مطالعه الگوی الکتروفورتیک عصاره پروتئینی عقده های لمفاوی گاوهای مبتلا به لوکوز در مقایسه با گاوهای سالم

دکتر فرهید همت زاده[1]* دکتر حسن ممتاز[2]

دریافت مقاله: ۲۸ مهرماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۱۴ مهرماه ۱۳۸۲

هدف: مطالعه الگوی الکتروفورتیک عقده های لمفاوی گاوهای مبتلا به لوکوز انزئوتیک در مقایسه با گاوهای به ظاهر سالم.

نمونه ها: نمونه ها شامل بیست و پنج مورد عقده لمفاوی توموری مربوط به گاوهایی که در آزمونهای سرولوژیک الایزا و ژل دیفوزیون مثبت شده و به خاطر شکل گیری لمفوسارکوم بالینی یا به کشتارگاه اعزام شده و یا کالبدگشایی شده بودند، به همراه تعداد ۵ نمونه عقده لمفاوی گاوهای به ظاهر سالمی که در آزمونهای سرولوژیک فوق الذکر پاسخ منفی داده و از نقاط مختلف مملکت تهیه شده بودند.

روش: پس از تشخیص سرولوژیک لوکوز و تشخیص بالینی لمفوسارکوم بر روی نمونه های مثبت و تایید منفی بودن نمونه های به ظاهر سالم اقدام به تهیه عصاره بافت هموژن گردید. کلیه نمونه ها پس از تنظیم میزان پروتئین به روش ژل پلی اکریلامید حاوی سدیم دودسیل سولفات الکتروفورز شدند.

نتایج: حد اقل ۲۵ باند پروتئینی مشترک بین عصاره بافتهای توموری و سالم مشاهده گردید و علاوه بر آنها در بافتهای توموری دو باند مشخص پروتئینی ۵۱ و ۲۴ کیلودالتونی نیز مشاهده گردید که در بافتهای سالم وجود نداشت. از آنجایی که این دو پروتئین از پروتئین های عمده ویروسی هستند می توان اذعان نمود که به علت ترانسفورمه شدن بافتهای لمفاوی این دو پروتئین ویروسی به میزان بسیار بالایی در بافت بروز پیدا نموده و از آنها می توان برای مقاصد تشخیصی استفاده نمود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۳)، دوره ۵۹، شماره ۱، ۴۷-۴۳.

واژه های کلیدی: لوکوز گاوی، SDS-PAGE ، لمفوسارکوم، p24, gp51.

ویروس لوکوز گاوها از خانواده رتروویریده و جنس دلتا رتروویروس است که ژنوم آن RNA تک رشته ای خطی سنس مثبت به صورت دیپلوئید به اندازه ۱۰-۷ کیلو باز می باشد (۲،۱۸).

بیماری ناشی از این ویروس در گاو دارای اشکال مختلفی است که شامل، لوکوز انزئوتیک گاو که شکل معمول بیماری در دامهای بالغ است، لوکوز انفرادی گاو که در دامهای کمتر از سه سال دیده می شود و خود دارای سه شکل مجزا است و در نهایت لمفوسیتوز با دوام که در اثر ازدیاد خوش‌خیم لنفوسیت ها به وجود می آید (۱۳،۱۸،۲۴).

بیماری از طریق افقی به واسطه راه هایی که در آنها انتقال به وسیله مواد یا وسایل آلوده به خون رخ می دهد امکان پذیر می باشد. عمده ترین راه های انتقال بیماری شامل سرنگ آلوده، وسایل شاخ بری آلوده، دستکش معاینه مقعدی آلوده بوده و همچنین شیر مادر آلوده ای که توسط گوساله شیرخوار از مادران آلوده دریافت می شود نیز منبع انتقال بیماری محسوب می شود. هدف اولیه ویروس لمفوسیت های B می باشند. حیوانات آلوده

۱) گروه آموزشی میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد - ایران.
*) نویسنده مسئول fhemmat@ut.ac.ir

Study on electrophoretic proteinal pattern of lymph nodes of cows with bovine leucosis and comparison with apparently healty cows

Hemmatzadeh, F.,[1] Momtaz, H.[2]

[1]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.* [2]*Faculty of Veterinary Medicine, Azad IslamicUniversity of Shahrekord, Shahrekord - Iran.*

Objectives: Determination of protein pattern of lymph nodes of 25 cows that had clinical bovine leucosis and comparison with apparently healthy cows.

