تشخیص میزان آلودگی به عامل بیماری لکوزگاوی (BLV) در گاوهای شیری هلشتاین به کمک تست DNA

مهدی خسروی [۱*]، امیر رضا پریزاده [۲]، محمد رضا نصیری [۳]، احسان باقرپور [۴]

۱ـ دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک و اصلاح نژاد دام عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر، کاشمر ـ ایران.
۲ـ دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد ـ ایران.
۳ـ استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد ـ ایران.
۴ـ دانشجوی دکتری دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار ـ ایران.
*نویسنده مسئول: Mahdi_khossravi@yahoo.com

دریافت مقاله: ۲۲ فروردین ۸۹، پذیرش نهایی: ۲۰ تیر ۸۹

چکیده

بیماری لکوزگاوی که به وسیله ویروس لوسمی گاو، یک انکوویروس تیپ C اگزوژن در خانواده رتروویریده ایجاد می‌شود، یکی از بیماری‌های کشنده ویروسی است که می‌تواند گونه‌های مختلف جانوری را به صورت طبیعی یا تجربی آلوده می‌کند. جهت بررسی آلودگی به ویروس لکوزگاوی، تعداد ۱۷۵ نمونه خون از گاوهای هلشتاین جمع آوری گردید. DNA ژنومی از ۱۰۰ میکرولیتر خون استخراج شد. جهت ارزیابی کیفیت وکمیت DNA استخراجی روش‌های ژل مونیتوریگ و اسپکتروفتومتری مورد استفاده قرار گرفت. تکثیر ناحیه پلی مورفیک ژن BLV به طول ۳۴۷ جفت باز با آغازگرهای gag1 وgag2 صورت گرفت. برای مشاهده ی محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۴ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد. از مجموع دام‌های مورد بررسی ۴۸ رأس (۲۷/۴ درصد) آلوده به ویروس لکوزگاوبودند. پژوهشنامه دامپزشکی، ۱۳۸۹، دوره ۶، شماره ۲، ۱۰۶-۱۰۱.

واژه‌های کلیدی: گاوهلشتاین، لکوزگاوی، تست DNA.

Identification prevalence of Bovine Leukemia Virus (BLV) in Holstein Dairy Cattle by DNA Test

Khosravi, M.[1*], Parizade, A. R.[2], Nassiry, M. R.[3], Bagherpour, E.[4]

[1] *Ph.D. student of Genetics and Animal Breeding (Yong Researchers Club), Islamic Azad University, Kashmar Branch, Kashmar- Iran.*

[2] *Ph.D. student of Genetics and Animal Breeding of Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad- Iran.*

[3] *Assistant Professor of Department of Animal Science Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad- Iran.*

[4] *student of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Garmsar Branch, Garmsar- Iran.*

Abstract

Bovine Leukosis that is established by leukemia virus. an exogenous C-type oncovirus in the Retroviridae family, is one of the diseases that can infect various animal specieses naturally or experimentally. In order to investigate the prevalence of Bovine Leukemia Virus (BLV), blood samples were taken from 175 Holstein of dairy cattle. Genomic DNA was extracted from 100 ?l of blood samples. Gel monitoring and spectrophotometric methods were used to determination quantity and quality of DNA. In standard PCR reactions primers gag1 and gag2 amplified a 347 bp fragment from the polymorphic region of BLV gene. Products of amplification were recognized by electrophoresis on 1.4% agarose gel stained with ethidium bromide.48(27.4%) cattle were positive. ***Vet. Res. Bull. 6,2:101-106, 2011.***

Keywords: Holstein Cattle, Bovine Leukemia Virus, DNA Test.

