بررسی پادگن‌های توموری ناشی از ویروس لکوزگاو در عقده‌های لمفاوی و مقایسه آن با کشت سلولی FLK آلوده به ویروس

دکتر غلامرضا نیکبخت بروجنی[1]* دکترفرهید همت زاده[1] بختیار محبوبی[2]

دریافت مقاله: ۲۱ اردیبهشت ماه ۱۳۸۳
پذیرش نهایی: ۱۰ اردیبهشت ماه ۱۳۸۴

هدف: مقایسه پادگن‌های عقده‌های لمفاوی توموری مبتلا به لکوزگاوی با کشت‌سلولی FLK آلوده به ویروس با روش ایمنوبلاتینگ.

طرح: مطالعه مشاهده‌ای.

نمونه‌ها: تعداد ۱۹ عقده لمفاوی مبتلا به لکوز و دو نمونه عقده لمفاوی گاوهای سالم.

روش: آزمون الکتروفورز SDS-PAGE و وسترن بلات بر روی عصاره تمامی عقده‌های لمفاوی مبتلا وسالم و عصاره کشت سلول FLK آلوده به ویروس صورت‌گرفت.

نتایج: الگوی الکتروفورتیک باآزمون SDS-PAGE در تمامی نمونه‌های مبتلا با نمونه عقده لمفاوی سالم مقایسه شدند و تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده نگردید. باندهای ۵۴، ۵۲، ۴۷، ۴۶، ۴۴، ۴۳، ۳۹ و ۳۶ کیلودالتون تنها در عقده‌های لمفاوی مبتلا مشاهده شد. باندهای ۷۲ و ۵۷ کیلو دالتون در همه نمونه‌های عقده لمفاوی سالم و مبتلا و همچنین نمونه یاخته‌های آلوده به ویروس لکوزگاوی (FLK-BLV) مشاهده شد. پروتئین ۴۸ کیلودالتون تنها در یک پروفایل ومشابه با پروتئینی ایمونوژنیک در عصاره کشت‌سلول FLK-BLV بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق حد اقل حضور هشت پروتئین ایمنوژنیک مختلف را در عقده‌های لمفاوی مبتلا به لکوز به اثبات می‌رساند. پروتئین ایمونوژنیک با وزن ۴۸ کیلودالتون در یک نمونه عقده لمفاوی مبتلا و نمونه FLK-BLV می‌تواند پادگنی ویروسی باشد که درشرایط خاص نمود می‌یابد. در مجموع از بررسی کل نمونه‌ها سه پروفایل متمایز در بین تومورهای لمفاوی مشخص گردید. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۵، دوره ۶۱، شماره ۱، ۵۵-۵۱.

واژه‌های کلیدی: لکوزگاوی، لمفوسارکوم، FLK، BLV، SDS-PAGE، وسترن بلات.

پادگن‌های مربوط به تومورهای ویروسی را می‌توان به سه دسته تقسیم نمود:

۱- پادگن‌های مربوط به ویروس که بیشتر پروتئین‌های ساختمانی یا آنزیمی هستند. ۲- پادگن‌های توموری (T) یا اختصاصی تومور (TSA) (Tumor Specific Antigens) که در یاخته‌های توموری تولید شده و در یاخته‌های معمولی وجود ندارند. این پادگن‌ها ممکن است در تومورهای مشابه وجود داشته باشند و ممکن است تنها در یک تومور دیده شوند. پادگن‌های مذکور توسط یاخته‌های لمفوسیتی T شناخته می‌شوند. ۳- پادگن‌های مربوط به تومور (TAA) (Tumor Associated Antigens) که در یاخته‌های معمولی نیز یافت می‌شوند و در بیشتر موارد از اجزای معمولی یاخته‌ای هستند که تولید آنها از تنظیم خارج گشته است. این پادگن‌ها بیشتر با روشهای سرمی و استفاده از پادتن‌های منوکلنال شناخته می‌شوند (۱،۲،۴).

