همین فایل قابل چاپ است

ردیابی ویروس لوسمی گاو در شیرهای پاستوریزه تعدادی از کارخانجات صنعتی شیر ایران به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای

شبیر یزدانی‌پرائی[۱]، محمدرحیم حاجی‌حاجیکلایی[۲*]، مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[۳]، محمد نوری[۲]، فرامرز بهشتی‌فر[۴]، سیما شاهین‌دوران[۵]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲- استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۳- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۴- استادیار گروه جراحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران.

۵- استاد گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه محمد عاکف ارسوی، ترکیه.

*نویسنده مسئول مکاتبات: mhajih@scu.ac.ir

(دریافت مقاله: //پذیرش مقاله: //)

چکیده

ویروس لوسمی گاوی به عنوان عامل ایجادکننده لکوز آنزوتیک گاوی رتروویروسی است که ارتباط نزدیکی با ویروس لوسمی نوع ۱ و نوع ۲ سلول‌هایT انسان دارد، به‌عنوان عامل احتمالی سرطان سینه زنان نیز شناخته شده‌است. ویروس فوق از طریق فرآورده‌های دامی مانند شیر و گوشت به انسان منتقل می‌شود. مطالعه حاضر با هدف شناسایی DNA ویروس مذکور در شیر پاستوریزه انجام شد. بدین منظور از شیرهای پاستوریزه مربوط به ۵ کارخانه صنعتی استان‌های تهران، مازندران، خوزستان و فارس موجود در فروشگاه‌های اهواز (از هر کارخانه ۱۰ نمونه شیر با تاریخ‌های مختلف تولید) نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان آزمایش نگه‌داری شدند. از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای برای ردیابی DNA ویروس استفاده گردید. از مجموع ۵۰ نمونه شیر پاستوریزه اخذ شده از کارخانه‌های مختلف، تعداد ۱۴ نمونه (۲۸ درصد نمونه‌ها) مثبت بودند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون دقیق فیشر هم نشان داد که بین شیر تولیدی کارخانه‌های مختلف (p=۰/۴۲۳) و همچنین بین کارخانجات تهران با سایر استان‌ها، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (p=۰/۱۹۸). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ویروس لوسمی گاوی در شیرهای پاستوریزه کارخانجات صنعتی وجود دارد، اما در مورد فعال بودن یا نبودن آن، نیاز به بررسی بیشتر دارد.

کلیدواژه‌ها: ویروس لوسمی گاو، لکوز آنزئوتیک گاو، شیر پاستوریزه، ایران.

مقدمه

ویروس لوسمی گاوی (Bovine Leukemia Virus; BLV) یک رتروویروس انکوژنیک، از جنس دلتا رتروویروس و عامل ایجاد کننده لکوز آنزئوتیک گاوی (Enzootic Bovine Leucosis; EBL) می‌باشد (Constable *et al*., 2017). جنس دلتا رتروویروس، علاوه بر BLV، شامل ویروس‌های لنفوتروپیک سلول‌های T انسانی نوع ۱ و ۲ (HTLV Types I and II =Human T-Cell Lymphotropic Virus Types I and II) و میمونی نوع ۱ (Simian T-Cell Lymphotropic Virus Type I= STLV-I) نیز می‌باشد (Tozser, 2010). لکوز آنزئوتیک گاوی یک بیماری لنفوپرولیفراتیو واگیردار گاو است که در تمام نژادهای گاو می‌تواند رخ دهد و با لنفوسارکوم سلول B مشخص می‌شود. وقوع این بیماری از سراسر جهان گزارش شده‌است (Kirkland and Rodwell, 2005). BLV می‌تواند انواع رده‌های سلولی از جمله سلول‌های B، T، مونوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها را آلوده کند و منجر به انواع پیامدهای بالینی شود (Aida *et al*., 2013). بیشتر گاوهای آلوده به BLV ناقل‌های بدون علامت ویروس هستند (یعنی نه علائم بالینی دارند و نه تغییری در تعداد لنفوسیت نشان می‌دهند). در اغلب اوقات، بیماری به طور طبیعی در گاو رخ می‌دهد، البته گزارش‌هایی از آلودگی طبیعی در بعضی از گونه‌های دامی مانند گاومیش‌های آبی نیز ثبت شده‌است. همچنین آلودگی تجربی در گوسفند، بز، خرگوش، خوک، میمون، شامپانزه، سگ، گربه و موش نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. گوسفند نسبت به تلقیح آزمایشگاهی بسیار حساس است و اغلب در سن پایین‌تری نسبت به گاو دچار ضایعات توموری می‌شود (Molnar *et al*., 2000; Lee *et al*., 2012; Ma *et al*., 2016; Oie, 2018). در جمعیت گاوها، BLV از هر دو راه افقی و عمودی قابل انتقال است. همچنین آلودگی گاوها با این ویروس در هر سنی می‌تواند اتفاق بیفتد ولی نشانه‌های بالینی معمولاً در گاوهایی با سن بالای ۳ سال دیده می‌شود. بعد از ورود ویروس به بدن، یکی از ۳ حالت زیر می‌تواند رخ دهد: الف) گاوهایی که فاقد علائم بالینی هستند. ب) گاوهایی که در آن‌ها تکثیر خوش‌خیم لنفوسیت B دیده‌می‌شود. ج) گاوهایی که به لنفوسارکوم بدخیم لنفوسیت B مبتلا می‌شوند. با توجه به این‌که در حال حاظر هیچ روش درمانی و هیچ واکسن مؤثری برای بیماری مذکور وجود ندارد، بنابراین تنها راه کنترل و ریشه‌کنی بیماری لکوز آنزئوتیک گاوی، انجام اقدامات بهداشتی و مدیریتی و همچنین آزمایش و حذف گاوهای آلوده از گله می‌باشد (Constable *et al*., 2017).

