نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۱، تابستان ۱۳۹۰

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: ۶۱۱۱۷۰۵۷ ۰۲۱
Email: nikbakht@ut.ac.ir

چکیده

ویروس لکوز گاو (BLV) رترو ویروسی است که موجب لکوز یا لمفومای مزمن گاو در بسیاری از کشورهای جهان می‌شود. الیزا اولین روش تشخیصی برای غربالگری حضور پادتن ها بر علیه ویروس لکوز گاوی است. تا کنون روشن نشده است که آیا این روش پادتن ها را در زمان آلودگی به ویروس لوسمی گاو شناسایی می‌کند یا خیر. واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) برای توالی‌های اختصاصی DNA پرووویروس هدف، در سلول های 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 محتواهای مختلف، روش آشیانه‌ای واکنش زنجیره ای پلی مراز (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 DNAی تخریب شده (۱۰ نمونه عقده لمفاوی سونیکه) انجام شد. حساسیت و ویژگی آزمون PCR به ترتیب ۰/۸۵ و ۰/۸۴محاسبه 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 مراز آشیانه‌ای در مقایسه با روش های PCR معمولی استفاده شده در آزمایش های متفاوت از حساسیت بیشتری برخوردار است. این تکنیک برای غربالگری انبوه و همچنین تشخیص DNA پرووویروس در نمونه های بافتی خاص اعم از پارافینه یا نمونه های قدیمی مفید خواهد بود.

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

www.SID.ir

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)[1] عامل شایع ترین بیماری نئوپلاستیک یا لکوز آنزئوتیک در گاو (EBL)[2] است. این ویروس در خانواده رتروویریده و جنس دلتا رتروویروس 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 (HTLV – ۱ ،۲)[3] و میمون (STLV -۱)[4] دارد (۱۰،۹،۸،۳).

در بررسی های بالینی آلودگی به BLV با دوره‌ی کمون طولانی و پاسخ ایمنی مداوم مشخص می شود. پاسخ ایمنی مداوم، نتیجه‌ی 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 لنفوسیت‌های B (PL)[5] را نشان داده و کمتر از ۵ درصد به تغییرات کشنده، منوکلونال و نئو پلاستیک لنفوسیت های B یا لنفومای بدخیم (ML)[6] دچار می‌شوند. PL معمولاً قبل از سن ۵ سالگی رخ می دهد در حالیکه حداکثر سن بروز لنفوما بین ۸-۵ سالگی است (۲۴،۱۹،۷).

روش‌های متعددی برای تشخیص EBL بکار گرفته شده است که شامل خنثی سازی سرم[7]، تثبیت عامل مکمل، سنجش ایمنی با مواد رادیو اکتیو[8]، ایمونو دیفوزیون روی ژل آگارز[9]، الیزا، بررسی عفونت سنسیشیال[10]، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[11] و وسترن بلاتینگ[12] می‌شود (۲۲،۲۱،۱۵) تشخیص آلودگی به ویروس BLV در هر یک از مراحل بیماری و با هر یک از روش‌های فوق با مشکلاتی مواجه است. در سنین پائین بدلیل وجود پادتن‌های مادری و یا ضعف سیستم ایمنی تشخیص حضور پادتن‌ها امکان پذیر نیست. در حیوانات واجد شکل الحاقی ویروس به ژنوم (پرووریوروس)[13] نیز، غلظت پایین، موقتی یا غیر قابل شناسایی پادتن، تشخیص بوسیله‌ی آزمون‌های سرولوژیک را مشکل می‌سازد. در تشخیص با پادتن های منوکلنال که بر علیه بخش‌های خاصی از ساختارهای گلیکوپروتئینی پوششی (gp۵۱) یا پروتئین های مرکزی (p۲۴) طراحی شده‌اند مواردی مشاهده می‌شود که حاکی از تنوع پاسخ سرمی علیه ویروس است و نمی‌توان هیچ یک از آنها را به تنهایی برای تشخیص آلوده‌گی به کار برد (۱۵، ۲۶).

در مطالعات گله‌ای، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز 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 گله‌هایی که برای مدت طولانی از BLV پاک بوده‌اند و همین طور مطالعات اصلاح نژادی کاربرد دارد (۱۴).

