

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

رضی‌اله جعفری‌جوزانی<sup>۱\*</sup>، غلامعلی مقدم<sup>۲</sup>، محسن آسمند<sup>۳</sup>

۱- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳- دانش‌آموخته دامپزشکی، شرکت سوا، تهران، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات: rjoozani@tabrizu.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۴/۶/۲۹ پذیرش نهایی: ۹۴/۹/۳۰)

### چکیده

ویروس لوسمی گاوی (BLV) یک رتروویروس است که باعث لکوز انزوئیک گاوی می‌شود. روش متداول برای شناسایی وجود عفونت با BLV غربالگری آنتی‌بادی‌ها است. آگار ژل ایمونودیفیوژن و الیزا به‌طور گسترده‌ای برای شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد BLV استفاده می‌شود. تکثیر و شناسایی DNA پروویروس لکوز گاو به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) روش توانمندی است که قادر به تشخیص مستقیم عفونت می‌باشد. با این حال، استفاده گسترده از این روش به منظور تشخیص آزمایشگاهی بیماری محدودیت‌هایی داشته و نیاز به مطالعات بیشتری دارد. هدف از این مطالعه مقایسه نتایج آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و یک الیزای تجاری در شناسایی پروویروس لکوز گاو و آنتی‌بادی‌های ضد این ویروس در خون گاوهای شیری بود. بدین منظور حساسیت و ویژگی نسبی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در مقایسه با یک الیزای تجاری مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های خونی از ۱۷۳ رأس گاو شیری از گاوداری‌های اطراف تبریز تهیه شد و توسط یک الیزای تجاری به منظور تشخیص آنتی‌بادی ضد لکوز ویروس گاو و نیز توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد ارزیابی قرار گرفتند. حساسیت و ویژگی نسبی آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در مقایسه با الیزای تجاری به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۸/۶٪ محاسبه شد. فراوانی حضور بخش هدف از ژن gag در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۱۳/۳٪ و فراوانی پاسخ سرمی مثبت با الیزای تجاری ۱۲/۱٪ به‌دست آمد. نتایج حاکی از آن است که امکان استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در تشخیص آزمایشگاهی بیماری وجود دارد.

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

**مقدمه**

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

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

**مواد و روش‌ها****نمونه‌های سرمی**

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

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

**الیزای تجاری**

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

3) *gag3* (5 AACACTACGACTTCGAATCG) برگرفته از قطعات ژنومی BLV، برای PCR استفاده گردید (Fechner *et al.*, 1996). علت انتخاب ژن *gag* به دلیل حفاظت و مصونیت ناحیه مربوطه آن می‌باشد.

#### واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

تمام واکنش‌های PCR در حجم ۲۰ μl از محلول حاوی ۱ μl نمونه DNA ۱۰۰ ng، ۰/۴ mM از ۰/۲ dNTPs mix، ۱/۴ μl از ۳/۵ mM MgSO<sub>4</sub>، ۲ μl از ۰/۱۲ μl PCR، ۰/۶ واحد پلی‌مراز platinum Taq و ۰/۴ μl از ۰/۲ mM از هر پرایمر صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دستگاه ترمال سایکلر پریموس ۹۶ (MWG, Germany)، با چرخش حرارتی به صورت دناتوراسیون اولیه برای ۵ دقیقه در ۹۵°C، سپس ۳۵ چرخش در ۹۴°C برای ۱ دقیقه، ۶۵°C به مدت ۱ دقیقه و ۷۲°C برای ۲ دقیقه و در نهایت کامل‌سازی قطعات به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C انجام گرفت (Fechner *et al.*, 1996).

برای رویت و عکس‌برداری از محصول تکثیر یافته در PCR از الکتروفورز ژل آگارز (۲٪) در بافر تریس استات EDTA و نیز رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (۵ mg/ml) استفاده شد. در نمونه فاقد الگو (non template control) از آب مقطر دو بار تقطیر استفاده شد. به عنوان کنترل مثبت نیز از DNA استخراج شده از رده سلولی FLK-BLV (هدیه از طرف دکتر فرهید همت‌زاده، دانشگاه آدلاید، استرالیا) در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز فوق استفاده شد.

#### کنترل واکنش

از دو پرایمر

(5-CGAGTCCTTATGAGCTTGATTCTT-3) *PRL033*

از دستگاه الیزا ریدر (DANA 3200, IRAN) در طول موج ۴۵۰ nm بهره گرفته شد.