در ایجاد سرطان در انسان عوامل متعددی نقش دارند، اما ژنتیک، سوء تغذیه، سبک زندگی، افزایش سن، مصرف دخانیات و الکل، چاقی و عوامل عفونی به عنوان مهمترین عوامل خطر در نظر گرفته می‌شوند. بر اساس یافته‌های آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان(International Agency for Research on Cancer; IARC)، عوامل عفونی مانند ویروس‌ها، در ایجاد و پیشرفت ۱۵– ۲۰ درصد از تومورهای انسان مرتبط هستند(Mirzaei *et al*., 2020).

در سال‌های اخیر شواهدی مبنی بر انتقال BLV به انسان وجود دارد. گزارش شده که ویروس لوسمی گاوی از نظر ردیف‌های اسید نوکلئیک و توالی اسیدهای آمینه موجود در پروتئین‌های ساختاری و غیرساختاری، ارتباط نزدیکی با ویروس لنفوتروپیک سلول T انسانی (HTLV) دارد (Marawan *et al*., 2021). ویروس‌های BLV و HTLV، از جهات دیگر نیز دارای شباهت‌هایی می‌باشند که شامل انتقال از طریق تماس با سلول آلوده به ویروس، تولید تعداد کم ویریون و توانایی انتقال از طریق شیر می‌باشد. همچنین، هر دو ویروس دارای یک انکوژن کدکننده پروتئینی به نام *Tax*

هستند که باعث اختلال در مکانیسم‌های ترمیم DNA می‌گردد و از آپوپتوزیس جلوگیری کرده و سرکوبگرهای تومور را مهار می‌کند و در نتیجه، باعث تجمیع جهش‌ها شده و می‌تواند منجر به سرطان شود (Gao *et al*., 2020). لذا علاوه بر بیماری‌زایی BLV در گاوها، برخی محققین امکان انتقال این ویروس به گونه‌های دیگر از جمله انسان را مطرح کرده‌اند (Giovanna *et al*., 2013). ارتباط مثبت بین آلودگی به BLV و سرطان، به خصوص سرطان پستان در خانم‌ها وجود دارد (Robinson *et al*., 2016; Baltzell *et al*., 2018; Ceriani *et al*., 2018; Khatami *et al*., 2020; Buehring *et al*., 2014; 2017; 2019). علاوه بر این یک همبستگی جغرافیایی شگفت‌انگیز بین بروز سرطان سینه و مصرف شیر و گوشت گاو مشاهده شده است. برای مثال، هر کدام از کشورهای بریتانیا، استرالیا، ایالات متحده و آلمان شیوع بالایی از سرطان سینه همراه با میزان بالای مصرف شیر و گوشت گاو را دارند. در مقابل، مردم کشورهای ژاپن، هند، چین و کره میزان کمتری از این محصولات مصرف می‌کنند و شیوع سرطان سینه نیز، در این کشورها کمتر است (Marawan *et al*., 2021). لذا از بین روش‌های احتمالی انتقال BLV به انسان، مانند انتقال از طریق تماس مستقیم با گاوهای آلوده، از طریق واکسن آلوده به سرم گاوهای مبتلا به BLV و خوردن محصولات دامی نظیر شیر و گوشت گاوهای آلوده به BLV (Buehring *et al*., 2017; Buehring *et al*., 2003)، مورد آخری یعنی مصرف شیر و سایر فراورده‌های گاوهای آلوده از اهمیت بیشتری برخوردار است.

روش‌های مختلفی برای تشخیص آلودگی به BLV وجود دارد که از جمله آنها می‌توان از روش‌های الیزا و آگارژل ایمنودیفیوژن برای ردیابی پادتن ضد ویروس در خون و شیر و روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ردیابی ژنوم ویروس در خون و شیر اشاره نمود، که در مطالعات صورت گرفته به منظور ردیابی ژنوم ویروس در شیر از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای استفاده شده است (Barzegar *et al*., 2021; Olaya *et al*., 2017). از آنجایی که این ویروس، از یک رشته RNA حاوی ۸۷۱۴ نوکلئوتید تشکیل شده است که ژن‌های رتروویروسی *gag*، *pro* ، *pol*، *Tax* و *env* را رمزگذاری می‌کنند (Aida *et al*., 2013; Buehring *et al*., 2014). در این مطالعه از پرایمرهایی استفاده شده است که ژن *Tax* را ردیابی می‌نمایند (Buehring *et al*., 2014; Delarmelina *et al*., 2020). پروتئین *Tax* که در ژنوم BLV برای تحریک رونویسی ویروسی عمل می‌کند، دارای پتانسیل انکوژنیک است، ترمیم DNA را مهار می کند و آسیب DNA را با تجمع جهش ها افزایش می دهد، بیان ژن‌های مرتبط با رشد سلولی را تعدیل می‌کند و بر تکثیر لنفوسیت‌های B، بقای سلولی و رشد مستقل سیتوکین‌ها در سلول‌های B تأثیر می‌گذارد (Úsuga-Monroy *et al*., 2023).