Samples: A total of 25 samples of BLV infected lymph nodes from slaughtered cows that were positive in ELISA and AGID serological tests and had clinical singes of leucosis along with five apparently healthy lymph nodes from cows that were negative in ELISA and AGID for BLV. These tissues were obtained during Jun.2001 to Oct.2002 in Iran.

Procedure: Following protein extraction and purification of the samples electrophoresis by SDS-PAGE method were done on the samples. Protein bands stained by commassie brilliant blue.

Results: The results of SDS-PAGE test of samples, were shown that all of the tissues posses 25 different protein bands that related to normal lymph node in addition two 51, 24 kd bands in protein patterns of affected cows. Those two proteins are the most important viral proteins of the BLV and detecting of these proteins can use in diagnosis of the disease. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 59, 1: 43-47, 2004.***

Key words: Bovine leukemia virus, SDS-PAGE, Lymphosarcoma, gp51, p24.

Corresponding author email:fhemmat@ut.ac.ir

معمولاً فاقد علامت بالینی هستند و حتی تا مدتها به شکل غیر لوسمیک باقی می مانند، سپس لمفوسیتوز پایدار B در ۱ درصد موارد به شکل لوسمیک رخ می دهد (۸،۱۹).

برای جدا کردن ویروس، باید بافتهای آلوده یا سلولهای سفید خون را در کشت بافت طحال بره کشت داد. اگر رشد ویروس صورت گرفته باشد، می توان به روشهای مختلف مثل استفاده از میکروسکوپ الکترونی، روش پادتن فلورسنت، آزمایش الایزا و رادیوایمنواسی (Radio immuno assay "RIA") آن را مشخص نمود. چون آزمایش کشت بافت گران تمام شده و بسیار مشکل و وقت گیر است، معمولاً به آزمایشهای سرمی اکتفا می کنند (۸،۲۲).

آزمایش ایمنو دیفوزیون روی ژل (Agar gel immuno diffusion "AGID") به عنوان آزمایشی برای برآورد اولیه و تشخیص گله آلوده به کار می رود، ولی

از آنجایی که بعضی از دامهای غیر بیمار نیز واکنش مثبت نشان می دهند، برای تشخیص انفرادی کاربرد ندارد. در این آزمایش موارد منفی کاذب نیز گزارش شده است. در مطالعه انجام شده توسط محققین ژاپنی، در تعداد کمی از گاوهای سرم مثبت مبتلا به شکل تحت درمانگاهی لوکوز، امکان تعقیب پادتن با روش AGID بعد از مدتی وجود نداشته است، علت این امر احتمالاً مربوط به تغییرات پادگنی ویروس بوده است (۸،۲۲،۲۵).

آزمایش وسترن بلاتینگ (Western blotting test "WB") جهت جستجوی پادتن های ضد BLV در گاو کاربرد پیدا کرده است. در تحقیقی ۲۳۳ نمونه سرمی از گاوهایی که به طور طبیعی و تجربی با ویروس آلوده بوده اند، با آزمون WB آزمایش شدند و نتایج حاصله با آزمون AGID مقایسه گردید. در ۹۰/۹ درصد موارد، تشابه بین نتایج دو آزمون مشاهده شد و تنها ۱/۷ درصد از نمونه های منفی شده در AGID به وسیله وسترن بلاتینگ مثبت تشخیص داده شدند (۱۰،۱۳،۲۲).

در بررسیهای بسیار محدودی که طی سالهای گذشته در رابطه با چگونگی حضور بیماری لوکوز در ایران صورت گرفته است، بیشتر به حضور بیماری اشاره شده و به چگونگی دخالت عوامل مؤثر در این پدیده کمتر توجه شده است. در مطالعه‌ای که توسط نور محمد زاده و برین در سال ۱۳۷۰ به منظور جستجوی پادتن ضد ویروس لوکوز گاوها در گوسفند صورت گرفت، ۱۲/۹درصد از گوسفندان مؤسسه تحقیقاتی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در امین آباد، واکنش سرمی مثبت علیه ویروس نشان دادند. در مطالعه کارگر و همکاران در سال ۱۳۷۵ میزان آلودگی گاوها در ایران معادل ۱/۷ درصد برآورد شده و استان تهران و آذربایجان شرقی با ۶ درصد آلودگی بیشترین میزان آلودگی را ازخود نشان داده اند (۱،۴).