هدف از تحقیق حاضر طراحی و ارزیابی روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز آشیانه‌ای[14] 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 روش‌ها

در مجموع تعداد ۲۱ نمونه عقده‌ی 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 سال‌های 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 نمونه‌ها از آنها اخذ شده بود با استفاده از روش ایمونودیفوزیون و الایزا به اثبات رسیده بود. تخریب ژنومی با الکتروفورز DNA ژنومی بر روی ژل آگارز و رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید مشخص

Archive of SID

www.SID.ir

شـده بود. در دو مورد سـایر اعضای بدن مثـل کبد ، کلیه و طحال هم مورد آزمایش قرار گرفتند.

استخراج DNA از نمونه های عقده لمفاوی

برای اسـتخراج DNA از نسـج عقده های لنفاوی از کیت High Pure PCR Template (Roche Molecular Biochemicals, Germany) استفاده شد. تمامی مراحل اسـتخراج بر اساس روش پیشنهادی شرکت سـازنده 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 جهـت جداسـازی پارافین اضافه شد. به طور خلاصـه مقاطع پارافینه به مدت ۳۰ دقیقه در گزیلول قرار داده شدند و سپس به مدت ۱۰ ثانیه به ترتیب در اتانول ۱۰۰ درصد (دهیدراتاسـیون)، اتانول ۸۰ درصد ، اتانول ۶۰ درصـد ، اتانـول ۴۰ درصد و آب دوبار تقطیر (رهیدراتاسـیون) قرار گرفتند. سـایر مراحل استخراج مشابه با مراحل استخراج DNA از نسج عقده‌های لمفاوی غیر پارافینه بود. پس از اتمام مراحل استخراج، نمونه‌ها تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA از نمونه های خون

اسـتخراج DNA از نمونـه های خون با روشی نویـن انجام گرفت. ابتدا ۱ میلی‌لیتـر بافر لیزکننده گلبول قرمـز (۱۰ میلی مولار Tris-HCl با pH= ۷/۵، ۵ میلـی مولار MgCl۲ ، ۰/۱۵ مولار NaClو ۰,۷۵درصد Triton X ۱۰۰) به ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه خون اضافه شده و سـپس به مدت ۶ دقیقه با نیروی g ۲۰۰۰ سـانتریفیوژ می‌شد. مایع رویی دور ریخته شـده و ۱ میلی‌لیتر از بافر مذکور دوباره به نمونه اضافه شده و به مدت ۳ دقیقه با نیروی g ۲۰۰۰ سانتریفیوژ می‌شد. این مرحله تا زمان لیز کامل گلبول های قرمز و مشـاهده یک پلت کاملاً سـفید در ته لوله تکرار می‌شد.

پلـت نهایی بـا ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیزه کننده گلبول سـفید (۱۰ میلی مـولار Tris-HCl، ۰/۱ مـولار NaCl، ۲۵ میلـی مـولار EDTA با pH =۸و ۰,۵ درصـد SDS) مخلـوط و یکنواخـت می‌گردیـد. ۳۰۰ میکرولیتـر بافر دناتوره کننده (۴ مولار گوانیدیم تیوسـیانات، ۲۵ میلی مولار سـیترات سـدیم و ۰/۵ درصد سـارکوزیل) به مخلوط قبلی اضافه شده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری می‌شد. سـپس ۳۰۰ میکرولیتر محلول اسـتات پتاسـیم (۳ مولار اسـتات پتاسـیم و ۱۱,۵ درصد اسید استیک گلاسیال) به مخلوط قبلی اضافه می‌شد.

پـس از یکنواخت کـردن محلول و به منظور رسـوب دادن پروتئین‌های موجـود، نمونه به مـدت ۵ دقیقه با نیـروی g ۱۲۰۰۰ سـانتریفوژ می شـد. ۱ میلی لیتر از مایع رویی به یـک تیوب جدید منتقل شده و ۷۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل به آن اضافه و به مدت ۳ دقیقه با نیروی g ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ می‌شد تا رسوب DNA بدست آید. مایع رویی کاملا از تیوب خـارج شده و پلـت DNA با ۶۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۰ درصد شستشـو داده می‌شـد. پلـت به مدت ۵ دقیقه در دمای محیـط قرار داده می شد تا الکـل باقیمانده تبخیر گردد. در نهایت پلـت در ۱۰۰ میکرو لیتر بافر TE (Tris-EDTA) حـل شده و در دمای ۲۰- درجه سـانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگهداری می‌شد.