از آنجایی که شیر گاوهای آلوده یکی از راه‌های دفع ویروس لوسمی گاوی می‌باشد لذا امکان انتقال آن به انسان از طریق خوردن شیر وجود دارد. از طرف دیگر در حال حاضر، عمده مصرف شیر گاوی توسط انسان، شیرهای پاستوریزه می‌باشند که توسط کارخانجات مختلف تولید و به بازار عرضه می‌شوند و چون احتمال انتقال ویروس مذکور از طریق شیر پاستوریزه می‌تواند وجود داشته باشد، لذا هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی احتمال وجود ویروس لوسمی گاوی در شیرهای پاستوریزه کارخانجات صنعتی تولید شیر در ایران، براساس ردیابی ژنوم ویروس مذکور بود.

مواد و روش‌ها

-نوع و نحوه نمونه‌برداری

مطالعه مقطعی (cross sectionsl) حاضر از تاریخ ۱۴۰۱/۱۲/۶ لغایت ۱۴۰۲/۵/۱ انجام گرفته است که در طی این مدت، تعداد ۵۰ نمونه شیرپاستوریزه تولید شده توسط ۵ کارخانه صنعتی ایران (از استان‌های مازندران، خوزستان و فارس هر کدام یک کارخانه و از استان تهران ۲ کارخانه متفاوت) که در فروشگاه‌های شهر اهواز عرضه می‌شدند، مورد بررسی قرار گرفتند، با این توضیح که از هر کارخانه ۱۰ نمونه شیر تولیدی در تاریخ‌های متفاوت خریداری شد. تاریخ تولید و تاریخ انقضاء مصرف شیرهای تحت بررسی در جدول شماره ۱ گنجانده شدند. لازم به ذکر است که نمونه‌های شیر مذکور، بلافاصله پس از تهیه و انتقال به محل آزمایش، به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شده و تا زمان آزمایش در فریزر منهای ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری می‌شدند.

جدول ۱- تاریخ نمونه‌برداری از شیرهای پاستوریزه عرضه شده در فروشگاه‌های شهر اهواز

کارخانه‌های مورد نظر	کارخانه شماره ۱	کارخانه شماره ۲	کارخانه شماره ۳	کارخانه شماره ۴	کارخانه شماره ۵
تاریخ‌های نمونه‌برداری	۱۴۰۱/۱۲/۹	۱۴۰۲/۱/۳۰	۱۴۰۲/۱۲/۹	۱۴۰۲/۲/۳۰	۱۴۰۲/۱/۱۳
	۱۴۰۲/۱/۱۶	۱۴۰۲/۲/۱۹	۱۴۰۲/۱۲/۱۶	۱۴۰۲/۳/۴	۱۴۰۲/۱/۱۵
	۱۴۰۲/۱/۱۹	۱۴۰۲/۲/۲۳	۱۴۰۲/۱/۱۴	۱۴۰۲/۳/۱۲	۱۴۰۲/۱/۲۸
	۱۴۰۲/۱/۲۳	۱۴۰۲/۲/۲۷	۱۴۰۲/۱/۱۸	۱۴۰۲/۳/۱۳	۱۴۰۲/۳/۵
	۱۴۰۲/۱/۲۳	۱۴۰۲/۳/۱	۱۴۰۲/۱/۲۴	۱۴۰۲/۳/۱۴	۱۴۰۲/۳/۱۴
	۱۴۰۲/۱/۲۵	۱۴۰۲/۳/۱۳	۱۴۰۲/۱/۲۸	۱۴۰۲/۳/۱۸	۱۴۰۲/۳/۱۷
	۱۴۰۲/۱/۲۸	۱۴۰۲/۳/۱۴	۱۴۰۲/۲/۲	۱۴۰۲/۳/۲۳	۱۴۰۲/۳/۱۸
	۱۴۰۲/۲/۶	۱۴۰۲/۳/۲۲	۱۴۰۲/۲/۱۱	۱۴۰۲/۳/۲۵	۱۴۰۲/۳/۲۰
	۱۴۰۲/۲/۱۲	۱۴۰۲/۴/۶	۱۴۰۲/۲/۱۶	۱۴۰۲/۳/۲۸	۱۴۰۲/۳/۲۶
	۱۴۰۲/۲/۲۲	۴۰۲/۴/۷	۱۴۰۲/۲/۱۹	۱۴۰۲/۳/۳۱	۱۴۰۲/۴/۱

