

Detection frequency of BLV Tax gene in human blood and breast tissue samples using Nested-PCR

Sina Dabaghi¹, Masoumeh Hajirezaei^{1✉}

¹Department of Microbiology, Islamic Azad University, Kerman, Iran

Abstract

Introduction: Many viruses have been associated with human cancers, and approximately 12% of cancers are believed to have a viral cause. One of the newest of these viruses is the bovine leukemia virus (BLV), which was first reported in 2007 in women with breast cancer. Several studies have been conducted on paraffin-embedded breast tissue samples, and a smaller number on blood samples from women, to detect this virus. This study aims to describe the frequency of the Tax gene of the BLV virus in blood samples and paraffin-embedded human breast tissue using the nested-PCR method.

Methods: In this study, which was conducted in 2022, the presence of bovine leukemia virus based on the Tax gene was investigated in 100 random paraffin-embedded breast tissue samples (50 patient samples and 50 healthy samples) and 120 random blood samples (60 patient samples and 60 healthy samples) using nested polymerase chain reaction. Data analysis was performed using SPSS version 26 software and Fisher's exact test.

Results: In the present study, the frequency of this virus in paraffin-embedded breast tissue samples was 1 case (1%), and in blood samples from female subjects, 18 cases (15%).

Conclusion: Despite the apparent frequency difference between blood samples and paraffin-embedded tissue, it was statistically close to the significant level ($P=0.057$). And since blood sampling is a more non-invasive method and the incidence of breast cancer in Iran is very high, these results can be used as an introduction to conducting larger, longitudinal studies to design molecular screening systems for at-risk groups.

Keywords: Bovine leukemia virus, Breast cancer, Nested-PCR, Tax gene, Blood sample

Received: 2025/09/18
Accepted: 2026/02/21

*Corresponding Author:
ma.hajirezaei@gmail.com

Ethics Approval:
[IR.IAU.KERMAN.REC.1400.015](https://ir.iau.kerman.rec.1400.015)



Introduction

Bovine Leukemia Virus (BLV), an oncogenic delta-retrovirus, primarily targets B-lymphocytes and facilitates malignant transformation(1,2). Given its global prevalence in dairy cattle and the detection of genetically similar strains in human tissues, recent epidemiological studies suggest a potential zoonotic transmission path via contaminated meat and dairy products, linking BLV to the etiology of human breast cancer(3). While structural genes like Gag (4) are commonly studied, delta retroviruses have an additional region called Tax (transcriptional activation region of gene X), which has regulatory activities and predisposes host cells to oncogenic transformation. Tax causes malignant transformation of the host cell by inhibiting DNA repair and disrupting cell growth control mechanisms. The gene is highly oncogenic due to its direct role in inducing cellular instability (2). Fewer studies have been conducted on the relationship between bovine leukemia virus and human blood samples than on tissue. Consequently, this study aims to determine the frequency and distribution of the BLV Tax gene in paraffin-embedded breast tissues and blood samples from both breast cancer patients and healthy controls. By addressing this clinical gap, the research aims to provide foundational data to develop high-sensitivity screening strategies and early diagnostic tools for breast cancer prevention.

Materials & Methods

This study analyzed 100 random paraffin-embedded breast tissue samples and 120 random extracted blood DNA samples (comprising both breast cancer patients and healthy controls, aged 18–80) collected from Bahonar and Afzalipor medical centers in Kerman, Iran. Genomic DNA was isolated using a specialized extraction kit, and its concentration and purity were verified via NanoDrop spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. To detect the BLV Tax gene, the Nested-PCR technique was employed due to its high sensitivity and specificity. Primers were designed and thermodynamically optimized using Gene Runner (v6.5.52) and OligoAnalyzer, with the human GAPDH gene serving as an internal housekeeping control. To ensure experimental reliability and eliminate false positives, positive controls (BLV-infected bovine DNA) and negative controls (Nuclease-Free Water and confirmed BLV-negative human/bovine samples) were included in each run. Statistical analysis was performed using SPSS software, utilizing Fisher's exact test to determine the significance of the results (p-value). This research was conducted in strict accordance with ethical guidelines under code IR.IAU.KERMAN.REC.1400.015. Sequence of primers, materials, and volumes as well as temperature and time schedules mentioned in tables 1,2 and 3, respectively.

Table 1: Sequence of primers used

Number	Template name	Sequence(5`-3`)	Temperature	Mer	Product size
1	Outer Forward Tax	AAGGATCGACACCACGCTCAC	61/78	21	732bp
2	Outer Reverse Tax	CTAGCAACCAATTCGGACCAGG	62/12	22	
3	Inner Forward Tax	CGACGACTCTGGATCAACTGCC	63/98	22	544bp
4	Inner Reverse Tax	GGCTGGACCATACGTGTAACCG	63/98	22	
5	Forward GAPDH	GCTCGGTGCCTTTAGTGATGG	61/78	21	255bp
6	Reverse GAPDH	CGATCCTGAGACTTCCACACTG	62/12	22	

Table 2: Materials and volumes used for the outer and inner reactions of the nested polymerase chain reaction, as well as the polymerase chain reaction

Volume in the external reaction and polymerase chain reaction	volume in the external reaction and polymerase chain reaction	Volume in the internal reaction
Mater mix	12/5 μ l	12/5 μ l
Primer Forward	1 μ l	1 μ l
Primer Reverse	1 μ l	1 μ l
DNase & RNase-free water	9 μ l	10 μ l
DNA Template	1/5 μ l	-
External reaction PCR product	-	0/5 μ l
Total Volume	25 μ l	25 μ l

Table 3: temperature and time schedules in nested PCR and human gene PCR

Gene	-	Initial denaturation	Subsequent denaturation	Annealing	Extension	Final extension
Tax	Outer	95°C 3 min 1X	95°C 1min 35X	61/7°C 1min 35X	72°C 1min 35X	72°C 5min 1X
	Inner	95°C 3min 1X	95°C 1min 30X	62°C 1min 30X	72°C 50sec 30X	72°C 5min 1X
GAPDH	-	94°C 8min 1X	94°C 1min 35X	64°C 1min 35X	72°C 1min 35X	72°C 7min 1X

Results

The quality and quantity of extracted DNA were validated via NanoDrop and agarose gel electrophoresis, with selected samples exhibiting an A_{260}/A_{280} absorbance ratio.

between 1.8 and 2.0. Following Nested-PCR amplification, the presence of the BLV Tax gene was identified by the detection of a 544 bp band on a 1.5% agarose gel (Figure 1).

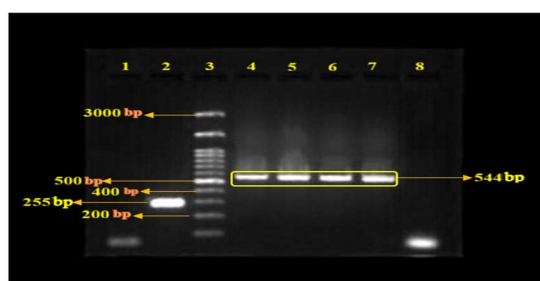


Figure 1: Tax gene amplification in some samples. Column 1: Negative control, Column 2: GAPDH gene (bp255), Column 3: 3kp ladder, Column 4: Positive control (544bp), Columns 5-7: Positive sample (544bp), Column 8: Negative control

Overall, the Tax gene was detected in 1% of paraffin-embedded breast tissue samples (1/100) and 15% of blood samples (18/120). While statistical analysis revealed no significant difference in Tax gene frequency between the breast cancer and control groups ($P = 0.057$)(Table 4), the results demonstrated that blood samples had significantly higher

performance than paraffin-embedded tissues in the detection efficacy of BLV in humans. The details of the frequency distribution in the patient and healthy (control) groups are presented in Table 5. This finding serves as a crucial methodological recommendation for future oncogenic virus surveillance studies.

Table 4: Statistical data between virus-infected and healthy samples

Sample type	Positive	Negative	Odds Ratio (95% CI)	P-value (Fisher's exact test)
Paraffin-embedded breast tissue (reference)	1(1%)	99(99%)	(Reference)1.00	-
Blood	18(15%)	102(85%)	(0.0436-0.0075) 0.057	0.057

Table 5: Distribution of healthy and infected bovine leukemia virus samples in paraffin-embedded breast tissue samples and blood samples

Sample type/sample status	sample Tax+	sample Tax-	Total	Total of each type of sample
Blood from people with breast cancer	7	53	60	18 (15%)
Blood of healthy people	11	49	60	
Paraffin-embedded tissue from people with breast cancer	1	49	50	1 (%1)
Paraffin tissue of healthy individuals	0	50	50	
Total	19	201	220	

Discussion

The association between oncogenic viruses—such as MMTV, HPV, and recently Bovine Leukemia Virus (BLV)—and human breast cancer has provided significant insights into the viral etiology of the disease. While global studies in the US (5), Brazil (6), and China (7) have predominantly identified the BLV Tax gene in breast tissues, our findings reveal a markedly higher detection frequency in blood samples (15%) than in paraffin-embedded (FFPE) tissues (1%). This discrepancy with previous literature may stem from variations in DNA extraction quality from FFPE blocks or the virus's tendency to remain latent in circulating blood cells before migrating to mammary tissues. Although the P-value for the comparison of the BLV Tax gene frequency in the case and control groups (especially in blood samples) was reported to be 0.057, indicating a statistical trend or trend towards a difference between the two groups, this difference was not interpreted as statistically significant based on the traditional significance threshold ($\alpha=0.05$). We acknowledge that the test's insufficient statistical power strongly influences this marginal P-value and the failure to achieve full significance. This power reduction is a direct result of the unbalanced distribution of positive cases, especially in tissue samples (only 1 positive case in 100), which prevents the detection of a real difference (if any). Therefore, within the framework of ($\alpha=0.05$), the interpretation of non-significance is considered a conservative approach. For a more accurate assessment and sufficient statistical power, future studies with larger sample sizes and that focus on blood samples (due to their higher frequency) are necessary to assess the significance of this tendency properly. This conclusion is not based on the statistical significance of the frequency difference, but rather on the 15-fold superiority in detection

efficiency in blood samples and its methodological and operational advantages for future large-scale screening.

One of the main limitations of this study was the restrictions imposed by the research ethics committee, which prohibited the researcher from accessing patients' personal or clinical information, including age, health status, disease stage, or tumor characteristics. Since the paraffin-embedded tissue samples were obtained from the pathology archives of public hospitals, it was not possible to contact the same patients to collect corresponding blood samples.

Consequently, the design of this study did not allow for paired or matched sampling from the same individual. However, the main aim of the present study was to determine a more suitable sample type for detecting the Tax gene of bovine leukemia virus (BLV) in future studies. Accordingly, simultaneous examination of the virus in tissue and blood samples from a patient was not necessary within the aims of this study.

Therefore, while acknowledging that the lack of homogeneity across groups in terms of age and demographic characteristics was one of the main limitations of the present descriptive study, it is emphasized that achieving complete homogeneity will require more robust analytical designs (such as case-control or cohort studies) in the future. The current results are presented solely to compare the sampling method's efficiency and determine the initial frequency.

Conclusion

The findings of this study showed that the Tax gene is more frequent in blood and breast tissue samples, although the difference was not statistically significant. Given the non-invasive nature of blood sampling, it is suggested that.

This type of sampling is used in larger epidemiological studies to detect BLV. Also, given the possibility that the virus genome may remain latent in the host and its potential role in long-term tumorigenesis, longitudinal studies are necessary to investigate the definitive association between this virus and breast cancer risk. These findings may serve as a basis for future, larger-scale, longitudinal studies aimed at developing molecular screening systems for at-risk populations.

References

1. Ciminale, V., Pavlakis, G. N., Derse, D. A. V. I. D., et al. (1992). Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: novel mRNAs and proteins produced by HTLV type I. *Journal of Virology*, 66(3), 1737-1745.
2. Schwartz, I., & Levy, D. (1994). Pathobiology of bovine leukemia virus. *Veterinary research*, 25(6), 521-536.
3. Corredor-Figueroa, A. P., Olaya-Galán, N. N., Velandia-Álvarez, S., Muñoz, et al. & Gutiérrez, M. F. (2021). Co-circulation of bovine leukemia virus haplotypes among humans, animals, and food products: new insights of its zoonotic potential. *International journal of environmental research and public health*, 18(9), 4883.
4. Dabaghi S, Hajirezaei M. Tracking of bovine leukemia virus in blood and breast paraffin tissue samples. *IJOGI*. 2023. 22732. 92-100 [Persian].
5. Baltzell KA, Shen HM, Krishnamurthy S, Sison JD, Nuovo GJ, Buehring GC. Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: Case-control study of women in Texas. *Cancer*. 1;124(7):1342-9.
6. Schwingel D, Andreolla AP, Erpen LM, Frandoloso R, Kreutz LC. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. *Scientific reports*. 27;9(1):2949.
7. Zhang R, Jiang J, Sun W, Zhang J, Huang K, Gu X, et al. Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients. *Breast Cancer Research*. 2016 Dec;18:1-2.

بررسی فراوانی ژن Tax و ویروس لوکمیای گاوی در نمونه‌های خون و بافت پستان انسان با استفاده از روش Nested-PCR

سینا دباغی^۱، معصومه حاجی رضایی^۱✉

^۱گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی کرمان، کرمان، ایران

چکیده

مقدمه: بسیاری از ویروس‌ها با سرطان‌های انسانی همراه بوده‌اند و اعتقاد بر این است که تقریباً ۱۲٪ سرطان‌ها دارای علت ویروسی هستند. یکی از جدیدترین این ویروس‌ها لوکمیای گاوی می‌باشد که برای اولین بار در سال ۲۰۰۷ حضور آن در زنان مبتلا به سرطان پستان گزارش شد. تحقیقات متعددی در نمونه‌های بافت پارافینه پستان و همچنین تعداد کمتری تحقیق در نمونه‌های خون افراد مونث به منظور ردیابی این ویروس صورت گرفته است. هدف از مطالعه حاضر، توصیف فراوانی ژن Tax و ویروس BLV در نمونه‌های خون و بافت پارافینه پستان انسان با استفاده از روش Nested-PCR می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه که در سال ۱۴۰۱ صورت گرفت به بررسی وجود ویروس لوکمیای گاوی براساس ژن Tax در ۱۰۰ نمونه تصادفی بافت پارافینه پستان (۵۰ نمونه بیمار و ۵۰ نمونه سالم) و ۱۲۰ نمونه تصادفی خون (۶۰ نمونه بیمار و ۶۰ نمونه سالم) با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای پرداخته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار spss نسخه ۲۶ و آزمون دقیق فیشر انجام شد.

یافته‌ها: در تحقیق حاضر فراوانی این ویروس در نمونه‌های بافت پارافینه پستان تنها ۱ مورد (۱٪) و در نمونه‌های خون افراد مونث ۱۸ مورد (۱۵٪) می‌باشد.

نتیجه گیری: در این مطالعه، شناسایی ژن Tax در نمونه‌های خون بیشتر از بافت پارافینه پستان مشاهده شد، اما این اختلاف از نظر آماری معنادار نبود. یافته‌ها توصیفی بوده و ضرورت انجام مطالعات آینده با حجم نمونه بالاتر را نشان می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: ویروس لوکمیای گاوی، سرطان پستان، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای، ژن Tax، بافت خون

تاریخ ارسال: ۱۴۰۴/۰۶/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۰۲

نویسنده مسئول:

ma.hajirezaei@gmail.com

مقدمه

ویروس لکوزگای (BLV)^۱ یک انکوویروس تیپ C و خارج سلولی است که در جنس دلتا رتروویروس‌ها از خانواده رتروویروس قرار دارد و توالی ژنومی آن به صورت کامل در گاو تعریف شده است (۱).

لنفوسیت‌های B از سلول‌های هدف اولیه ویروس لکوز گاو به شمار می‌رود، هر چند سلول‌های T نیز می‌توانند توسط این ویروس آلوده گردند. در واقع این ویروس باعث می‌شود که لنفوسیت‌های T در مورد سنتز اینترلوکین و یا پاسخ به اینترلوکین دچار نقص شوند. برخی پژوهش‌ها گزارش کرده‌اند که آلودگی به این ویروس می‌تواند با اختلال در عملکرد ایمنی همراه باشد.

ژنوم این ویروس و سایر دلتا ویروس‌ها تا حدی با دیگر رتروویروس‌ها متفاوت بوده و علاوه بر ژن‌های رمزگذار پروتئین‌های ساختاری، دارای ژن‌های مربوط به رمزگشایی پروتئین‌های تنظیمی نیز می‌باشند که در روند ایجاد تومور توسط این ویروس‌ها دخالت دارند (۱،۲).

این ویروس باعث لوسمی در گوشت و لبنیات گاو می‌شود. ویروس لوکمایی گاوی دارای مناطق ژنوم معمولی رترووایرال شامل LTR، Gag، Pol (پلیمراز، منطقه رونویسی معکوس، که یک کپی DNA از ژنوم RNA ویروس لوکمایی گاوی را تولید می‌کند) و Env است.

با این حال، برخلاف دیگر رتروویروس‌های آنکوژنیک، دلتا رتروویروس‌ها یک منطقه اضافی دارند به نام Tax (منطقه رونوشت فعال ژن x)، که دارای فعالیت‌های نظارتی است و سلول‌های میزبان را مستعد تغییرات آنکوژنیک می‌کند. Tax با مهار تعمیر DNA و اختلال در مکانیسم‌های کنترل رشد سلولی باعث تغییر بدخیم سلول میزبان می‌شود. لوسمی بالینی در کمتر از ۵٪ گاوهای آلوده توسعه می‌یابد با این حال، لنفوسیت‌های آلوده به ویروس لوکمایی گاوی در خون و شیر گاوهای آلوده تحت بالینی یافت می‌شوند (۳).

گله گاو آلوده به ویروس لوکمایی گاوی در سراسر جهان یافت می‌شوند. در ایالات متحده آمریکا، حدود ۳۸ درصد از گله‌های گوشت گاو، ۸۴ درصد از تمام گله‌های لبنی و ۱۰۰

درصد از گله‌های عملیات لبنیاتی در مقیاس بزرگ آلوده هستند (۴). ویروس لوسمی گاو و سلول‌های آلوده به این ویروس در کلستروم و شیر اغلب گاوهای آلوده وجود دارد (۱،۳).

برخی محققان احتمال انتقال ویروس از گاو به انسان را مطرح کرده‌اند، اما شواهد موجود هنوز قطعی نیست. همبستگی جغرافیایی قابل توجهی بین مرگ و میر ناشی از سرطان پستان و مصرف گوشت و شیر گاو وجود دارد. زور هاوسن^۲ د ویلیر^۳ ارتباط بین مصرف گوشت و شیر گاو و شیوع سرطان پستان را نشان داده‌اند (۵).

در مطالعه‌ای که در ایالت میناس گرایس برزیل، منطقه‌ای با الگوی مصرف سنتی شیر و فرآورده‌های لبنی خام، انجام شد، وجود ویروس لوکمایی گاوی (BLV) در ۹۵/۹٪ از بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با ۵۹٪ از افراد سالم (گروه کنترل) شناسایی شد (۶).

همچنین، بررسی ژنتیکی نشان داده است که بین گاو، انسان و محصولات غذایی، گونه‌های BLV با شباهت ژنتیکی وجود دارد که «مسیر انتقال بالقوه از حیوان به انسان از طریق مواد غذایی» را تقویت می‌کند (۷).

مطالعات نشان داده‌اند که BLV می‌تواند در سلول‌های اپی‌تلیال پستانی انسان ادغام شود و به شکل پایدار باقی بماند، مشابه آنچه در گاو رخ می‌دهد. این پایداری می‌تواند دهه‌ها طول بکشد تا به تغییرات سرطانی منجر شود (۸). امروزه مشخص شده است که علت سرطان پستان به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر عوامل محیطی قرار دارد. سرطان‌های مرتبط با ویروس به سرطان‌هایی گفته می‌شود که عفونت ویروسی منجر به تحول بدخیم سلول‌های آلوده می‌شود. ویروس‌های پاپیلوما ی انسانی (HPV)^۴، ویروس تومور پستان موش (MMTV)^۵ و ویروس اپشتین-بار (EBV)^۶ جز ویروس‌های اولیه منتخب به عنوان فاکتور سرطان پستان انسان هستند (۹). البته جدیداً بعضی از تحقیقات اپیدمیولوژیکی گزارش کردند که ویروس لوکمایی گاوی نیز در انسان بیماری‌زا است (۱۰).

وجود ویروس BLV در برخی بافت‌های انسانی در مطالعات اخیر، نشان‌دهنده پتانسیل خطر ابتلا به بیماری و

⁴ Human Papilloma Virus

⁵ Mouse Mammary Tumor Virus

⁶ Epstein-Barr Virus

¹ Bovine leukemia virus

² Zur Hausen

³ De Villier

پارافینه پستان تصادفی (۵۰ نمونه از افراد مبتلا به سرطان پستان و ۵۰ نمونه کنترل) و همچنین ۱۲۰ نمونه DNA استخراج شده خون تصادفی (۶۰ نمونه از افراد مبتلا به سرطان پستان و ۶۰ نمونه کنترل) استفاده شد. این پژوهش دارای کد اخلاق "IR.IAU.KERMAN.REC.1400.015" می‌باشد و براساس قوانین کمیته اخلاق صورت گرفته است. در این پژوهش از نمونه‌های بافت پارافینه پستان (۵۰ میلی گرم)، موجود در بانک بافت بیمارستان‌های افضل پور و باهنر شهر کرمان و همچنین از نمونه خون افراد مونث که دارای طیف سنی ۱۸ الی ۸۰ سال بودند و به صورت کاملاً تصادفی و بدون مشخص بودن درجه بیماری استفاده شد. جهت استخراج DNA از بافت پارافینه پستان، از کیت آزما اکسیر پژوه (Cat. No. AEPTDX-1003) استفاده گردید. سپس جهت بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز ژل آگارز و نانودراپ استفاده شد. جهت شناسایی وجود ژن Tax ویروس لوکمیای گاوی در نمونه‌های بافت پارافینه پستان و خون، توالی پرایمرها توسط برنامه Gene Runner نسخه ۶.۵.۵۲ طراحی و از لحاظ ترمودینامیکی در نرم‌افزارهای Gene Runner و Oligo analyzer بررسی شدند. به منظور تأیید DNA استخراج شده از نمونه‌های انسانی از پرایمرهای اختصاصی ژن GAPDH انسانی موجود در مقالات که یک ژن خانه‌دار می‌باشد استفاده شد (۱۲). پرایمرها جهت سنتز به شرکت سیناکلون فرستاده شدند. اطلاعات مربوط به پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

قابلیت تکثیر این ویروس در بدن انسان است (۱۱). با وجود آنکه ژن‌های ساختاری (مانند Gag) در برخی پژوهش‌های داخلی به عنوان شاخص حضور ویروس بررسی شده‌اند، اما ژن Tax به دلیل ماهیت کاملاً متفاوت خود، دارای اهمیت انکوژنیک بالاتری است. Tax برخلاف ژن‌های ساختاری Gag و Env که صرفاً مسئول ایجاد ساختار ویروس هستند، یک ژن تنظیمی و کاملاً غیرساختاری است. این ژن مسئول اصلی فعالیت‌های انکوژنیک ویروس است، زیرا با مهار ترمیم DNA و اختلال در مکانیسم‌های کنترل رشد سلولی، مستقیماً سلول میزبان را مستعد تغییرات بدخیم می‌کند (۸، ۳). علی‌رغم اهمیت این ژن در ایجاد لوسمی در گاو و پتانسیل بیماری‌زایی آن در انسان، در پژوهش‌های داخلی کمتر به توصیف فراوانی آن در نمونه‌های بافت پارافینه پستان و خون پرداخته شده است. بنابراین، هدف از این پژوهش، تعیین فراوانی و توزیع ژن Tax ویروس BLV در نمونه‌های بافت پارافینه پستان و خون بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم است تا با پر کردن این خلأ علمی، اطلاعات پایه ارزشمندی را برای توسعه روش‌های تشخیص زودهنگام و حساس‌تر و طراحی استراتژی‌های غربالگری سریع‌تر برای شناسایی افراد آلوده و پیشگیری از پیشرفت سرطان پستان ارائه دهد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، جهت بررسی وجود ویروس لوسمی گاوی در نمونه‌های انسانی در استان کرمان از ۱۰۰ نمونه بافت

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

Table 1 : Sequence of primers used

Number	Template name	Sequence(5'-3')	Temperature	Mer	Product size
1	Outer Forward Tax	AAGGATCGACACCACGCTCAC	61/78	21	732bp
2	Outer Reverse Tax	CTAGCAACCAATTCGGACCAGG	62/12	22	
3	Inner Forward Tax	CGACGACTCTGGATCAACTGCC	63/98	22	544bp
4	Inner Reverse Tax	GGCTGGACCATACGTGTAACCG	63/98	22	
5	Forward GAPDH	GCTCGGTGCCTTTAGTGATGG	61/78	21	255bp
6	Reverse GAPDH	CGATCCTGAGACTTCCCACTG	62/12	22	

کنترل‌های منفی شامل آب مولکولی عاری از نوکلئاز (NTC) و نمونه DNA انسانی (خون/بافت) که به طور قطعی فاقد ژن Tax بود، استفاده شد. همچنین، خون گاو فاقد ویروس BLV صرفاً به‌عنوان یک کنترل منفی اختصاصی گونه و برای رد واکنش‌های متقاطع احتمالی با گونه‌ی هدف در یک محیط کنترل شده، به کار گرفته شد. بررسی محصولات PCR، با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد. مواد و حجم مورد استفاده جهت واکنش‌های بیرونی و داخلی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای^۷ و همچنین واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۸ ژن انسانی در جدول ۲ نشان داده شده است.

از آنجا که تکنیک آزمایشگاهی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای (Nested-PCR) دارای دقت بالا، هزینه کمتر و سادگی اجرای بیشتر نسبت به سایر تکنیک‌ها است، برای این پژوهش انتخاب شد. در این روش آزمایشگاهی از دو جفت پرایمر بیرونی و درونی استفاده می‌شود و جفت دوم درون جفت اول جای می‌گیرد.

به عنوان نمونه کنترل مثبت برای ویروس لوکمیا گاو، DNA از خون گاو آلوده به این ویروس که از آزمایشگاه دانش بنیان تأمین آتیه سلامت البرز تهیه شده بود، استخراج شد. در هر مرحله از Nested-PCR، برای اطمینان از صحت نتایج و حذف نتایج مثبت کاذب، از

جدول ۲: مواد و حجم مورد استفاده جهت واکنش‌های بیرونی و داخلی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای و همچنین واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

Table 2: Materials and volumes used for the outer and inner reactions of the nested polymerase chain reaction as well as the polymerase chain reaction

Volume in the external reaction and polymerase chain reaction	volume in the external reaction and polymerase chain reaction	Volume in the internal reaction
Mater mix	12/5 µl	12/5 µl
Primer Forward	1 µl	1 µl
Primer Reverse	1 µl	1 µl
DNase & RNase-free water	9 µl	10 µl
DNA Template	1/5 µl	-
External reaction PCR product	-	0/5 µl
Total Volume	25 µl	25 µl

نرم‌افزار SPSS و آزمون دقیق فیشر انجام شد و p-value محاسبه گردید.

برنامه دمایی و زمانی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن انسانی مطابق جدول ۳ انجام شد. آنالیز آماری برای نتایج به دست آمده با استفاده از

جدول ۳: برنامه دمایی و زمانی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن انسانی

Table 3: temperature and time schedules in nested PCR and human gene PCR

Gene	-	Initial denaturation	Subsequent denaturation	Annealing	Extension	Final extension
Tax	Outer	95°C 3 min 1X	95°C 1min 35X	61/7°C 1min 35X	72°C 1min 35X	72°C 5min 1X
	Inner	95°C 3min 1X	95°C 1min 30X	62°C 1min 30X	72°C 50sec 30X	72°C 5min 1X
GAPDH	-	94°C 8min 1X	94°C 1min 35X	64°C 1min 35X	72°C 1min 35X	72°C 7min 1X

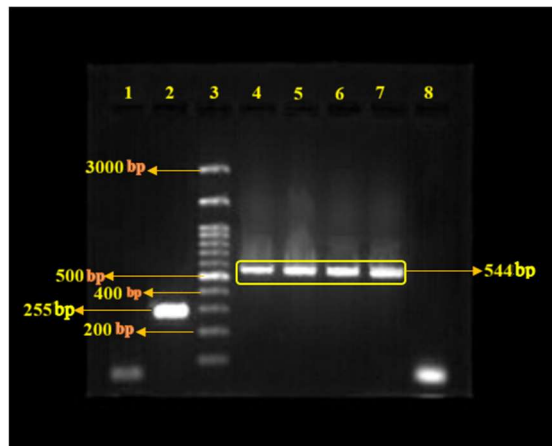
⁸ PCR

⁷ Nested-PCR

یافته‌ها

کیفیت و کمیت DNA های استخراج شده از بافت پارافینه پستان و خون توسط ژل آگارز و نانودراپ بررسی شد و نمونه‌های دارای باند مناسب و نسبت جذب نوری OD ۲۶۰ به OD ۲۸۰ در بازه ۱/۸ تا ۲ داشتند برای ادامه کار انتخاب شدند.

بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای برای نمونه‌های بافت پارافینه پستان و خون، محصولات بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ران شدند. نمونه‌هایی که باند ۵۴۴ bp برای ژن Tax داشتند به عنوان نمونه Tax+ (مثبت برای ژن Tax) شناخته شدند (شکل ۱).



شکل ۱: تکثیر ژن Tax در برخی از نمونه‌ها. ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: ژن GAPDH (۲۵۵bp)، ستون ۳: لدر ۳kb، ستون ۴: کنترل مثبت (۵۴۴bp)، ستون ۵-۷: نمونه مثبت (۵۴۴bp)، ستون ۸: کنترل منفی

Fig. 1: Tax gene amplification in some samples. Column 1: Negative control, Column 2: GAPDH gene (bp255), Column 3: 3kp ladder, Column 4: Positive control (544bp), Columns 5-7: Positive sample (544bp), Column 8: Negative control

لوکمیی گاو آلوده بودند. جزئیات توزیع فراوانی در گروه‌های بیمار و سالم (کنترل) در جدول ۴ ارائه شده است.

در مجموع، ۱ مورد از ۱۰۰ نمونه بافت پارافینه پستان (۱٪) و ۱۸ مورد از ۱۲۰ نمونه خون (۱۵٪) به ژن Tax ویروس

جدول ۴: توزیع نمونه‌های سالم و آلوده به ویروس لوکمیی گاو در نمونه‌های بافت پارافینه پستان و نمونه‌های خون

Table 4: Distribution of healthy and infected bovine leukemia virus samples in paraffin-embedded breast tissue samples and blood samples

Sample type/sample status	sample	sample	Total	Total of each type of sample
	Tax+	Tax-		
Blood from people with breast cancer	7	53	60	18 (15%)
Blood of healthy people	11	49	60	
Paraffin-embedded tissue from people with breast cancer	1	49	50	1 (%1)
Paraffin tissue of healthy individuals	0	50	50	
Total	19	201	220	

بافت پارافینه پستان در کارایی ردیابی این ویروس در انسان است. این یافته، می‌تواند به‌عنوان یک توصیه متدولوژیک در مطالعات آتی مورد توجه قرار گیرد.

مقایسه آماری نشان داد که تفاوت فراوانی ژن Tax بین نمونه‌های آلوده به ویروس و نمونه‌های سالم، معنادار نبود ($P=0/057$) (جدول ۵). با این وجود، این پژوهش نشان‌دهنده برتری قابل توجه نمونه‌های خون نسبت به

جدول ۵: داده‌های آماری بین نمونه‌های آلوده به ویروس و نمونه‌های سالم

Table 5: Statistical data between virus-infected and healthy samples

Sample type	Positive	Negative	Odds Ratio (95% CI)	P-value (Fisher's exact test)
Paraffin-embedded breast tissue (reference)	1(1%)	99(99%)	(Reference)1.00	—
Blood	18(15%)	102(85%)	(0.0436-0.0075) 0.057	0.057

بحث

مطالعه مسا^۲ و همکاران در سال ۲۰۱۳ در کلمبیا (۲۱)، تحقیق ژانگ^۳ و همکاران در چین و در سال ۲۰۱۶ (۲۳)، لاوسون و همکاران در سال ۲۰۱۷ در استرالیا (۲۰)، بالتزل و همکاران در سال ۲۰۱۸ و در آمریکا (۱۹)، شوینگل و همکاران در سال ۲۰۱۹ در جنوب برزیل (۲۲)، دلارملینا و همکاران در سال ۲۰۲۰ در برزیل (۲۸) و زنیب خان و همکاران در سال ۲۰۲۲ و در پاکستان (۲۴) اشاره کرد. در زمینه ارتباط ویروس لوکمیا گاو و نمونه خون انسان مطالعات کمتری نسبت به بافت انجام شده است که از آن جمله میتوان به تحقیق بوهرینگ و همکاران در سال ۲۰۰۳ اشاره کرد که در آن آنتی‌بادی‌های ایزوتایپ واکنش‌پذیر با BLV در ۷۴٪ از نمونه‌های خون (۱۹۱ نمونه مثبت از ۲۵۷ مورد) شناسایی شدند (۱۰). این محقق در سال ۲۰۱۹ با استفاده از روش‌های Sanger DNA و Liquid PCR و sequencing آلودگی به ویروس لوکمیا گاو در ۳۸٪ نمونه‌های خون انسان (۳۳ نمونه مثبت از ۹۵ نمونه) گزارش کرد. نتایج این تحقیق با اغلب مطالعات پیشین که از ژن Tax برای شناسایی ویروس BLV استفاده کرده‌اند (۱۱، ۱۸، ۲۶، ۲۷) مغایرت دارد. در تحقیقات مختلفی از جمله پژوهش‌های بوهرینگ و همکاران (۲۰۰۷، ۲۰۱۴، ۲۰۱۵، ۲۰۱۷)، مسا (۲۰۱۳)، کلمبیا، ژانگ (۲۰۱۶)، چین، لاوسون (۲۰۱۷)، استرالیا، بالتزل (۲۰۱۸)، آمریکا، شوینگل (۲۰۱۹)، برزیل و زنیب خان (۲۰۲۲)، پاکستان، حضور ژن Tax در بافت پستان بیماران مبتلا به سرطان پستان گزارش شده است. با این حال، در مطالعه حاضر، آلودگی به ویروس در نمونه‌های خونی به مراتب بیشتر از نمونه‌های بافتی مشاهده گردید که برخلاف تمرکز بیشتر مطالعات پیشین بر نمونه‌های بافتی است (۲۲، ۲۴، ۲۸). تفاوت در نتایج مطالعات می‌تواند ناشی از عوامل مختلفی از جمله تفاوت در روش نمونه‌گیری، کیفیت DNA استخراج‌شده از بافت‌های پارافینه، نوع پرایمرهای مورد

بسیاری از ویروس‌ها با بروز سرطان در انسان ارتباط دارند و برآورد می‌شود حدود ۱۲ درصد از کل سرطان‌ها منشأ ویروسی داشته باشند (۱۳). احتمال نقش ویروس‌ها در ایجاد سرطان پستان با کشف ویروس MMTV به عنوان عامل ایجادکننده سرطان پستان موش شروع شد (۱۴). نقش ویروس‌های دیگر از جمله ویروس پاپیلوما انسانی (HPV) (۱۵) و ویروس اپشتین-بار (EBV) (۱۶، ۱۷) هم در سرطان پستان کشف شده است. یکی از جدیدترین ویروس‌هایی که ارتباط آن با سرطان پستان مطرح شده، ویروس لوکمیا گاو (BLV) است (۱۸). مطالعات متعددی در کشورهای آمریکا (۱۹)، استرالیا (۲۰)، کلمبیا (۲۱)، برزیل (۲۲)، چین (۲۳) و پاکستان (۲۴) در رابطه با نقش این ویروس در ایجاد سرطان پستان انجام شد. در تمامی این مطالعات حضور این ویروس در بافت پستان گزارش گردیده است. در ایران نیز تنها در سال ۲۰۱۹ مطالعاتی توسط خلیلیان و همکاران در استان قم بروی ۳۷۲ نمونه خون و بافت پارافینه پستان انجام شد که وجود ژن‌های Tax و Gag این ویروس (بدون بررسی مقایسه‌ای میان نوع نمونه و ژن مؤثرتر برای مطالعات آینده) با روش Nested-PCR تأیید گردید (۱۲). همچنین در سال ۲۰۲۳ مطالعه‌ای توسط دباغی و همکاران به منظور ردیابی ژن Gag در نمونه‌های خون و بافت پارافینه پستان انجام شد که در آن نیز، نمونه خون به‌عنوان نمونه مناسب‌تر جهت ردیابی BLV پیشنهاد شد (۲۵). استفاده از ژن Tax جهت بررسی حضور ویروس لوکمیا گاو در مبتلایان به سرطان پستان در مقالات مختلف گزارش شده است. در گذشته مطالعات متعددی به منظور بررسی وجود ژن Tax در نمونه‌های بافت پارافینه پستان انجام گرفته است که از جمله آن‌ها می‌توان به تحقیق بوهرینگ^۱ و همکاران در سال‌های ۲۰۰۷ (۱۸)، ۲۰۱۴ (۱۱)، ۲۰۱۵ (۲۶)، ۲۰۱۷ (۲۷)،

³ Zhang¹ Buehring² Mesa

این نتیجه‌گیری بر پایه‌ی معناداری آماری اختلاف فراوانی نیست، بلکه بر اساس برتری ۱۵ برابری در کارایی ردیابی در نمونه خون و مزایای متدولوژیک و عملیاتی آن برای غربالگری‌های بزرگ مقیاس آتی استوار است.

یکی از محدودیت‌های اصلی این مطالعه، محدودیت‌های تعیین‌شده از سوی کمیته اخلاق پژوهش بود که بر اساس آن، پژوهشگر مجاز به دسترسی به اطلاعات شخصی یا بالینی بیماران، از جمله سن، وضعیت سلامت، مرحله بیماری یا ویژگی‌های تومور، نبود. از آنجا که نمونه‌های بافت پارافینه از آرشیو بخش پاتولوژی بیمارستان‌های دولتی تهیه شده بودند، امکان تماس با همان بیماران برای جمع‌آوری نمونه‌های خونی متناظر وجود نداشت.

در نتیجه، طراحی این پژوهش اجازه انجام نمونه‌گیری زوجی یا همسان از یک فرد را فراهم نمی‌کرد. با این حال، هدف اصلی تحقیق حاضر تعیین نوع نمونه مناسب‌تر برای ردیابی ژن Tax و ویروس لوکمیای گاوی (BLV) در مطالعات آتی بود. بر همین اساس، انجام بررسی هم‌زمان ویروس در نمونه‌های بافت و خون از یک بیمار، در چارچوب اهداف این مطالعه ضرورت نداشت.

لذا، با اذعان به اینکه عدم همسان‌سازی گروه‌ها از نظر سن و ویژگی‌های جمعیت‌شناختی یکی از محدودیت‌های اصلی پژوهش توصیفی حاضر بود، تأکید می‌شود که دستیابی به همسان‌سازی کامل نیازمند طراحی‌های تحلیلی قوی‌تر (مانند مطالعات موردشاهدی یا کوهورت) در آینده است و نتایج کنونی صرفاً به منظور مقایسه کارایی روش نمونه‌گیری و تعیین فراوانی اولیه ارائه شده‌اند.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که حضور ژن Tax در نمونه‌های خون و بافت پستان تفاوت فراوانی قابل توجهی دارد، هرچند این اختلاف از نظر آماری معنادار نبود. با توجه به غیرتهاجمی بودن نمونه‌گیری خون، پیشنهاد می‌شود در مطالعات اپیدمیولوژیک وسیع‌تر برای ردیابی ویروس BLV، از این نوع نمونه‌گیری استفاده شود. همچنین، با توجه به احتمال نهفتگی ژنوم ویروس در میزبان و نقش بالقوه آن در تومورزایی طولانی‌مدت، انجام مطالعات طولی (Longitudinal) برای بررسی ارتباط قطعی این ویروس با ریسک ابتلا به سرطان پستان در آینده ضرورت دارد. این نتایج می‌تواند به‌عنوان مقدمه‌ای برای انجام پژوهش‌هایی با

استفاده، شرایط اپیدمیولوژیک منطقه، و حتی ویژگی‌های ژنتیکی جمعیت مورد مطالعه باشد. از سوی دیگر، احتمال می‌رود ویروس BLV در سلول‌های خونی به حالت نهفته باقی بماند و از طریق جریان خون به سایر بافت‌ها از جمله بافت پستان منتقل شود، موضوعی که در برخی از مطالعات قبلی نیز مورد اشاره قرار گرفته است (۱۰، ۲۹).

همچنین با توجه به دامنه‌ی سنی شرکت‌کنندگان، احتمال نهفتگی ژنوم ویروس در DNA انسانی وجود دارد که می‌تواند خطر بروز سرطان پستان را در ۱۰ تا ۲۰ سال آینده افزایش دهد. با این حال، ارزیابی ارتباط آن با خطر بروز سرطان پستان نیازمند مطالعات آینده با طراحی تحلیلی و داده‌های طولی است.

در این پژوهش، نمونه‌ها از بیمارستان‌های دولتی شهید باهنر و افضل‌پورکرمان جمع‌آوری شدند که پذیرای بیماران از گروه‌های مختلف جمعیتی هستند. اگرچه برخی پژوهش‌ها به نقش احتمالی عوامل سبک زندگی، مانند مصرف فرآورده‌های لبنی خام، در انتقال ویروس اشاره کرده‌اند، داده‌های این مطالعه برای بررسی چنین ارتباطی کافی نیست و هرگونه استنباط در این باره نیازمند پژوهش‌های طراحی‌شده اختصاصی است.

گرچه مقدار P-Value برای مقایسه فراوانی ژن Tax و ویروس BLV در گروه‌های مورد و شاهد (به‌ویژه در نمونه‌های خون) برابر با ۰/۰۵۷ گزارش شد، که نشان‌دهنده یک تمایل یا روند آماری به سمت اختلاف بین دو گروه است، اما بر اساس آستانه‌ی سنتی معناداری ($\alpha=0.05$)، این اختلاف معنادار آماری تفسیر نشد. ما اذعان داریم که این مقدار مرزی P-Value و عدم دستیابی به معناداری کامل، به‌شدت تحت تأثیر قدرت ناکافی آزمون آماری (Low Statistical Power) قرار دارد. این کاهش قدرت، نتیجه‌ی مستقیم توزیع نامتعادل موارد مثبت به‌ویژه در نمونه‌های بافتی است (فقط ۱ مورد مثبت از ۱۰۰ نمونه بافتی) که مانع از تشخیص یک اختلاف واقعی (در صورت وجود) می‌گردد. بنابراین، در چارچوب ($\alpha=0.05$)، تفسیر عدم معناداری یک رویکرد محافظه‌کارانه تلقی می‌شود. برای ارزیابی دقیق‌تر و با قدرت آماری کافی، انجام مطالعات آینده با حجم نمونه بزرگ‌تر و تمرکز بر نمونه‌های خون (به دلیل فراوانی بالاتر) ضروری است تا وضعیت معناداری این تمایل به درستی ارزیابی گردد.

6. Delarmelina E, Buzelin MA, Souza BS, et al. High positivity values for bovine leukemia virus in human breast cancer cases from Minas Gerais, Brazil. *PLoS One*. 2020;15(10):e0239745.. doi:10.1371/journal.pone.0239745
7. Corredor-Figueroa AP, Olaya-Galán NN, Velandia-Álvarez S, Muñoz M, Salas-Cárdenas SP, Ibáñez-Pinilla M, et al. Co-Circulation of Bovine Leukemia Virus Haplotypes among Humans, Animals, and Food Products: New Insights of Its Zoonotic Potential. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021; 18(9):4883. <https://doi.org/10.3390/ijerph18094883>
8. Moran, P. E., Nieto Fariás, M. V., Dolcini, G. L., & Ceriani, M. C. (2025). Infectivity and persistence of bovine leukemia virus in human breast cells: assessing a possible zoonotic link to cancer. *Veterinary Research Communications*. 49(3): 1-6.
9. Amarante MK, Watanabe MA. The possible involvement of virus in breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2009;135:329-37.
10. Buehring GC, Philpott SM, Choi KY. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. *AIDS research and human retroviruses*. 2003 1;19(12):1105-13.
11. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Choi KY, Sun D, Nuovo G. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerging infectious diseases*. 2014;20(5):772.
12. Khalilian M, Hosseini SM, Madadgar O. Bovine leukemia virus detected in the breast tissue and blood of Iranian women. *Microbial pathogenesis*. 2019 1;135:103566.
13. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International journal of cancer*. 2006 15;118(12):3030-44.
14. Wang Y, Holland JF, Bleiweiss IJ, Melana S, Liu X, et al. Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer. *Cancer research*. 1995 15;55(22):5173-9.
15. Di Lonardo A, Venuti A, Marcante ML. Human papillomavirus in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 1992;21:95-100.
16. Bonnet M, Guinebretiere JM, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G, et

جامع آماری بالاتر و طولی به منظور طراحی سیستم‌های غربالگری مولکولی برای گروه‌های در معرض خطر مورد استفاده قرار گیرد.

تعارض منافع

نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچگونه تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

سیاسگزاری

بدین وسیله از پرسنل زحمتکش پاتولوژی بیمارستان افضل‌پور و همچنین باهنر شهر کرمان که ما را در جمع‌آوری نمونه‌های بافت پارافینه پستان یاری نمودند نهایت تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین لازم می‌دانم اشاره کنم که در جمله‌بندی و نگارش بخش‌هایی از متن، از هوش مصنوعی Microsoft Copilot بهره گرفته شده است که نقش مؤثری در بهبود کیفیت نگارش داشته است.

References

1. Ciminale V, Pavlakis GN, Derse DA, Cunningham CP, Felber BK. Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: novel mRNAs and proteins produced by HTLV type I. *Journal of Virology*. 1992;66(3):1737-45.
2. Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*. 2007;4(1):1-32.
3. Schwartz I, Lévy D. Pathobiology of bovine leukemia virus. *Veterinary research*. 1994;25(6):521-36.
4. US Department of Agriculture Animal and Plant Health Services, Veterinary Services, Center for Epidemiology and Animal Health. Info Sheet: Bovine Leukosis Virus (BLV) on U.S. Dairy Operations – 2007. Riverdale, Maryland: U.S. Department of Agriculture (2008).
5. Zur Hausen H, de Villiers EM. Dairy cattle serum and milk factors contributing to the risk of colon and breast cancers. *International journal of cancer*. 2015;137(4):959-67.

- al. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999 18;91(16):1376-81.
17. Salahshor Z, Hejazi H, Hadi F, Saedi Z. The Study of Relationship Between Epstein - Barr virus and Breast Cancer in Isfahan Province. *Iranian Journal of Breast Diseases*. 2018;11(2):16–24.
 18. Buehring G, Shen HM, Jensen H, Block G. Bovine leukemia virus infection is significantly associated with risk of breast cancer. *Cancer Research*. 2007 1;67(9_Supplement):1747-.
 19. Baltzell KA, Shen HM, Krishnamurthy S, Sison JD, Nuovo GJ, Buehring GC. Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: Case-control study of women in Texas. *Cancer*. 2018 1;124(7):1342-9.
 20. Lawson JS, Glenn WK. Multiple oncogenic viruses are present in human breast tissues before development of virus associated breast cancer. *Infectious agents and cancer*. 2017;12:1-8.
 21. Mesa G, Ulloa JC, Uribe AM, Gutiérrez MF. Bovine leukemia virus gene segment detected in human breast tissue. *UDCA*. 2013
 22. Schwingel D, Andreolla AP, Erpen LM, Frandoloso R, Kreutz LC. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. *Scientific reports*. 2019 27;9(1):2949.
 23. Zhang R, Jiang J, Sun W, Zhang J, Huang K, et al. Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients. *Breast Cancer Research*. 2016;18:1-2.
 24. Khan Z, Abubakar M, Arshed MJ, Aslam R, Sattar S, Shah NA, et al. Molecular investigation of possible relationships concerning bovine leukemia virus and breast cancer. *Scientific reports*. 2022 9;12(1):4161.
 25. Dabaghi S, Hajirezaei M. Tracking of bovine leukemia virus in blood and breast paraffin tissue samples. *IJOGI*. 2023. 22732. 92-100 [Persian].
 26. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Jin DL, Hudes M, et al. Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: a case-control study. *PloS one*. 2015 2;10(9):e0134304.
 27. Buehring GC, Shen H, Schwartz DA, Lawson JS. Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development. *PloS one*. 2017 22;12(6):e0179367.
 28. Delarmelina E, Buzelin MA, Souza BS, Souto FM, Bicalho JM, Câmara RJ, et al. High positivity values for bovine leukemia virus in human breast cancer cases from Minas Gerais, Brazil. *Plos one*. 2020 5;15(10):e0239745.
 29. Buehring GC, DeLaney A, Shen H, Chu DL, Razavian N, Schwartz DA, Demkovich ZR, Bates MN. Bovine leukemia virus discovered in human blood. *BMC infectious diseases*. 2019;19(1):1-0.