مطالعات مختلفی در زمینه الگوی پروتئینی BLV انجام گرفته است که برحسب نوع سلول و حتی سویه ویروسی الگوهای نسبتاً متفاوتی به دست آمده است. Uckert در سال ۱۹۸۶ طی مطالعه ای که بر روی ویروس های تکثیریافته در کشت سلولی کلیه بره (Fetal lamb kidney "FLK") انجام داد مشخص نمود که روی پروتئین مختلف به اسامی gp64,gpc,p24,p15(1),p15(2) در الکتروفورز ویروس در ژل پلی اکریلامید قابل تشخیص اند البته توسط روش بلاتینگ مشخص گردیده که p10 حاصل شکافته شدن p51(2) در ویروس می باشد (۲۴).

در مطالعه Schult در سال ۱۹۸۴ دو پروتئین یکی به نام gp60 و دیگری p30 مورد مطالعه قرار گرفته اند که p30 به عنوان محصول ژن env معرفی گردیده است. Mamoun در ۱۹۸۳سال چهار پروتئین به اسامی p70، p45، p52 و p27 را معرفی نمود و طی مطالعه Deshayes در سال ۱۹۸۰ مشخص گردید که پاسخ ایمنی هومورال علیه پادگن های gp51، gp45 و gp12 شکل گرفته ولی پاسخ مشهودی علیه gp35 مشاهده نمی گردد. Liames در سال ۲۰۰۰ با توسل به ۵۹ مورد پادتن منوکلونال توانست پادگن های مختلف را در سطح ویروس شناسایی نموده و میزان بروز هرکدام از این پادگن ها را در ویروس های مختلف مشخص نماید (۹،۱۶،۱۷،۲۰).

در آزمونهای تشخیص سرمی عمده ترین پادگن های دخیل p24 و gp51 می باشند. پروتئین p24 محصول ژن gag از زمره ژن های اصلی رتروویروس هاست و جزو پروتئین های هسته مرکزی (core) محسوب می گردد. گلیکوپروتئین gp51 نیز جزو پروتئین های پوشینه محسوب می گردد و در اغلب آزمونهای سرولوژیک پاسخ ایمنی قوی را باعث می گردد (۸).

آنچه از مجموع نتایج کارهای محققین دانشگاه Davis در کالیفرنیا برمی آید آنست که پروتئین p24 و گلیکو پروتئین gp51 مهمترین پادگن های دخیل در پاسخ ایمنی هومورال بوده و ردیابی پادتن های ضد این دو پادگن راه اصلی تشخیص سرولوژیک این بیماری می باشد (۵،۱۱).

حساسیت و ویژگی آزمونهای تشخیص سرولوژیک نیز با توجه به ماهیت پادگنی مورد استفاده متفاوت بوده به طوری که در صورت بکارگیری p24 در آزمون ایمونو بلات حساسیت به ۹۷/۴ بالغ شده و ویژگی آن ۹۹/۴ درصد می باشد در حالی که حساسیت و ویژگی سیستم الایزا براساس پادگن p24 برابر ۹۶/۵ و ۵۳/۳ تا ۸۵ درصد بالغ می شود. که این نشانگر عدم کارایی مطلوب این پادگن در سیستم الایزا می باشد و برهمین اساس سیستم الایزا بر اساس پادگن gp51 از نظر حساسیت و ویژگی کارایی بسیار مطلوبتری را نسبت به p24 دار است. در حالی که در مطالعات دیگران که به روش ایمونوبلاتینگ در گاوهای آلوده انجام گرفته است ردیابی پادتن های ضد p24 به منظور تشخیص سرولوژیک عفونت نتایج بسیار بهتری را نسبت به gp51 از خود نشان داده است گرچه پادتن های ضد gp51 چند روز زود تر از p24 در خون ظاهر شده و ردیابی این پادتن ها با سرعت زیاد تری بروز عفونت را نمایان می سازند (۱۴،۱۵،۲۳).