افزوده سازی بخشی از ژن gag با روش آشیانه‌ای PCR

در دور اول افزوده سـازی ژن gag ویروس لوسـمی گاوان صورت گرفت. ایـن ژن در ویـروس لکـوز گاوی حراسـت شده اسـت و در تشـخیص سویه های مختلف ویروس اختلالی ایجاد نخواهد کرد (۱۷). برای افزوده سـازی ژن gag از آغازگرهایی استفاده شد که تمامی طول ژن را افزوده می ساختند:

gag F: nt ۶۲۸-۶۴۸: ۵'-ATGGGAAATTCCCCCTCCTAT۳-'

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

در دور بعدی از آغازگرهای داخلی برای افزوده سـازی 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'- GTTCCTTAGGACTCCGTCG ۳-'

طراحـی پرایمرهای خارجی و داخلی بر اسـاس ردیف های نوکلئوتیدی مشـخص شـده در ژنـوم ویـروس لوسـمی گـاوان صـورت گرفـت. (BLV genome, GenBank K۰۲۱۲۰) از کشـت سـلول کلیه بره کـه به طور پایدار به ویـروس BLV آلوده بود (Fetal lamb kidney BLV infected, FLK-BLV) به عنوان کنترل مثبت و از نمونه های عقده لمفاوی گاو های سـالم مشخص شده با آزمایش های الیزا، آگار ژل دیفوزیون و بررسی کالبد گشایی به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

برای هر دو مرحله، اجـزای واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میلی مـولار Mgcl۲، ۲۰۰ میکرو مولارdNTP.۰/۴ میلی مولار از آغازگرهـای اختصاصی، ۱ واحـد Taq DNA Polymerase (شرکت سـینا ژن) و یک میکرو لیتر از DNA اسـتخراج شده از عقده‌ی لنفاوی یا ۳ میکرولیتر از DNA اسـتخراج شده از خـون (حدود ۱۰۰ نانوگرم DNA) اسـتفاده گردیـد. چرخه‌های حرارتی بـرای دور اول شامل یک چرخه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه سه مرحله‌ای شامل ۹۴درجه سـانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۵ درجه سـانتی گراد بـه مـدت ۶۰ ثانیه ، ۷۲ درجه سـانتی گـراد به مـدت ۱۲۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه (Bio-Rad, Mini-MJ) بود. در دور دوم افزوده سـازی بـا ۲ میکرولیتر از محصول مرحله اول و با غلظت های مشـابه واکنش قبـل ادامه یافت. چرخه‌های حرارتی برای دور دوم شامل یک چرخه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه سـه مرحله‌ای شامل ۹۴درجه 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 سـانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقـه بـود. و در نهایت ۱۰ میکرولیتـر از محصول مرحله دوم روی ژل آگـارز 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 مسـتقیم و با استفاده از کیت های تشخیص سـرمی BLV (BioX ELISA kit Belgium BLB) و تشـخیص سرمی آنتی بادی های اختصاصی ضد ((((BLV-gp۵۱ BLV-gp۵۱-

Archive of SID

Antibody; Svanova Biotech AB, Uppsala, Sweden بـر روی پلاسـمای نمونه های خون صورت گرفـت. تمامی مراحل انجام آزمایش و تفسـیر نتایج بر اساس روش های پیشـنهادی تهیه کنندگان کیت ها بود.