پادگن‌های ویژه ویروس در یاخته‌های ترانسفورمه قابل شناسایی هستند. شاخص‌های توموری یا پادگن‌های پیوندی اختصاصی تومور (TSTA) (Tumor Specific Transplantation Antigens) در گروه دوم یا پادگن‌های اختصاصی قرار میگیرند و در سطح سلول بارز می‌شوند. این پادگن‌ها محل هدف پاسخهای ایمنی می‌باشند. برخی پادگن‌های توموری (TAA) نیز در غشاء پلاسمایی قرار دارند که دستگاه ایمنی می‌تواند آنها را شناسایی کند. این

۱) گروه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) دانشجوی دوره دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول: nikbakht@ut.ac.ir

Study on Tumor Antigens of BLV Infected Lymph Nodes in Comparison with FLK-BLV Cell Culture

Nikbakht Brujeni, GH.[1], Hemmatzadeh, F.[1], Mahbubi, B.[2]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran , Tehran-Iran. [2]Student of Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran , Tehran-Iran.

Objective: To detect the tumor antigens in BLV associated lymph nodes and comparing with FLK-BLV cell culture antigens by immunoblotting.

Design: Observational study.

Samples: Nineteen BLV infected and 2 healthy lymph nodes.

Procedure: SDS-PAGE and Western blotting were carried out for all infected and non infected lymph nodes.

Results: SDS-PAGE results revealed no considerable differences between infected and non-infected lymph nodes. Among all protein profiles of BLV infected lymph nodes, in western blot test, protein bands with 54, 52, 47, 46, 44, 43, 39 and 36 kD weight were detected to be immunogenic. Both 72 and 57 kD bands were exist in all infected and non-infected lymph nodes as well as FLK-BLV cells. Cells infected by BLV (FLK-BLV) demonstrated only 48 kD band as an immunoreactive protein identical to only one sample profile.

Conclusion: The present work demonstrates at least 8 different immunogenic proteins in BLV infected lymph nodes that could be classified to three distinct profiles. 48kD protein demonstrated in FLK- BLV and just one of the profiles, seems to be a viral antigen that is expressing in certain conditions. ***J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 61,1:51-55,2006.***

Keywords: BLV, lymphosarcoma, SDS-PAGE, western blot.

Corresponding author's email: nikbakht@ut.ac.ir

پادگن‌ها توسط MHC کلاس I نمود یافته و قابل شناسایی با $T\text{-}CD8^+$ می‌باشند (۱۳، ۱۱، ۴). در حال حاضر پادگن‌های توموری را بیشتر بر اساس ساختمان ملکولی و منشا پادگنی آن‌ها تقسیم بندی می‌کنند(۴). رتروویروس‌ها از جمله ویروس‌های تومورزای مهمی هستند که تومورزایی و انکوپروتئین‌ها در آن‌ها به خوبی بررسی شده‌اند(۱۸، ۱۵، ۱۲). انکوپروتئین‌ها ممکن است پروتئین‌های موثر در رشد یاخته، تقسیم و تمایز آن باشند. در رتروویروسها این پادگن‌ها شامل عوامل رشد، پذیرنده‌های عوامل رشد و پذیرنده‌های هورمونی، علامت دهنده‌های داخل سلولی و فاکتورهای رونوشت برداری هسته می‌شوند(۱۸، ۱۰).