مقدمه

ویروس لکوز گاو(BLV) یک نوع ویروس از گروه ویروس‌های RNA از خانواده ی رتروویریده، جنس دلتاویروس می‌باشد که باعث پیدایش سرطان خون در گاو می‌شود(۲۴). لکوز یکی از بیماری‌های مهم ویروسی و از تومورهای بدخیم سیستم رتیکولواندوتلیال گاو می‌باشد که با ایجاد توده‌هایی از لنفوسیت‌های توموری تقریباً در هر عضوی مشخص می‌شود و برحسب عضو مبتلا با علائم درمانگاهی متفاوتی همراه است (۲۷و۱،۲۶).

BLV در تعدادی از لمفوسیت‌های B محیطی که در نتیجه عفونت تکثیر می‌یابند، استقرار می‌یابد. از بین دام‌های مختلف تنها گاو به طور طبیعی به این ویروس آلوده می‌شود اما به طور

تجربی توانستند ویروس را به گونه‌های مختلفی از حیوانات از قبیل گوسفند، بز، خوک، خرگوش، راسو، میمون، شامپانزه، و گاومیش انتقال دهند (۱۸و۱۵،۱۴،۲). اولین بار بیماری، در اروپای شرقی در سال (۱۹۰۰) گزارش شد. چگونگی پیدایش تومور از سال (۱۹۱۲) مورد توجه قرار گرفت ولی تا (۱۹۶۹) هنوز عامل بیماری نامشخص بود و تنها آن را به عنوان یک بیماری عفونی می‌شناختند ولی در (۱۹۶۹) ویروس عامل بیماری تحت عنوان ویروس لوکوز گاو شناسایی گردید(۱۹و۴). در ایران نیز بیماری وجود دارد و در سال (۱۹۶۵) میلادی مطابق با (۱۳۴۴) هجری شمسی در دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران تشخیص داده شد(۷و۳).

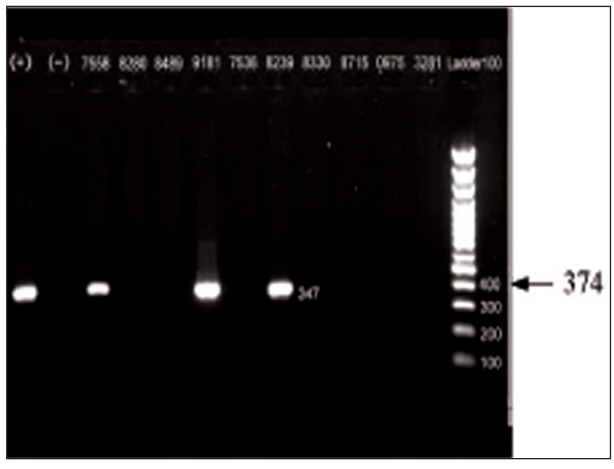
آلودگی به این ویروس با ورود آن به ژنوم سلول‌های میزبان دنبال شده و با وجود تولید پادتن در بدن، این آلودگی تا آخر عمر ماندگار می‌گردد(۲۳و۱۷). انتقال بیماری به شکل افقی و عمودی صورت می‌گیرد بصورت افقی از طریق تماس‌های بسیار نزدیک فیزیکی، مواد یا وسایل آلوده به خون، از جمله: سرنگ‌های آلوده، وسایل کمکی زایشگاه، لوازم شاخ بری، دستکش‌های معاینه از راه راست روده‌ای و بصورت عمودی شامل جابجایی ویروس از مادر آلوده به جنین یا مصرف ماک و شیر مادر آلوده عمده ترین راه‌های انتقال بیماری هستند(۲۶و۲۴). و در صورت مساعد بودن شرایط محیطی بویژه استعداد ژنتیکی دام و عدم رعایت اصول بهداشتی، خصوصاً در زمان واکسیناسیون و خونگیری می تواند افزایش یابد(۲۵و۱،۲۱). ویروس لکوز گاوی که عامل بیماری لکوز گاوها می‌باشد، ضررهای اقتصادی مهمی را به صنعت دامداری وارد می‌کند و از اینرو هزینه‌های قابل توجهی برای کنترل و ریشه کنی این بیماری صرف می‌شود. ضررهای اقتصادی مستقیم در نتیجه بروز علایم درمانگاهی بیماری ایجاد می‌شود و شامل مواردی مثل مرگ یا حذف گاوهای مبتلا، کاهش تولید شیر، کاهش ارزش لاشه و غیره می‌باشند. ولی ضررهای اقتصادی غیرمستقیم که از عدم فروش گاوهای آلوده ناشی می‌شوند، اهمیت بیشتری دارند. کشورهای خارجی واردات گاوهای مثبت را محدود کرده‌اند و این ممنوعیت شامل اسپرم و جنین این گاوها هم می‌باشد، حتی دیده شده که بعضی از کشورها از ورود گاوهای منفی و جنین و اسپرم گاوهای منفی هم، صرفًا به این خاطر که گاوهای مذکور متعلق به گله‌هایی که درگیر با بیماری لکوز هستند خودداری می‌کنند(۱،۶). تلاش‌های زیادی برای دسترسی به یک درمان موفقیت‌آمیز انجام شده است که همگی با شکست روبرو شده‌اند. برای مقابله با این بیماری بایستی تمام سعی و تلاش بر روی کنترل و پیشگیری بیماری صورت گیرد. اکثر این موارد به نحوی در کشورهایی که بیماری در آن‌ها حضور فعال دارد گزارش شده و مورد توجه قرار گرفته‌اند(۶).