مطالعات اخیر حاکی از وجود حداقل ۱۵ باند پروتئینی مختلف در SDS-PAGE ویروس و البته در سیستمهای سلولی مختلف می باشد اما تعداد و الگوی استقرار این باندها بسته به نوع سیستم لیز کننده سلول، نوع تیره سلولی و حتی سویه ویروس با هم متفاوت بوده ولی برخی پروتئین های غیر ویروس از قبیل p25kd واکنش پذیری شدیدی را در روش ایمونوبلات با سرم های مربوط به گاوهای بیمار از خود نشان داده اند. با توجه به این یافته ها هنوز الگوی دقیقی که گویای پروتئین های ویروس BLV باشد به خوبی تعریف نشده است و بسته به نوع ویروس و نحوه استخراج پادگن الگوهای متفاوتی حاصل می آید. این تحقیق تلاشی است در جهت ردیابی پادگنهای ویروس در عقده های لمفاوی گاوهای مبتلا به شکل لمفوسارکوم و مقایسه این الگوها با الگوی الکتروفورتیک عصاره عقده های لمفاوی گاوهای به ظاهر سالم که این مطالعه از این منظر منحصر به فرد می باشد (۱۱،۱۶).

مواد و روش کار

الف- نمونه ها: نمونه های اخذ شده در این طرح شامل ۲۵ نمونه عقده لمفاوی مربوط به گاوهایی بود که در آزمونهای سرولوژیک الایزا و ژل دیفوزیون پاسخ مثبت داده و به خاطر شکل گیری لوکوز بالینی یا به کشتارگاه اعزام شده و یا کالبدگشایی شده بودند. در کنار این موارد تعداد ۵ نمونه هم که

مربوط به گاوهای به ظاهر سالمی که در آزمونهای سرولوژیک فوق الذکر پاسخ منفی داده بودند هم اخذ و مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه های مورد اشاره از تابستان ۱۳۸۰ تا تابستان ۱۳۸۱ از نقاط مختلف مملکت تهیه شده بودند.

آماده سازی نمونه ها: تمامی نمونه ها توسط دستگاه Tissue Grinder یا لوله تن بروک در حضور PBS به شکل شیرابه در آمده و پس از عبور از کاغذ صافی در ۱۴۰۰۰rpm به مدت نیم ساعت سانتریفوژ گردید. مایع رویی پس از اخذ تا زمان انجام آزمونهای بعدی در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. سپس به منظور تنظیم میزان پروتئین نمونه ها، پروتئین موجود در شیرابه های حاصله به روش لوری مورد سنجش قرار گرفته و با استفاده از PBS سطح پروتئین در حد ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر تنظیم گردید (۱۲).

پس از تنظیم میزان پروتئین به میزان مطلوب، اقدام به انجام الکتروفورز ۳۰ نمونه فوق الذکر در ژل پلی اکریلامید غیرپیوسته ۵ و ۱۰ درصد حاوی سدیم دودسیل سولفات در حضور مارکرپروتئینی ۱۸ تا ۱۱۶ کیلودالتونی فرمنتاس (Fermentas) الکتروفورز گردید.

روش آزمایش

جهت انجام الکتروفورز ژل پلی اکریلامید نمونه ها از سیستم ژل ناپیوسته که شامل ژل پایین (ژل جداکننده) ۱۰ درصد و ژل بالا (ژل متراکم کننده) ۵ درصد حاوی SDS استفاده گردید. پس از انعقاد ژل پلی اکریلامید در شرایط مطلوب اقدام به استقرار نمونه های آماده شده در چاهکهای ژل متراکم کننده می گردید البته قبل از قرار دادن نمونه ها در ژل می بایستی یک حجم از نمونه های آماده شده در مراحل قبلی به یک حجم بافر نمونه اضافه شده و پس از ۵-۳ دقیقه حرارت در ۹۵ درجه سانتیگراد قرار داده شود. حرارت، جدا شدن واحدهای پروتئینهای چند واحدی و اشباع شدن زنجیرهای پلی پپتیدی با SDS را تسهیل می کند. این کار همچنین با غیر فعال کردن بسیاری از پروتئازها، امکان تجزیه پروتئینها توسط این آنزیم‌ها را از بین می‌برد (۳).