#### استخراج DNA

پس از جداسازی لوکوسیت‌ها از نمونه‌های خونی توسط گرادیان‌ت فایکول و سه مرتبه شستشوی آن‌ها با فسفات بافر سالین (pH=۷/۴)، سلول‌ها در ۶۶۵ μl بافر لیزکننده (حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۲۵ میلی‌مولار EDTA و ۱۰ میلی‌مولار تریس-کلریدریک با pH=7.0 و نیم درصد سدیم دودسیل سولفات) و پروتئیناز K (۱ mg/ml) تخریب شدند، سپس مطابق توصیه سازنده کیت (Bioneer, S. Korea) و با استفاده از ستون‌های سیلیکا ژل استخراج DNA انجام شد. سپس DNA خشک شده در ۱۰۰-۲۰۰ μl از بافر TE (Tris-EDTA) تا رسیدن به تغلیظ ۰/۵ μg/μl حل شد. کنترل مثبت شامل DNA استخراجی از سلول‌های رده FLK-BLV بود (هدیه از طرف دکتر فرهید همت‌زاده، دانشگاه آدلاید، استرالیا).

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

ارزیابی کمی و کیفی به ترتیب توسط روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از دستگاه بایوفتومتر (Eppendorf, Germany) در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ nm و الکتروفورز ژل آگاروز همراه با رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید انجام گردید.

#### پرایمرها

از دو پرایمر

3) *gag4* (5 GGTTCCTTAGGACTCCGTCG) و

**تحلیل آماری داده‌ها**

و PRL035 (3- GCCTTCCAGAAGTCGTTTGTTC) (5)

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

به‌منظور تکثیر بخش اگزوزن شماره ۳ ژن پرولاکتین گاوی استفاده شد.

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

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

محکم و بین ۰/۷۱ تا یک معادل توافق بسیار کامل می باشد (Landis and Koch, 1977).

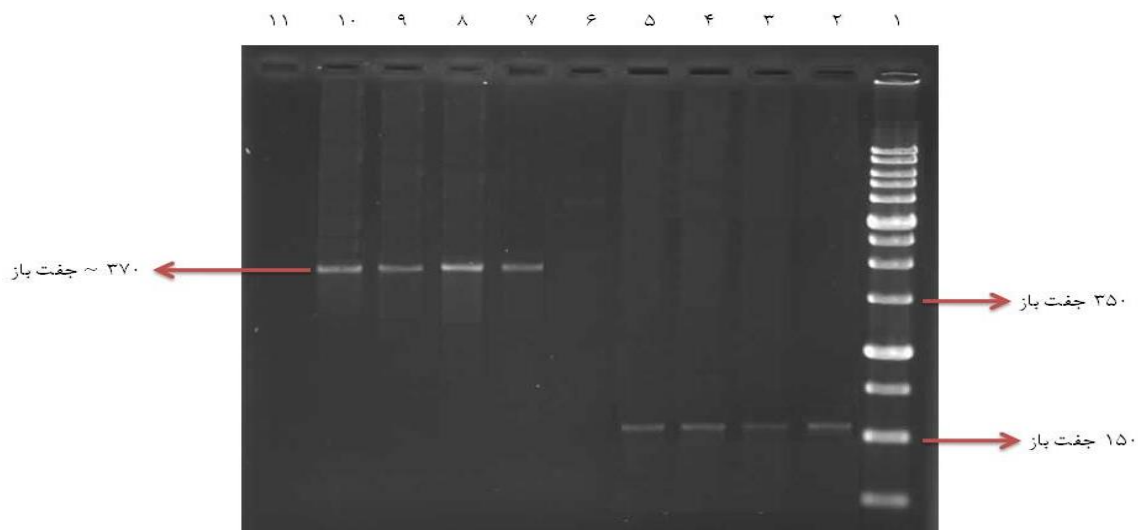
نتایج آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی مرز و الیزای تجاری توسط آزمون بررسی توافق مثبت (آماره کاپا) و در نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ مورد مقایسه قرار گرفت و تفسیر آماره کاپا به صورت زیر انجام گردید:

**یافته‌ها**

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

آماره کاپا بین صفر (شانس) و یک (توافق کامل) متغیر می باشد. تفسیر آن طبق نظری است که توسط لاندیس و کچ در سال ۱۹۷۷ ارائه شده است. بدین صورت که مقادیر بین صفر و دو دهم معادل توافق جزئی، بین ۰/۲۱ و ۰/۴ معادل توافق اندک، بین ۰/۴۱ و ۰/۶ معادل توافق متوسط، بین ۰/۶۱ و ۰/۷ معادل توافق

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



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

پاسخ سرمی مثبت با الیزای تجاری ۱/۱۲٪ محاسبه شد. نتایج مثبت و منفی هر دو واکنش زنجیره‌ای پلی مرز و الیزای تجاری در جدول ۱ با یکدیگر مقایسه شده است. توافق بین دو آزمایش بر حسب آماره کاپا، ۰/۹۴ محاسبه شد که نشان از توافق محکم میان واکنش زنجیره‌ای پلی مرز و الیزای تجاری وجود دارد.

