Original Article

Development of a TaqMan Real Time PCR Assay for Quantifying the HTLV-1 Proviral Load Using the *HBZ* Gene

Reihane Teimoori[1], Zohreh Sharifi[1], Mahmoud Reza Pourkarim[2], Mehdi Ajorloo[1]

[1]Biological Products and Blood Safety Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
2Laboratory of clinical and Epidemiological Virology, Rega Institute, Leuven, Belgium

Received: 2025/02/16
Accepted: 2025/04/21

https://doi.org/10.18502/avr.v34i2.18052

Citation:
Teimoori R, Sharifi Z, Pourkarim M.R, Ajorloo M. Development of a TaqMan Real Time PCR Assay for Quantifying the HTLV-1 Proviral Load Using the *HBZ* Gene. J Iran Blood Transfus. 2025: 22 (2) :

Correspondence: Ajorloo M., Assistant professor of Biological Products and Blood Safety Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran.
Tel: (+9821) 88601501
E-mail: *m.ajorloo@tmi.ac.ir*

ABSTRACT

Background and Objectives

HTLV-1 is the first identified human oncogenic retrovirus, associated with ATL and HAM/TSP diseases. The *HBZ* gene, one of the key genes of this virus, plays an important role in disease progression due to its low immunogenicity and genetic stability. Despite the progress of diagnostic methods such as ELISA and Western blot, indeterminate results are occasionally reported. Moreover, measuring viral load is critical for prognosis of the disease. In this study, a sensitive system for determining HTLV-1 proviral load based on the *HBZ* gene was designed and implemented using the TaqMan Real Time PCR method.

Materials and Methods

In this experimental study, primers and probes were designed to amplify a 106 bp region of the *HBZ* gene. Then, genomic DNA was extracted from PBMCs. After amplification of the *HBZ* gene, the PCR product was inserted into the TOPO TA vector and used as a standard to develop the TaqMan Real Time PCR method.

Results

The logarithmic dilutions of 1.2×10^{1}-10^{8} were prepared from the recombinant plasmid to draw the standard curve. The slope of the standard curve line was -3.2 and R^2 was 0.97, indicating the linearity and efficiency of the test. The results of the reproducibility of the reaction at the intra-assay and inter-assay levels (three replicates per step) and the average coefficient of variation CV of the standard samples were below 5.3% and 5.9%, respectively. Also, the Limit of Detection of this test was determined to be 1.2×10^{1} Copies/µL, reflecting the high sensitivity of this assay.

Conclusions

Given its high sensitivity, rapid analysis and ease of use, the Real Time PCR method represents a suitable approach for determining the proviral load of HTLV-1 and assessing the prognosis of associated diseases.

Key words: Viral Load, Real-Time PCR, HTLV-1

Copyright © 2025 Journal of Iranian Blood Transfusion, Published by Blood Transfusion Research Center.
This work is licensed under a Creative Common Attribution-Non Commercial 4.0 International license.

In Press

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۲۲ شماره ۲ تابستان ۱۴۰۴ ()

مقاله پژوهشی

راه اندازی روش TaqMan Real Time PCR جهت تعیین میزان بار پرووایرال ویروس HTLV-1 با استفاده از ژن *HBZ*

ریحانه تیموری[۱]، زهره شریفی[۲]، دکتر محمودرضا پورکریم[۳]، مهدی آجورلو[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی ـ مرکز تحقیقات فرآورده‌های بیولوژیک و سلامت خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- PhD ویروس‌شناسی ـ استاد مرکز تحقیقات فرآورده های بیولوژیک و سلامت خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- PhD ویروس‌شناسی ـ انستیتو تحقیقاتی بالینی و آزمایشگاهی اپیدمیولوژی ویروس‌شناسی رگا ـ لوون ـ بلژیک
۴- PhD ویروس‌شناسی ـ استادیار مرکز تحقیقات فرآورده‌های بیولوژیک و سلامت خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۰۱

https://doi.org/10.18502/avr.v34i2.18052

Citation:
Teimoori R, Sharifi Z, Pourkarim M.R, Ajorloo M. Development of a TaqMan Real Time PCR Assay for Quantifying the HTLV-1 Proviral Load Using the *HBZ* Gene. J Iran Blood Transfus. 2025: 22 (2) :