عامل بیماری لوسمی واگیردار گاوان (EBL)(bovine leukosis Enzootic)، که شایعترین بیماری نئوپلاستیک در گاوها به شمار می‌رود، رتروویروسی بنام ویروس لوسمی گاوان (BLV) است و به جنس دلتا رتروویروس تعلق دارد. از نظر ساختار ژنومی و پروتئینی این ویروس قرابت بسیار نزدیکی با ویروس‌های مولد لوسمی در انسان (HTLV-1,2) (Viruses 1 and 2 Human T-lymphotropic) و میمون (STLV-1) (T-lymphotropic Virus Simian) دارد که در جنس دلتا ویروس قرار گرفته‌اند(۳،۶،۷،۸). از آنجایی که این ویروس جزء RNA ویروس‌های تومورزای حیوانی است و سرطان‌های حاصل از ویروس‌های انکوژن موجب پاسخ شدید ایمنی می‌شوند بررسی پادگن‌های توموری حاصل از این ویروس‌ها اهمیت زیادی دارد(۱۱). از طرفی مقایسه چگونگی عرضه پادگن‌های ویروس در بافت‌های توموری و سلول‌های غیر توموری آلوده می‌تواند در پاسخگویی به برخی مجهولات تومورزایی، تشخیص و ایمنی زایی کمک نماید. هدف از این مطالعه یافتن پادگن‌های ایمونوژنیک لمفوسارکوم ناشی از BLV یا به عبارتی شاخص‌های توموری این ویروس و مقایسه آنها با چگونگی عرضه پادگن‌های ویروس در بافت غیر توموری بوده است.

مواد و روش کار

نمونه‌های عقده‌های لمفاوی و سرم: در مجموع تعداد ۱۹ عقده لمفاوی متعلق به گاوهای مبتلا به لکوز و دو نمونه عقده لمفاوی گاو سالم در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. ابتلا یا عدم ابتلا به لکوز در تمامی گاوهایی که عقده لمفاوی آنها مورد مطالعه قرار گرفته بود و همچنین سرم مورد استفاده در روش وسترن بلات با استفاده از روش آگارژل ایمیونودیفیوژن (AGID) و الیزا به اثبات رسید. عقده‌های لمفاوی در طی سال‌های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۳ از گاوهای مبتلا در گاوداری‌ها اطراف تهران اخذ شده بودند.

فرآوری نمونه‌ها و SDS-PAGE: ابتدا عصاره عقده‌های لمفاوی در PBS فرآوری شده و در ۷۰- درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش قرار می‌گرفتند. با استفاده از روش SDS-PAGE به بررسی پروفایل پروتئینی نمونه‌های مذکور پرداخته شد. سپس خصوصیات پادگنی آنها با استفاده از روش وسترن بلات مورد مطالعه قرار گرفت.

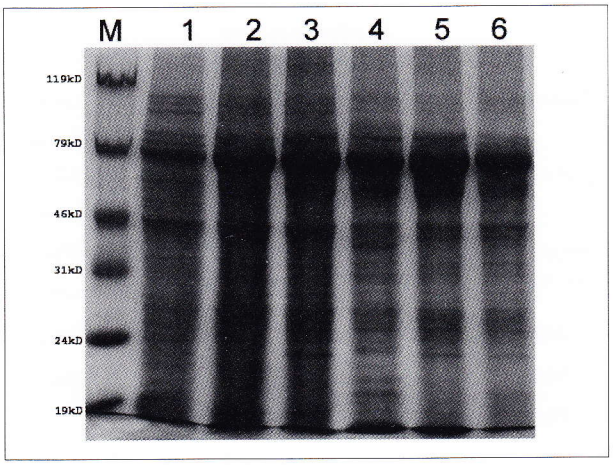
۵۰ میکرولیتر از عصاره عقده لمفاوی با ۵۰ میکرولیتر بافر دناتوره کننده حل می‌شد. ترکیب بافر مورد استفاده بدین قرار بود: تریس هیدروکلراید (Tris-HCl) ۰/۱ مول pH=6، SDS ۴ درصد، برم فنل بلو ۰/۲ درصد، گلیسرول ۲۰ درصد و بتا مرکاپتواتانل ۵ درصد پس از حل کردن عصاره‌ها در بافر فوق مخلوط به مدت ۳ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفته و سپس در ۱۰ هزار دور به مدت کوتاهی سانتریفوژ می‌شد. ۲۰ میکرولیتر از مایع رو جهت الکتروفورز استفاده می‌گردید. غلظت ژل اکریلامید ۱۲ درصد تعیین گشته و برای رنگ آمیزی از کوماسی بلو (Comassi blue) ۰/۰۵ درصد استفاده شد. تمامی اعمال انجام شده بر اساس روش شرح داده شده جهت الکتروفورز یک بعدی پروتئین‌ها توسط آسوبل و همکاران بوده است(۵).