روش های تجزیه و تحلیل داده ها

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

با اسـتفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت. بر اسـاس ایـن معیارها و با تفاوت معنادار بین مشـاهدات در سـطح P<۰/۰۵، معـدل ۰ تا ۰/۲۰ ناچیز، ۰/۲۱ تا ۰/۴۰ بی طرف، ۰/۴۱ تا ۰/۶۰ متوسـط، 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 اسـتخراج DNA از نمونه های خون کامل با موفقیت همراه بوده و DNA به دست آمده تخریبی را نشان نمی دهد. شکل ۱- ب DNA اسـتخراج 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 تعـدادی از نمونه‌هـای 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 نموه های منفـی ۱۵۷ عدد بود. تعداد نمونه ها مثبت در PCR ۱۴۲ و نمونه های منفـی ۱۵۲ عدد بود. حساسـیت و ویژگی آزمون PCR به ترتیب ۰/۸۵ و ۰/۸۴محاسـبه گردید. درجه توافق بین دو آزمون (کاپا) مقدار ۰/۶۹۳ محاسـبه گردید که قابل توجه می باشد. ارزش پیشـگویی 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 الایزا به عنوان یک آزمون غربال‌گری بـرای تشـخیص آلودگی به صورت انفـرادی در گله مورد اسـتفاده قرار مـی گیرد. ویژگی این آزمون حدود ۹۸/۸ درصد و حساسـیت آن ۹۸/۵ درصد بیان شده اسـت (۱۹،۱۸). روش تشـخیص رسمی و معتبر BLV در کانادا، الایزا بر پایه‌ی گلیکو پروتئین gp۵۱ است. محققین استفاده از الایزا را بدلیل حساسیت بسیار بالای آن نسبت به AGID، جهت کنترل و ریشـه کنی ویروس در سطح گله توصیه می کنند(۲۵). حساسیت الیزا به حدی اسـت که در صورتی که روی مجموعه‌ی سـرم گله (Pooled) انجام شود، این امکان را میسـر می سازد که پادتن‌های با شیوع کمتر از ۱ درصد در سطح گله تشخیص داده شوند، اما AGID فقط ۵۰ درصد از گلـه هایی را که با الایزا تایید شده‌انـد را مثبت اعلام می‌کند. واکنش زنجیره ای پلیمراز نسـبت به روش‌های سـرمی جهت تشخیص مستقیم آلودگی روشی حسـاس‌تر بوده و حتی قبل از ظهور پاد تن در خون قابل استفاده می‌باشد (۱۸).

Fechner و همکـاران (۱۹۹۶) بـه مقایسـه روش هـای PCR و ایمونودیفوزیون پرداخته‌اند. آنها نشـان داده‌اند که حساسـیت این روش ۱۰ درصد بیش از ELISA و ۱۷/۷ درصد بیش از AGID اسـت (۱۲). در سـال ۲۰۰۱ ، Martin و همکاران نیز یک مطالعه مقایسـه‌ای بین PCR بـه عنـوان روش مسـتقیم و ELISA و AGID به عنوان روش غیرمستقیم، انجام داده اند (۱۸).

در ایـن بررسـی از پرایمرهـای اختصاصی برای ژن هـای env pol و tax اسـتفاده شـده اسـت و PCR بـر روی DNA اسـتخراج شده از منوسـیت های خون محیطی و یا لکوسیت های شیر صورت گرفته است. بالاترین پاسـخ 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 سـال ۲۰۰۳ توسـط Nagy و همکاران انجام شده، کاربرد روش PCR در تشـخیص بیماری در گـاو های شیری بالغ مورد ارزیابـی قرار گرفته اسـت. این محققین حساسـیت و ویژگی این آزمون را بترتیـب ۰/۶۷ و ۱ ذکر کرده اند. ارزش پیشـگویی مثبت تسـت ۱ و ارزش پیشـگویی منفی آن ۰/۴۲ بوده است. درصد گاوهایی که بدرستی بوسـیله ی این روش تشـخیص داده شدند ۷۳/۵ درصد ذکر شده است. اما در کل، حساسیت و ارزش پیشگویی منفی این تست، پایین است. در نتیجه، در تشـخیص ویروس در گله های با شیوع بالای بیماری، استفاده از PCR به تنهایی، توصیه نمی‌شود (۲۵).

در مقایسـه نتایج ذکـر شده با تحقیق حاضر به نظر می رسـد که روش آشیانه ای PCR از حسـایت بیشـتر (۰/۸۵) و ویژگـی کمتری (۰/۸۴) برخوردار است ولی ارزش پیشگویی منفی آن بسیار بالاتر است (۰/۸۶) و درصد گاوهایی که بدرسـتی بوسیله ی این روش تشخیص داده شده اند بیشتر است (۸۵ درصد).