نویسنده مسئول:
دکتر مهدی آجورلو. استادیار مرکز تحقیقات فرآورده های بیولوژیک و سلامت خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران
صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷
E-mail: *m.ajorloo@ibto.ir*

کد اخلاق:
IR.TMI.REC.1402.016

چکیده

سابقه و هدف

ویروس HTLV-1 اولین رتروویروس انکوژن انسانی است که با بیماری‌های ATL و HAM/TSP مرتبط می‌باشد. ژن *HBZ* به‌عنوان یکی از ژن‌های کلیدی این ویروس، به دلیل ایمنی‌زایی پایین و پایداری ژنتیکی، نقش مهمی در پیشرفت بیماری ایفا می‌کند. با وجود پیشرفت روش‌های تشخیصی مانند الایزا و وسترن بلات، در برخی موارد نتایج نامشخص گزارش می‌شود. از سوی دیگر، اندازه‌گیری بار ویروسی در پیش‌آگهی بیماری اهمیت دارد. در این مطالعه، با استفاده از روش TaqMan Real Time PCR، سیستمی حساس برای تعیین پرووایرال لود HTLV-1 بر اساس ژن *HBZ* طراحی و راه‌اندازی شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، آغازگرها و پروب برای ناحیه‌ای از ژن *HBZ* به طول ۱۰۶ bp طراحی گردید. سپس DNA ژنومی از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی یا PBMCs استخراج شد. پس از تکثیر ژن HBZ ، محصول PCR در پلاسمید TOPO TA vector کلون گردید و از آن به عنوان استاندارد جهت راه‌اندازی روش TaqMan Real Time PCR استفاده شد.

یافته‌ها

برای رسم منحنی استاندارد، از پلاسمید نوترکیب رقت‌های لگاریتمی $۱۰^{۸}$-$۱۰^{۱}$× ۱/۲ تهیه گردید. در این آزمایش، شیب خط منحنی استاندارد برابر با ۳/۲- و R^2 برابر با ۰/۹۷ بود که نشان‌دهنده خطی بودن و کارآیی آزمایش می‌باشد. نتایج تکرارپذیری واکنش در سطح درون‌سنجی و بین سنجی (در قالب سه تکرار در هر مرحله کاری) و میانگین ضریب تغییرات CV برای نمونه‌های استاندارد، به ترتیب کمتر از ۵/۳ ٪ و ۵/۹ ٪ بود. هم‌چنین کمترین حد تشخیص این آزمایش برابر با $۱۰^{۱}$× ۱/۲ Copies/µL بوده که نشان‌دهنده حساسیت بالای این روش می‌باشد.

نتیجه گیری

استفاده از روش TaqMan Real Time PCR با توجه به حساسیت بالا، آنالیز و کاربرد آسان می‌تواند روش مناسبی برای تعیین بار پرووایرال ویروس HTLV-1 باشد و امکان پیش‌آگهی دقیق‌تری از بروز بیماری‌ها به واسطه این ویروس را فراهم کند.

