

Original Article

Molecular detection of HTLV-1 provirus from DNA released from cells in plasma, in cases of lack of access to genomic DNA of peripheral blood mononuclear cells

Masoudi M.¹, Sharifi Z.¹, Maghsudlu M.¹

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Human lymphotropic virus type I mainly infects lymphocytes. For the detection of this virus, mainly nucleated cells are evaluated. Due to the short longevity of cells, sample collection is a challenge. The purpose of the study was to investigate the presence of HTLV-1 virus in genomic DNA released from cells in plasma and to determine its viral load in Western blot-positive blood donors.

Materials and Methods

In this descriptive study, 30 HTLV-1 positive Western blot donors were evaluated. Using an extraction kit, genomic DNA was extracted from plasma and isolated PBMC using Ficol. A nested PCR test was used to confirm the presence of HTLV-1 virus. A real-time PCR quantitative test by Sybergreen method was used to determine the amount of virus load.

Results

The average age of subjects was 42.9 ± 13.5 years; 93.3% of them were male and 6.6% female. LTR gene region was detected by nested PCR method in 80% of plasma and 100% of PBMC samples. The median viral loads in plasma and PBMC were 1.90 Copies/ μ L and 20 copies/ 10^6 PBMC, respectively.

Conclusions

To detect the HTLV-1 virus by molecular method, the HTLV-1 provirus DNA released from cells, in the plasma can be used when peripheral blood mononuclear cells are unavailable. It has also been observed that the virus load in the plasma of asymptomatic carriers is approximately 10 times lower than in PBMC.

Key words: HTLV-1, Cell-Free Nucleic Acids, qPCR

Received: 2 Mar 2024

Accepted: 13 May 2024

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

تشخیص مولکولی پروویروس HTLV-1 از DNA آزاد شده از سلول‌ها در پلاسما، در موارد عدم دسترسی به DNA ژنومی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

منیره مسعودی^۱، زهره شریفی^۲، مهتاب مقصودلو^۳

چکیده

سابقه و هدف

ویروس لنفوتروپیک تیپ I انسانی، عمدتاً لنفوسیت‌ها را آلوده می‌کند. برای تشخیص آیین ویروس، عمدتاً سلول‌های هسته دار مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. با توجه به طول عمر کوتاه سلول‌ها، جمع‌آوری نمونه یک چالش به حساب می‌آید. هدف از این مطالعه، بررسی حضور ویروس HTLV-1 در DNA ژنومی آزاد شده از سلول‌ها در پلاسما و تعیین بار ویروسی آن در اهداکنندگان خون و سترن بلات مثبت بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی، ۳۰ اهداکننده ناقل ویروس HTLV-1 و سترن بلات مثبت بررسی شدند. با استفاده از کیت استخراج، DNA ژنومی از پلاسما، و PBMC جداسازی شده با فایکول، استخراج گردید. حضور ویروس HTLV-1 با آزمایش مولکولی Nested PCR تایید و جهت تعیین بار ویروس از آزمایش کمی Real-Time Sybergreen PCR استفاده گردید.

یافته‌ها

میانگین سنی افراد برابر با $42/9 \pm 13/5$ سال بود. ۹۳/۳٪ از افراد مذکر و ۶/۶٪ مؤنث بودند. ناحیه ژنی LTR به روش Nested PCR در ۸۰٪ از نمونه‌های پلاسما و ۱۰۰٪ نمونه‌های PBMC شناسایی گردید. میان لود ویروس در پلاسما برابر با ۱/۹۰ Copies/μL و میان لود ویروس در PBMC برابر با ۱۰^۶ Copies /۲۰ بود.

نتیجه‌گیری

جهت تشخیص مولکولی ویروس HTLV-1، می‌توان پروویروس HTLV-1 را در DNA آزاد شده از سلول‌ها در پلاسما، در مواردی که سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در دسترس نمی‌باشد، مورد استفاده قرار داد. هم‌چنین دیده شد که میزان بار ویروس در پلاسمای ناقلین بدون علامت نسبت به PBMC حدود ۱۰ برابر کمتر می‌باشد.

کلمات کلیدی: ویروس لنفوتروپیک انسانی تیپ I، اسید نوکلئیک آزاد شده از سلول، PCR کمی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد خون‌شناسی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- مؤلف مسئول: PhD ویروس‌شناسی - استاد مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی:

۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

۳- متخصص پزشکی اجتماعی - استاد مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

مقدمه

ویروس لنفوتروپیک تیپ یک انسانی (HTLV-1)، رتروویروس اگزوزن می‌باشد (۱). این ویروس عضو خانواده رتروویریده و جنس دلتا ویروس است (۲، ۳). رتروویروس‌ها RNA ویروس‌هایی هستند که فرم cDNA آن‌ها به داخل ژنوم سلول میزبان اینتگره می‌شود (۴). تعداد افراد مبتلا به ویروس HTLV-1 در سراسر جهان حدود ۱-۲۰ میلیون نفر تخمین زده شده است که ۵-۱۰ میلیون نفر در مناطق اندمیک زندگی می‌کنند (۵-۷، ۳، ۱). شیوع این ویروس در مناطق اندمیک مانند ژاپن، جنوب صحرای آفریقا، منطقه کارائیب و جنوب آمریکا زیاد می‌باشد. همچنین این ویروس به میزان کمتر در رومانی، ملانژی-استرالیا و ایران حضور دارد (۳). در حال حاضر در ایران غربالگری ویروس HTLV-1 در اهداکنندگان خون، عمدتاً در ۷ استان خراسان رضوی، خراسان شمالی، خراسان جنوبی، گلستان، البرز، اردبیل و آذربایجان شرقی انجام می‌شود (۸).

این ویروس از سه طریق مادر به فرزند، تماس جنسی و به واسطه پزشکی از فرد به فرد دیگر منتقل می‌شود، که خطر انتقال ویروس از راه تزریق خون را می‌توان با فیلتر کردن خون و فرآیند کاهش لکوسیت قبل از تزریق خون کاهش داد (۹، ۵، ۳). احتمال تغییرات سرمی (Seroconversion) ویروس HTLV-1 از طریق تزریق خون حدود ۶۰٪-۴۰٪ گزارش شده است. بنابراین خطر انتقال ویروس از راه تزریق خون در مناطقی با شیوع بالای ویروس حائز اهمیت باشد (۱۰).