روش وسترن بلات(Western Blot): در این مرحله نیز ۵۰ میکرولیتر از عصاره عقده لمفاوی با ۵۰ میکرولیتر بافر دناتوره کننده حل شده و پس از الکتروفورز بر روی ژل اکریلامید (رجوع شود به روش SDS-PAGE)، انتقال پروتئین‌ها به غشای PVDF(شرکت Roche) با استفاده از دستگاه ترانس بلات(Minitrans- Blot) (شرکت Bio - RAD) و بر اساس دستورالعمل پیشنهادی همراه دستگاه صورت گرفت. غشای PVDF پس از خروج از دستگاه به مدت یک ساعت در محلول تثبیت حاوی PBS و (0.5 %) Tween 20 قرار داده شده و سپس و در محلول بلوکینگ به همراه BSA(۳ درصد) به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. از سرم مثبت گاو آلوده به لکوز به عنوان پادتن اولیه (Antibody Primary) استفاده گردید. حضور پادتن‌ها در سرم با روش‌های AGID و الیزا مورد تائید قرار گرفته بود. سرم در محلول بلوکینگ حاوی BSA به میزان ۱ به ۵ رقیق گردید. غشای PVDF به مدت یک شب در محلول حاوی پادتن قرار گرفته و روز بعد پس از سه بار شستشوی غشا در بافر بلوکینگ از پروتئین G کونژوگه پروکسیداز (شرکت Roche) به جای پادتن ثانویه(Secondary Antibody) استفاده شد. غشا به مدت یک ساعت در محلول بلوکینگ حاوی پروتئین G قرار گرفته پس از آن سه بار در بافر بلوکینگ شسته شده و برای رؤیت باندها از سوبسترای آلفاکلرونفتول (α-chloronaphtol) (Sigma) استفاده شد. تمامی اعمال انجام شده بر اساس روش شرح داده شده جهت ایمنوبلات پروتئین‌ها توسط آسوبل و همکاران بوده است (۵).

نتایج

نتایج بدست آمده از الکتروفورز عصاره عقده‌های لمفاوی در تصویر ۱ مشخص شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود تعداد ۲۰ باند پروتئینی بین وزن‌های ۱۸ تا ۱۰۳ کیلودالتون قرار گرفته‌اند. تمامی نمونه‌ها با نمونه عقده لمفاوی سالم مقایسه شدند و تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده نگردید.

نتایج بدست آمده از آزمون وسترن بلاتینگ با استفاده از سرم گاو مبتلا به لکوز و اوزان باندها در تصویر ۲ مشخص شده. باندهای ۱۴۳ کیلودالتون در تمامی عقده‌های لمفاوی مبتلا مشاهده شد. باند ۸۵ کیلودالتون تنها در نمونه آنتی ژن p_{24} حضور داشت و در سایر نمونه‌ها اعم از سالم و غیر سالم مشاهده نگردید. باندهای ۷۲ و ۵۷ کیلودالتون در همه نمونه‌های عقده لمفاوی سالم و مبتلا و همچنین نمونه یاخته‌های آلوده به ویروس لکوز گاوی (FLK-BLV)



تصویر ۱- وزن باندهای بدست آمده در الکتروفورز عقده‌های لمفاوی گاوهای مبتلا به لکوز.

مشاهده شد. باندهای ۵۴، ۵۲، ۴۸، ۴۶، ۴۴، ۴۳، ۳۹ و ۳۶ کیلودالتون تنها در عقده‌های لمفاوی مبتلا مشاهده شد. باند ۴۸ کیلودالتون تنها در نمونه BLV-FLK حضور داشت. در مجموع از کل نمونه‌های مورد بررسی سه پروفایل متمایز مشخص گردید.