کلمات کلیدی: بار ویروسی، Real Time PCR ، HTLV-1

In Press

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]

مقدمه

ویروس HTLV-1 (Human T-Cell Leukemia Virus-1) در سال ۱۹۸۰ به وسیله پوئز و همکاران از طریق بررسی لنفوسیت‌های خون محیطی از یک بیمار مبتلا به لنفوم سلول T پوستی یافت شد (۱). ویروسHTLV نوع ۱ و ۲ با دو بیماری، لوسمی/ لنفوم سلول T بالغین (ATL) و پاراپارسیس اسپاستیک گرمسیری (HAM/TSP) در انسان مرتبط بوده، که تقریباً ۱۰ تا ۲۰ میلیون نفر را در سراسر جهان درگیر کرده است (۳، ۲). برخی از مطالعه‌ها نشان داده‌اند که این ویروس در مناطقی هم‌چون جنوب غربی ژاپن، بخش‌هایی از آفریقا، آمریکای لاتین، جزایرکارائیب و در شمال شرق ایران از جمله شهرهای مشهد، سبزوار و نیشابور شیوع بالایی دارد (۴). راه‌های انتقال ویروس شامل دریافت خون و یا فرآورده‌های خونی آلوده، تماس جنسی، انتقال از مادر به کودک از طریق شیر دادن، تزریق داروهای وریدی و پیوند عضو می‌باشد (۵). ژنوم HTLV دارای kbp ۹ است که شامل ژن‌های ساختاری *gag* ، *pol* و *env* بوده و در دو انتها به وسیله توالی‌های تکراری طویل (Long terminal repeat) 3′ LTR و 5′ LTR احاطه شده و ناحیه‌ای موسوم به px دارد که بین ژن *env* و 3′ LTR قرار دارد (۶). ناحیه px که نقش تنظیم‌کنندگی را دارد شامل p30 ، p13 ، p12 ، rex ، tax و HBZ (HTLV-1 basic leucine zipper factor) می‌باشد (۶). ژن *tax* در رشته مثبت (sense) ژنوم قرار دارد و از 5′ LTR رونویسی می‌شود که نقش مرکزی در رونویسی از ژن، همانندسازی ویروس و تکثیر سلول‌های آلوده به ویروس را دارد (۷). از آن جایی که tax بسیار ایمنزا بوده و هدف اصلی لنفوسیت‌های سیتوتوکسیک است، بنابراین ویروس استراتژی‌های متعددی را برای تنظیم دقیق و کاهش بیان این پروتئین به کار می‌برد. یکی از این استراتژی‌ها استفاده از پروتئین HBZ است که با مهار رشته مثبت ژنوم ویروسی، موجب کاهش تولید پروتئین tax می‌گردد (۸). ژن *HBZ* از رشته منفی (antisense) کد شده و از 3′ LTR رونویسی می‌شود که نقش کلیدی در تداوم و پاتوژنز این ویروس دارد (۸). بیان ژن *HBZ* سبب مهار رشته مثبت ژنوم ویروسی و کاهش تولید پروتئین tax می‌گردد (۹). با توجه به انتقال ویروس HTLV از طریق فرآورده‌های خونی آلوده، غربالگری بر روی خون‌های اهدایی، در مناطقی که شیوع ویروس بالاست انجام می‌شود. که به طور معمول روش EIA (Enzyme Immunoassays) در ابتدا برای شناسایی آنتی‌بادی‌های HTLV در خون استفاده شده و اگر آزمایش اولیه مثبت باشد، از تست وسترن بلات برای تایید استفاده می‌شود (۱۰). وسترن بلات روشی است که پروتئین‌های gag، p19، p24، p53 و rgp46 را تشخیص می‌دهد. در آزمایش وسترن بلات حداقل یک باند gag و یک باند ۴۶envgp باید شناسایی شود تا نتیجه HTLV مثبت تلقی گردد. در سایر الگوها، نتیجه وسترن بلات نامعلوم در نظر گرفته می‌شود و تشخیص صحیح عفونت را مشکل می‌کند، به همین دلیل برای کاهش پاسخ‌های نامعلوم، نیاز به روش‌های تشخیصی با حساسیت و اختصاصیت بالا می‌باشد (۱۰).