کارخانه شماره ۱ (مازندران)، کارخانه شماره ۲ (خوزستان)، کارخانه شماره ۴ (استان فارس) و کارخانه‌های شماره ۳ و ۵ (استان تهران)

- **استخراج DNA ژنومی ویروس لوسمی گاو**: با توجه به این‌که در طی تحقیق حاضر، از روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای (Nested-PCR)، به منظور جستجوی وجود ویروس لوسمی گاو در شیرهای تحت

بررسی، براساس ردیابی ژنوم ویروس مذکور، استفاده شد، لذا در نمونه‌های شیر پاستورریزه، ابتدا با استفاده از یک کیت تجاری (شرکت رها زیست پادتن، ایران)، به شرح زیر و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، استخراج DNA ژنومی ویروس مذکور انجام گرفت:

به ازای هر یک میلی‌لیتر نمونه شیر، ۳۰۰ میکرولیتر بافر EDTA (مرک، آلمان) ۰/۵ مولار و ۲۰۰ میکرولیتر بافرTE (مرک، آلمان) به شیر اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شده و سپس میکروتیوب‌های حاوی شیر به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ (سیگما، ژاپن) می‌شدند. در ادامه چربی و مایع روئی رسوب حاصله از سانتریفیوژ برداشته شده و مقداری از بافر TE به رسوب اضافه می‌گردید. بعد از عمل پیپت کردن، محتویات میکروتیوب به یک میکروتیوب جدید منتقل شده و با استفاده از مقدار لازم از بافر TE، حجم نهائی مایع، به یک میلی‌لیتر رسانده می‌شد. سپس محتویات میکروتیوب مذکور به مدت ۱ دقیقه، با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ (سیگما، ژاپن) شده و بلافاصله مایع رویی حاصله، حذف می‌شد. در ادامه، مقدار۱۰۰میکرولیتر از بافر PrK (از اجزاء کیت رهازیست پادتن) و ۱۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتئیناز K (BIORON GmbH، آلمان) به رسوب حاصله در محله قبل اضافه شده و عمل پیپت کردن انجام می‌شد و سپس میکروتیوب فوق، به مدت ۱ ساعت در داخل بن‌ماری ۶۵ درجه سلسیوس قرارداده می‌شد. در ادامه، ۶۰۰ میکرولیتر از بافر لیز کیت استخراج، به محتویات میکروتیوب اضافه گردیده و میکروتیوب مذکور به مدت نیم ساعت در داخل بن‌ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گرفت. سپس میکروتیوب حاوی نمونه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس مایع سطحی به یک ستون حاوی فیلتر سیلیکا منتقل می‌شد. در ادامه ستون فیلتر، به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه و بلافاصله هم به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ شده و سپس مایع داخل لوله جمع‌کننده، تخلیه شده و ستون فیلتر با استفاده از بافر شستشو، ۲ مرتبه شستشو داده می‌شد، به‌طوری‌که در هر بار شستشو، مقدار ۷۵۰ میکرولیتر بافر شستشو (مرک، آلمان) را به ستون فیلتر اضافه نموده و پس از ۱ دقیقه نگهداری در دمای محیط، مایع مذکور، به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ می‌شد. پس از تخلیه بافر شستشوی مرحله دوم، ستون فیلتر برای خشک شدن به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ می‌گردید. در ادامه مقدار ۳۰ میکرولیتر از بافر الوشن (مرک، آلمان) را در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به ستون فیلتر اضافه کرده و سپس ستون فیلتر، به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری می‌شد. در نهایت میکروتیوب حاوی ستون فیلتر به مدت ۲ دقیقه، با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیده و مایع روئی حاصله از آن، به عنوان DNA استخراج شده، به یک میکروتیوب جدید منتقل و تا زمان انجام آزمایش PCR، در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

- **مشخصات آزمایش PCR آشیانه‌ای انجام گرفته در تحقیق:** پس از استخراج DNA ژنومی ویروس لوسمی گاو، در این مرحله برای ردیابی ژنوم ویروس مذکور از آزمایش PCR آشیانه‌ای استفاده شد. بدین منظور از ۲ جفت پرایمر اختصاصی ژن *Tax* استفاده شد که توالی نوکلوتیدی آن‌ها در جدول شماره ۲ ارائه شده است. همچنین برنامه‌های دمائی مختلف مورد استفاده در مراحل اول و دوم واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای، در جدول شماره ۳ ارائه شده‌است.