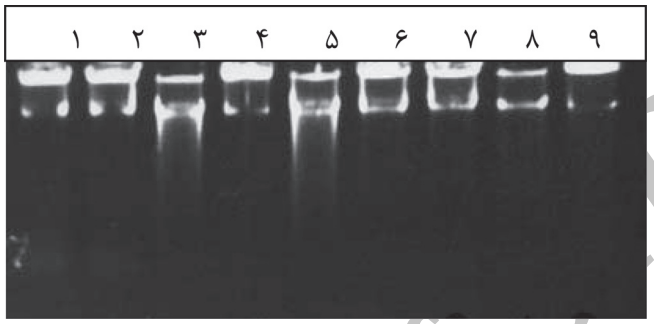
تفـاوت اصلـی روش پیشـنهادی حاضـر با روش هـای مورد اسـتفاده سـایر محققیـن طراحی افـزوده سـازی ژن gag بوده اسـت و با روش آشیانه ای حساسیت بیشتری را در تشخیص DNA ویروسی از خود نشان می دهد. بررسـی ژن gag و ناحیه داخلی افزوده شده در بانک اطلاعاتی (GeneBank) نشـان می دهد که ناحیه مذکور از تنوع کمی برخوردار بوده و در ویروس لوسـمی گاوان کاملاً حراسـت شده اسـت (شکل ۴). بنابرایـن برای اولین بار می‌توان اظهار داشت که حساسـیت شناسـایی پرووِیروس، 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 ایِ خون محیطی هدف اصلی ویروس هستند. با این وجود ممکن اسـت ویروس در بافت های لمفـاوی (عقده های لمفاوی و طحال)، کبد و کلیه نیز یافت شود(۱۵). امکان تشـخیص ویروس نیز در بافت های مذکور به اثبات رسید. نکته قابل توجه دیگر، امکان استفاده از این روش در تشـخیص پرووِیروس در نمونه های پارافینه و حتی تخریب

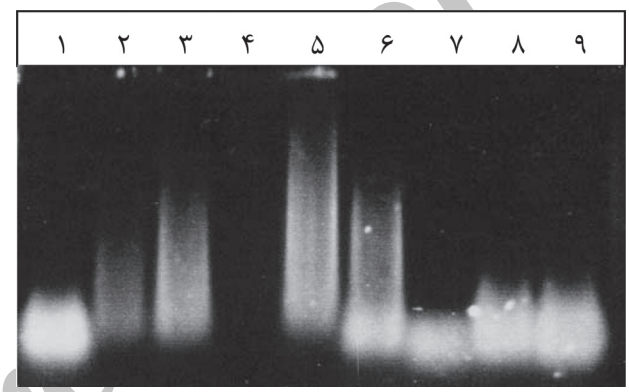
Archive of SID

شده اســت که کمک زیادی به بررســی های گذشته نگر نموده و گستره تشخیص را فراتر می برد.

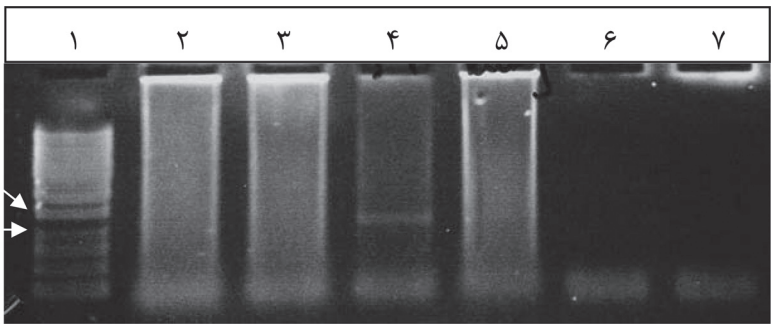
در یک عفونت معمولی با BLV، پاسخ ایمنی، به صورت تولید پادتن بر علیه پادگن های BLV، خواهد بود. در مراحل غیرطبیعی آلودگی، غلظت پایین، موقتی یا غیر قابل شناســایی پادتن، بویژه در حیوانات واجد شکل الحاقی ویروس به ژنوم ســلول (پرووویروس) مشــاهده شده که تشخیص و کنترل آلودگی را در گله، بوســیله‌ی تســت های ســرولوژیک مشــکل می سازد. از مجموع نتایج به دست آمده در این تحقیق و همچنین سایر تحقیقاتی که به تشــخیص آلودگی با ویــروس توجه داشته اند چنین بر می آید که در مطالعات بر روی گله ها و یا حتی نمونه های منفرد، واکنش زنجیره ای پلی‌مراز مفید خواهد بود و حساســیتی 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).