در برخی مطالعه‌ها، زمانی که الگوهای وسترن بلات نامشخص (Indeterminate ، IND) بررسی شد، مشاهده گردید که ژن *tax* قابل شناسایی نبوده و دلیل حذف این ژن مشخص نبود به همین دلیل در مطالعه‌ها تأکید شده که برای تشخیص ویروس باید بیش از یک بخش ژنوم را جستجو کرد (۱۱). هم‌چنین مشخص شده تعیین لود ویروس HTLV-1 در پیش آگهی ایجاد بیماری‌ها، نتایج عفونت و پیشرفت بیماری دارای اهمیت می‌باشد. برای پیش‌بینی نتایج عفونت و پیشرفت بیماری در مطالعه حاضر آزمایش TaqMan Real Time PCR با هدف طراحی یک روش حساس به منظور تعیین لود ویروس HTLV-1 راه‌اندازی شد.

مواد و روش‌ها

طراحی آغازگر و پروب اختصاصی:

در این پژوهش از آغازگرها و پروب مورد نظر برای ژن *HBZ*، که به وسیله نرم‌افزارهای Gene Runner و AlleleID طراحی شده بود، استفاده گردید. سپس توالی آن‌ها در بانک اطلاعات NCBI بلاست (BLAST) گردید تا از ویژگی آغازگرها و پروب برای نواحی مکمل با ژن *HBZ* اطمینان حاصل شود (جدول۱).

استخراج DNA از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) و انجام آزمایش PCR :

در این مطالعه تجربی، افرادی که مورد بررسی قرار گرفتند شامل اهداکنندگان با نتیجه Reactive آزمایش غربالگری CLEIA برای ویروس HTLV-1/2 و نتیجه آزمایش تائیدی وسترن بلات مثبت بودند. این اهداکنندگان از نظر سایر ویروس‌های منتقله از راه خون مانند HIV، HBV، HSV

In Press

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]

جدول ۱: توالی آغازگرها و پروب مورد استفاده در TaqMan Real Time PCR

نام توالی	توالی آغازگرها و پروب ′3-′5
توالی آغازگر Forward HBZ	GGAGTCCTTGGAGGCTGAAC
توالی آغازگر Reverse HBZ	TTATTGCAACCACATCGCCTC
توالی پروب HBZ	6-FAM TCCCCTGCCAATAATTAACCTCTCC BHQ-1
توالی آغازگر Forward ERV-3	CATGGGAAGCAAGGGAACTAATG
توالی آغازگر Reverse ERV-3	CCCAGCGACCAATACAGAATTT
توالی پروب ERV-3	HEX-TCTTCCCTCGAACCTGCACCATCAAAGTCA-BHQ-1

وHCV منفی بودند. نمونه‌ها از فراخوان اهداکنندگان استان‌های خراسان رضوی، خراسان جنوبی، خراسان شمالی، آذربایجان غربی، اردبیل، البرز و گیلان بر روی ماده ضد انعقاد EDTA تهیه گردید. سپس سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به روش فایکول جدا شدند. استخراج DNA از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی اهداکنندگان آلوده به HTLV-1 با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت یکتا تجهیز آزما - ایران) انجام شد. سپس آزمایش PCR بر روی نمونه‌های مثبت جهت اطمینان از حضور ژن *HBZ* با استفاده از Master mix 2X (آمپلیکون، آلمان)(۱۰ میکرولیتر)، آغازگرها (۰/۵ میکرولیتر از هر کدام) و DNA استخراج شده (۲ میکرولیتر) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، در چرخه دمایی مشخص انجام شد (جدول ۲). سپس محصول PCR جهت تعیین توالی همراه با آغازگر جلوبرنده ژن *HBZ* به شرکت زیست فناوری پیشگام فرستاده شد.