لازم به ذکر است که در آزمایش مذکور، از نمونه مربـوط بـه رده سـلولی FLK (Fetal Lamb Kidney) (تهیـه‌شـده از موسسه وکسن و سرم سازی رازی، حصارک) که به‌شکل پایدار آلوده به BLV می باشد به عنوان کنترل مثبـت و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جدول ۲- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر (Buehring *et al.*, 2014; Delarmelina *et al.*, 2020)

ژن هدف		توالی پرایمرهای تحقیق (′3→′5)	اندازه محصول Nested-PCR
Tax	آغازگر بیرونی	Forward: 5’GGCCCCACTCTCTACATGC3’ Reverse: 5’AGACATGCAGTCGAGGGAAC3’	206 bp
	آغازگر درونی	Forward: 5’ATGTCACCATCGATGCCTGG3’’ Reverse: 3′-AGACATGCAGTCGAGGGAAC-5′	113 bp

جدول ۳- برنامه حرارتی مراحل اول و دوم آزمایش PCR آشیانه‌ای

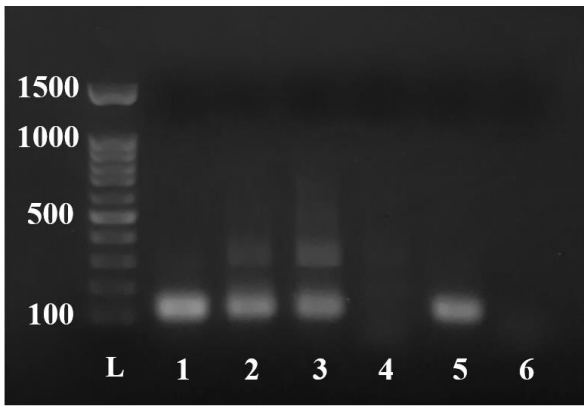
مرحله اول				
	تناوب	**دما (درجه سانتی گراد)**	**زمان**	**تعداد تناوب**
تناوب اول	دناتوره شدن	۹۵	۴ دقیقه	۱
تناوب دوم	دناتوره شدن	۹۵	۳۰ ثانیه	۴۰
	اتصال پرایمرها	۶۰/۵	۳۰ ثانیه	
	سنتز DNA	۷۲	۲۰ ثانیه	
تناوب سوم	سنتز نهایی DNA	۷۲	۵ دقیقه	۱
مرحله دوم				
	تناوب	**دما (درجه سانتی گراد)**	**زمان**	**تعداد تناوب**
تناوب اول	دناتوره شدن	۹۵	۴ دقیقه	۱
تناوب دوم	دناتوره شدن	۹۵	۳۰ ثانیه	۳۵
	اتصال پرایمرها	۶۰/۵	۳۰ ثانیه	
	سنتز DNA	۷۲	۱۵ ثانیه	

تناوب سوم	سنتز نهایی DNA	۷۲	۵ دقیقه	۱

- **تحلیل آماری داده‌ها**: نتایج تحقیق با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۷ و آزمون دقیق فیشر(Fisher's Exact Test) با ضریب اطمینان ۹۵ درصد، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. همچنین مقدار $p<۰/۰۵$ به‌عنوان معنی‌دار بودن اختلافات مشاهده شده بین نمونه‌های شیر پاستوریزه کارخانجات مختلف در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

نتایج مربوط به آزمایشات انجام گرفته در تحقیق حاضر، در شکل شماره ۱ و نیز جدول شماره۴ ارائه شده‌است.
همان‌گونه که در شکل شماره۱ ملاحظه می‌گردد، براساس اطلاعات ارائه شده در جدول شماره۲، محصولات مراحل اول و دوم واکنش، بایستی به ترتیب ۲۰۶ و ۱۱۳ جفت باز باشند.



شکل ۱- ژل الکتروفورز شده محصولات آزمایش PCR آشیانه‌ای (مرحله دوم PCR طول ۱۱۳ جفت باز) انجام گرفته در تحقیق حاضر: چاهکL) سایز مارکر۱۰۰جفت بازی شرکت (سیناژن، ایران)، چاهک شماره۱) نمونه کنترل مثبت، چاهک شماره ۶) نمونه کنترل منفی، چاهک‌های شماره ۲، ۳ و ۵) جواب‌های مثبت در نمونه‌های شیر پاستوریزه، چاهک شماره ۴) جواب منفی در نمونه‌های شیر پاستوریزه.

همچنین بر اساس داده‌های ارائه شده در جدول شماره ۴، بیشترین و کمترین میزان آلودگی به ویروس لوسمی گاو به ترتیب در شیر پاستوریزه یکی از کارخانه‌های تولیدی تهران و مازندران بوده‌است.

جدول ۴- نتایج PCR آشیانه‌ای در خصوص حضور ویروس لوسمی گاوی در شیرهای پاستوریزه تولید شده توسط ۵ کارخانه صنعتی

محل کارخانه شیر پاستوریزه	تعداد نمونه‌های هر کارخانه	تعداد و درصد نمونه‌های مثبت	تعداد و درصد نمونه‌های منفی
۱(استان مازندران)	۱۰	۱ (۱۰درصد)	۹ (۹۰درصد)
۲ (استان خوزستان)	۱۰	۳ (۳۰درصد)	۷ (۷۰درصد)

۳ (استان تهران)	۱۰	۵ (۵۰درصد)	۵ (۵۰درصد)
۴ (استان فارس)	۱۰	۲ (۲۰درصد)	۸ (۸۰درصد)
۵ (استان تهران)	۱۰	۳ (۳۰درصد)	۷ (۷۰درصد)
جمع کل نمونه‌ها	۵۰	۱۴ (۲۸درصد)	۳۶ (۷۲درصد)