شکل۱- الف: نتایج حاصل از استخراجDNAاز نمونه های بافتی (ستون۱ الی۹)

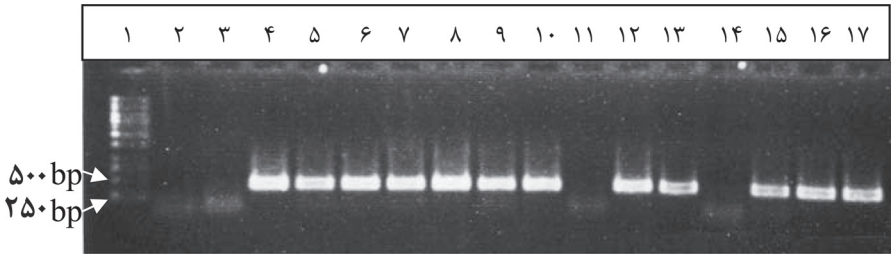


شکل ۱- ب: نتایج حاصل استخراج DNA از نمونه‌های بافتی پارافینه و سونیکه (ستون ۱ الی ۹)

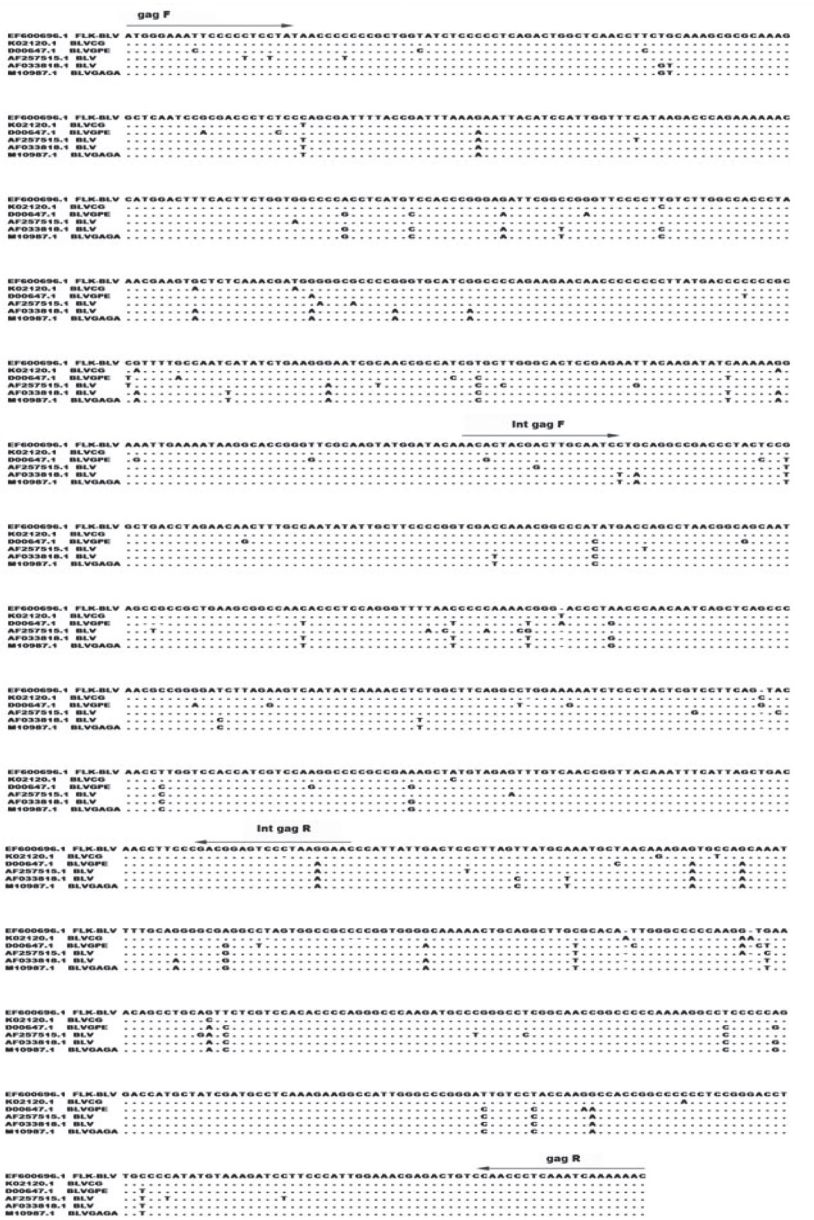


شکل ۲- الف: نتایج حاصل افزوده سازی در مرحله اول؛ ستون ۱، مارکر Fermentase Co) Kb۱.)؛ ستون ۲ الی ۶ نمونه‌های تحت آزمون؛ ستون ۷ شاهد منفی.