کلونینگ محصول PCR:

محصول PCR ژن *HBZ* به وسیله کیت TOPO TA Cloning Kit (آمریکا، اینویتروژن) درون وکتور TOPO TA (PCR 2.1 TOPO) قرار گرفت و صحت کلونینگ با colony PCR سنجیده شد. پلاسمید نوترکیب به وسیله کیت رُوش (آلمان) استخراج و در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. سپس پلاسمید نوترکیب به وسیله آنزیم BamH I ، خطی شده و تعداد کپی آن بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{تعداد کپی DNA} = \frac{۶/۰۲۲ \times ۱۰^{۲۳} \times \text{OD Plasmid}}{۶۵۰ \times (۱ \times ۱۰^{۹}) \times \text{Plasmid length}}$$

$$\frac{۶/۰۲۲ \times ۱۰^{۲۳} \times ۵۸}{۶۵۰ \times (۱ \times ۱۰^{۹}) \times ۴۳۹۳} = ۱۲ \times ۱۰^{۹} \text{ copy } /\mu L$$

بهینه‌سازی و راه‌اندازی آزمایش TaqMan Real Time PCR:

با توجه به دستورالعمل مسترمیکس (Ampliqon: Cat.No: A314402)، دما، حجم و غلظت اجزاء واکنش، جهت راه‌اندازی آزمایش مورد نظر، بهینه‌سازی و تعیین شد (جداول ۳ و ۴).

جدول ۲: برنامه زمانی و دمایی در آزمایش PCR

مرحله	دما درجه سانتی‌گراد	زمان	چرخه
واسرشت اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
واسرشت(Denaturation)	۹۵	۴۵ ثانیه	۴۰
اتصال (Annealing)	۶۲	۴۵ ثانیه	
طویل سازی (Extension)	۷۲	۴۵ ثانیه	
طویل سازی نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

جدول ۳: حجم مورد نیاز برای واکنش TaqMan Real-Time PCR ژن *HBZ*

اجزا	حجم (میکرولیتر)
مستر میکس Low Rox2X	۷/۵ میکرولیتر
آغازگر جلوبرنده ژن *HBZ* (۱۰ میکرومولار)	۰/۵ میکرولیتر
آغازگر معکوس ژن *HBZ* (۱۰ میکرومولار)	۰/۵ میکرولیتر
پروب HBZ	۰/۱ میکرولیتر
آب مقطر استریل	۴/۴ میکرولیتر
DNA الگو	۲ میکرولیتر
حجم نهایی	۱۵ میکرولیتر

In Press

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]

جدول ۴: برنامه زمانی Two-step روش TaqMan Real Time PCR

چرخه	زمان چرخه	چرخه
۱	۱۵ دقیقه	۹۵ درجه سانتی‌گراد
۴۰	۴۵ ثانیه ۴۵ ثانیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد ۶۲ درجه سانتی‌گراد

در مرحله بعد جهت رسم منحنی استاندارد، از پلاسمید خطی نوترکیب رقت‌های سریالی 10^{8}-10^{1} تهیه، سپس واکنش TaqMan Real Time PCR با استفاده از آغازگرها و پروب اختصاصی ژن *HBZ* و *ERV-3* (به عنوان کنترل داخلی)، بر اساس چرخه دمایی و زمانی بهینه شده انجام گردید.

معتبرسازی (Validation) آزمایش Real Time PCR:

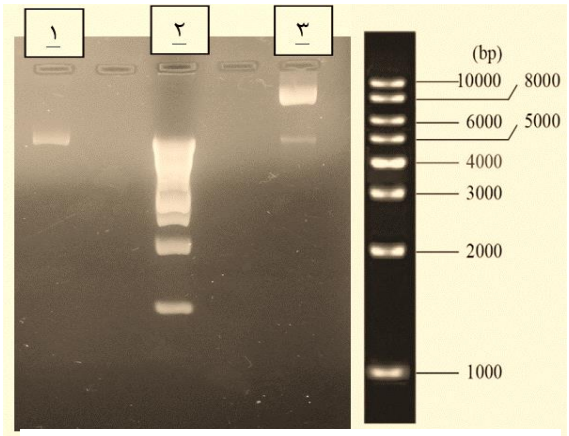
به منظور ارزیابی صحت (Accuracy) آزمایش، از استاندارد (10^{8} Copy/µL- 10^{1} Copy/µL) به صورت تکرارهای ۳ تایی در ۳ روز متفاوت استفاده شد (۱۲). جهت ارزیابی حساسیت (Analytical Sensitivity) آزمایش از استاندارد (10^{3} Copy/µL- 10^{1} Copy/µL) به صورت تکرارهای ۳ تایی در ۳ روز متفاوت استفاده شد (۱۲). برای تعیین محدوده خطی بودن نمودار تست (Linearity)، استانداردهای (10^{8} Copy/µL- 10^{1} Copy/µL) به صورت تکرارهای ۳ تایی در یک روز انجام شد (۱۲). جهت تعیین دقت (Precision) آزمایش، از استاندارد (10^{8} Copy/µL- 10^{1} Copy/µL) به صورت تکرارهای ۳ تایی در ۳ نوبت کاری متفاوت در یک روز به منظور درون‌سنجی Intra assay و تکرارهای ۳ تایی در یک نوبت کاری در ۳ روز متفاوت به منظور بین سنجی Inter assay استفاده گردید (۱۳).

به منظور ارزیابی ویژگی (Analytical Specificity) آزمایش، آغازگرها با سکانس‌های موجود در بلنک ژنی با استفاده از سرور BLAST در سایت NCBI چک و مقایسه شدند. آغازگرها از مناطق محافظت شده ژنوم HTLV-1 که با بقیه سکانس‌ها شباهت نداشته باشد، انتخاب شدند. این آغازگرها به گونه‌ای انتخاب شده بودند که با ژنوم سایر ویروس‌ها واکنش متقاطع نداشته باشند. به همین منظور از DNAهای استخراج شده ویروس‌های HBV ، HCV ، HIV، HSV و ۱۲نمونه منفی (افراد سالم) از لحاظ حضور ویروس به صورت تکرارهای ۵ تایی استفاده شد (۱۳). ارزیابی کارآیی تکثیر (Efficiency)، از طریق فرمول $E= 10^{-1/slope}$ محاسبه می‌شود. در این فرمول Slope شیب خط نمودار و E کارآیی تکثیر می‌باشد. R^2 خطی بودن نمودار را نشان می‌دهد (۱۲).

یافته‌ها

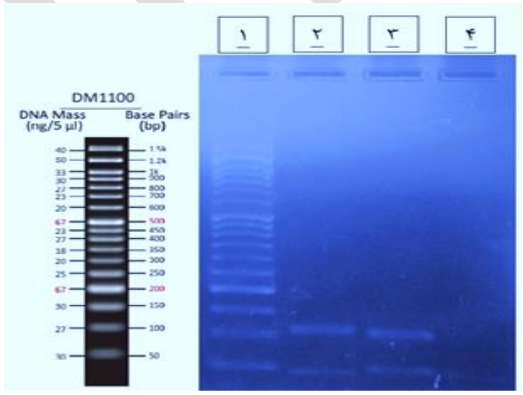
آزمایش PCR و کلونینگ ژن *HBZ*:

پس از PCR و تعیین توالی ژن مورد نظر، نتیجه تعیین توالی در پایگاه NCBI ، BLAST و تایید شد. سپس ژن *HBZ* در وکتور TOPO TA (PCR 2.1 TOPO) کلون گردید و جهت تایید کلونینگ، پلاسمید نوترکیب با روش کلونی PCR و با استفاده از آنزیم BamH I خطی شد (شکل ۱).