ویروس HTLV-1 عمدتاً سلول‌های لنفوسیت $CD4^+$ T، که در ایجاد پاسخ‌های ایمنی دخیل هستند، را درگیر می‌کند (۱۱). گسترش این ویروس عمدتاً از طریق تکثیر سلول‌های آلوده از راه تماس سلول به سلول می‌باشد (۱۲). در شرایط آزمایشگاهی مشاهده شده است که ویروس HTLV-1 ویروئین‌های آزاد کمی تولید می‌کند و بیشتر به صورت اینتگره درون ژنوم سلول میزبان می‌باشد (۱۳). در مطالعه‌های اخیر ذکر شده است که ژنوم ویروس HTLV-1 به واسطه حضور DNA آزاد شده از سلول‌ها در مایعات بیولوژیک بدن (cfDNA)، قابل شناسایی است.

cfDNA شامل قطعات اسیدنوکلئیک تک‌رشته‌ای و دو رشته‌ای خارج سلولی می‌باشد که عمدتاً ناشی از نکروز و آپوپتوز سلولی است. اخیراً دیده شده است که انتشار cfDNA از طریق میکروویزیکول‌هایی مانند اگزوزوم نیز امکان‌پذیر می‌باشد. cfDNA در پلاسما و مایعات بیولوژیک مانند CSF قابل شناسایی هستند. اسیدهای نوکلئیک درون زاد به طور دائم در جریان خون حضور دارند و مقدار آن در شرایط پاتولوژیک تغییر می‌کند. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که می‌توان از cfDNA به عنوان یک نشانگر زیستی برای تشخیص، تعیین اثر درمان و پیش‌آگهی بیماری‌ها استفاده کرد (۱۷-۱۴).

در پژوهش‌های مولکولی ویروس HTLV-1، عمدتاً ژنوم سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و بافی‌کوت مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. از آن جایی که طول عمر سلول‌های هدف چند روز می‌باشد و این امکان وجود دارد که در روند جمع‌آوری و انتقال نمونه، سلول‌های هسته‌دار از بین بروند، جمع‌آوری نمونه در مطالعه‌های مولکولی HTLV-1 یک چالش به حساب می‌آید. بنابراین اگر امکان تشخیص ژنوم ویروس HTLV-1 در نمونه‌های سرم و پلاسما، که شرایط نگهداری طولانی مدت دارند، وجود داشته باشد، تا حدودی می‌توان این چالش را برطرف نمود. هدف از این مطالعه، بررسی حضور ویروس HTLV-1 در DNA آزاد شده از سلول در پلاسما و تعیین بار ویروسی آن در مقایسه با سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) در اهداکنندگان خون و سترن بلات مثبت بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش از نوع توصیفی بود و جامعه مورد مطالعه شامل ۳۰ اهداکننده خون ایرانی بودند که به مراکز انتقال خون کشور، به منظور غربالگری ویروس HTLV-1 مراجعه داشتند. معیار ورود افراد به این مطالعه حضور آنتی بادی علیه ویروس HTLV-1/2 (نتیجه Reactive آزمایش غربالگری CLEIA) و نتیجه مثبت آزمایش تائیدی و سترن بلات و عدم حضور ویروس‌های منتقله از راه خون مانند HIV، HCV و HBV تعیین شد.

جمع‌آوری نمونه:

در این مطالعه از نمونه‌های خون کامل استفاده شد. پس از جمع‌آوری، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور RPM ۳۰۰۰ سانتریفوژ شدند. لایه پلاسما جدا گردیده و در فریزر ۳۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی از فایکول (ایران، mBio) و سانتریفوژ شیب غلظت استفاده شد. با کمک لام ثوبار تعداد سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی شمارش گردید. جهت استخراج DNA ژنومی تعداد یک میلیون PBMC در حجم ۲۰۰ μ L تهیه شد. به منظور استخراج DNA آزاد شده از سلول در پلاسما، از ۲۰۰ μ L پلاسما استفاده گردید. DNA پروویروس توسط کیت استخراج اسیدهای نوکلئیک ویروسی ساخت شرکت دینابایو ایران با شماره کالانما K1۰۰۲۵ طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. غلظت و خلوص DNA استخراج شده با کمک دستگاه نانودراپ (آمریکا، دنوویکس) مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه DNA استخراج شده از پلاسما و PBMC تا زمان آزمایش در فریزر ۳۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مابقی جهت نگهداری طولانی مدت در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تائید حضور ویروس به روش Nested PCR:

به منظور تائید حضور ویروس در نمونه‌های مورد استفاده، از آزمایش Nested PCR استفاده گردید. واکنش Nested PCR به منظور تکثیر ناحیه ژنی LTR، بر روی DNA استخراج شده از پلاسما (cdDNA) و DNA ژنومی انجام شد. توالی آغازگر پیش‌برنده بیرونی ناحیه ژنی LTR، 5' ACC ATG AGC CCC AAA TAT CCC C 3' و توالی آغازگر معکوس بیرونی ناحیه ژنی LTR، 5' TCG TAT 3' آغازگر درونی ناحیه ژنی LTR، 5' AGA CTA AGG 3' و توالی آغازگر معکوس درونی ناحیه ژنی LTR، 5' AAT TTC TCT CCT 3' و توالی آغازگر معکوس درونی ناحیه ژنی LTR، 5' GAG AGT GCT ATA G 3' بود (۱۸).

جدول ۱: توالی آغازگرهای Outer و Inner ژن LTR

نام آغازگر	توالی آغازگر 5'-3'
آغازگر جلویرنده بیرونی LTR	ACCATGAGCCCCAAATATCCCC
آغازگر معکوس بیرونی LTR	TCGTATCCCGGACGAGCCCCCAA
آغازگر جلویرنده درونی LTR	AGACTAAGGCTCTGACGTCTCCC
آغازگر معکوس درونی LTR	AATTTCTCTCCTGAGAGTGCTATAG

به جهت انجام واکنش Nested PCR، ۱۰ μ L از (آلمان، آمپلیکون) ۲X Master Mix، ۰/۵ μ L از آغازگرهای درونی و بیرونی (۱۰ μ L)، ۴ μ L از آب مقطر استریل و (۱۰۰ ng-۵۰) ۵ μ L از DNA استخراج شده از پلاسما و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی استفاده شد. حجم نهایی PCR، ۲۰ μ L تعیین شد. برنامه دمایی و زمانی واکنش Nested PCR در جدول آورده شده است (جدول ۱ و ۲). پس از اتمام واکنش، محصول مرحله دوم Nested PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ DNA Green viewer در مقابل نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp الکتروفورز انجام شد. سپس با دستگاه ژل داک (ایران، ATP) در مقابل نور فرا بنفش آشکارسازی گردید.

اندازه‌گیری بار ویروس HTLV-1 به روش Quantitative Real-Time PCR:

به منظور اندازه‌گیری میزان بار ویروس HTLV-1 از آزمایش Quantitative Real-Time PCR به روش سایبرگرین و ژن هدف Tax استفاده گردید. توالی آغازگر پیش‌برنده ژن Tax، 5' CCC ACA ATC CAA CCA GCT CAG 3' و توالی آغازگر معکوس 5' GTG GTG AAG CTG CCA 3' و توالی آغازگر معکوس درونی ناحیه ژنی LTR، 5' TCG GGT TTT 3' بود (۱۹).