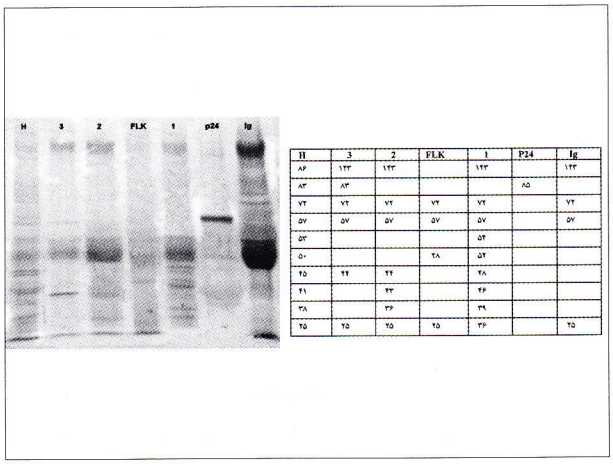
بحث

هدف از این تحقیق ردیابی پروتئین‌های ایمنوژنیک لمفوسارکوم ناشی از BLV اعم از پادگن‌های ویروسی و یا توموری بوده است. تاکنون بررسی‌های زیادی برروی سرم گاوهای مبتلا به لکوز با استفاده از روش ایمونوبلاتینگ صورت گرفته است. در غالب این روش‌ها برای ردیابی پادتن‌های مختلف سرمی از یاخته‌های FLK عفونی یا ویروس (Fetal lamb kidney - BLV infected) (FLK-BLV) استخراج شده از محیط کشت یاخته به عنوان پادگن استفاده شده است (۲۱، ۱۷، ۱۶، ۱۴، ۱۰، ۸).

بر اساس اطلاعات موجود اولین بار پروتئین‌های ویروس لکوز توسط Deshayes و همکاران در سال ۱۹۹۷ مورد بررسی قرار گرفت. این محققین ویروس BLV را از کشت یاخته‌های کلیه جنین بره استخراج کرده و الگوی الکتروفورتیک ویروس را مشخص نموده‌اند. در این بررسی هشت پلی پپتید مختلف با استفاده از روشهای کلاسیک مشخص شد. وزن مولکولی این اجزا بین ۱۱ تا ۸۰ کیلودالتون بوده است (۹).

Bunger و همکاران در سال ۱۹۹۶ برروی فرآوری پروتئین‌های عقده لنفاوی با روشهای مختلف بررسی هایی انجام دادند، هدف نامبردگان تهیه پادگن‌های ویروس BLV از عقده‌های لمفاوی جهت استفاده در آزمون ایمونوبلات بوده است این تنها موردی است که کاوش برروی پادگن‌های ویروسی در عقده‌های لمفاوی صورت گرفته است (۲۰).

Tajima و همکاران نیز پروتئین‌های ویروسی را که در یاخته‌های مختلف ترانسفورمه بیان شده‌اند را با روش وسترن بلات مورد ارزیابی قرار دادند، این دانشمندان باندهای پروتئینی مهم در پاسخ ایمنی (Immuno reactive) را حداقل به ۳ پیش ساز پروتئین‌های ویروسی نسبت داده‌اند که شامل: $gpr\ 72^{env}$



H	3	2	FLK	1	P24	Ig
۸۶	۱۲۳	۱۲۳		۱۲۳		۱۲۳
۸۳	۸۳				۸۵	
۷۲	۷۲	۷۲	۷۲	۷۲		۷۲
۵۷	۵۷	۵۷	۵۷	۵۷		۵۷
۵۳				۵۳		
۵۰			۴۸	۵۲		
۴۵	۴۴	۴۴		۴۸		
۴۱		۴۳		۴۶		
۳۸		۳۶		۴۳		
۳۵	۳۵	۳۵	۳۵	۳۶		۳۵

تصویر ۲- نتایج حاصل از آزمون وسترن بلات و اوزان باندهای ایمونوژنیک در عقده‌های لمفاوی مورد مطالعه: Ig ایمنو گلوبولین، ۱-۳ نمونه‌های مبتلا به لکوز، H نمونه عقده لمفاوی سالم.