با توجه به این‌که بیماری در اکثر کشورها از جمله کشور ما وارداتی می‌باشد و در کشور ما در چند دهه اخیر به منظور اصلاح نژاد از کشورهای دیگر گاو خریداری و یا اسپرم وارد شده است که باعث آلوده شدن گاوها به این ویروس شده است. برهمین اساس انجام مطالعات وسیع به منظور تعیین وضعیت آلودگی به این ویروس را در سطح کشور می‌طلبد. این مطالعه در گاوداری‌های اطراف شهر مشهد صورت گرفته تا میزان آلودگی گاوها را به ویروس لکوز گاو عامل ایجاد کننده لکوز مشخص نماید.

مواد و روش کار

برای انجام این تحقیق خونگیری از ۱۷۵ رأس گاو ماده شیری هلشتاین از گاوداری‌های صنعتی اطراف مشهد انجام گرفت. گاوهای مورد آزماش بین ۲ تا ۷ سال سن داشتند خون مورد نیاز با خونگیری از رگ زیر دم حیوان و به میزان ۵-۱۰ میلی لیتر فراهم گردید. به منظور جلوگیری از انعقاد خون، ماده ضد انعقاد EDTA مورد استفاده قرار گرفت. خون‌ها تا زمان انجام آزمایشات، در فریزر و در دمای (۲۰-) درجه سانتیگراد نگهداری شدند. جهت استخراج DNA از روش تیوسیانات گوانیدین- سیلیکاژل استفاده شد. در روش مربوطه از تیوسیانات گوانیدین به عنوان عامل لیز کننده سلولی و از ذرات سیلیکون به عنوان جاذب DNA در مخلوط حاصل از لیز سلول‌ها استفاده می‌شود. در این آزمایش از کیت DIATOM DNA Prep محصول شرکت Biokom مسکو که مبتنی بر استفاده از روش Boom و همکاران (۱۹۸۹) که تغییراتی نیز توسط شیخایف (۱۹۹۵) در آن داده شده، جهت استخراج DNA از نمونه‌های خون استفاده شد(۳۲و۱۲). پس از استخراج DNA از نمونه خون تام در گاوهای هلشتاین، جهت تشخیص BLV در گاوهای مبتلا، واکنش PCR جهت تکثیر قطعه (bp) ۳۷۴ جفت باز از ژن BLV صورت پذیرفت (۳۰). توالی آغازگرهای gag1 و gag2 مورد استفاده برای این آزمایش بصورت زیر است:

1:5'GGAGGTGGGAAGATGCGAACTATT 3'



شکل۱ـ تکثیر قطعه ۳۴۷ جفت بازی ژن BLV در نمونه ها آلوده.

gag

2:5' GTCCGCTCTACCAACCCTGAACTT 3'

gag

واکنش PCR جهت تشخیص BLV در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل یک واحد تک پلیمراز، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۲۰۰ میکرومول Mgcl2، ۱۰ تا ۲۰ پیکامول مخلوط پرایمرها، ۰/۸ میکرولیتر DNA با غلظت ۵۰ تا ۸۰ نانوگرم انجام شد(۳۲). برای تشخیص محصولات PCR از ژل آگارز استفاده شد. با قرار دادن چند میکرولیتر از نمونه محصول PCR برروی ژل آگارز ۱/۴ درصد و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید در زیر لامپ UV، قطعه تکثیر شده به صورت یک باند مجزا رویت شد.

نتایج

با استفاده از روش گوانیدین سیلیکاژل مقدار زیادی DNAی ژنومی (حدود ۵۰ u/µl) با طول حدود ۵۰ تا ۶۰ هزار جفت باز حاصل شد که با روش اسپکتروفتومتر ارزیابی گردید.

نتیجهٔ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در شکل ۱ نشان داده شده است. همان طور که مورد انتظار بود یک قطعه دارای ۳۴۷ جفت باز برای دام‌های بیمار تکثیر شده است که برای تشخیص از اندازه مارکر ۱۰۰ جفت بازی استفاده شده است (شکل ۱).

از مجموع ۱۷۵ گاوی که مورد بررسی قرار گرفتند، قطعه (bp) ۳۷۴ برای ۴۸ نمونه تشکل شد. (جدول ۱). نه تنها در زمان نمونه گیری گاوهای مبتلا به شکل بالینی بیماری مشاهده نگردیدند بلکه دامداران اطلاعات مشخصی از سابقه وجود اشکال بالینی بیماری ارائه ندادند. در تمام دامداری‌های تحت مطالعه واکسیناسیون تحت نظارت شبکه دامپزشکی صورت می‌گرفت.

بحث و نتیجه‌گیری

به علت پنهان بودن چهره ی بالینی این بیماری در اکثر موارد و عدم بروز علایم بالینی قابل توجه در بررسی‌های بالینی سطحی و نیز پیچیدگی تشخیص آزمایشگاهی، این بیماری گسترش نسبتاً وسیعی در سیستم‌های صنعتی پرورش گاو در اکثر کشورهای جهان دارد(۷و۱). انتقال BLV از طریق لمفوسیت‌های آلوده صورت می‌گیرد و تبادل مواد بیولوژیک حاوی این‌گونه لمفوسیت‌ها مانند خون، شیر و توده‌های توموری به تماس فیزیکی نزدیک و طولانی مدت نیاز دارد، بدیهی است که این شرایط در گله‌هایی که از تراکم بالا برخودارند و دام‌های با سنین مختلف به صورت مخلوط نگهداری می‌شوند بسیار بهتر فراهم می‌شود. (۲۲و۱۹،۱۶،۱۴،۱۲،۱). این بیماری در بعضی از کشورها مانند ایران به عنوان یک بیماری وارداتی مطرح است که از طریق وارد نمودن گاو یا اسپرم و جنین آلوده به کشور وارد شده است (۳،۲۹). اولین گزارش در مورد این بیماری در سال (۱۳۴۴) توسط بخش پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتشر شد ولی اولین تحقیق در مورد میزان شیوع این بیماری توسط حدادزاده در سال (۱۳۶۴) صورت گرفت. حدادزاده با استفاده از ۴۷۹۷ نمونه جمع آوری شده از گاوداری های صنعتی و نیمه صنعتی نشان دادند که ۹/۸۱ درصد از لحاظ BLV مثبت بوده اند و به منظور تحقیق در صحت نظریه وارداتی بودن بیماری در کشور اقدام به نمونه گیری از ۲۰۰ رأس گاو بومی در دو نوبت به فاصله یک سال از هم نمودند و هیچ اثری از پادتن ضد ویروس لکوزآنزئوتیک گاوان در آن‌ها یافت نشد که دال بر تأیید نظریه وارداتی بودن بیماری در کشور بود(۳). در بررسی قائم مقامی و همکاران (۱۳۸۷) نیز ۶۴۳ رأس گاو از نژادهای اصیل، دو رگ و بومی ۳ درصد از لحاظ BLV مثبت بودند و ۸۴/۴۲ درصد نمونه‌های مثبت متعلق به دام‌های اصیل و کمترین میزان (۵/۳۴ درصد) مربوط به گاوهای بومی بود که تأیید نظریه وارداتی بودن بیماری در کشور را به دنبال داشت(۵). در بررسی ممتاز و همت‌زاده (۱۳۸۲) از مجموع ۳۶۸ راس گاو تحت بررسی در استان چهار محال بختیاری ۵/۷۰ درصد دارای BLV بودند(۸). در مورد میزان وقوع آلودگی در کشورهای مختلف، گزارشات حاکی از آن است که میزان آن در داخل گله‌های مختلف و در بین کشورهای مختلف متفاوت می‌باشد به طوری که میزان آلودگی در داخل گله‌ها در آمریکا بین (۱۰۰- ۰ درصد)