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

حساسیت و ویژگی نسبی آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی مرز در مقایسه با الیزای تجاری به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۸/۶٪ محاسبه شد. فراوانی حضور بخش هدف از ژن gag در واکنش زنجیره‌ای پلی مرز ۱۳/۳٪ و فراوانی

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

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

## بحث و نتیجه‌گیری

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

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

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

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

حساسیت بالای PCR موجب شده که از آن در تجارت حیوانات و در مراکز تلقیح مصنوعی و اصلاح نژاد برای شناسایی عوامل عفونی استفاده شود. گذشته از این، می‌توان از این آزمایش در برنامه‌های ملی مبارزه با بیماری لکوز گاو به‌خصوص زمانی که بر اثر راهکارهای قبلی فراوانی بیماری کاهش یافته است، به منظور تایید صحت آزمایشات سرولوژیک متداول استفاده نمود. یکی از مشکلات آزمایشات سرولوژیک به‌ویژه انواع الیزا، نتایج مشکوک آنها می‌باشد که در این موارد می‌توان با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به تایید یا رد این دسته از نتایج اقدام نمود. نتایج آزمایش الیزا در این مطالعه حاکی از فراوانی نسبی ۱۲/۱٪ می‌باشد که با نتایج مطالعه قبلی جعفری‌جوزانی و همکاران در سال ۲۰۱۰ هم‌هنگ می‌باشد (Jafari Jozani *et al.*, 2010). این نتایج در مقایسه با نتایج گزارش‌های حدادزاده در سال ۱۳۶۴، کارگر موخر و همکاران در سال ۱۳۷۵ و ممتاز و همت‌زاده در سال ۱۳۷۴ حاکی از گسترش بیماری در طی سه دهه اخیر می‌باشد (حدادزاده، ۱۳۶۴؛ کارگر موخر و همکاران، ۱۳۷۵؛ ممتاز و همت‌زاده، ۱۳۷۴).

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

نظر گرفته شده‌اند، واقعاً منفی می‌باشند گرچه ممکن است که در این روند شاهد رخداد موارد مثبت کاذب باشیم.

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

### سپاسگزاری

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

از هر دو آزمایش الیزا و PCR برای تشخیص عفونت استفاده نمود. برخی از مطالعات قبلی حاکی از حساسیت بالاتر آزمایش PCR در مقایسه با الیزا هستند. به‌طور مثال فیچنر و همکاران در سال ۱۹۹۶ با آزمایش PCR، ۱۰٪ فراوانی نسبی بالاتری را در مقایسه با الیزا مشاهده نمودند که البته گاوهای مورد مطالعه توسط ایشان دارای فراوانی بسیار پایینی از نقطه نظر این بیماری بودند. در این مطالعه آزمایش PCR قادر به شناسایی تمامی موارد مثبت شناسایی شده توسط آزمون الیزا تجاری بود (حساسیت ۱۰۰٪) ضمن اینکه، دو مورد از نتایج منفی الیزای تجاری نیز مثبت تشخیص داده شد (Fechner et al., 1996).

در هر صورت باید توجه داشت که فراوانی بیماری یکی از عوامل تعیین‌کننده نوع آزمایش مورد استفاده در تشخیص آزمایشگاهی این عفونت می‌باشد. به‌طور مثال، در مناطقی که فراوانی عفونت به ویروس لکوز گاو بالاتر می‌باشد، استفاده از آزمایشی با ویژگی بالا دارای اهمیت بیشتری است و در مقابل، در مناطقی که فراوانی بیماری پایین است استفاده از روشی با حساسیت بالاتر، ارزشمندتر می‌باشد تا مطمئن شویم مواردی که منفی در

### منابع

- حاجی حاجیکلائی، م.ر.، صیفی آباد شاپوری، م.ر. و اکبری م. (۱۳۷۵). مطالعه سرولوژیکی آلودگی به ویروس لکوز گاوی (BLV) در گاوهای اهواز. پژوهش و سازندگی، شماره ۷۱، صفحات: ۲۶-۳۰.
- حدادزاده، ح.ر. (۱۳۶۴). فراوانی آلودگی با ویروس لکوز انزوتوتیک گاوها در گاوداری های اطراف تهران، پایان نامه برای دریافت دکتری دامپزشکی از دانشگاه تهران، شماره ۱۵۷۷.