یا گلیکوپروتئین ۷۲ کیلودالتونی پوشش ویروس، $pr70\ \&\ 45^{gag}$ یا گلیکوپروتئین‌های ۷۰ و ۴۵ کیلودالتونی مرکزی ویروس و همچنین ۳ پروتئین بالغ gp_{51}، gp_{30} و p_{24} در یاخته‌های لیزه شده مورد مطالعه آنها بوده است. لازم به ذکر است که تمامی نتایج بدست آمده فوق در آزمون وسترن بلات با استفاده از سرم گوسفند آلوده شده با BLV بدست آمده است (۱۹).

ما در این بررسی از سرم گاو مبتلا به لکوز برای بدست آوردن پروفایل پادگنی تومور لمفاوی ناشی از BLV بهره بردیم، این آزمون اختلافات پادگنی در بین عقده‌های لمفاوی متفاوت که همگی از گاوهای مبتلا به لکوز تهیه شده بودند را مشخص کرد. با توجه به نتایج بدست آمده حداقل ۳ پروفایل آنتی ژنیک در بین عقده‌های لمفاوی مذکور قابل شناسایی هستند، با ارزیابی باندهای پروتئینی این پروفایل‌ها می‌توان به ۹ پروتئین ایمونوژن در بین عقده‌های مذکور اشاره نمود. باند مشخص شده در نمونه پادگنی p_{24} احتمالا مربوط به بخش‌های پروتئینی است که همراه پادگن p_{24} حضور دارند.

براساس یافته‌های Tajima، پروتئین‌های ۴۵، ۷۰ و ۷۲ کیلودالتون مربوط به ویروس را می‌توان با وسترن بلات مشخص نمود. ما نیز در این بررسی حضور پروتئین ۷۲ کیلودالتون را در عقده‌های لمفاوی مبتلا مشخص نمودیم (تصویر ۲). پروتئین مذکور پیش ساز gp_{51} یا گلیکوپروتئین ۷۲ کیلودالتونی پوشش ویروس است (۱۹). نتایج این تحقیق حداقل حضور هشت پروتئین ایمنوژنیک مختلف را در عقده‌های لمفاوی مبتلا به لکوز به اثبات می‌رساند. پروتئین ۴۸ کیلودالتون تنها در یک پروفایل عقده لمفاوی مشابه پروتئین ایمونوژنیک در عصاره کشت سلول FLK-BLV بود (تصویر ۲). این پروتئین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است چرا که در تمامی نمونه‌ها مشاهده نشده و تنها در یک نمونه به صورتی مشابه با BLV-FLK حضور داشته است. از آنجایی که این پروتئین در یاخته‌های FLK-BLV مربوط به بره و همچنین در عقده لمفاوی گاو حضور داشته و از سوی دیگر در تمامی عقده‌های لمفاوی نبوده، حاکی از نمود آن در شرایطی خاص است. در مجموع این پروتئین‌ها در مقایسه با عقده‌های سالم

ممکن است انکوپروتئین‌های حاصل از آلودگی با ویروس BLVبوده و از لحاظ روند انکوژنز و بیماریزایی ویروس می‌توانند مبنایی برای تحقیقات بعدی قرار گیرند.

موضوع جالب دیگر نمود بیشتر بخشهای ایمونوگلوبولینی(۲۵، ۵۷ و ۱۴۳ کیلودالتون) در عقده‌های لمفاوی بیمار نسبت به عقده‌های سالم هستند که خود حاکی از پدیده پرولیفراتیو یاخته‌های لمفوسیتی Bبه همراه بیان بیشتر ایمونوگلوبولین‌ها است.

تشکر وقدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از زحمات استاد ارجمند دکتر تقی تقی پور بازرگانی در جهت تهیه نمونه‌های سرمی و عقده لمفاوی مبتلا به لکوز تشکر وقدر دانی نمایند. این تحقیق با پشتوانه مالی از سوی معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به ثمر رسیده و بدینوسیله نگارندگان مراتب قدردانی خود را از آن معاونت ابراز می‌دارند.