سپس ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه به هر چاهک ریخته شده و پس از استقرار صفحات حاوی ژل در تانک مربوطه اقدام به الکتروفورز نمونه ها در ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه وسپس ۱۴۰ ولت به مدت ۱۰۰ دقیقه گردید. پس از اتمام کار ژل مربوطه با استفاده از رنگ کوماسی برلیانت بلو R-250 رنگ آمیزی شده و توسط محلول رنگ بر خطوط مربوط به باند های پروتئینی آشکار گردیدند. سپس با استفاده از محلول ویژه خشک نمودن ژل و غشا سلوفان اقدام به خشک نمودن ژل های حاصله به منظور حفظ و نگهداری آنها گردید که تصاویر تعدادی از ژل های خشک شده در ادامه آورده شده است (۳۶).

نتایج

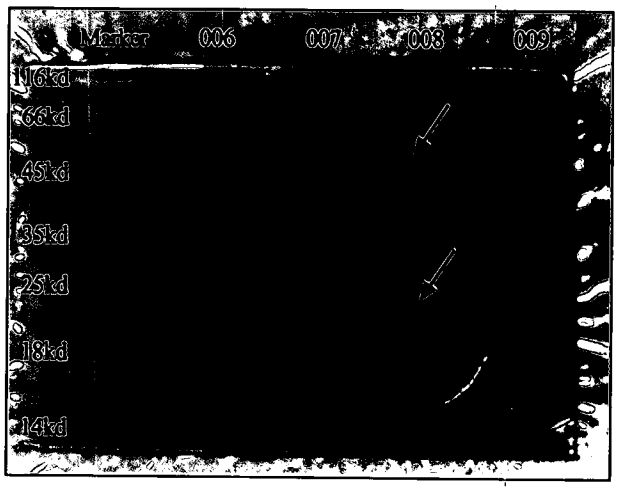
نتایج حاصل از SDS-PAGE نمونه های آماده شده حاکی از حضور حد اقل ۲۵ باند پروتئینی مشترک در کلیه نمونه های مربوط به گاوهای بیمار و سالم بود در حالی که در الگوی پروتئینی عقده های لمفاوی گاوهای بیمار علاوه بر این موارد حد اقل ۲ باند پروتئینی واضح در SDS-PAGE مشاهده گردید که مربوط به ویروس لوکوز می باشند. وزن ملکولی این باندها ۵۱ و ۲۴کیلو دالتون می باشند که همگی جزو پادگن های اختصاصی ویروس بوده و قاعدتاً در بافتهای لمفاوی سالم مشاهده نمی شوند. در عین حال پادگن مورد استفاده در آزمون ژل دیفوزیون ساخت فرانسه نیز تحت شرایط ذکر شده و به همراه نمونه های مورد آزمایش الکتروفورز شده که تطابق کاملی با پادگن های ویروس در بافتهای آلوده از خود نشان داده است (تصویر۲). علاوه بر پادگن های شناخته شده مربوط به ویروس تفاوتهای جزیی در نحوه استقرار یا در میزان بروز پادگن های غیر ویروسی در نمونه های التروفورز شده مشاهده گردید که می تواند مربوط به تفاوتهای فردی یا اختلاط سایر پروتئین ها مثل سرم و خون یا بافت لمفاوی آلوده باشد. تصویر ۱ مربوط به SDS-PAGE تعدادی از نمونه ها است. همانگونه که در تصویر مشاهده می گردند باند ۵۱ کیلودالتونی در نمونه های مربوط به موارد بیماری مشاهده می گردد ولی چنین پروتئینی در نمونه های مربوط به گاوهای به ظاهر سالم مشاهده نمی گردد (تصویر ۲). علاوه بر این، پروتئین p24 نیز در تعدادی از نمونه ها ردیابی شده که در تصویر ۱ با علامت پیکان مشخص شده است.