جدول ۱ ـ فراوانی گاوهای آلودگی به ویروس لکوز در تحقیق حاضر.

	فراوانی مطلق	فراوانی نسبی
BLV+	۴۸	۲۷/۴
BLV-	۱۲۷	۷۲/۶
کل	۱۷۵	۱۰۰

می باشد یعنی بعضی از گله ها ممکن است آلوده نباشند و بعضی حتی آلودگی آن ها به ۱۰۰ درصد برسد ولی آلودگی در جمعیت گاوهای آمریکا حداقل ۲۰ درصد، کانادا (۱۱-۶ درصد)، فرانسه(۲۷ درصد)، ونزوئلا(۳۷ درصد)، ترکیه(۱۱درصد)، تانزانیا (۳۶ درصد) و اوگاندا (۱۷ درصد) گزارش شد (۲۸و۲۱،۱۰،۱). البته در برخی نقاط دنیا از جمله بعضی از کشورهای اروپای غربی بیماری ریشه کن شده است یا میزان شیوع آن بسیار پایین بوده و به ندرت به بالای ۱/۵ درصد می رسد (۲۶و۲۴،۹). به طور مثال در لهستان در ۲۰ سال اخیر میزان شیوع از (۲۷ درصد) به (۲ درصد) کاهش یافته است(۲۸).

حدادزاده نشان داد که بین آلودگی به ویروس لکوز آنزئوتیک گاو در گله آلوده و فاکتورهایی نظیر سن، تعداد زایمان و میزان تولید شیر در گله های آلوده ارتباط معنی دار بوده به طوری که بیشترین درصد آلودگی در گاوهای چهارشکم زاییده و بالاتر از ۶ سال و یا میزان تولید شیر کمتر یا مساوی ۲۰ کیلوگرم دیده شد (۳). در مطالعه ممتاز و همت زاده(۱۳۸۲) کمترین میزان آلودگی در سه گروه سنی ۱،۲ و ۳ سال با صفر درصد و بیشترین مقدار در گروه گاوهای ۷ سال و بالاتر با (۱۷/۱۸ درصد) آلودگی تعیین شد(۸).