به جهت طبیعی کردن نتایج و کنترل داخلی، آزمایش PCR از ژن ERV3 استفاده شد. در سلول‌های دیپلوئید

جدول ۲: برنامه دمایی و زمانی برای ژن *LTR*

مرحله	دما	زمان	چرخه
مرحله ۱ (با آغازگر بیرونی)			
واسرشت و فعال شدن آنزیم	۹۴ درجه سانتی گراد	۵ دقیقه	۱
واسرشت اتصال طولیل سازی	۹۴ درجه سانتی گراد	۶۰ ثانیه	۳۵
	۶۰ درجه سانتی گراد	۷۵ ثانیه	
	۷۲ درجه سانتی گراد	۹۰ ثانیه	
طولیل سازی نهایی	۷۲ درجه سانتی گراد	۱۰ دقیقه	۱
مرحله ۲ (با آغازگر درونی)			
واسرشت و فعال شدن آنزیم	۹۴ درجه سانتی گراد	۵ دقیقه	۱
واسرشت اتصال طولیل سازی	۹۴ درجه سانتی گراد	۶۰ ثانیه	۲۰
	۶۰ درجه سانتی گراد	۷۵ ثانیه	
	۷۲ درجه سانتی گراد	۹۰ ثانیه	
طولیل سازی نهایی	۷۲ درجه سانتی گراد	۱۰ دقیقه	۱

جدول ۳: توالی آغازگرهای ژن *Tax* و *ERV-3* روش *Quantitative Real-Time PCR Sybergreen*

نام توالی	توالی آغازگر و پروب 5'-3'
آغازگر جلوبرنده <i>Tax</i>	CCC ACA ATC CAA CCA GCT CAG
آغازگر معکوس <i>Tax</i>	GTG GTG AAG CTG CCA TCG GGT TTT
آغازگر جلوبرنده <i>ERV3</i>	CAT GGG AAG CAA GGG AAC TAA TG
آغازگر معکوس <i>ERV3</i>	CCC AGC GAC CAA TAC AGA ATT T

جدول ۴: برنامه دمایی و زمانی *Quantitative Real-Time PCR* به روش سایبرگرین

دما	زمان	چرخه
۹۵ درجه سانتی گراد	۱۵ دقیقه	۱
۹۵ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه	۴۵
۵۸ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه	
۷۲ درجه سانتی گراد	۴۵ ثانیه	
۷۲-۹۵ درجه سانتی گراد	Hold sec on the 1 st step, Hold 5 sec on nextstep	Melt

جهت انجام واکنش qPCR به روش سایبرگرین، ۷/۵ از (آلمان، آمپلیکون) ۲X Master Mix حاوی رنگ سایبرگرین، ۰/۵ آغازگرهای ذکر شده، ۴/۵ μL آب مقطر استریل و حجم (۵۰-۱۰۰ ng) ۲ μL DNA

انسانی دو کپی از ژن *ERV3* حضور دارد. توالی آغازگر پیشبرنده ژن *ERV3*، 5' CAT GGG AAG CAA GGG AAC TAA TG 3' و توالی آغازگر معکوس 5' CCC AGC GAC CAA TAC AGA ATT T 3' می باشد (۲۰).

یافته‌های بالینی و بار ویروسی:

۳۰ نمونه خون کامل با نتیجه وسترن بلات مثبت HTLV-1 جمع‌آوری گردید. با روش Nested PCR ناحیه ژنی LTR با طول قطعه ۶۸۲ bp مورد ارزیابی قرار گرفت. این ناحیه ژنی تنها در ۸۰٪ موارد (۲۴ مورد) DNA آزاد شده از سلول در نمونه پلاسما شناسایی گردید. ناحیه ژنی LTR در ۱۰۰٪ موارد (۳۰ مورد) DNA ژنومی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به روش Nested PCR شناسایی گردید (شکل ۱).

میزان بار ویروسی در این نمونه‌ها با Real Time PCR به روش سایبرگرین با ژن هدف Tax اندازه‌گیری شد. میزان لود ویروس پلاسما (cfDNA) دارای توزیع غیر طبیعی بوده و میانه لود ویروس برابر با ۱/۹۰ Copies/μL بود ($p < ۰/۰۰۱$). چارک اول بار ویروس برابر با ۰/۹۲ Copies/μL و چارک سوم برابر با ۴/۴ Copies/μL بود (IQR: ۳/۴۸ Copies/μL). کمترین و بیشترین میزان لود ویروس به ترتیب برابر با ۰/۱۲ Copies/μL و ۰/۴۱ تعیین شد. میزان لود ویروس سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (gDNA) دارای توزیع غیر طبیعی بوده و

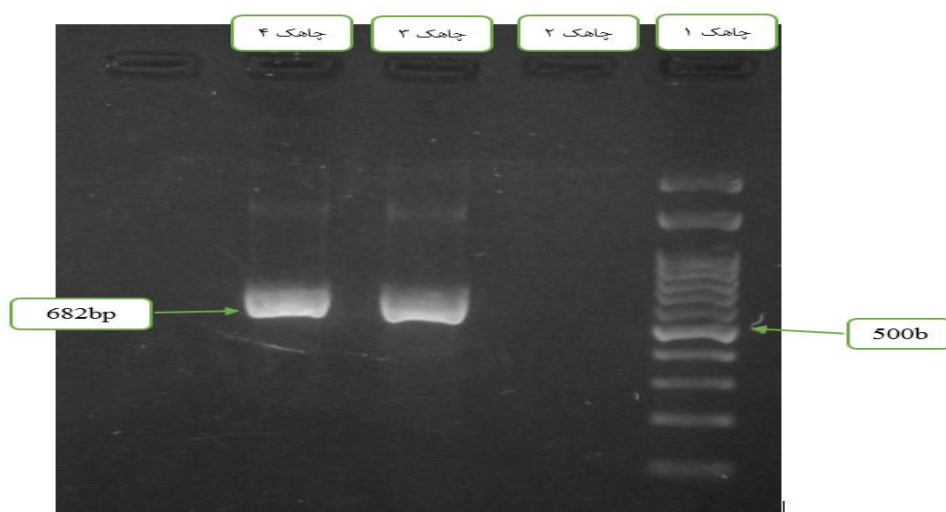
استخراج شده (gDNA و cfDNA) استفاده گردید. حجم نهایی واکنش qPCR، ۱۵ μL تعیین شد. برنامه دمایی و زمانی مورد استفاده در جدول آورده شده است (جدول ۲-۴). جهت تعیین تعداد کپی ژن Tax ویروس، از پلاسمید حاوی ژن Tax ویروس HTLV-1 تحت عنوان نمونه استاندارد استفاده و منحنی استاندارد رسم گردید. مطابق فرمول $\times 10^2 \left(\frac{HTLV-1 \text{ DNA average copy number}}{ERV3 \text{ DNA average copy number}/2} \right)$ تعداد کپی ژن Tax ویروس HTLV-1 در میکرولیتر محاسبه گردید (۲۱).

آنالیز آماری:

جهت انجام تحلیل آماری این پژوهش از نرم افزار SPSS ورژن ۲۶ استفاده شد.

یافته‌ها

مطالعه حاضر بر روی ۳۰ اهداکننده خون ناقل ویروس HTLV-1 بدون علامت با نتیجه وسترن بلات مثبت انجام شد. ۹۳/۳٪ از افراد (۲۸ نفر) مذکر و ۶/۶٪ از افراد (۲ نفر) مؤنث بودند. میانگین سنی افراد مورد مطالعه برابر با ۱۳/۵ ± ۴۲/۹ سال بود. ۹۰٪ از افراد (۲۷ نفر) متأهل و ۱۰٪ از افراد (۳ نفر) مجرد بودند.