از طرف دیگر بررسی آماری نتایج ارائه شده در جدول شماره ۴ با استفاده از آزمون دقیق فیشر نشان داد که بین کارخانه‌های مختلف صنعتی شیر پاستوریزه و میزان آلودگی شیر پاستوریزه تولیدی آن‌ها، اختلاف معنی‌دار وجود ندارد (p=۰/۴۲۳). همچنین بین کارخانه‌های مربوط به استان تهران و سایر استان‌ها نیز از این نظر، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نگردید (p=۰/۱۹۸).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده است که ۲۸ درصد شیرهای پاستوریزه تحت مطالعه تعدادی از کارخانجات تولید شیر ایران که شامل استان‌های مازندران، تهران و فارس بودند، آلوده به ژنوم ویروس BLV بودند. گرچه میزان آلودگی در نمونه شیر استان‌های مختلف از ۱۰ تا ۵۰ درصد متغیر بوده است، اما از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین آنها وجود نداشت. در مطالعات صورت گرفته در ترکیه نشاده داده شد که از ۵۰ نمونه شیر تازه و گوشت خام به ترتیب ۲۴ و ۲۵ نمونه و مجموعاً ۴۹ درصد، آلوده به BLV بوده‌اند (Olaya-Galan *et al*., 2017). همچنین در مطالعه Barzeghar و همکاران در سال ۲۰۲۱ نشان داده شده که ۹/۹۳ درصد گاوهای تحت مطالعه در گاوداری‌های زنجان، ویروس BLV را از طریق شیر دفع می‌کردند (Barzeghar *et al*., 2021). درخصوص دفع ویروس از طریق شیر این نکته حائز اهمیت است که BLV عمدتاً لنفوسیت‌های B را آلوده می‌کند. در نتیجه، ویروس از طریق ترشحات حاوی لنفوسیت‌های آلوده از دام بیمار به دام سالم منتقل می‌شود (Gutierrez *et al*., 2014). به همین دلیل اغلب از طریق انتقال سلول‌های آلوده به ویروس به شکل افقی از طریق مایعات بیولوژیک مانند ترشحات بینی، بزاق، خون، ادرار، اسپرم، آغوز، شیر و یا به دنبال روش‌های درمانی و مدیریتی مانند شاخ‌بری، شماره‌گذاری گوش، واکسیناسیون با سوزن مشترک، اختکردن و معاینه رکتال که از طریق انتقال لنفوسیت‌های B آلوده از گاوهای آلوده به ویروس به گاوهای غیرآلوده در سطح گله گسترش می‌یابد (Wrathall *et al*., 2006; Bartlett *et al*., 2014; Smith *et al*., 2015; Constable *et al*., 2017). بر این اساس چنین می‌توان بیان نمود که هر چقدر تعداد لنفوسیت‌های آلوده به ویروس در شیر بیشتر باشند، امکان دفع ویروس از طریق شیر و ردیابی ژنوم آن در شیر بیشتر خواهد بود. به عبارت دیگر گاوهای آلوده‌ای که دچار ورم پستان به‌خصوص از نوع تحت بالینی هستند میزان بیشتری لنفوسیت‌ها را از طریق شیر دفع می‌کنند و چنین گاوهایی اگر آلوده به ویروس باشند، امکان دفع بیشتر ویروس از طریق شیر را دارند. لذا علت احتمالی تفاوت در مطالعه حاضر با سایر مطالعات را می‌توان به وضعیت بهداشتی گاوداری‌هایی که نمونه شیر از آن‌ها اخذ شده است، نسبت داد.

گرچه مطالعات فوق بر روی شیرهای خام بوده، اما مطالعه حاضر بر روی شیرهای پاستوریزه انجام شده‌است. از طرف دیگر کارایی پاستوریزه کردن شیر به متغیرهای حیاتی مانند دما، زمان و ترکیب محصول بستگی دارد و شاید به دلیل

تاثیر پاستوریزاسیون شیر یا حرارت دادن سایر محصولات دامی مانند گوشت بر BLV، نتایج متفاوتی را به دنبال داشته است. گرما فعل و انفعالات بین مولکولی بین پروتئین‌های کپسید و یکپارچگی پوشش ویروس آزاد را از نظر حرارتی بی‌ثبات می‌کند. این بی‌ثباتی حرارتی باعث از بین رفتن عفونت‌پذیری ویروس‌ها می‌شود (Sandoval-Monzón *et al.*, 2021). پاستوریزه کردن، زنده ماندن سلول‌های شیر را تا بیش از ۹۰ درصد کاهش می‌دهد و از تکثیر پیش‌ویروس و عفونت سلول‌های دیگر جلوگیری می‌کند. غیرفعال شدن BLV و غیرفعال شدن طیف وسیعی از ویروس‌های پوشش-دار و بدون پوشش توسط پاستوریزه کردن نشان داده شده است (Sandoval-Monzón *et al*., 2021؛ Sandoval-Monzón *et al*., 2020)، اگرچه ریکرت و همکاران در سال۱۹۹۴ گزارش کرده‌اند که پاستوریزاسیون، DNA پیش-ویروس BLV را دناتوره نمی‌کند (Reichert *et al*., 1994).

هر چند در مطالعه حاضر وجود ژنوم ویروسBLV در شیرهای پاستوریزه تولیدی کارخانجات مختلف تحت بررسی نشان داده شده است ولی زنده ماندن ویروس به اثبات نرسیده است. با توجه به تاثیرات متفاوت پاستوریزاسیون شیر بر ویروس، نیاز به بررسی بیشتر با استفاده از دیگر روش‌های اختصاصی می‌باشد تا زنده و فعال بودن ویروس مذکور هم در شیرهای پاستوریزه مشخص گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مرکز مطالعات و همکاری‌های بین‌المللی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری به‌واسطه حمایت مالی و حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران به‌واسطه همکاری در اجرای طرح تحقیقاتی اعلام می‌نمایند.

تعارض منافع

بین نتایج حاصل از این تحقیق با نویسندگان تعارض منافع وجود ندارد.

منابع

- Aida, Y., Murakami, H., Takahashi, M. & Takeshima, S.N. (2013). Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. Frontiers in Microbiology, 4(328): 1-11.
- Baltzell, K.A., Shen, H.M., Krishnamurthy, S., Sison, J.D., Nuovo, G.J. & Buehring, G.C. (2018). Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: Case-control study of women in Texas. Cancer, 124(7): 1342-1349.
- Bartlett, P.C., Sordillo, L.M., Byrem, T.M., Norby, B., Grooms, D.L., Swenson, C.L., *et al*. (2014). Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. Journal of the American Veterinary Medical Association, 244(8): 914-922.

- Barzegar, H., Mirshahabi, H., Motamed, N., Yavarmanesh, M., Mahdavi Poor, B., Moaddab, S.R., *et al*. (2021). Identification of bovine leukemia virus in raw milk samples in North-West of Iran. Veterinary Research Forum, 12(2): 223-227.
- Buehring, G.C., DeLaney, A., Shen, H., Chu, D.L., Razavian, N., Schwartz, D.A., Demkovich, Z.R. *et al*. (2019). Bovine leukemia virus discovered in human blood. BMC Infectious Diseases, 19(297): 1-10.
- Buehring, G.C. (2017). Response to "Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients". Breast Cancer Research: BCR, 19(24): 1-2.
- Buehring, G.C., Philpott, S.M. and Choi, K.Y. (2003). Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. AIDS Research and Human Retroviruses, 19(12):1105-1113.
- Buehring, G.C., Shen, H.M., Jensen, H.M., Choi, K.Y., Sun, D. and Nuovo, G. (2014). Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. Emerging Infectious Diseases, 20(5): 772-782.
- Constable, P.D., Hinchcliff, K.W., Done, S.H. and Granberg, W. (2017). Veterinary Medicine. 11th ed., W.B. Saunders Copmpany, London, U.K., pp: 785-795
- Ceriani, M.C., Lendez, P.A., Martinez-Cuesta, L., Nieto-Farias, M.V., Shen, H.M., *et al*. (2018). Bovine leukemia virus presence in breast tissue of Argentinian women. Its association with cell proliferation and prognosis markers. Multidisciplinary Cancer Investigation, 2 (4):16-24.
- Delarmelina, E., Buzelin, M.A., Souza, B.S., Souto, F.M., Bicalho, J.M., Câmara, R.J.F., *et al*. (2020). High positivity values for bovine leukemia virus in human breast cancer cases from Minas Gerais, Brazil. Plos One, 15(10): e0239745, 1-12.
- Gao, A., Kouznetsova, V.L. and Tsigelny, I.F. (2020). Bovine leukemia virus relation to human breast cancer: Meta-analysis. Microbial pathogenesis, 149(104417): 1-7.
- Gröner, A., Broumis, C., Fang, R., Nowak, T., Popp, B., *et al*. (2018). Effective inactivation of a wide range of viruses by pasteurization. Transfusion, 58(1): 41-51.
- Giovanna, M., Ulloa, J.C., Uribe, A.M. and Gutierrez, M.F. (2013). Bovine leukemia virus gene segment detected in human breast tissue. Open journal of medical microbiology, 3(1):84-90
- Gutiérrez, G., Rodríguez, S.M., de Brogniez, A., Gillet, N., Golime, R., Burny, A., *et al*. (2014). Vaccination against δ-retroviruses: the bovine leukemia virus paradigm. Viruses, 6(6): 2416-2427.
- Khatami, A., Pormohammad, A., Farzi, R., Saadati, H., Mehrabi, M., Kiani, S.J., *et al*. (2020). Bovine Leukemia virus (BLV) and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. Infectious Agents and Cancer, 15(48): 1-8.
- Lee, E., Kim, E.J., Ratthanophart, J., Vitoonpong, R., Kim, B.H., *et al*. (2016). Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle. nfection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 41:245-254.
- Ma, J.G., Zheng, W.B., Zhou, D.H., Qin, S.Y., Yin, M.Y., Zhu, X.Q., *et al*. (2016). First Report of Bovine Leukemia Virus Infection in Yaks (*Bos mutus*) in China. BioMed Research International, 9170167: 1-4
- Marawan, M.A., Alouffi, A., El Tokhy, S., Badawy, S., Shirani, I., Dawood, A., *et al*. (2021). Bovine Leukemia Virus: Current Epidemiological Circumstance and Future Prospective. Viruses, 13(2167): 1-24.
- Mirzaei, H., Ghorbani, S., Khanizadeh, S., Namdari, H., Faghihloo, E. and Akbari, A. (2020). Histone deacetylases in virus-associated cancers. Reviews in Medical Virology, e2085: 1-13.
- Molnár, E., Molnár, L., Guedes, V.T. and de Lima, E.S. (2000). Naturally occurring bovine leucosis virus in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Brazil. The Veterinary Record, 146(24): 705-706.
- OIE, https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.10_EBL.pdf
- Olaya Galan, N.N., Corredor Figueora A.P., Guzmán Garzón, T.C., Ríos-Hernandez, K.S., Salas-Cárdenas, S.P., Patarroyo, M.A., *et al*. (2017). Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption. Epidemiology and Infection, 145(15): 1-6.