References

۱. تاج بخش، ح. (۱۳۷۴): ایمنی شناسی بنیادی. چاپ ششم. انتشارات دانشگاه تهران شماره۱۸۰۹. ایران، صفحه: ۳۴۲-۳۲۵.

۲. وجگانی، م. (۱۳۸۰): ایمونولوژی، چاپ چهارم، موسسه نشر جهاد، ایران، صفحه: ۵۲۴۷-۵۱۷.

۳. کیوانفر، ه.، کریمی، ن. (مترجمین). ۱۳۷۶: ویروس شناسی دامپزشکی (بخش بیماریها). انتشارات دانشگاه تهران، شماره ۲۳۵۷، صفحه: ۳۶۶-۳۲۴.

4. Abbas, A.K., Lichtman, A. H. (2000): Cellular and Molecular Immunology, 5th ed., Saunders, Philadelphia.USA, p. 391-411
5. Ausubel, FM., Brent, R., Kingstone, R., Moore, DD Seidman, JG., Smith, JA., Struhl, K. eds. (2002): Short protocols in molecular biology John Wiley & Sons, Inc. New York.10-2 to 10-9
6. Bicka, L., J. Kuzmak, B. Kozaczynska, A. Plucienniczak, and A. Skorupska. (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., Radostits, O. M. (2000): Veterinary Medicine,. Bailliers Tindal, London. p. 1046-1058
8. Choi, K. Y., Liu, R. B., 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., Levy, J. P. (1977): Proteins of bovine leukemia virus. I. Characterization and reactions with natural antibodies. J Virol. 21:1056-1060.
10. Dolz, G. , Moreno,E. (1999): Comparison of agar gel immunodiffusion test, enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting for the detection of BLV antibodies. Zentralbl Veterinarmed. B 46:551-558.
11. Domenech, A., Llames,L., Goyache,J., Suarez,G. and Gomez-Lucia, E. (1998): Comparison of four tests to evaluate the reactivity of rabbit sera against envelope or Gag-related proteins of bovine leukemia virus (BLV). Vet Microbiol. 60:13-25.
12. Domenech, A., Goyache, J.,Llames, L., Jesus,P. M., Suarez,G. and Gomez-Lucia, E.(2000): In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. J Gen Virol Jan(15).109-118.
13. Gonzalez, ET., Oliva,G. A., Norimine,J., Cid de la Paz,V. and Echeverr, M. G.(1998): Evaluation of western blotting for the diagnosis of enzootic bovine leukemia. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia. 51:299-305.
14. Kittelberger, R., Reichel,M. P., Meynell,R. M., Tham, K. M. and Molloy,J. B.(1999): Detection of antibodies against the core protein p24 of the bovine leukaemia virus in cattle for confirmatory serological testing. J Virol Methods. 77:109-114.
15. Lewin, B. (1997): Genes VI. Oxford University Press, New York.
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 Invest. 12:337-344.
17. Llames, L., Goyache,J., Domenech, A., Arjona, A., Suarez,G. and Gomez-Lucia, E. (2001): Evaluation of virus excretion by cells persistently infected with the bovine leukaemia virus (BLV) using monoclonal antibodies. J Clin Virol. 22:31-39.
18. Murphy, A., Gibbs, J., Horzinek, C., Studdert, J.(1999): Vetrerinary virology 3rd Ed. Academic

Press. USA PP:26, 29, 33,34,50, 363- 383

19. Tajima, S., Ikawa,Y., Aida, Y.(1998): Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-infected cattle throughout the course of B-cell lymphosarcoma development. J Virol. 72:7569-7576.
20. Trono, K. G., Perez-Filgueira,D. M., Duffy, S.,Borca, M. V., Carrillo, C.(2001): Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. Vet Microbiol. 26: 235-248.
21. Usui, T., Konnai,S., Tajima,S., Watarai,S., Aida, Y., Ohashi,K. and Onuma, M.(2003): Protective effects of vaccination with bovine leukemia virus (BLV) Tax DNA against BLV infection in sheep. J Vet Med Sci. 65(11):1201-1205.