بحث

با علم به اینکه اختلافات موجوددر ویژگیهای اجرام مختلف ناشی ازتغییراتی است که در ژنوم این اجرام رخ داده است، می‌توان در بسیاری ازموارد (نه درهمه موارد) با مطالعه پروتئین‌های کد شده توسط ردیفهای ژنتیکی این اجرام به تفاوتهای موجود در آنها پی برده و در جهت تشخیص سریع و دقیق بیماریهای ناشی از این اجرام و همچنین تفریق و دسته بندی اجرام بیماریزا به کارگرفت (۱۸).

طی مطالعاتی که توسط محققین مختلف در نقاط مختلف دنیا صورت گرفته، به طور متوسط۷ و حد اکثر ۱۵ پروتئین در ویروس بیماری لوکوز انزئوتیک گاو مورد شناسایی قرار گرفته است و از طریق مطالعات تکمیلی، وظیفه و محل استقرار هر کدام از این پروتئین‌ها، مشخص شده و اختلافات مختصر مشاهده شده در این موارد نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. آنچه مشخص است تکثیر یافتن جرم درکشتهای سلولی مختلف مثل FLK و ریه خفاش یا برخی تیره های سلولی تفاوتهایی را در الگوهای پروتئینی ایجاد می‌نماید (۵،۱۴).

مطالعات انجام شده در مورد پروتئینهای ویروس EBL عمدتاً در مورد ویروس های کشت شده در کشت سلولی FLK می باشند و مطالعه خاصی در مورد نحوه استقرار پروتئینهای ویروس در بافت لمفاوی آلوده انجام نگرفته است البته مطالعه الگوهای پروتئینی ویروس در کشتهای سلولی و ویروس های خالص شده به طریق اولترا سانتریفوژ نتایج دقیقتری را حاصل می نماید ولی مطالعه پروتئینهای ویروس در حالت طبیعی و در بافتهایی که مستقیماً مورد تهاجم ویروس قرار گرفته و ترانسفورمه شده اند ممکن است یافته های



تصویر ۱ - ردیابی پروتئینهای ۵۱ و ۲۴ کیلودالتونی در نمونه های مربوط به گاوهای بیمار.

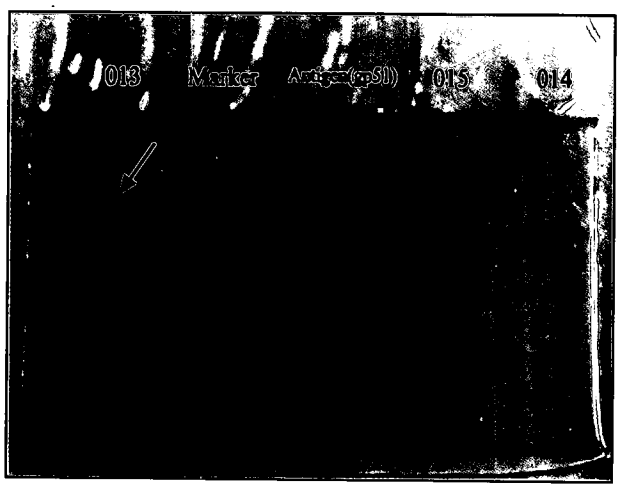
دیگری را حاصل نماید، که این تحقیق از این نظر منحصر به فرد می باشد (۱۳).

همان گونه که در مبحث نتایج نیز ذکر شده است ۲ باند پروتئینی به وزن مولکولی متوسط ۵۱ و ۲۴ کیلو دالتونی تشخیص داده شده‌اند که چنین نتایجی با نتایج سایر محققین همخوانی دارد. مثلا پروتئین۵۱ کیلو دالتونی در منابع مختلف بین۵۱-۴۹ کیلودالتون قید شده است. و وظیفه آن به عنوان پادگن دخیل در شکل گیری پاسخ سرمی و همچنین گلیکوپروتئین غشا معرفی گردیده است (۸،۱۶).

پروتئین دیگر که در این بررسی موردتوجه قرار گرفته، پروتئین۲۴ کیلو دالتونی است که در متون مختلف نیز به همین شکل معرفی گردیده است این پروتئین به عنوان پروتئین های هسته مرکزی قلمداد شده و در تکثیر ویروس دخالت دارد (۸).