در مطالعه برنرو همکاران(۲۰۰۰) در فلسطین اشغالی در فاصله بین (۱۹۸۵) تا(۲۰۰۱- ۱۹۹۹)، میزان فراوانی آلودگی از (۸۰/۶) به (۵/۵ درصد) کاهش یافت و برخی از گله ها به طور کلی عاری از آلودگی شدند. در این فاصله زمانی تلاش شده است تا به منظور کنترل آلودگی برخی از عوامل که در کاهش آلودگی حائز اهمیت هستند مانند تعویض سر سوزن ها، تغییر در روش های شاخ بری و تعویض دستکش ها در بین هر توش رکتال مورد توجه قرار گیرد(۱۳).

میزان فراوانی آلودگی در نژادهای مختلف گاو ممکن است متفاوت باشد در مطالعه باتماز و همکاران (۱۹۹۵) در ترکیه آلودگی در گاوهای هلشتاین، براون سوئیس و بومی به ترتیب ۱۰/۳، ۹/۴ و ۲ درصد بوده است(۱۱).

برخی از محققان، بالا بودن میزان شیوع بیماری را در

جدول ۲ ـ فراوانی گاوهای آلوده به ویروس لکوز برحسب سن.

سن (سال)	فراوانی	درصد
۳	۲	۴/۱
۴	۵	۱۰/۴۱
۵	۱۱	۲۲/۹۱
۶	۱۵	۳۱/۲۵
۷	۱۵	۳۱/۲۵

بررسی های خویش، با دلایلی همچون سیستم یا مدیریت پرورش متراکم و بسته گاوها و در نتیجه تماس های فیزیکی بسیار نزدیک ناشی از آن، واردات گاوو اسپرم از کشورهایی مثل آمریکا، آلمان، استرالیا، کانادا، هلند که لوکوز در آن ها شایع بوده و عدم رعایت نکات بهداشتی مرتبط دانسته اند (۲۹و۱۱،۵). میزان آلودگی به ویروس لکوز در گاوهای اصیل نژاد هلشتاین بالاتر از سایر نژادهای بومی و دورگ در کشور گزارش شده است(۸و۶).

در مطالعه قائم مقامی و همکاران (۱۳۸۷) در دامداری های صنعتی نسبت به سایر دامداری ها آلودگی بیشتر بوده است(۵). در بررسی حاضر دام های آلوده همه از نوع دامداری های صنعتی بودند. هر چند که نوع مدیریت در انتشار آلودگی نقش به سزایی دارد(۳۱و۱۱)، ولی آنچه که حائز اهمیت است حضور ویروس می باشد که در صورت موجود بودن و فراهم بودن شرایط انتقال، از گاوی به گاو دیگر انتقال می یابد. عامل بعدی تعداد دام های موجود در گله می باشد که هر چه بیشتر باشد و در صورت حضور ویروس فراوانی آلودگی بیشتر خواهد بود(۲۶).

بررسی های حاصل از این تحقیق نشان داد که سه واحد گاوداری مورد مطالعه از اسپرم های وارداتی استفاده می کنند یا قبلاً استفاده کرده بودند واین امر می تواند احتمال وارداتی بودن این بیماری را افزایش دهد. در نهایت پیشنهاد می گردد با بررسی جامع تر در سطح استان خراسان و همچنین در سطح کشور امکان جلوگیری از انتشار بیشتر بیماری و پاک شد گاوداری ها از بیماری فراهم شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت های مالی باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر برای انجام این پژوهش قدردانی می شود. بعلاوه نگارندگان برخود لازم می دانند از زحمات و مساعدت های آقای دکتر توکل افشاری معاون محترم

دانشگاه علوم پزشکی مشهد و همچنین پرسنل محترم بخش ایمنوژنتیک پژوهشکده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد برای همکاری در انجام این تحقیق صمیمانه تشکر نمایند.

منابع

۱. پور جعفر، م. (۱۳۶۸) مطالعه سرولوژی عفونت با ویروس لوسمی گاو در گاوهای شیری و جستجوی آنتی بادی ضد آن در کارکنان گاوداری های منطقه شهرکرد. مجله دامپزشکی ایران، دوره سوم، شماره ۴، صفحه: ۱۲-۵.

۲. حاجی حاجیکلایی، م.(۱۳۸۵) مطالعه سرولوژیکی آلودگی به ویروس لکوز (BLV) در گاوهای اهواز. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۷۱، صفحه: ۳۰-۲۶.

۳. حدادزاده، ح.(۱۳۶۵) بررسی میزان آلودگی به ویروس لکوز آنزئوتیک گاو در گاوداری‌های اطراف تهران. پایان نامه دوره دکترای عمومی دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۱۵۸۷.

۴. طلوعی، م.(۱۳۸۸) بررسی کشتارگاهی میزان شیوع آلودگی به ویروس لکوز آنزئوتیک گاو اختلالات بالینی، هماتولوژیک و فلوسایتومترک همراه در گاوهای هلشتاین در تهران. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دوره۶۴، شماره ۲، صفحه: ۱۵۶-۱۴۷.

۵. قائم مقامی، ش. اولیایی، م. نیرومند، ح. فیروزی، م. و بخشش، م.(۱۳۷۸) مطالعه سرولوژیک لکوز آنزوئوتیک گاو در استان مرکزی. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره(۱)۵۴، صفحه: ۱۳-۱۱.

۶. کارگر، ر. اهورایی، پ. قابوسی، ب. خدمتی، ک. عزی، ع. پورزاهدی، ر. سرمست ر.(۱۳۷۵) بررسی سرواپیدمیولوژی بیماری لکوز آنزیوتیک گاوان(EBL) در ایران. پژوهش و سازندگی، شماره ۳۰، صفحه: ۱۶۴-۱۶۶.

۷. کیوان فر، ه. همت زاده، ف. محمودیان، ع.(۱۳۸۰) ویروس شناسی دامپزشکی(بیولوژی ویروس‌ها)، تألیف فنر، گیبس، مورفی، روت، استادرت و وایت، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه: ۲۳۸-۲۲۴.

۸. ممتاز، ح. همت زاده، ف.(۱۳۸۲) بررسی سرولوژیک آلودگی با ویروس لکوز گاوها(BLV) در گاوداری‌های استان چهارمحال و بختیاری. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دوره چهارم، شماره اول، صفحه: ۴۴-۳۷.

9. Andrews, A.H., Blowy, W., Boyd, H., Eddy, R.G. (2003) Bovine medicine. (2th ed.) *Blackwell Sci.Ltd. Oxford*, pp: 693-700.
10. Azuba, R.B., Zieger, U. and Schmidt, F.W. (1994) A prevalence study of bovine leukemia virus infection in slaughtered cattle in selected areas in Uganda, *Bulletin Animal Production African*, **42**:13-17.
11. Batmaz, H., Carli, K.T., Kahraman, M., Kennerman, E. (1995) Serological and hematological diagnosis of enzootic bovine leucosis in cattle in Turkey. *Veterinary Record*, **36**: 42-44.
12. Boom R., C. J. A. SOL, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-Van Dillen, and J. Van Der Moordea. (1989) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, **28(3)**: 495-503.
13. Brenner, J., Meirom, R., Avraham, R., Trainin, Z.(2000) Bovine leukemia virus seroprevalence in large Israeli dairy herds. *Israeli Journal of Veterinary Medicine*, **57(2)**: 107-113.
14. Digiacomo R.F. (1992) Horizontal transmission of the bovine leukemia virus. *Veterinary Medicine*, **87**: 263-271.
15. Feldman, B.V., ZinkI, J.G., Jain, N.C. (2000) Schalm,s *Veterinary Hematology. 5th ed. Philadelhia, USA*:614-619.
16. Gottschau, A., Willeberg, P., Franti,CE. and Flensburg, JC. (1990) The effect of a control program for enzootic bovine leukosis changes in herd prevalence in Denmark 1969-1978; *American Journal of Epidemiology, Abst*, **131(2)**:356-364.
17. Heuvel, M.V., Portetella, D., Jefferson, B., Jacobs, R.M. (2003) Adaptation of a sandwich enzymelinked immunosorbent assay to determine the concentration of bovine leukemia virus P24 and optimal conditionds for P24 expression in short term cultures of peripheral blood mononuclear cells. *J. Virol. Method*. **111**: 61-67.
18. Howard, J.L. and Smith, RA. (1999) Current veterinary therapy food animal practice. 4th ed. Philadelphia,USA:296-299.
19. Howard, J.L. (1986) Current veterinary therapy.

Animal practice, W.B.Saunders, Philadelphia. USA. pp. 640-649.

20. Islas, LA., Lopez, M.J. and Aguilar, M.F. (1992) Diagnosis of enzootic bovine leucosis by agar gel immunodiffusion and ELISA. *Agro Ciencia. Abst*, **20(1):** 27-31.
21. Itoh, H., Ogasawara, N. (1990) An attempt to eradicate bovine leukemia virus infection in a public pasture. *Japanese Journal of veterinary Science*, **52**: 661-663.
22. Jacobson, KL .,Kaneene, JB., Miller, JM. And Bull, RW. 1985;Comparison of the commercial agar-gel immunodiffusion test and redioimmunoprecipitation assy for detection of antibodies to bovine leukemia Virus. American *Journal of Veterinary Research*, **46(7)**:1430-1433.
23. Jean Stephane G. and Isablle C. (2002) Bovine leukemia virus SU protein interacts with Zinc, and mutations within two interacting regions differently affect viral fusion and infectivity in vivo. *Journal of Virology*, **76(16)**: 7956-7967.
24. Johnson, R., Kaneene, J.B. (1992) Bovine leukemia virus and Enzootic bovine leukosis.*Vet. Bull*. **62**: 287.
25. Pelzer K.D. and Sprecher D.J. (1993) Controlling BLV infection on dairy operations.*Veterinary Medicine, Food Animal Practice*, **88**: 275-281.
26. Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood D. C., Hinchcliff, K.W. (2000) Veterinary Medicine. 9th ed. *Soundrrs company, London*, pp: 1046-1058.
27. Reginald, J. (1999). Bovine Leukemia Virus. Current Veterinary therapy (Food Animal Practice). 4th ed. *Sounders Company*, pp: 296-299.
28. Salwa, A., Arent, Z., Kamionowska, E., Barancewicz, M. (2002) Epidemiology of Bovine leukemia virus in the Gdansk region in 1983-2001. *Vet. Bull*. **72**: 15-26.
29. Schoepf, K.C., Kapaga, A.M., Msami, H.M., Hyera, J.M.K. (1997) Serological evidence of the occurrence of Enzootic bovine leucosis virus infection in cattle in Tanzania. *Trop. Anim. Hlth. Prod*, **29**: 15-19.
30. Shaikhayev, G. O., Myakishev, M. V., Kapanadze, G. I., Georgivev, G. P. and Beritashvili, D. R. (1995) Extraction of DNA from the whole blood by silica gel. *Institute of gene biology, Moscow, Russia*.
31. Uysal, A., Yilmaz., H., Bilal, T., Berriatua, E., Bakirel, U., Arslan, M.,Zerin, M. and Tan, H.(1998) Seroprevalenc of enzootic bovine leukosis in Trakya district (Marmara region) in Turkey. *Preventive Veterinary Medicine*.**37**:121-128.
32. Zanotti, M., Poli, G., Ponti, W., Polli, M., Rocchi, M., Bolzani, E., Longeri, M., Russo, S., Lewin, H. A. and Van Eijk, M. J. (1996) Association of BoLA classII ?haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia viruse infection in holstein-friesian cattle. *J. Animal Genetics*. **27**: 337-341.