شکل ۱: الکتروفورز محصول ناحیه ژنی LTR با طول قطعه ۶۸۲ bp به روش Nested PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. چاهک ۱ نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ bp، چاهک ۲ نمونه کنترل منفی، چاهک ۳ نمونه اهداکننده با نتیجه وسترن بلات مثبت و چاهک ۴ نمونه کنترل مثبت.

جدول ۵: میزان لود ویروس HTLV-1 به روش Real Time PCR سایبرگرین در نمونه‌های DNA آزاد شده از سلول در پلاسما و DNA ژنومی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

میزان لود ویروس در DNA آزاد شده از سلول در پلاسما	میزان لود ویروس در DNA ژنومی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی	
۱/۹۰ Copies/ μ L	۲۰ Copies/ 10^6 PBMC	میانه
۰/۹۲ Copies/ μ L	۹/۱۸ Copies/ 10^6 PBMC	چارک اول
۴/۴ Copies/ μ L	۷۸/۵ Copies/ 10^6 PBMC	چارک سوم
۰/۱۲ Copies/ μ L	۶ Copies/ 10^6 PBMC	کمترین بار ویروس
۲۱ Copies/ μ L	۲۷۸/۶ Copies/ 10^6 PBMC	بیشترین بار ویروس

میانه لود ویروس برابر با ۲۰ Copies/ 10^6 PBMC بود ($p < 0/001$). چارک اول بار ویروس برابر با ۹/۱۸ Copies/ 10^6 PBMC و چارک سوم برابر با ۷۸/۵ Copies/ 10^6 PBMC بود (IQR: ۶/۷۸ Copies/ 10^6 PBMC و ۶ Copies/ 10^6 PBMC). کمترین و بیشترین میزان لود ویروس به ترتیب برابر با ۶ Copies/ 10^6 PBMC و ۶/۷۸ Copies/ 10^6 PBMC تعیین شد (جدول ۵).

بحث

در این مطالعه میزان پرووایرال لود HTLV-1 در پلاسما و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی اهداکنندگان خون با نتیجه وسترن بلات مثبت به روش qPCR اندازه‌گیری شد تا آشکار شود در مواردی که سرم یا پلاسما به جای استفاده از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی برای تشخیص ویروس به کار برده می‌شود، تا چه حد نتایج و لود ویروس با یکدیگر مشابهت دارد. در این مطالعه، میزان میانه بار ویروس در پلاسمای ناقلین بدون علامت ۱/۹۰ Copies/ μ L بود و میانه لود ویروس در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی ناقلین بدون علامت برابر با ۲۰ Copies/ 10^6 PBMC بود که نشان می‌دهد میزان لود ویروس در پلاسمای ناقلین بدون علامت حدود ۱۰ برابر کمتر از بار ویروس در Genomic DNA است. نتایج حاصل از این پژوهش، با نتایج سایر مطالعه‌های انجام شده در دیگر کشورها در طی سال‌های اخیر مطابقت دارد و بیان‌کننده این موضوع می‌باشد که ژنوم ویروس HTLV-1 در مایعات بیولوژیک بدن مانند پلاسما قابل شناسایی

می‌باشد. Cell-free DNA، قطعات DNA هستند که برای اولین بار در سال ۱۹۴۸ در کمپلکس‌های ایمنی بیماران مبتلا به لوپوس اریتماتوز در سیستم گردش خون توصیف شدند (۲۲). اهمیت بالینی cfDNA زمانی مشخص شد که محققان تفاوت‌هایی بین ویژگی‌های cfDNA افراد سالم و بیمار گزارش کردند (۲۳). توماس جوریس و همکاران در کشور انگلستان، ۶ فرد سالم به عنوان گروه کنترل، ۲۵ ناقل بدون علامت ویروس HTLV-1، ۲۱ بیمار میلوپاتی ناشی از ویروس HTLV-1 (HAM) و ۲۵ بیمار مبتلا به لوسمی سلول T بالغین (ATL) را مورد ارزیابی قرار دادند. cfDNA از پلاسمای خون و Genomic DNA از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی این افراد جدا شد. به منظور تأیید حضور DNA انسانی از ژن بتاگلوبین و هم‌چنین برای اندازه‌گیری بار ویروس از ژن Tax و qPCR به روش سایبرگرین استفاده کردند. پروویروس HTLV-1 در ۸۵٪ از cfDNA‌ها شناسایی شد و نشان داده شد که عدم شناسایی پروویروس در cfDNA به دلیل لود پایین ویروس در gDNA سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی مرتبط است. در این مطالعه بیان گردید که DNA پروویروس یکی از اجزا cfDNA پلاسما در ناقلین HTLV-1 می‌باشد و میزان پرووایرال لود ویروس HTLV-1 در cfDNA پلاسما تقریباً ۱۰ برابر کمتر از پرووایرال لود ویروس در gDNA سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی است (۲۴). بیماری لوسمی سلول T بزرگسالان براساس ویژگی‌های بالینی و شرح حال بیمار به چهار زیر گروه — بالینی Acute، Lymphoma، Chronic و Smoldering

تقسیم می‌گردد. هیروکاتسویا و همکاران در کشور ژاپن cfDNA را از پلاسما و gDNA را از PBMC، ۴۲ ناقل بدون علامت، ۹ بیمار مبتلا به Smoldering ATL، ۷ بیمار مبتلا به Chronic ATL، ۵ بیمار مبتلا به Lymphoma ATL و ۴ بیمار مبتلا به Acute ATL استخراج کردند و به روش Droplet digital PCR میزان پرووایرال لود ویروس اندازه‌گیری شد. میانگین لود ویروس در نمونه‌های cfDNA پلاسما در ناقلین بدون علامت ۰/۷ Copies/mL، نوع Smoldering ۱۷/۵ copies/mL، نوع Chronic ۵۶/۳ ATL، نوع Lymphoma ۱۶۵۰ copies/mL و نوع Acute ۶۲۵ copies/mL گزارش شد. میانگین پرووایرال لود ویروس در نمونه‌های gDNA سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در ناقلین بدون علامت ۶٪، نوع Smoldering ATL ۱۶/۳٪، نوع Chronic ATL ۷۶٪، نوع Lymphoma ATL ۸/۵٪ و نوع Acute ATL ۶۹/۳٪ تعیین گردید. در این مطالعه بیان شد که بیماران مبتلا به لوسمی سلول T بالغین نوع Lymphoma بیشترین مقدار بار ویروس را در cfDNA پلاسما و کمترین میزان پرووایرال لود را در PBMC دارند (۲۵). دانیل روزا و همکاران در کشور برزیل ۴۸ اهداکننده خون که از نظر حضور ویروس HTLV-1 مثبت گزارش شده بودند را مورد ارزیابی قرار دادند. این افراد براساس میزان درگیری عصبی به دو گروه تقسیم شدند. گروه ۱ متشکل از ۲۳ بیمار بدون درگیری عصبی و گروه ۲ متشکل از ۲۵ بیمار با نشانه‌هایی از درگیری عصبی بودند. در این مطالعه میزان پرووایرال لود ویروس در پلاسما و مایع مغزی نخاعی به روش Real-Time SYBR Green PCR اندازه‌گیری شد.