همان گونه که در اهداف تحقیق نیز مورد توجه قرار گرفته است یکی از اهداف این تحقیق، مشخص نمودن اختلافات احتمالی بافت لمفاوی آلوده و غیر آلوده می‌باشد. با مقایسه نتایج حاصله از الگوهای الکتروفورتیک این نمونه ها می توان پروتئینهای اختصاصی ویروس را در بافتهای آلوده ردیابی نمود، علت عمده امکان ردیابی این دو پروتئین در نمونه های مرضی می تواند به بروزبسیار زیاد این دو پروتئین ویروسی در بافتهای آلوده باشد چون سایر پروتئین های ویروس یا از نظر مقدار میزان کمتری را شامل می شوند و یا تنها در مراحل خاصی از تکثیر ظاهر شده و سپس محو می گردند. شاید رخداد پاسخ هومورال قوی علیه این دو پروتئین همین بروز فوق العاده آنها باشدکه به تحریک ایمنی مطلوبی منجر می گردد (۲۱،۲۳).

در نهایت جهت تشخیص قطعی این دو پروتئین به عنوان پروتئینهای اصلی ویروس پیشنهاد می گردد آزمون وسترن بلاتینگ با استفاده از سرم گاوهای آلوده جهت ردیابی پادگن های واکنش دهنده بر روی محصول الکتروفورز این نمونه ها انجام گرفته و پادگن های ویروس مستنداً در این نمونه ها معرفی گردند و در صورت موفقیت، در مرحله بعدی این طرح می توان به جداسازی و خالص سازی پادگن gp51 از عقده های لمفاوی



تصویر ۲ - مربوط به SDS-PAGE نمونه های عقده های لمفاوی گاوهای مبتلا به لوکوز انزئوتیک بالینی (۰۱۳) در مقایسه با گاوهای سالم (۰۱۵ و ۰۱۴) و پادگن استاندارد gp51 (Merioux).

گاوهای بیمار به منظور کاربرد در آزمونهای تشخیص سرولوژیک بویژه الایزا اقدام نموده و قدمی در راه خود کفایی مملکت در این زمینه برداشت.

تشکر و قدردانی

نگارندگان وظیفه خود می دانند از کلیه افرادی که به انحا مختلف به انجام این طرح یاری رسانده اند مراتب تشکر قلبی خود را ابراز دارند، بویژه جناب آقایان دکتر بازرگانی، دکتر شریف زاده، دکتر اشرفی، دکتر کسرو ی، دکتر فرزادی، مهندس غفاری و سرکارخانمها دکتر علی نژاد و دکتر عقیلی.

References

۱. کارگر مؤخر،ر.، حسامی قاجار،م.، اهورایی، پ.، قابوسی، ب.، خدمتی، ک.، عزی، ع.، پورزاهدی، ر. و سرمست، ر. (۱۳۷۵): بررسی سرواپیدمیولوژیک بیماری لوکوز نزئوتیک گاوان (EBL) در ایران- پژوهش و سازندگی سال ۹، جلد ۱، صفحه: ۱۶۷-۱۶۴.

۲. کیوانفر،ه.، همت زاده، ف، و محمودیان، ع. (۱۳۸۰): ویروس‌شناسی دامپزشکی (بیولوژی ویروس‌ها)- انتشارات دانشگاه تهران. صفحه: ۵۷،۴۳، ۶۱، ۶۵، ۸۰-۸۲.

۳. مصطفایی، ع. (۱۳۷۸): الکتروفورز پروتئین در ژل، راهنمای عملی و نظری. صفحه: ۱۲-۲، ۳۸-۳۳، ۵۴-۵۲، ۸۹-۸۷، ۱۰۲-۱۰۰.

۴. نور محمد زاده، ف. و برین، ع. (۱۳۷۰): جستجوی سرولوژیکی پادتن ضدلوکوز انزئوتیک گاوی (BLV) در گوسفند. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۴۶ (۱): صفحه: ۶۹-۸۰.

5. Altaner, C., Ban, J., Altanerova, V., Burny, A. and Kettmann, R. (1987): Bovine leukemia virus: isolation and characterization of nonproducer cell clones. Neoplasma. 34:641-52.