- کارگر موخر، ر.، اهورایی، پ.، قابوسی، ب.، خدمتی، ک.، عزیزی، ع.، پورزاهدی، ر. و همکاران (۱۳۷۵). بررسی سرواپیدمیولوژیک بیماری لکوز آنزوتیک گاوان (EBL) در ایران، پژوهش و سازندگی، شماره ۳۰، صفحات: ۱۶۶-۱۶۴.
- ممتاز، ح. و همت زاده، ف. (۱۳۷۴). بررسی سرولوژیک آلودگی به ویروس لکوز گاو ها (BLV) در گاو‌داری‌های استان چهارمحال و بختیاری. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دوره ۴، شماره ۱، صفحات: ۴۴-۳۷.
- Brandon, R., Naif, H., Daniel, R.C.W. and Lavin, M.F. (1991). Early detection of bovine leucosis DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Sciences*, 50: 79-94.
- Burkhardt, H., Fechner, H., Mewes, G., Mewes, L., Wagner, H. and Ebner, D. (1993). Search with capture-ELISA nucleic acid probe and DNA-amplification for BLV in a AGID seronegative dairy cattle herd in a long term study. In: 22nd FEBS Meeting, Stockholm, Sweden.
- Eaves F.W., Molloy, J., Dimmock, C. and Eaves, L. (1994). A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Veterinary Microbiology*, 39: 313-321.
- Fechner, H., Kurg, A., Geue, L., Blankenstein, P., Mewes, G., Ebner, D., *et al.* (1996). Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl Veterinarmed*, 43(10): 621-30.
- Heeney, J., Valli, P., Jacobs, R. and Valli, V. (1992). Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. *Laboratory Investigations*, 66: 607-617.
- Jacobs, R.M., Smith, H.E., Gregory, B., Valli, V.E. and Whetstone, C.A. (1992). Detection of multiple retroviral infections in cattle and cross-reactivity of bovine immunodeficiency-like and human immunodeficiency virus type 1 proteins using bovine and human sera in a Western blot assay. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 56: 353-359.
- Jafari Jozani, R., Moghaddam, Gh., Khazraimnia, P. and Jabbari Nooghabi, H. (2010). Adaptation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay by purified gp51SU for detection of antibodies to bovine leukemia virus. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 11 (4): 332-336.
- Johnson, R. and Kaneene, J.B. (1991). Bovine leukemia virus. Part 1. Descriptive epidemiology, clinical manifestations and diagnostic tests. *Compensation Continuing Education* 13: 315-325.
- Johnson, R. and Kaneene, J.B. (1992). Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Veterinary Bulletin*, 62: 276-312.
- Kittelberger, R., Laybourn, B.J., Diack, D.S., Penrose, M.E., Reichel, M.P., Motha, J., *et al.* (1996). Evaluation of electrophoretic immunoblotting for the detection of antibodies against the bovine leukosis virus in cattle. *Journal of Virological Methods*, 61: 7-22.
- Klintevall, K., Ballagi-Pordany, A., Naslund, K. and Belak, S. (1994). Bovine leukemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Veterinary Microbiology*, 42: 191-204.
- Landis, J.R. and Koch, G.G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33: 159-174.
- Poon, H., Jimenez, E., Jacobs, R.M., Song, Z. and Jefferson, B. (1993). Detection of bovine leukemia virus RNA in serum using the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 41: 101-112.
- Schwartz, I., Bensaid, A., Polack, B., Perrin, B., Berthelemy, M. and Levy, D. (1994). In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. *Journal of Virology*, 67: 4579-4596.



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



## **A comparative study for diagnosis of Bovine Leukemia Virus (BLV) infection in dairy cows by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Enzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA)**

**Jafari Jozani, R.<sup>1\*</sup>, Moghaddam, Gh.<sup>2</sup>, Asmand, M.<sup>3</sup>**

1- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

2- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

3- Student of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

\*Corresponding author email: [rjoozani@tabrizu.ac.ir](mailto:rjoozani@tabrizu.ac.ir)  
(Received: 2015/9/20 Accepted: 2015/12/21)

### **Abstract**

Bovine Leukemia Virus (BLV) is a retrovirus that causes bovine enzootic leukemia (EBL). The routine method for the diagnosis of the infection is antibody screening tests. Agar gel immunodiffusion (AGID) and ELISA are widely used for detection of the antibody against BLV. Amplification and detection of the proviral DNA by PCR is a powerful method for direct detection of the infection. However there are some limitations for routine use of this method in laboratory diagnosis of the disease and it requires further investigations. The objective of this study was to compare the results of a PCR assay with a commercial ELISA in detection of the bovine leukemia provirus and antibodies to this agent, in blood samples of dairy cows. The ELISA was assumed as reference test and the relative sensitivity and specificity of the PCR assay was calculated by testing samples from 173 cows in suburb of Tabriz. Blood sample were taken and taken sera and DNA contents were harvested. Sensitivity and specificity of the PCR assay in comparison to commercial ELISA were 100% and 98.6% respectively. The frequency of the presence of the targeted part of gag gene in PCR was 13.3% and the frequency of the seropositive reaction by commercial ELISA was 12.1%. The results showed that it is possible to use PCR as a laboratory diagnostic method for identification of the disease.

**Key words:** Bovine Leukosis, Polymerase Chain Reaction (PCR), Commercial Enzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA).