خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۷ شماره ۳ پاییز ۹۹ (۲۰۹-۲۰۰)

مقاله پژوهشی

مقایسه آزمایش‌های الکتروکمی لومینسانس، وسترن بلات و PCR برای تائید ویروس HTLV-1 در داوطلبان اهدای خون

حسین مهرابی حبیب‌آبادی[۱]، زهره شریفی[۲]، مسعود پارسانیا[۳]، علی‌اکبر پورفتح‌اله[۴]، ستاره حقیقت[۵]

چکیده

سابقه و هدف

ویروس لنفوتروپیک سلول T انسانی نوع I ، با دو بیماری در انسان یعنی لوکمی/لنفوم T بزرگسالان و پاراپارسیس اسپاستیک گرمسیری مرتبط است. حدود ۵ تا ۱۰ میلیون نفر با HTLV-1 در سراسر جهان آلوده شده‌اند. به منظور افزایش سلامت خون در گیرندگان و جلوگیری از نتایج کاذب در داوطلبان اهدای خون، نیاز است روش‌های شناسایی عوامل عفونی، از حساسیت و اختصاصیت بالا برخوردار باشند. هدف از این مطالعه؛ مقایسه آزمایش‌هـای الکتروکمی لومینسانس، وسترن بلاتینگ و PCR ، برای تائید ویروس HTLV-1 بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۷ بر روی تعداد ۶۶ نمونه(۶۲ مرد و ۴ زن) که با کیت الایزا دارای آنتی‌بادی علیه ویروس HTLV-1 بودند و با روش‌های الکتروکمی لومینسانس و وسترن بلات آزمایش شدند، انجام شد. هم‌چنین جهت تشخیص ویروس با روش PCR ، اهداکنندگان خون مجدد فراخوان شدند و نمونه جدید از آنان اخذ شد. پس از استخراج DNA ، آزمایش Nested PCR با آغازگرهای هر دو ناحیه TAX و LTR انجام شد.

یافته‌ها

در این مطالعه تعداد ۸ (۱۲/۱٪) نمونه از ۶۶ نمونه که با آزمایش الایزا، مجدداً واکنش نشان داده بودند، انتخاب شدند. تعداد ۴ (۶٪) نمونه با روش الکتروکمی لومینسانس، حاوی آنتی‌بادی علیه HTLV-1 بودند. در بررسی با روش‌های وسترن بلات و Nested PCR نیز، همان ۴ (۶٪) نمونه مجدد مثبت شدند.

نتیجه گیری

استفاده از آزمایش‌های الکتروکمی لومینسانس، وسترن بلات و روش PCR که در این مطالعه نتایج مشابهی داشتند، برای تایید ویروس HTLV-1 مناسب می‌باشند.

کلمات کلیدی: **وسترن بلات، کمی لومینسانس، Nested PCR ، HTLV-1**

تاریخ دریافت: ۹۸/ ۷/۳۰
تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۲۶

۱- دانشجوی PhD میکروبیولوژی ـ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران ـ دانشگاه آزاد اسلامی ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسئول: PhD ویروس‌شناسی ـ استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۳- PhD ویروس‌شناسی ـ دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران ـ دانشگاه آزاد اسلامی ـ تهران ـ ایران
۴- PhD ایمنی‌شناسی ـ استاد گروه ایمونولوژی ،دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۵- PhD میکروبیولوژی ـ استادیار گروه میکروبیولوژی ،دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران ـ دانشگاه آزاد اسلامی ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-11]

مقدمه

HTLV ویروسی با زنجیره RNA از خانواده رتروویریده و جنس دلتا رتروویروس می‌باشد که اولین بار توسط پوئز در سال ۱۹۸۰ در انسان شناخته شد(۳-۱). نوع ۱ این ویروس (HTLV-I) در سال ۱۹۷۹ در مبتلایان به بیماری لنفوپرولیفراتیو سلول T و دو سال بعد نوع ۲ ویروس (HTLV-II) در یک فرد مبتلا به لوکمی سلول مویی (Hairy Cell Leukemia) به عنوان اولین رتروویروس‌های انسانی شناسایی شدند(۴). به علاوه موارد محدودی از آلودگی انسان به نوع ۳ و ۴ این ویروس در سال‌های اخیر از آفریقای مرکزی گزارش شده است(۵، ۶). اغلب مبتلایان به عفونت(HTLV-I) در بیشتر عمر خود بدون علامت باقی می‌مانند و تنها در کمتر از ۱۰٪، عوارض ناشی از این ویروس را آشکار می‌کنند(۷، ۲، ۱). راه‌های انتقال ویروس شامل: ۱- دریافت خون و یا فرآورده‌های خونی آلوده، ۲- تماس جنسی، ۳- مادر به کودک و ۴- اعتیاد تزریقی می‌باشد و آلودگی HTLV-I گسترش جهانی دارد(۱۰، ۸). روش‌هایی که برای تشخیص ویروسHTLV به کار برده می‌شود شامل روش‌های سرولوژی و مولکولی می‌باشد. یکی از روش‌های سرولوژیک، روش الکتروکمی لومینسانس است. الکتروکمی لومینسانس، تکنولوژی جدیدی است. وقتی یک الکترون از سطح تهییج شده یا بالاتر به سطح پایین‌تر انرژی می‌رسد و انرژی خود را به صورت نور متصاعد می‌کند، واکنش را به نام لومینسانس می‌شناسیم(۱۴-۱۱). شناسایی ویروس توسط این روش، ساندویچ دوتایی آنتی‌ژن اطلاق می‌گردد، بدین صورت که آنتی‌ژن‌های نوترکیب خاصHTLV بیوتینه شده (HTLV-I gp21 و HTLV- II p24) و آنتی‌ژن‌های نوترکیب اختصاصی HTLV (HTLV-I gp21 و HTLV- II p24) که با کمپلکس روتنیوم نشانه‌گذاری شده‌اند و همراه با نمونه تشکیل ساندویچ می‌دهند. بعد از آن با افزودن میکرو ذرات پوشیده شده با استرپتاویدین به فاز جامد متصل می‌شود. ترکیب واکنش به صورت مغناطیسی روی سطح الکترود در سلول اندازه‌گیری می‌شود و ترکیباتی که متصل نشوند، توسط ProCell II M برداشته می‌شوند. با استفاده از نور سنج نتایج به صورت خودکار با مقایسه سیگنال‌های نمونه‌های مثبت که قبلاً توسط کالیبراسیون به دست آمده، تعیین می‌شود.

یکی دیگر از روش‌های کلیدی آزمایش وسترن بلات می‌باشد. این روش یک آزمایش تأییدکننده است و وجود نوعی پادتن(ایمونوگلوبولین نوع جی) علیه چند نوع پروتئین ویروسی را بررسی می‌کند. افتراق بین HTLV I و HTLV II از طریق استفاده از rgp46-I ، یک واحد پروتئین نوترکیب پوشش‌دار HTLV I و rgp46-II و یک واحد پروتئین نوترکیب پوشش‌دار HTLV II انجام می‌شود. GD21 ، یک پروتئین نوترکیب پوشش‌دار اپی‌توپ اختصاصی مشترک HTLV I و HTLV II است که برای افزایش اختصاصیت تشخیص مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر این، افتراق بین انواع ویروس HTLV تحت تأثیر استفاده پروتئین gag(p19, p24) قرار می‌گیرد. اگر p19 بزرگتر یا مساوی p24 باشد، عفونت HTLV-I و اگر p24 بزرگتر از p19 باشد، عفونت HTLV-II پیشنهاد می‌گردد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR)، یک روش آزمایشگاهی مولکولی است که همانندسازی و تکثیر قطعه‌ای از D ژنوم ویروسی در دو ناحیه LTR و Tax توسط روش Nested PCR انجام می‌شود.

بررسی و مقایسه نتایج واکنش‌زای آزمایش الایزا با آزمایش‌های تأییدی جهت تشخیص HTLV-I واقعی در جمعیت اهداکنندگان خون به منظور افزایش ضریب سلامت خون در گیرندگان و جلوگیری از معافیت‌های کاذب و حفظ اهدکنندگان و تأمین ذخایر خونی مهم می‌باشد. هدف از این مطالعه، مقایسه آزمایش‌های الکتروکمی لومینسانس، وسترن بلات و PCR به منظور تایید ویروس HTLV-I بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۷ در آزمایشگاه ویروس‌شناسی مرکز تحقیقات مؤسسه عالی طب انتقال خون انجام شد. تعداد ۶۶ نمونه(۶۲ مرد و ۴ زن) که با کیت الایزا (ایتالیا، Diapro HTLV I-II Ab Kit) دارای جذب نوری مثبت و یا جذب نوری سر مرز به کنترل مثبت بودند، جمع‌آوری شدند. جذب نوری تعداد ۶ نمونه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-11]

بر اساس معیار cut off دارای واکنش قوی بودند و تعداد ۶۰ نمونه سر مرز مثبت گزارش شدند. برای همه این نمونه‌ها، مجدد با همان کیت، آزمایش انجام شد. هم‌چنین بر روی این نمونه‌ها و با استفاده از آزمایش الکتروکمی لومینسانس(آلمان، Roche ECL Kit) و بر اساس دستورالعمل کیت آزمایش انجام شد. بر روی نمونه‌های مثبت، آزمایش وسترن بلات(سوئیس، MP Kit) بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد. برای انجام PCR ، اهداکنندگان با نتایج واکنش‌زا با الایزا دوباره فراخوان شده و نمونه خون کامل همراه با ماده ضد انعقاد از آن‌ها اخذ گردید. ابتدا از نمونه‌ها DNA ژنومی استخراج(تایوان، FavorGen) گردید و به وسیله نانودراپ، غلظت‌ها سنجش شد. در ادامه با DNA ژنومی استخراج شده، برای نمونه‌ها آزمایش Nested PCR (دستگاه آلمانی، PEQ STAR) با آغازگرهای هر دو ناحیه ژنی TAX و LTR انجام شد و حجم محتویات میکروتیوب‌ها به همراه چرخه‌های دمایی در نظر گرفته شد(جداول ۳-۱).

جدول ۱: توالی آغازگرهای دو ناحیه Tax و LTR

ناحیه ژنی		آغازگر	
ژن *Tax*	آغازگرهای بیرونی	5'-TCGAAACAGCCCTGCAGATA-'3	جلوبرنده
		5'-TGAGCTTATGATTTGTCTTCA-'3	معکوس
	آغازگرهای داخلی	5'-ATACAAAGTTAACCATGCTT-'3	جلوبرنده
		5'-AGACGTCAGAGCCTTAGTCT-'3	معکوس
ژن *LTR*	آغازگرهای بیرونی	5'-ACCATGAGCCCCAAATATCCCCC-'3	جلوبرنده
		5'-TCGTATCCC-GGACGAGCCCCCAA-'3	معکوس
	آغازگرهای داخلی	5'-AGACTAAGGCTCTGACGTCTCCC-'3	جلوبرنده
		5'-AATTTCTCTCCTGAGAGTGCTATAG-'3	معکوس

جدول ۲: حجم مواد میکروتیوب‌های Nested PCR

مواد	حجم (µL)
ران اول با آغازگرهای بیرونی	
مستر میکس	۱۲/۵
آغازگر جلوبرنده(۱۰ µM)	۱
آغازگر معکوس(۱۰ µM)	۱
الگو(۱-۱۰۰ ng)	۲/۵
آب مقطر	۸
حجم نهایی	۲۵
ران اول با آغازگرهای داخلی	
مستر میکس	۱۲/۵
آغازگر جلوبرنده(۱۰ µM)	۱
آغازگر معکوس(۱۰ µM)	۱
الگو(۱-۱۰۰ ng)	۲/۵
آب مقطر	۸
حجم نهایی	۲۵

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-11]

جدول ۳: چرخه‌های دمایی Nested PCR

مرحله	زمان	دما به سانتی‌گراد	چرخه
ران اول با آغازگرهای بیرونی			
واسرشت شدن اولیه/فعال شدن آنزیم	۵ دقیقه	۹۴	۱
واسرشت شدن	۶۰ ثانیه	۹۴	۳۵
اتصال	۷۵ ثانیه	۵۸	
گسترش	۹۰ ثانیه	۷۲	
گسترش نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲	
ران اول با آغازگرهای داخلی			
واسرشت شدن اولیه/فعال شدن آنزیم	۵ دقیقه	۹۴	۱
واسرشت شدن	۶۰ ثانیه	۹۴	۲۰
اتصال	۷۵ ثانیه	۵۸	
گسترش	۹۰ ثانیه	۷۲	
گسترش نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲	۱

در نوبت اول با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ناحیه بیرونی Tax با آغازگر جلوبرنده به طول ۷۲۷۶-۷۲۵۷ و آغازگر معکوس به طول ۸۴۶۷-۸۴۴۷ و ناحیه LTR با آغازگر جلوبرنده به طول ۳۱-۹ و معکوس به طول ۷۷۹-۷۵۷ تکثیر شدند و در نوبت دوم با استفاده از آغازگرهای اختصاصی داخلی ناحیه Tax با آغازگر جلوبرنده به طول ۷۲۹۳-۷۲۷۴ و معکوس به طول ۸۳۹۳-۸۳۷۴ و ناحیه LTR با آغازگر جلوبرنده به طول ۱۱۹-۹۷ و معکوس به طول ۷۴۶-۷۲۲ تکثیر شدند و در پایان محصول ران دوم، Nested PCR روی ژل آگاروز ۱/۵٪، با ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز گردید و باندها روی ژل داک بررسی شد. نهایتاً محصولات PCR با باندهای اختصاصی نواحی LTR (۶۸۲ bp) و Tax (۱۱۱۹ bp) تفسیر شدند. به منظور صحت فرآیند استخراج و PCR ، ژن بتااکتین به عنوان ژن خانه‌داری(Gene House Keeping) استفاده شد. آزمایش PCR در دستگاه آلمانی، PRQ STAR انجام شد.

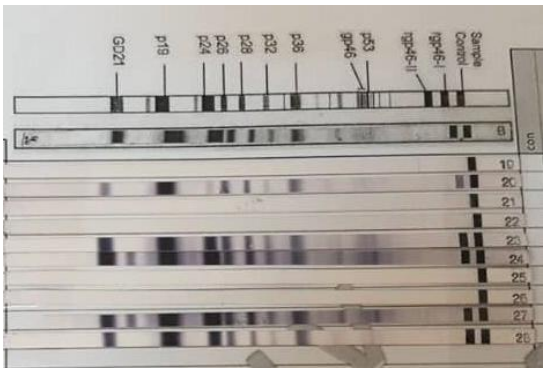
یافته‌ها

در مطالعه انجام شده، ۶۶ نمونه از داوطلبان اهدای خون(شامل ۶۲ مرد با میانگین سنی ۳۷/۵۶ سال و ۴ زن با میانگین سنی ۳۸/۹۲ سال هم‌چنین تعداد ۵۳ نفر متأهل و ۱۳ نفر مجرد، بررسی شدند که در الایزای مجدد تعداد ۸ نمونه(۱۲/۱٪) مثبت شدند. در آزمایش‌های الکتروکمی لومینسانس و وسترن بلات ، تعداد ۴ (۶٪) نمونه مثبت نتایج یکسان و مشابه داشتند(شکل ۱).

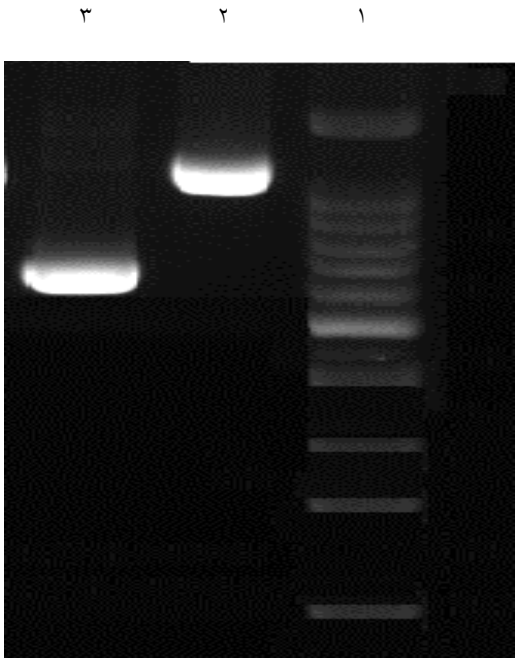
کیت وسترن بلات MP مورد استفاده، برای اولین بار تائیدیه FDA را به عنوان تست تأییدی دریافت کرده است.

هم چنین ۸ نمونه با دو تکرار واکنش‌زای الایزا برای نمونه‌گیری مجدد فراخوان شدند که همه افراد فراخوان شده غیر از یک نفر، همکاری کردند و نمونه جدید گرفته شد. پس از استخراج DNA ژنومی، غلظت و خلوص DNA با نانودراپ اندازه‌گیری شد که خلوص DNA ژنومی برابر ۱/۸ بود. هم چنین آزمایش PCR بر روی DNA استخراجی نمونه‌ها با آغازگر بتااکتین انجام شد و در تمام موارد محصول PCR مورد تائید قرار گرفت. در ادامه کار با بررسی حضور ژنوم ویروس HTLV-۱ ، نتایج آزمایش Nested PCR برای سه نمونه در هر دو ناحیه TAX (۱۱۱۹ bp) و LTR (۶۸۲ bp) درکنار نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی مثبت شد و باند مورد نظر مشاهده گردید(شکل۲).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-11]



شکل شماره ۱: نتایج وسترن بلات نمونه های مثبت الایزا



شکل ۲: نتایج ژل الکتروفورز محصول Nested PCR ویروس HTLVI . چاهک ۱ نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی. چاهک ۲ محصول PCR ژن *TAX* (۱۱۱۹ bp) و چاهک ۳ محصول PCR ژن *LTR* (۶۸۲ bp).

بحث

در این مطالعه در الایزای اولیه، موارد واکنش‌زا و سر مرزی HTLV-I ، تعداد ۸ (۱۲/۱٪) نمونه مثبت شد و از این ۸ نمونه واکنشی الایزا، در بررسی با آزمایش‌های الکتروکمی لومینسانس و وسترن بلات، تعداد ۴ (۶٪) نمونه به صورت یکسان در هر دو آزمایش تائید شد. هم چنین همان نمونه ها با آزمایش PCR هم مورد تائید قرار گرفتند.

ویروس HTLV ، یک رتروویروس است که ژنوم آن RNA تک رشته‌ای می‌باشد. این ویروس با فعالیت نسخه‌برداری معکوس، DNA می‌سازد که به داخل ژنوم میزبان وارد می‌شود و با فرار از پاسخ‌های سیستم ایمنی میزبان، می‌تواند سال‌های طولانی در بدن باقی بماند(۱۶). تنوع ژنتیکی ویروس در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت است ولی در یک منطقه معمولاً یکسان است. میزان موتاسیون در این ویروس نسبت به سایر ویروس‌ها بسیار کم است و در حدود ۱٪ در طی هزاران سال می‌باشد(۱۷). حدود ۱۵ تا ۲۰ میلیون نفر در سراسر دنیا به این ویروس آلوده هستند که از این بین ۸٪-۲٪ به سمت بیماری‌های شدید مرتبط با HTLV-1 می‌روند و بقیه به صورت ناقلین بدون علامت باقی می‌مانند(۱۷). در مطالعه ژیاهوی بی و همکاران در سال ۲۰۱۲، به منظور ارزیابی گذر آزمایش‌های نسل سوم HIV (enzyme linked immunosorbent assay/EIA) به نسل چهارم (electrochemiluminescence immunoassay/ChIA)، تعداد ۲۲۷۷۶۱ نمونه با EIA و تعداد ۱۱۵۸۳۵ نمونه با ChIA بررسی شدند و موارد مثبت هر دو آزمایش با آزمایش تائیدی وسترن بلات تکرار شد و حساسیت بالینی ChIA ۹۹/۸۸٪ و EIA ۹۹/۶۴٪ اعلام شد(۱۸). در مطالعه ریموند بوآدو در سال ۲۰۱۶، به منظور بررسی و مقایسه ویژگی و حساسیت نمونه خون کامل و نمونه سرم با استفاده از کیت‌های تشخیصی HIV ، تست تشخیصی سریع(RDT : Rapid diagnostic Test)، بر روی ۲۸۰ بیمار مبتلا به HIV و غیر آلوده توسط آزمایش الکتروکمی لومینسانس انجام شد و مشخص گردید که نمونه‌های خونی کامل از ویژگی‌ها و حساسیت‌های بالاتر و ارزش تشخیصی مثبت و منفی بالاتری نسبت به سرم برخوردار هستند(۱۹). در مطالعه آنجا دی وقلیره و همکاران در سال ۲۰۱۷، به منظور غربالگری و شیوع HCV در بین بیماران HIV مثبت در شهر کامبوج، تعداد ۳۰۴۵ بیمار HIV مثبت بدون سابقه درمان با HCV با روش الکتروکمی لومینسانس مورد ارزیابی قرار دادند و تعداد ۲۳۰ (۷/۵۵٪) مورد تشخیص داده شد که غربالگری هدفمند HCV در بین بیماران HIV

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-11]

مثبت را ارائه دادند(۲۰). الکتروکمی لومینسانس، مزایای خوبی نسبت به روش‌های تشخیصی دیگر مانند الایزا دارا می‌باشد، از جمله این مزایا می‌توان قابلیت اتوماسیون کامل دستگاه در حذف کامل خطای تکنیکی، دارای معرف غیر ایزوتوپی بسیار پایدار و با کاربرد آسان، حساسیت بالا جهت اندازه‌گیری آنالیت‌ها با مقادیر بسیار کم و هم‌چنین در مدت زمان کوتاه، سنجش با کیفیت بالا، برگشت سریع و آماده شدن برای سنجش دیگر و هم‌چنین با توجه به عملکرد دستگاه قدرت تکرارپذیری بسیار بالا و کاهش مصرف معرف‌ها و در نتیجه کاهش هزینه‌ها و کاهش زمان را می‌توان از ویژگی‌های این سیستم بیان کرد. علاوه بر مزایا دارای معایب و محدودیت‌هایی نیز است که این محدودیت‌ها شامل: بسته بودن سیستم(در این روش بایستی حتماً از دستگاه و کیت‌ها و محلول‌ها و هم‌چنین سر سمپلر و چاهک‌های مخصوصی استفاده شود که کاملاً انحصاری و در اختیار یک شرکت مشخص است)، هزینه قابل توجه دستگاه و هم‌چنین کیت‌ها و محلول‌های آن می‌باشد. عبدالوهاب مرادی و همکاران، فراوانی آنتی‌بادی ضد TLV-1 را در ۱۸۱ بیمار تالاسمی ماژور شهرستان گرگان در سال‌های ۸۳ و ۸۴ مورد مطالعه قرار داده و موارد مثبت واقعی را ۴/۴٪ (۸ نفر) گزارش نموده‌اند. روش کار مرادی برای غربالگری اولیه الایزا و تست تائیدی وسترن بلات بود. در غربالگری به وسیله الایزا از ۱۸۱ بیمار تالاسمی، ۲۷ نفر (۱۴/۹٪) مثبت شده بودند اما در آزمایش تائیدی وسترن بلات تنها ۸ نفر (۴/۴٪) نتایج مثبت را نشان دادند(۲۱). در مطالعه انارکی و همکاران سال ۲۰۰۳، به منظور تشخیص ویروس HTLV در ۱۷۵ بیمار تالاسمی شهر تهران با آزمایش الایزا، تعداد ۱۲(۶/۸٪) نمونه مثبت گزارش شد و آزمایش تائیدی وسترن بلات، تعداد ۱۱ (۶/۳٪) نمونه را تائید کرد(۲۲). در مطالعه شهابی و همکاران سال ۲۰۱۴، به منظور تشخیص ویروس HTLV ، تعداد ۲۰۱۷۱۹ نمونه از داوطلبان اهدای خون در خراسان رضوی در سال‌های ۸۷–۸۵ مورد مطالعه قرار گرفتند. در این مطالعه نتایج آزمایش الایزا ۸۵۰ (۰/۴۲٪) نمونه مثبت بود و با آزمایش وسترن بلات تعداد ۳۲ (۰/۰۱۶٪) نمونه تائید شد(۲۳). در مطالعه جمیلی و همکاران سال ۲۰۱۳، به منظور تشخیص ویروس HTLV ، تعداد ۲۱۲۲۸ نمونه اهداکنندگان خون در سال‌های ۸۷–۸۶ در شهر سبزوار بررسی شدند. نتایج غربالگری با آزمایش الایزا در تعداد ۱۱۶(۰/۵۵٪) نمونه مثبت بود و در بررسی با آزمایش تائیدی وسترن بلات، تعداد ۵۶ (۰/۲۶٪) نمونه مثبت تائید شد(۲۴). در مطالعه استرامر و همکاران سال ۲۰۱۸، جهت غربالگری ویروس HTLV از دو آزمایش الایزا و کمی‌لومینسانت استفاده کردند و نتایج مثبت هر آزمایش با آزمایش دیگر تکرار شد و ۱۰۰ نمونه repeat-reactive با آزمایش تکمیلی وسترن بلات مورد سنجش قرار گرفتند که نتایج شامل ۷۹ نمونه منفی و ۲۱ نمونه نامشخص بودند(۲۵). وسترن بلات در مقایسه با آزمایش الایزا، اختصاصی‌تر است ولی چون آزمایش نسبتاً گرانی محسوب می‌شود و از حساسیت کمتری برخوردار است به عنوان اولین آزمایش انجام نمی‌گیرد و بیشتر در تائید نتایج مثبت شده آزمایش الایزا به کار می‌رود. آزمایش وسترن بلات در همراهی با آزمایش الایزا بیش از ۹۹٪ مورد اطمینان خواهد بود. از مزایای وسترن بلات می‌توان به قابلیت تشخیص سطح پیکوگرم پروتئین در نمونه اشاره کرد(۲۶). اجازه می‌دهد تا این روش برای بسیاری از اهداف به عنوان ابزار تشخیصی مؤثر استفاده شود(۲۷–۲۸). حساسیت و اختصاصی بودن وسترن بلات به دو دلیل اصلی آن است: ۱) جداسازی پروتئین‌هایی که از نظر اندازه، بار و ترکیب با یکدیگر متفاوت هستند به وسیله ژل الکتروفورز انجام می‌شود. پروتئین‌های دناتوره شده با اتصال به SDS (سدیم دودسیل سولفات) یک بار منفی داده می‌شوند، سپس بر اساس اندازه جدا می‌شوند. ۲) اثر متقابل آنتی‌بادی و آنتی‌ژن. مانند همه روش‌ها، وسترن بلات هم محدودیت‌های خود را نیز دارد(۲۸، ۲۷). محدودیت اصلی وسترن بلات این است که فقط در صورت وجود یک آنتی‌بادی اولیه علیه پروتئین مورد نظر می‌توان آن را انجام داد(۲۹). در مطالعه موناوردی و همکاران در سال ۲۰۱۱، به منظور تشخیص ویروس HTLV در ۶۰ بیمار با بدخیمی خون بستری در بخش انکولوژی بیمارستان حضرت رسول، در غربالگری نمونه‌ها با آزمایش الایزا، تعداد ۱۸ (۳۰٪) نمونه مثبت گزارش شد و برای تائید آن‌ها از