- Reichert, M., Grundboeck, Jusko., J., Ruka, J., Stec, J. and Kozaczynski, W. (1994). Influence of selected technological treatments on the BLV provirus DNA occurring in the tissues of leukemic cattle. Bulletin of the Veterinary Institute in Puawy, 38(2): 52-60.
- Robinson, L.A., Jaing, C.J., Pierce Campbell, C., Magliocco, A., Xiong, Y., Magliocco, G., *et al*. (2016). Molecular evidence of viral DNA in non-small cell lung cancer and non-neoplastic lung. British Journal of Cancer, 115(4): 497-504.
- Sandoval-Monzón, R.S., Arévalo-Rodriguez, I.C.K., Carrillo-Torres, A.A. and Ruiz-García, L.F. (2021). Efficacy of physical and chemical treatments on the inactivation of bovine leukosis virus present in milk. Clinical and Experimental Vaccine Research, 10(1): 52-58.
- Sandoval-Monzon., R.S., Arévalo-Rodriguez, I., Carrillo-Torres, A. and García, L.F. (2020). Efficacy of pasteurization and freezing on the inactivation of bovine leukosis virus present in milk. Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú, 31(3): e16849.
- Smith, B.P. (2015). Large Animal Internal Medicine, 5th ed., Mosby, London, pp: 1070-1073.
- Úsuga-Monroy, C., Díaz, F.J., González-Herrera, L.G., Echeverry-Zuluaga, J.J. and López-Herrera, A. (2013). Phylogenetic analysis of the partial sequences of the env and tax BLV genes reveals the presence of genotypes 1 and 3 in dairy herds of Antioquia, Colombia. Virus Disease, 34(4): 483-497.
- Wrathall, A.E., Simmons, H.A. & Van-Soom, A. (2006). Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. Theriogenology, 65(2): 247-274.

Bovine Leukemia Virus DNA Detection in Pasteurized Milk by Nested Polymerase Chain Reaction (PCR) from some Dairy Industries Company in Iran

Yazdani Paraei, S.[1], Haji Hajikolaei, M.R.[2*], Seyfi Abad Shapouri, M.R.[3], Nouri, M.[2], Beheshtifar, F.[4], Şahinduran, Ş.[5]

1- PhD Student, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
3- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
4- Assistant Professor, Department of Surgery, School of Medicine, Ahvaz Jundishpur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
5- Professor, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Klinik Bilimler Bölümü, Veterinerlik Cerrahisi Anabilim Dali, Turkey.

[*]Corresponding author's email: mhajih@scu.ac.ir

(Received: // Accepted: //)

Abstract

Bovine leukemia virus (BLV) as the causative agent of enzootic bovine leukemia (EBL) is a retrovirus cause of breast cancer in women. The virus transmits to human through animal products such as milk and meat. This study aimed to detect DNA of Bovine leukemia virus in

pasteurized milk. For this purpose, the samples of pasteurized milk were taken from 5 Dairy Industries Company in Tehran, Mazandaran, Khouzestan and Farse provinces of Iran. The samples were taken from the pasteurized milk available in Ahvaz city stores, so that 10 milk samples with different production dates were taken from each factory and stored at -20 centigrade until examination. They were examined by nested PCR to detect Bovine leukemia virus DNA. Out of 50 samples of pasteurized milk from different factories, 14(28%) samples were positive. Statistical analysis (Fisher's Exact Test) showed there was no significant difference between the milk produced by different factories studied (P= 0.423) and also between factories in two factory of Tehran with other provinces (P= 0.198). The results of this study show that this virus is present in pasteurized milk, but whether it is active or not requires further investigation.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Bovine leukemia virus, Enzootic bovine leukosis, Iran, Pasteurized milk.