص داده شد (Fechner *et al*., 1996).

در هر صورت باید توجه داشت که فراوانی بیماری یکی از عوامل تعیین‌کننده نوع آزمایش مورد استفاده در تشخیص آزمایشگاهی این عفونت می‌باشد. به‌طور مثال، در مناطقی که فراوانی عفونت به ویروس لکوز گاو بالاتر می‌باشد، استفاده از آزمایشی با ویژگی بالا دارای اهمیت بیشتری است و در مقابل، در مناطقی که فراوانی بیماری پایین است استفاده از روشی با حساسیت بالاتر، ارزشمندتر می‌باشد تا مطمئن شویم مواردی که منفی در نظر گرفته شده‌اند، واقعاً منفی می‌باشند گرچه ممکن است که در این روند شاهد رخداد موارد مثبت کاذب باشیم.

علی‌رغم این‌که در دهه گذشته پیچیدگی انجام آزمایش و هزینه گزاف آن از جمله عوامل ممانعت‌کننده از توسعه PCR به منظور تشخیص بالینی بوده است، اما در طی چند سال گذشته با پیشرفت‌های چشمگیر در این زمینه هزینه انجام این آزمایش و مشکلات انجام آن به شدت کاهش یافته است و همین امر زمینه را برای استفاده روزمره آن به منظور شناسایی پرووویروس در خون گاوها فراهم می‌سازد.

سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی و فناوری و کارکنان محترم مدیریت پژوهشی و فناوری دانشگاه تبریز به‌خاطر فراهم نمودن امکانات مالی برای انجام این مطالعه و نیز از جناب دکتر ذکریا زاده (کارشناس سازمان دامپزشکی استان آذربایجان‌شرقی) تشکر و قدردانی نمایند.

Archive of SID

منابع

- حاجی حاجیکلایی، م.ر.، صیفی آباد شاپوری، م.ر. و اکبری م. (۱۳۷۵). مطالعه سرولوژیکی آلودگی به ویروس لکوز گاوی (BLV) در گاوهای اهواز. پژوهش و سازندگی، شماره ۷۱، صفحات: ۳۰-۲٦.
- حدادزاده، ح.ر. (۱۳٦٤). فراوانی آلودگی با ویروس لکوز انزئوتیک گاوها در گاوداری های اطراف تهران، پایان نامه برای دریافت دکتری دامپزشکی از دانشگاه تهران، شماره ۱۵۷۷.

www.SID.ir

- کارگر موخر، ر.، اهورایی، پ.، قابوسی، ب.، خدمتی. ک.، عـزی، ع.، پورزاهـدی، ر. و همکـاران (۱۳۷۵). بررسـی سرواپیدمیولوژیک بیماری لکوز آنزوتیک گاوان (EBL) در ایران، پژوهش و سازندگی، شماره ۳۰، صفحات: ١٦٦-١٦٤.
- ممتاز، ح. و همت زاده، ف. (١٣٧٤). بررسی سرولوژیک آلودگی به ویروس لکوز گاو ها (BLV) در گاوداری‌های استان چهارمحال و بختیاری. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دوره ٤، شماره١، صفحات: ٤٤-٣٧.
- Brandon, R., Naif, H., Daniel, R.C.W. and Lavin, M.F. (1991). Early detection of bovine leucosis DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction. Research in Veterinary Sciences, 50: 79-94.
- Burkhardt, H., Fechner, H., Mewes, G., Mewes, L., Wagner, H. and Ebner, D. (1993). Search with capture-ELISA nucleic acid probe and DNA-ampli®cation for BLV in a AGID seronegative dairy cattle herd in a long term study. In: 22nd FEBS Meeting, Stockholm, Sweden.
- Eaves F.W., Molloy, J., Dimmock, C. and Eaves, L. (1994). A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. Veterinary Microbiology, 39: 313-321.
- Fechner, H., Kurg, A., Geue, L., Blankenstein, P., Mewes, G., Ebner, D., *et al*. (1996). Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. Zentralbl Veterinarmed, 43(10): 621-30.
- Heeney, J., Valli, P., Jacobs, R. and Valli, V. (1992). Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. Laboratory Investigations, 66: 607-617.
- Jacobs, R.M., Smith, H.E., Gregory, B., Valli, V.E. and Whetstone, C.A. (1992). Detection of multiple retroviral infections in cattle and cross-reactivity of bovine immunode®ciency-like and human immunode®ciency virus type 1 proteins using bovine and human sera in a Western blot assay. Canadian Journal of Veterinary Research, 56: 353-359.
- Jafari Jozani, R., Moghaddam, Gh., Khazraiinia, P. and Jabbari Nooghabi, H. (2010). Adaptation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay by purified gp51SU for detection of antibodies to bovine leukemia virus. Iranian Journal of Veterinary Research, 11 (4): 332-336.
- Johnson, R. and Kaneene, J.B. (1991). Bovine leukemia virus. Part 1.Descriptive epidemiology, clinical manifestations and diagnostic tests. Compensation Continuing Education 13: 315-325.
- Johnson, R. and Kaneene, J.B. (1992). Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. Veterinary Bulletin, 62: 276-312.
- Kittelberger, R., Laybourn, B.J., Diack, D.S., Penrose, M.E., Reichel, M.P., Motha, J., *et al*. (1996). Evaluation of electrophoretic immunoblotting for the detection of antibodies against the bovine leukosis virus in cattle. Journal of Virological Methods, 61: 7-22.
- Klintevall, K., Ballagi-Pordany, A., Naslund, K. and Belak, S. (1994). Bovine leukemia virus: rapid detection of roviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. Veterinary Microbiology, 42: 191-204.
- Landis, J.R. and Koch, G.G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics, 33: 159-174.
- Poon, H., Jimenez, E., Jacobs, R.M., Song, Z. and Jefferson, B. (1993). Detection of bovine leukemia virus RNA in serum using the polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods, 41: 101-112.
- Schwartz, I., Bensaid, A., Polack, B., Perrin, B., Berthelemy, M. and Levy, D. (1994). In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. Journal of Virology, 67: 4579-4596.

Archive of SID

www.SID.ir

- Sherman, M., Ehrlich, G., Ferrer, J., Sninsky, J., Zandomeni, R., Dock, N. and Poiesz, B. (1992). Amplification and analysis of specific DNA and RNA sequences of bovine leukemia virus from infected cows by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, 30: 175-191.
- Sherman, M.P., Ehrlich, G.D., Ferrer, J.F., Sninsky, J.J., Zandomeni, R., Dock, N.L., *et al*. (1992). Ampli®cation and analysis of speci®c DNA and RNA sequences of bovine leukemia virus from infected cows by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, 30: 175-191.
- Simard, C., Richardson, S., Dixon, P., Bélanger, C. and Maxwell, P. (2000). Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. Canadian Journal Veterinary Research, 64(2): 101-106.
- Tani, K., Asahina, M., Wu, D.L., Ajito, T., Murakami, K., Goryo, M., *et al*. (1997). Further analysis of the phenotype and distribution of tumor cells in sporadic B-cell and T-cell lymphomas in the lymph node and spleen of cattle. Veterinary Immunology and Immunopathology, 55: 273-290.

Archive of SID

www.SID.ir