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-11]

آزمایش Real-time PCR ناحیه TAX استفاده شد که تعداد ۱۲ (۲۰٪) نمونه مورد تائید قرار گرفت(۳۰). در مطالعه ثقفی و همکاران در سال ۲۰۱۸، در میان ۱۲۵ فرد مبتلا به بیماری تنفسی- خود ایمنی سارکوئیدوز در مقایسه با جمعیت سالم شهر مشهد، وجود HTLV1 با آزمایش الایزا در تعداد ۵ نمونه مثبت تشخیص داده شد و همان نمونه‌ها با آزمایش PCR تائید شد. و در نهایت فروانی HTLV1 در این بیماران در شمال شرقی ایران ۴٪ گزارش شد(۳۱). در مطالعه پیرایش فرد و همکاران در سال ۲۰۱۸، به منظور تشخیص ویروس HTLV تعداد ۲۰۰۰ نمونه اهداکنندگان شهر تهران، ۱۰۰ نمونه بیمارHIV مقبت و ۱۰۰ نمونه بیمار بتا تالاسمی و در مجموع ۲۲۰۰ نمونه غربالگری شد که با آزمایش الایزا تعداد ۳۴ نمونه اهداکنندگان و ۱۲ نمونه بیمار HIV مثبت شدند و با آزمایش تائیدی Nested PCR، تعداد ۱ نمونه از اهداکنندگان، ۵ نمونه از بیماران HIV مثبت و ۸ نمونه از بیماران بتا تالاسمی تائید شد(۱۵). روش Nested PCR جهت افزایش حساسیت PCR و هم‌چنین به حداقل رساندن تکثیر غیر اختصاصی و محصولات کاذب PCR طراحی می‌شود که سبب اتصال آغازگر به جایگاه‌های پیش‌بینی شده DNA هدف شود. Nested PCR شامل ۲ مجموعه از آغازگر است که آن‌ها در دو نوبت کاری پی در پی در واکنش PCR استفاده می‌شوند. عملکرد مجموعه دوم آغازگر این است که به جایگاه هدف دوم در داخل توالی تکثیر شده با مجموعه اول آغازگر اتصال یابند. به طوری که بسیار بعید است که توالی کاذب یا ناخواسته، جایگاه اتصال برای هر دو مجموعه آغازگرها داشته باشد. به خاطر این که تکثیر با آغازگرهای اختصاصی، انجام می‌شود، روش بسیار اختصاصی است. به علت تولید میلیون‌ها نسخه از طریق تکثیر در کمتر از سه ساعت، روش نسبتاً سریعی است. در مواردی که افراد از نظر ایمنی قادر به تولید آنتی‌بادی نباشند، از این آزمایش می‌توان برای تائید استفاده نمود. در کنار این مزایا و قابلیت اجرا، این روش معایب بالقوه‌ای نیز دارد. اولین و مهم‌ترین عیب، هزینه آن است. در مقایسه با آزمون‌های سنتی تکنیکی، گران قیمت است و انجام PCR به مهارت و تخصص نیاز دارد. علاوه بر این جهت انجام PCR باید دانش دقیقی از بیوانفورماتیک برای طراحی آغازگرها، برای وارد کردن جایگاه‌های محدود کننده و غیره داشت(۳۳، ۳۲).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه در آزمایش الایزای اولیه، تعداد ۶۶ نمونه واکنش‌زا و سر مرز بودند. در الایزای مجدد فقط ۸ نمونه مثبت شدند. و در بررسی با آزمایش‌های الکتروکمی لومینسانس، وسترن بلات و PCR همه ۴ نمونه نتایج مشابه داشتند. اولین قدم متداول در تشخیص آلودگی افراد، برای تشخیص آنتی‌بادی‌های اختصاصی این ویروس، آزمایش الایزا می‌باشد. الایزا حساسیت بالا دارد ولی ممکن است اختصاصیت بالایی نداشته باشد و با آنتی‌بادی‌های دیگری واکنش متقاطع بدهد. این امر خود نشان‌دهنده ویژگی پایین و مثبت کاذب در کیت‌های آنتی‌بادی به روش الایزای موجود در بازار می‌باشد. بنابراین استفاده از آزمایش الکتروکمی لومینسانس با حساسیت بالا می‌تواند باعث کاهش موارد مثبت کاذب روش الایزا شود و به همراه آزمایش‌هایی با ویژگی بالا مانند روش وسترن بلات و یا روش PCR به عنوان آزمایش تائیدی و تکمیلی استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان‌نامه دانشجویی در مقطع PhD میکروبیولوژی و دارای کد اخلاق IR.TMI.REC.1396.014 از مؤسسه عالی طب انتقال خون می‌باشد. از مدیریت پایگاه انتقال خون استان گلستان، آقای دکتر بنی‌عقیل و پرسنل پایگاه هم چنین از خانم پاز کارشناس آزمایشگاه ویروس‌شناسی، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-11]

References:

1- Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukemia virus type I at age 25: a progress report. Cancer Res 2005; 65(11): 4467-70.
2- Verdonck K, González E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. Lancet Infect Dis 2007; 7(4): 266-81.
3- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 7415-9.
4- Lowis GW, Sheremata WA, Minagar A. Epidemiologic features of HTLV-II: serologic and molecular evidence. Ann Epidemiol 2002; 12(1): 46-66.
5- Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R, Gessain A. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. Retrovirology 2005; 2: 30.
6- Mahieux R, Gessain A. The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: new members of the HTLV family. Pathol Biol (Paris) 2009; 57(2): 161-6.
7- Vrielink H, Reesink HW. HTLV-I/II prevalence in different geographic locations. Transfus Med Rev 2004; 18(1): 46-57.
8- Tabei SZ , Safaei A. HTLV1 infection in the world and Khorasan. J Birjand Univ Med Sci 2008; 15(1): 5-16. [Article in Farsi]
9- Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. Oncogene 2005; 24(39): 6058-68.
10- Aceijas C, Stimson GV, Hickman M, Rhodes T. Global overview of injecting drug use and HIV infection among injecting drug users. AIDS 2004; 18(17): 2295-303.
11- Durrant I. Enhanced chemiluminescent detection of horseradish peroxidase labeled probes. Methods Mol Biol 1994; 31: 147-61.
12- Alegria-Schaffer A, Lodge A, Vattem K. Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. Methods Enzymol 2009; 463: 573-99.
13- Kapeluich YL, Rubtsova M, Egorov AM. Enhanced chemiluminescence reaction applied to the study of horseradish peroxidase stability in the course of p-iodophenol oxidation. J Biolumin Chemilumin 1997; 12(6): 299-308.
14- Bergendahl V, Glaser BT, Burgess RR. A fast Western blot procedure improved for quantitative analysis by direct fluorescence labeling of primary antibodies. J Immunol Methods 2003; 277(1–2): 117-25.
15- Pirayeshfard L, Sharifi Z, Amini-Kafiabad S, Haghnazari Sadaghiani N. Phylogenetic analysis of HTLV-1 in Iranian blood donors, HIV-1 positive patients and patients with beta thalassemia. J Med Virol 2018; 90(8): 1398-405.
16- Cassar O, Charavay F, Touzain F, Jeannin P, Grangeon J-P, Laumond S, *et al*. A novel human T-lymphotropic virus type 1c molecular variant in an indigenous individual from New Caledonia, Melanesia. PLoS Negl Trop Dis 2017; 11(1): e0005278.
17- Nobre AFS, Almeida DS, Ferreira LC, Ferreira DL, Junior ECS, Viana M, *et al*. Low genetic diversity of the Human T-cell Lymphotropic Virus (HTLV-1) in an endemic area of the Brazilian Amazon basin. PloS One 2018; 13(3): e0194184.
18- Xiaohui Bi, Hongxia Ning, Tingting Wang, Dongdong Li, Yongming Liu, Tingfu Yang, *et al*. Comparative Performance of Electrochemiluminescence Immunoassay and EIA for HIV Screening in a Multiethnic Region of China. PLoS One 2012; 7(10): e48162.
19- Boadu R, Darko G, Nortey P, Akweongo P, Sarfo B. Assessing the sensitivity and specificity of First Response HIV-1-2 test kit with whole blood and serum samples: a cross-sectional study. AIDS Res Ther 2016; 13: 9.
20- Weggheleire AD, An S, Baetselier I D, Soeung P, Keath H, So V, *et al*. A cross-sectional study of hepatitis C among people living with HIV in Cambodia: Prevalence, risk factors, and potential for targeted screening. PLoS One 2017; 12(8): e0183530
21- Moradi A, Mansourian AR, Ahmadi Ar, Ghaemi E, Kalavi KH, Marjani A, *et al*. Prevalence of HTLV-I antibody among major thalassemic patients in Gorgan(south east of Caspian sea). J Appl Sci 2008; 8: 391-3. [Article in Farsi]
22- Anaraki Mohammadi Gh.R., Sadeghipour A.R., Vossough P, Nour Mohammadi I, Mirnateghi A.M.. Assessment of the Prevalence of Human T-Lymphotropic Virus type 1 among Thalassemic Patients with Frequent Blood Transfusion in Tehran in 2003. Journal of Iran Medical science University 2005; 12(47): 19-24.
23- Shahabi M, Sayadpour Zanjani D, Afzal Aghaei M, Maghsoudlou M, Bazargani R , Shakibaei H, et al. Seroepidemiology of blood donors in Khorasan Razavi province with unknown Western blot results of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2. Iran J Infect Dis Trop Med 2014; 19(65): 91. [Article in Farsi]
24- Jamili P, Safabakhsh H, Sadegh marvi M, Taghi Shakeri M, Sadeghi R. Seroepidemiology of HTLV infection in Sabzevar blood donors from 2007 to 2008. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences 2014; 4(20): 271. [Article in Farsi]
25- Stramer SL, Townsend RL, Foster GA, Johnson R, Weixlmann B, Dodd RY. Discordant human T-lymphotropic virus screening with Western blot confirmation: evaluation of the dual-test algorithm for US blood donations. Transfusion 2018; 58(3); 638-40.
26- Coorssen JR, Blank PS, Albertorio F, *et al*. Quantitative femto- to attomole immunodetection of regulated secretory vesicle proteins critical to exocytosis. Anal Biochem 2002; 307(1): 54-62.
27- Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. Methods 2006; 38(4): 283-93.
28- Murphy RM, Lamb GD. Important considerations for protein analyses using antibody based techniques: down-sizing Western blotting up-sizes outcomes. J Physiol 2013; 591(23): 5823-31.
29- Koller A, Watzig H. Precision and variance

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-11]

components in quantitative gel electrophoresis. Electrophoresis 2005; 26(12): 2470-5.
30- Monavari SH, Keyvani H, Mollaie H, Fazlalipour M, Sadeghi F, Salehi-Vaziri M, *et al*. Detection of human T-cell lymphotropic virus Type-1 among patients with malignant hematological diseases in Capital of Iran, Tehran. J Gen Mol Virol 2011; 3(5): 67-70.
31- Saghafi M, Rezaieyazdi Z, Nabavi S, Mirfeizi Z, Sahebari M, Salari M. HTLV-1 seroprevalance in sarcoidosis. A clinical and laboratory study in northeast of Iran. Int J Rheum Dis 2018; 21(6): 1309-13.
32- Birbian DJ, Sinha N, Shweta S, Akshra G. A critical review on PCR, its types and applications. International J Adv Res Biol Sci 2014; 1(7): 65-80.
33- Quin C, Marion R, David E B, Jonathan R, Will B. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. Nucleic Acids Res 1992; 20(7): 1717-23.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-11]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2020;17 (3): 200-209

Original Article

Comparison of Western blotting and PCR assays for confirmation of HTLV-1 virus in volunteer blood donors

Mehrabi Habibabadi H.[1] , Sharifi Z.[2], Parsania M.[3], Pourfathollah A.A.[4], Haghighat S.[1]

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences , Islamic Azad University ,Tehran, Iran*
[2]*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*
[3]*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[4]*Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) has been associated with two diseases in humans such as adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and HTLV-associated myelopathy/tropical spastic Para paresis (HAM/TSP). About 5 to 10 million people are infected with HTLV-1 worldwide. In order to improve the blood safety and to prevent false positive results in blood donors, methods for identifying infectious agents need to be highly sensitive and specific. The purpose of this study was to compare the electrochemical luminescence, western blotting, and PCR assays to confirm HTLV-1 virus.

Materials and Methods

This exprimental study was carried out in 2018 on 66 samples (62 males and 4 females) which had antibody against HTLV-1 virus. All retested samples with the same ELISA kit were examined by electrochemical luminescence and western blotting. For virus detection by PCR method, blood donors were recalled for new samples. After DNA extraction, nested PCR was performed with primers in both TAX and LTR regions.

Results

In this study 8 (%12/1) samples from 66 samples were reacted with ELISA test. Also 4 (%6) samples had antibody against HTLV-1 by electrochemiluminescence test. Finally, four samples were confirmed by Western blotting and Nested PCR.

Conclusions

The use of the electrochemical luminescence, western blotting and PCR assays, which had similar results in this study, is suitable for detection and confirmation of HTLV-1 virus.

Key words: Western Blotting, Chemiluminescence, Nested PCR, HTLV-1

Received: 22 Oct 2019
Accepted: 15 Feb 2020

Correspondence: Sharifi Z., PhD of Virology. Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052152; Fax: (+9821) 88601555
E-mail: *sharifiz@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-11]