6. Bejo, S.K. (1997): SDS-polyacrylamid gel electrophoresis. Institute biosains university pertanian Malaysia 43400, Serdong, Selangor. Many. PP: 1-20.

7. Castro, A.E. and Heuschele,W.P. (1992): Veterinary Diagnostic Virology. A practitioner's guide. Mosby year book. PP: 54-57.
8. Choi, K.Y., Liu, R.B. and Buehring, G.C. (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.
9. Deshayes, L., Levy, D., Parodi, A.L. and Levy, J.P. (1980): Spontaneous immune response of bovine leukemia-virus-infected cattle against five different viral proteins. Int. J. Cancer. 15: 503-508.
10. Gonzalez, E.T., Oliva , G.A. and Norimine, J. (1999): Evaluation of Western Blotting (WB) for the diagnosis of BLV. Arq. Bras. Med. Vet. Zoo. 51: 299-305.
11. Hammar, L., Merza, M., Malm, K., Eriksson, S. and Morein, B. (1989): The use of aqueous two-phase systems to concentrate and purify bovine leukemia virus outer envelope protein gp51. Bio. App. Bioche. 11: 296-306.
12. Hudson, L. and Hay, F.C. (1989): Practical Immunology, Blackwell Scientific Publication. PP: 4-7.
13. Johnson, R. and Kaneene, J.B. (1992): Bovine leukemia virus and enzootic bovine leukosis. Vet. Bull. 2: 287-314.
14. Kittelberger, R., Laybourn, B.J., Diack, D.S., Penrose, M.E., Reichel, M.P., Motha, J., Molloy, J.B. and Merza, M. (1996): Evaluation of electrophoretic immunoblotting for the detection of antibodies against the bovine leukosis virus in cattle. J. Virol. Methods. 61: 7-22.
15. Kittellberegerm, R., Reichel, M.P. and Meynell, R.M. (1999): Detection of antibodies against the core protein p24 BLV in cattle . J. Virol. Methods. 77: 109-114.
16. Llames, L., Gomez-Lucia, E., Domenech, A., Suarez, G. and Goyache, J. (2000): Analysis by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot of nonspecific and specific viral proteins frequently detected in different antigen preparations of bovine leukemia virus. J. Vet. Diagn. 4: 337-44.
17. Mamoun, R.Z., Astier, T., Guillemain, B. and Duplan, J.F. (1983): Bovine lymphosarcoma: expression of BLV-related proteins in cultured cells. J. Gen. Virol. 1983 Sep. 64, Pt 9:1895-905.
18. Murphy. F.A., Gibbs, E.P., Horzine, K.M.C. and Studdert, M.J. (1999): Veterinary Virology. Academic press. 3rd ed. PP: 411-428.
19. Radostits, O.M., Gay, C.C. and Blood, D.C. (2000): Veterinary Medicine . 9th ed. Bailliere Tindal, London. PP: 1046-1058.
20. Schultz, A.M., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1984): The envelope proteins of bovine leukemia virus: purification and sequence analysis. Virol. 135: 417-27.
21. Simard, C., Richardson, S. and Dixon, P. (2000): ELISA for the diagnosis of bovine leukosis: Comparison with the AGID test approved by the Canadian Food Inspection Agency. Can.Vet. Res. 64: 101-106.
22. Simard, C., Richardson, S. and Dixon, P.(2000): AGID test for the detection of BLV antibodies lack of trans -Atlontic standardization. Can.Vet. Res. 64: 69-100
23. Timoney, J. F., Gillespie, J.H., Scott, F.W. and Barlough, J.E. (1994): Hagan and Burner's Microbiology and infections diseases of domestic animals. 9th ed. PP: 813-818.
24. Uckert, W., Hertling, I., Kraft, R., Bossmann, H., Rossler, H. and Meyer, U. (1986): Structural components of bovine leukemia virus: further biochemical and immunological characterization of major structural proteins and glycoproteins. Virus Res. 4: 343-56.
25. Ungan, W. H. (1990): Reduced immunocompentence of antibodies produced in leukemic cattle. Vet. Bull. 58: 91-93.