www.SID.ir



شکل ۲- ب: نتایج حاصل افزوده سازی در مرحله دوم؛ ستون ۱، مارکر Kb (Fermentase Co ۱.)؛ 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

نشریه دامپزشکی www.SID.ir

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

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

پاورقی ها

1- Bovine Leukemia virus
2- Enzootic bovine leukosis
3- Human T-lymphotropic viruses 1 and 2
4- Simian T- lymphotropic viruses
5- Persistart 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- کیوانفـر، ه، کریمـی، ن، (مترجمین)،(۱۳۷۶) ویروس شناسـی دامپزشکی (بخش بیماری ها)، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۴۵۵ صفحه.

3- Agresti, A., Ponti, W., Rocchi, M., Meneveri, R., Maozzi, A., Cavallri, 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 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 Radostits, 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

Archive of SID

384
21- Naif, H. M., Brandon, R. B., Daniel, R. C. and Lavin, M. F. (1990) Bovine leukaemia proviral DNA detection in cattle using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol*. 25: 117-129.
22- Naif, H. M., Daniel, R. C., Cougle, W. G. and Lavin, M. F. (1992) Early detection of bovine leukemia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. *J. Clin. Microbiol.* 50: 675-679.
23- Roberts, D. H., Lucas, M. H., Wibberley, G. and Chasey, D. (1990) Survival of bovine leukosis virus in bovine hole blood,serum and plasma. *J. Biol. Stand*. 9: 469-473
24- Rola, M. and Kuzmak, J. (1999) The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. *J. Virol .Methods.* 99: 33-40
25- Tajima, S. and Aida, Y. , (2002) Mutant tax protein from bovine leukemia virus with enhanced ability to activate the expression of c-fos. *J. Virol.* 76: 2557-2562.
26- Tajima, S., Takahashi, M., Takeshima, S., Konnai, S., Yin, S.A., Watarai, S., Tanaka, Y., Onuma, M., Okada, K. and Aida, Y., (2003) A mutant form of the tax protein of bovine leukemia virus (BLV), with enhanced transactivation activity, increases expression and propagation of BLV *in vitro but not in vivo. J. Virol.* 77: 1894-1903.
evaluation of a highlt sensitive and specific blocking enzyme-linked immunosorbant assay and polymerase chain reaction assay for diagnosis of bovine leukemia virus infection in cattle. *Am. J. Vet. Res*.62:1571-1577
15- Kittelberger, R., Reichel, M., Meynell, R., Tham, K. and Molloy, J. (1999) Detection of antibodies against the core protein p24 of the bovine leukaemia virus in cattle for confirmatory serological testing. *J. Virol. Methods.* 77: 109-14.
16- Landis, J. R., and Koch, G. G. (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174.
17- Licursi, M., Inoshima, Y., Wu, D., Yokoyama, T., Gonzalez, E. and Sentsui, H. (2002) Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts. *Virus Res*. 86: 101-110.
18- Martin, D., Arjona, A.,Soto, I., Barquero, N.,Viana, M. and Gomez-Lucia, E. (2001) Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assay for the detection of bovine leukemia virus. J. Vet. Med. B Infect. Dis. *Vet. Public Health*. 48: 97-106
19- Monke, D. R.,Rohde, R. F, Hueston, W. D.and R. J. Milburn, (1992) Estimation of the sensitivity and specificity of the agar gel immunodiffusion test for bovine leukemia virus:1,296cases (1982-1989) *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 200: 2001-2004
20- Murphy, A. ,Gibbs, J., Horzinek, C. and Studdert, J. (1999) *Vet. virol.* Academic Press, California, USA. PP: 363-373, 383-

Archive of SID

www.SID.ir