نتایج نشان دادند که میزان لود ویروس در پلاسما افراد گروه ۱ و ۲ از نظر آماری تفاوت چشمگیری نداشتند. در حالی که به طور چشمگیری میزان لود ویروس در مایع مغزی - نخاعی گروه ۲ (همراه با درگیری عصبی) نسبت به گروه ۱ (بدون درگیری عصبی) بالاتر بود ($p=0/03$). این نتیجه می‌تواند تأییدکننده این موضوع باشد که میزان لود ویروس در بیماران پاراپارازی اسپاستیک گرمسیری همراه میلوپاتی ناشی از ویروس HTLV-1 (HAM/TSP) حدود ۱۰ تا ۱۰۰ برابر بیشتر از ناقلین بدون درگیری عصبی

می‌باشد (۲۶). سیلوا فورتادو و همکاران در کشور برزیل میزان پرووایرال لود ویروس HTLV-1 را در ۷۵ ناقل بدون علامت و ۷۸ بیمار HAM مورد ارزیابی قرار دادند. در این پژوهش DNA ویروس از خون محیطی استخراج شد و با روش Real-Time SYBR Green PCR و ژن هدف Pol آلومین میزان لود ویروس اندازه‌گیری شد. در این مطالعه عنوان شده است که میزان بار ویروس در بیماران HAM ($336 \text{ Copies}/10^4 \text{ cell}$ median: $711 \text{ Copies}/10^4 \text{ cell}$) حدود ۶ برابر بیشتر از ناقلین بدون علامت ($336 \text{ Copies}/10^4 \text{ cell}$ median: $117 \text{ Copies}/10^4 \text{ cell}$) است (۲۷). در این مطالعه، در ۸۰٪ موارد DNA ژنومی استخراج شده از پلاسما اهداکنندگان خون با نتیجه وسترن بلات مثبت، ناحیه ژنی LTR ویروس به روش Nested PCR شناسایی گردید. فایو کابرال و همکاران میزان لود ویروس HTLV-1 را در DNA ژنومی آزاد شده از سلول، از پلاسما ۱۵۰ فرد مبتلا به ویروس (۱۲۳ ناقل بدون علامت و ۲۷ بیمار HAM/TSP) با هدف قرار دادن ژن Pol و کنترل داخلی آلومین به روش TaqMan Real-Time PCR ارزیابی کردند. نتایج نشان دادند که تکثیر ژن Pol در ۴٪ ناقل بدون علامت و ۲۶٪ بیمار HAM/TSP وجود دارد (۲۸). مطالعه‌ها نشان دادند که خون کامل و فرآورده‌های سلولی و بافتی می‌توانند منجر به انتقال ویروس HTLV-1 شوند، ولی تاکنون علی‌رغم حضور پروویروس در cfDNA در پلاسما، انتقال ویروس HTLV-1 از فرآورده‌های بدون سلول گزارش نشده است که به دلیل عدم حضور تعداد کافی ویرون HTLV-1 عفونت‌زا در پلاسما بیماران می‌باشد. پژوهش انجام شده در این زمینه نشان داده که تعداد بسیار کمی از پروویروس‌های آزاد شده از سلول‌های آلوده به HTLV-1 در شرایط آزمایشگاهی عفونی هستند. تخمین زده شده است که از هر 10^6-10^5 ذره تولیدی، تنها یک مورد عفونت‌زای باشد (۳۰، ۲۹).

هم‌چنین در مطالعه‌هایی، ژنوم ویروس در وزیکول‌های خارج سلولی در پلاسما افراد نیز شناسایی گردیده است. اخیراً ساختارهای کوچک متصل به غشا تحت عنوان وزیکول‌های خارج سلولی (EVs) به دلیل حمل پروتئین‌ها و RNA ویروس در چندین عفونت ویروسی مانند HIV-1،

HTLV-1 و ویروس Zika مورد توجه قرار گرفته است. در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک تقریباً تمام سلول‌ها EVs ترشح می‌کنند که می‌توان آن را در مایعات بیولوژیک مانند خون، ادرار، خلط، شیر مادر، مایع مغزی-نخاعی و... شناسایی کرد. وزیکول‌های خارج سلولی حاوی پروتئین، لیپید، DNA، RNA، محتوای ژنتیکی پاتوژن‌ها مانند ویروس‌ها و باکتری‌ها و... می‌باشند (۳۱). مولکول‌های زیادی بر روی EVs وجود دارد که می‌توانند به تعداد زیادی از گیرنده‌های سلولی متصل شوند و یا از طریق فرآیند فاگوسیتوز سلول‌های ایمنی محتویات وزیکول‌ها، وارد سلول‌های هدف می‌شوند (۳۲، ۳۱). مطالعه‌های اخیر نشان داده‌اند که سلول‌های آلوده به ویروس یک سری وزیکول‌های خارج سلولی تولید می‌کنند که حاوی پروتئین‌ها ($gp61^{+++}/Tax^{+++}/HBZ^{+}$) و RNA ویروس می‌باشد. این وزیکول‌های خارج سلولی قادر هستند بر روی سلول‌های سالم تاثیر گذاشته و آن‌ها را نیز درگیر کنند. همچنین در این مطالعه نشان داده شده، که میزان سنتز RNA ویروس HTLV-1 در موش‌های NOG (موش‌هایی که زنجیره گاما رسپتور اینترلوکین ۲ در آن‌ها حذف شده است) مجاور شده با وزیکول‌های خارج سلولی ویروس HTLV-1 در مقایسه با موش‌های مجاور شده با وزیکول‌های خارج سلولی سلول‌های غیر عفونی افزایش یافته است. همچنین میزان DNA ویروس در خون، ریه، طحال، کبد و مغز موش‌ها پس از مجاور کردن با وزیکول‌های HTLV-1 اندازه‌گیری گردید که افزایش سطح DNA ویروس در تمام بافت‌ها به ویژه مغز مشاهده گردید (۳۳). مطالعه‌ها نشان داده که وزیکول‌های خارج سلولی از خون محیطی و مایع مغزی نخاعی بیماران مبتلا به HAM/TSP، حاوی پروتئین ترانس اکتیو Tax می‌باشند که باعث افزایش تجمع سلولی و گسترش ویروس می‌شود (۳۱). وزیکول‌های خارج سلولی می‌توانند باعث افزایش RNA و DNA پروویروس در خون، غدد لنفاوی و طحال شوند (۳۴). از آن جایی که مطالعه‌های زیادی بر روی وزیکول‌های خارج سلولی مشتق از سلول‌های آلوده به HTLV-1 صورت نگرفته است و مشخص نشده است که این EVs ها عفونی هستند یا خیر، بنابراین ضروری است

وزیکول‌های خارج سلولی تولید شده توسط سلول‌های حاوی ویروس از نظر حضور ژنوم ویروس HTLV-1، پرووایرال لود ویروس، بیان ژن‌های ویروسی و عفونی بودن مورد ارزیابی قرار گیرند.

در این مطالعه میزان پرووایرال لود HTLV-1 در پلاسما و سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی اهداکنندگان خون با نتیجه وسترن بلات مثبت به روش qPCR سایبرگرین اندازه‌گیری شد تا در مواردی که سرم یا پلاسما به جای استفاده از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی برای تشخیص ویروس به کار برده می‌شود یا لود ویروس تعیین می‌شود، تا چه حد نتایج با یکدیگر مشابهت دارد. در این مطالعه، میزان میانه بار ویروس در پلاسما ناقلین بدون علامت $1/90$ Copies/ μ L بود و میانه لود ویروس در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی ناقلین بدون علامت برابر با 10^6 Copies/ 10^6 PBMC بود که نشان می‌دهد میزان لود ویروس در پلاسما ناقلین بدون علامت حدود ۱۰ برابر کمتر از بار ویروس در Genomic DNA است. نتایج حاصل از این پژوهش، با نتایج سایر مطالعه‌های انجام شده در دیگر کشورها در طی سال‌های اخیر مطابقت دارد و بیان‌کننده این موضوع می‌باشد که ژنوم ویروس HTLV-1 در مایعات بیولوژیک بدن مانند پلاسما قابل شناسایی می‌باشد. DNA Cell-free قطعات DNA هستند که برای اولین بار در سال ۱۹۴۸ در کمپلکس‌های ایمنی بیماران مبتلا به لوپوس اریتماتوز در سیستم گردش خون توصیف شدند (۲۲). اهمیت بالینی cfDNA زمانی مشخص شد که محققان تفاوت‌هایی بین ویژگی‌های cfDNA افراد سالم و بیمار گزارش کردند (۲۳). توماس جوریس و همکاران در کشور انگلستان، ۶ فرد سالم به عنوان گروه کنترل، ۲۵ ناقل بدون علامت ویروس HTLV-1، ۲۱ بیمار مبتلا به HAM و ۲۵ بیمار مبتلا به ATL را مورد ارزیابی قرار دادند. cfDNA از پلاسما خون و Genomic DNA از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی این افراد جدا شد. به منظور تأیید حضور DNA انسانی از ژن بتاگلوبین و همچنین برای اندازه‌گیری بارویروس از ژن Tax و qPCR به روش سایبرگرین استفاده کردند. پروویروس HTLV-1 در ۸۵٪ از cfDNA شناسایی شد و نشان داده شد که عدم

SYBR Green PCR اندازه‌گیری شد.

نتایج نشان دادند که میزان لود ویروس در پلاسما ای افراد گروه ۱ و ۲ از نظر آماری تفاوت چشمگیری نداشتند. در حالی که به طور چشمگیری میزان لود ویروس در مایع مغزی نخاعی گروه ۲ (همراه با درگیری عصبی) نسبت به گروه ۱ (بدون درگیری عصبی) بالاتر بود ($p = 0/03$). این نتیجه می‌تواند تأییدکننده این موضوع باشد که میزان لود ویروس در بیماران HAM/TSP حدود ۱۰ تا ۱۰۰ برابر بیشتر از ناقلین بدون درگیری عصبی می‌باشد (۲۶). سیلوا فورتادو و همکاران در کشور برزیل میزان پرووایرال لود ویروس HTLV-1 را در ۷۵ ناقل بدون علامت و ۷۸ بیمار HAM مورد ارزیابی قرار دادند. در این پژوهش DNA ویروس از خون محیطی استخراج شد و با روش Real-Time SYBR Green PCR و ژن هدف Pol آلومین میزان لود ویروس اندازه‌گیری شد. در این مطالعه عنوان شده است که میزان بار ویروس در بیماران HAM ($336 \text{ Copies}/10^4 \text{ cell}$ median: $711 \text{ Copies}/10^4 \text{ cell}$) حدود ۶ برابر بیشتر از ناقلین بدون علامت (HAM) (10^4 Copies/ $48 \text{ Copies}/10^4 \text{ cell}$ median: 117 Copies) است (۲۷).

در این مطالعه، در ۸۰٪ موارد DNA ژنومی استخراج شده از پلاسمای اهداکنندگان خون با نتیجه وسترن بلات مثبت، ناحیه ژنی LTR ویروس به روش Nested PCR شناسایی گردید. فایو کابرال و همکاران میزان لود ویروس HTLV-1 را در DNA ژنومی آزاد شده از سلول، از پلاسما ۱۵۰ فرد مبتلا به ویروس (۱۲۳ ناقل بدون علامت و ۲۷ بیمار HAM/TSP) با هدف قرار دادن ژن Pol و کنترل داخلی آلومین به روش TaqMan Real-Time PCR ارزیابی کردند. نتایج نشان دادند که تکثیر ژن Pol ۴٪ ناقل بدون علامت و ۲۶ بیمار HAM/TSP وجود دارد (۲۸). مطالعه‌ها نشان دادند که خون کامل و فرآورده‌های سلولی و بافت می‌توانند منجر به انتقال ویروس HTLV-1 شوند، ولی تاکنون علی‌رغم حضور پروویروس در cfDNA در پلاسما، انتقال ویروس HTLV-1 از فرآورده‌های بدون سلول گزارش نشده است که به دلیل عدم حضور تعداد کافی ویرون HTLV-1 عفونت‌زا در پلاسمای بیماران می‌باشد. پژوهش انجام شده در این زمینه نشان داده که

شناسایی پروویروس در cfDNA به لود پایین ویروس در gDNA سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی مرتبط است. در این مطالعه بیان گردید که DNA پروویروس یکی از اجزای cfDNA پلاسما در ناقلین HTLV-1 می‌باشد و میزان پرووایرال لود ویروس HTLV-1 در cfDNA پلاسما تقریباً ۱۰ برابر کمتر از پرووایرال لود ویروس در gDNA سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی می‌باشد (۲۴). بیماری لوسمی سلول T بزرگسالان براساس ویژگی‌های بالینی و شرح حال بیمار به چهار زیرگروه بالینی Acute، Chronic، Lymphoma و Smoldering تقسیم می‌گردد. هیرو کاتسویا و همکاران در کشور ژاپن cfDNA را از پلاسما و gDNA از PBMC، ۴۲ ناقل بدون علامت، ۹ بیمار مبتلا به Smoldering ATL، ۷ بیمار مبتلا به Chronic ATL، ۵ بیمار مبتلا به Lymphoma ATL و ۴ بیمار مبتلا به Acute ATL استخراج کردند و به روش Droplet digital PCR میزان پرووایرال لود ویروس اندازه‌گیری شد. میانگین لود ویروس در نمونه‌های cfDNA پلاسما در ناقلین بدون علامت ۰/۷ copies/mL، نوع ATL Smoldering ۵۶/۳ copies/mL، نوع ATL Chronic ۱۷/۵ copies/mL، نوع ATL Lymphoma ۱۶۵۰ copies/mL و نوع ATL Acute ۶۲۵ copies/mL گزارش شد. میانگین پرووایرال لود ویروس در نمونه‌های gDNA سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در ناقلین بدون علامت ۰/۶٪، نوع ATL Smoldering ۱۶/۳٪، نوع ATL Chronic ۷۶٪، نوع ATL Lymphoma ۸/۵٪ و نوع ATL Acute ۶۹/۳٪ تعیین گردید. در این مطالعه بیان شد که بیماران مبتلا به لوسمی سلول T بالغین نوع Lymphoma بیشترین مقدار بار ویروس را در cfDNA پلاسما و کمترین میزان پرووایرال لود را در PBMC دارند (۲۵). دانیل رزا و همکاران در کشور برزیل ۴۸ اهداکننده خون که از نظر حضور ویروس HTLV-1 مثبت گزارش شده بودند را مورد ارزیابی قرار دادند. این افراد براساس میزان درگیری عصبی به دو گروه تقسیم شدند. گروه ۱ متشکل از ۲۳ بیمار بدون درگیری عصبی و گروه ۲ متشکل از ۲۵ بیمار با نشانه‌هایی از درگیری عصبی بودند. در این مطالعه میزان پرووایرال لود ویروس در پلاسما و مایع مغزی نخاعی به روش Real-Time

تعداد بسیار کمی از پروویروس های آزاد شده از سلول های آلوده به HTLV-1 در شرایط آزمایشگاهی عفونی هستند. تخمین زده شده است که از هر 10^6 - 10^5 ذره تولیدی تنها یک مورد عفونت زای باشد (۳۰، ۲۹).

همچنین در مطالعه هایی، ژنوم ویروس در وزیکول های خارج سلولی در پلاسمای افراد نیز شناسایی گردیده است. اخیراً ساختارهای کوچک متصل به غشا تحت عنوان وزیکول های خارج سلولی (EVs) به دلیل حمل پروتئین ها و RNA ویروس در چندین عفونت ویروسی مانند HIV-1، HTLV-1 و ویروس Zika مورد توجه قرار گرفته است. در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک تقریباً تمام سلول ها EVs ترشح می کنند که می توان آن را در مایعات بیولوژیک مانند خون، ادرار، خلط، شیر مادر، مایع مغزی- نخاعی و... شناسایی کرد. وزیکول های خارج سلولی حاوی پروتئین، لیپید، DNA، RNA، محتوای ژنتیکی پاتوژن ها مانند ویروس ها و باکتری ها و... می باشند (۳۱). مولکول های زیادی بر روی EVs ها وجود دارد که می توانند به تعداد زیادی از گیرنده های سلولی متصل شوند و یا از طریق فرآیند فاگوسیتوز سلول های ایمنی محتویات وزیکول ها وارد سلول های هدف می شوند (۳۲، ۳۱). مطالعه های اخیر نشان داده اند که سلول های آلوده به ویروس یک سری وزیکول های خارج سلولی تولید می کنند که حاوی پروتئین های $(gp61^{+++}/Tax^{+++}/HBZ^{+})$ و RNA ویروس می باشد. این وزیکول های خارج سلولی قادر هستند بر روی سلول های سالم تاثیر گذاشته و آن ها را نیز درگیر کنند. هم چنین در این مطالعه نشان داده شده، که میزان سنتز RNA ویروس HTLV-1 در موش های NOG (موش هایی که زنجیره گاما رسپتور اینترلوکین ۲ در آن ها حذف شده است) مجاور شده با وزیکول های خارج سلولی ویروس HTLV-1 در مقایسه با موش های مجاور شده با وزیکول های خارج سلولی سلول های غیر عفونی افزایش یافته است.

هم چنین میزان DNA ویروس در خون، ریه، طحال، کبد و مغز موش ها پس از مجاور کردن با وزیکول های HTLV-1 اندازه گیری گردید که افزایش سطح DNA ویروس در تمام بافت ها به ویژه مغز مشاهده شد (۳۳).

مطالعه ها نشان داده که وزیکول های خارج سلولی از خون محیطی و مایع مغزی نخاعی بیماران مبتلا به HAM/TSP، حاوی پروتئین ترانس اکتیو Tax می باشند که باعث افزایش تجمع سلولی و گسترش ویروس می شود (۳۱). وزیکول های خارج سلولی می توانند باعث افزایش RNA و DNA پروویروس در خون، غدد لنفاوی و طحال شوند (۳۴).

از آن جایی که مطالعه های زیادی بر روی وزیکول های خارج سلولی مشتق از سلول های آلوده به HTLV-1 صورت نگرفته است و مشخص نشده است که این EVs ها عفونی هستند یا خیر. بنابراین ضروری است وزیکول های خارج سلولی تولید شده توسط سلول های حاوی ویروس از نظر حضور ژنوم ویروس HTLV-1، پرووایرال لود ویروس، بیان ژن های ویروسی و عفونی بودن مورد ارزیابی قرار گیرند.

نتیجه گیری

جهت تشخیص مولکولی ویروس HTLV-1، می توان از DNA های پروویروس HTLV-1 آزاد شده از سلول ها در پلاسمای ناقلین بدون علامت در مواردی که سلول های تک هسته ای خون محیطی در دسترس نمی باشد، استفاده نمود. هم چنین دیده شد که میزان بار ویروس در پلاسمای ناقلین بدون علامت حدود ۱۰ برابر کمتر از لود ویروس در سلول های تک هسته ای خون محیطی ناقلین بدون علامت است که نشان دهنده تعداد کمی پایین ویروس HTLV-1 در پلاسمای این افراد می باشد.

حمایت مالی

این پروژه توسط مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین مالی شده است.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه توسط کمیته اخلاق تحقیقات زیست پزشکی مؤسسه عالی آموزش و پژوهشی طب انتقال خون مورد بررسی و تأیید قرار گرفت (IR.TMI.REC.1400.018).

عدم تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع در مطالعه حاضر وجود نداشته است.

نقش نویسندگان

منیره مسعودی: نوشتن مقاله و انجام آزمایش‌ها، روش‌شناسی، تحلیل و بررسی داده‌ها.
دکتر زهره شریفی: طراحی مطالعه، ویرایش مقاله، بررسی و

تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ایران می‌باشد. بدین وسیله از مؤسسه جهت حمایت مالی تشکر می‌گردد.

References:

- Iwamoto N, Araki T, Umetsu A, Takatani A, Aramaki T, Ichinose K, *et al.* The Association of Increase of Human T-Cell Leukemia Virus Type-1 (HTLV-1) Proviral Load (PVL) With Infection in HTLV-1-Positive Patients With Rheumatoid Arthritis: A Longitudinal Analysis of Changes in HTLV-1 PVLs in a Single Center Cohort Study. *Front Immunol* 2022; 13: 887783.
- de La-Roque DGL, Santos EV, Rodrigues ES, da Costa PNM, Brauer VS, Almeida F, *et al.* The Expression of Tax and HBZ Genes in Serum-Derived Extracellular Vesicles From HTLV-1 Carriers Correlates to Proviral Load and Inflammatory Markers. *Front Immunol* 2022; 13: 881634.
- Simioli FR, Bouzas MB, Mijalovsky D, Pineda MV, Mammana L, Mangano A, Orduna TA. Making Visible HTLV Infection in a Non-endemic Area of Argentina. *Front Med (Lausanne)* 2022; 9: 892159.
- Mozhgani SH, Kermani HA, Norouzi M, Arabi M, Soltani S. Nanotechnology based strategies for HIV-1 and HTLV-1 retroviruses gene detection. *Heliyon* 2020; 6(5): e04048.
- Komatsu N, Iwanaga M, Hasegawa Y, Miura S, Fuchi N, Moriuchi H, *et al.* Frequency of HTLV-1 seroconversion between pregnancies in Nagasaki, Japan, 2011-2018. *Front Microbiol* 2022; 13: 1036955.
- Haghnazari Sadaghiani N, Pirayeshfard L, Aghaie A, Sharifi Z. The Effect of TAX-1 Gene of Human T-cell Leukemia Virus Type-1 on the Expression of CCR5 in K562 Cell Line. *Avicenna J Med Biotechnol* 2019; 11(1): 67-71.
- Futsch N, Mahieux R, Dutartre H. HTLV-1, the other pathogenic yet neglected human retrovirus: from transmission to therapeutic treatment. *Viruses* 2017; 10(1): 1.
- Saffari M, Rahimzada M, Mirhosseini A, Ghezaldasht SA, Valizadeh N, Moshfegh M, *et al.* Coevolution of HTLV-1-HBZ, Tax, and proviral load with host IRF-1 and CCNA-2 in HAM/TSP patients. *Infect Genet Evol* 2022; 103: 105337.
- Ji H, Chang L, Yan Y, Wang L. Development and validation of a duplex real-time PCR for the rapid detection and quantitation of HTLV-1. *Virol J* 2023; 20(1): 9.
- Eusebio-Ponce E, Candel FJ, Paulino-Ramirez R, Serrano-García I, Anguita E. Seroprevalence and Trends of HTLV-1/2 among Blood Donors of Santo Domingo, Dominican Republic, 2012-2017. *Rev Esp Quimioter* 2021; 34(1): 44-50.
- Forlani G, Shallak M, Accolla RS, Romanelli MG. HTLV-1 infection and pathogenesis: New insights from cellular and animal models. *Int J Mol Sci* 2021; 22(15): 8001.
- Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, *et al.* Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 2003; 299(5613): 1713-6.
- Kalinichenko S, Komkov D, Mazurov D. HIV-1 and HTLV-1 transmission modes: Mechanisms and importance for virus spread. *Viruses* 2022; 14(1): 152.
- Song HS, Kang DH, Kim H, Ahn TS, Kim TW, Baek MJ. Clinical relevance and prognostic role of preoperative cell-free single-stranded DNA concentrations in colorectal cancer patients. *Korean J Clin Oncol* 2021; 17(2): 59.
- Mayo S, Gómez-Manjón I, Fernández-Martínez FJ, Camacho A, Martínez F, Benito-León J. CfDNA measurement as a diagnostic tool for the detection of brain somatic mutations in refractory epilepsy. *Int J Mol Sci* 2022; 23(9): 4879.
- Melamud MM, Buneva VN, Ermakov EA. Circulating Cell-Free DNA Levels in Psychiatric Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci* 2023; 24(4): 3402.
- Pös Z, Pös O, Styk J, Mocova A, Strieskova L, Budis J, *et al.* Technical and methodological aspects of cell-free nucleic acids analyzes. *Int J Mol Sci* 2020; 21(22): 8634.
- 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): 1398-1405.
- 19- Ghasemzadegan H, Shahabi M, Rezaei N, Sharifi Z. Design a Real Time PCR with SYBR Green for quantification of HTLV-1 proviral load for blood donors. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2019; 16(3): 194-200. [Article in Farsi]
- 20- Miley WJ, Suryanarayana K, Manns A, Kubota R, Jacobson S, Lifson JD, Waters D. Real-time polymerase chain reaction assay for cell-associated HTLV type I DNA viral load. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16(7): 665-75.
- 21- Rosadas C, Cabral-Castro MJ, Vicente ACP, Peralta JM, Puccioni-Sohler M. Validation of a quantitative real-time PCR assay for HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol Methods* 2013; 193(2): 536-41.
- 22- Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther* 2019; 20(8): 1057-67.
- 23- Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif* 2019; 17: 100087.
- 24- Joris T, Haddow J, Taylor GP, Cook LB, Rowan AG. Detection of HTLV-1 proviral DNA in cell-free DNA: Potential for non-invasive monitoring of Adult T cell leukaemia/lymphoma using liquid biopsy? *Front Immunol* 2023; 14: 1150285.
- 25- Katsuya H, Nakamura H, Maeda A, Ishii K, Nagaie T, Sano H, *et al.* HTLV- 1 cell- free DNA in plasma as a potential biomarker in HTLV- 1 carriers and adult T-cell leukemia- lymphoma. *EJHaem* 2023; 4(3): 733-7.
- 26- Rosa DV, Magno LA, Pereira NC, Romanelli LC, Albuquerque MR, Martins ML, *et al.* Plasma and cerebrospinal fluid levels of cytokines as disease markers of neurologic manifestation in long-term HTLV-1 infected individuals. *Biomark Med* 2018; 12(5): 447-54.
- 27- Furtado MdSBS, Andrade RG, Romanelli LCF, Ribeiro MA, Ribas JG, Torres EB, *et al.* Monitoring the HTLV- 1 proviral load in the peripheral blood of asymptomatic carriers and patients with HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from a Brazilian cohort: ROC curve analysis to establish the threshold for risk disease. *J Med Virol* 2012; 84(4): 664-71.
- 28- Cabral F, Arruda LB, de Araújo ML, Montanheiro P, Smid J, de Oliveira ACP, *et al.* Detection of human T-cell lymphotropic virus type 1 in plasma samples. *Virus Res* 2012; 163(1): 87-90.
- 29- Fan N, Gavalchin J, Paul B, Wells K, Lane M, Poiesz B. Infection of peripheral blood mononuclear cells and cell lines by cell-free human T-cell lymphoma/leukemia virus type I. *J Clin Microbiol* 1992; 30(4): 905-10.
- 30- Derse D, Hill SA, Lloyd PA, Chung H-k, Morse BA. Examining human T-lymphotropic virus type 1 infection and replication by cell-free infection with recombinant virus vectors. *J Virol* 2001; 75(18): 8461-8.
- 31- Al Sharif S, Pinto DO, Mensah GA, Dehbandi F, Khatkar P, Kim Y, *et al.* Extracellular vesicles in HTLV-1 communication: the story of an invisible messenger. *Viruses* 2020; 12(12): 1422.
- 32- Feng D, Zhao WL, Ye YY, Bai XC, Liu RQ, Chang LF, *et al.* Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* 2010; 11(5): 675-87.
- 33- Pinto DO, DeMarino C, Pleet ML, Cowen M, Branscome H, Al Sharif S, *et al.* HTLV-1 extracellular vesicles promote cell-to-cell contact. *Front Microbiol* 2019; 10: 2147.
- 34- Pinto DO, Al Sharif S, Mensah G, Cowen M, Khatkar P, Erickson J, *et al.* Extracellular vesicles from HTLV-1 infected cells modulate target cells and viral spread. *Retrovirology* 2021; 18(1): 1-27.