شکل ۱ : وکتور هضم شده با BamH I

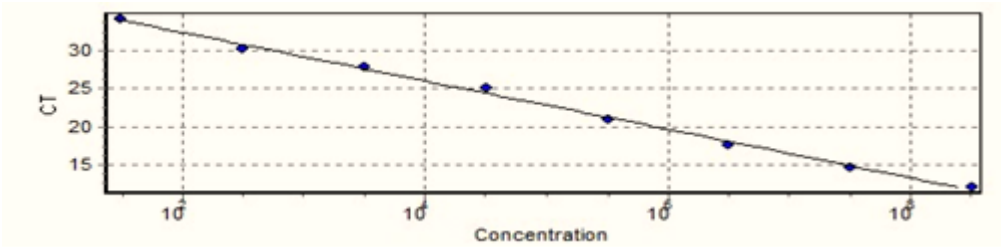
چاهک شماره ۱ مربوط به وکتور هضم شده با آنزیم BamH I ، چاهک شماره ۲ مربوط به Ladder 1kb و چاهک شماره ۳ مربوط به وکتور هضم نشده می‌باشد.



شکل ۲ الکتروفورز محصول Real-Time PCR ژن *HBZ* .

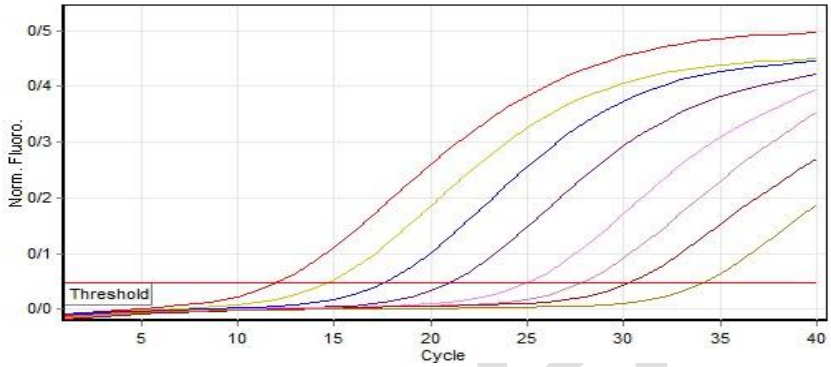
چاهک ۱ حاوی Ladder 50bp ، چاهک ۲ و ۳ شامل نمونه HTLV مثبت (باند مورد نظر، قطعه ۱۰۶bpمربوط به ژن *HBZ* را نشان می‌دهد) و چاهک ۴ مربوط به نمونه کنترل منفی می‌باشد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]



شکل ۳ : منحنی استاندارد (Standard Curve) ژن *HBZ* به روش TaqMan Real-Time PCR

شیب خط منحنی استاندارد برابر با ۳.۲- و R^2 برابر با ۰/۹۷ که نشان‌دهنده خطی بودن و کارآیی آزمایش بوده وEfficiency آن نیز ۱/۰۶ تعیین شد.



شکل ۴ : منحنی تکثیر سیگموئیدی نمونه‌های استاندارد ژن *HBZ* به روش TaqMan Real-Time PCR

نمونه‌های با غلظت بالاتر زودتر از حد آستانه (Threshold) عبور می‌کنند و Ct کمتری دارند، در حالی که نمونه‌های با غلظت کمتر دیرتر از حد آستانه عبور می‌کنند و Ct بالاتری دارند (از چپ به راست به ترتیب: رقت 10^{8} از نمونه استاندارد تا رقت 10^{1} از نمونه استاندارد).

بهینه‌سازی آزمایش TaqMan Real Time PCR :

پس از بهینه‌سازی آزمایش TaqMan Real Time PCR، نتایج آن بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شد (شکل ۲).

راه‌اندازی آزمایش TaqMan probe Real Time PCR:

پس از تهیه رقت‌های مختلف از پلاسمید خطی شده و انجام آزمایش Real Time PCR (به وسیله دستگاه Rotor Gene RG-3000)، منحنی استاندارد رسم شد. شیب خط منحنی استاندارد برابر با ۳.۲- و R^2 برابر با ۰/۹۷ بود که نشان‌دهنده خطی بودن و کارآیی آزمایش بوده وEfficiency آن نیز ۱/۰۶ تعیین شد (اشکال ۳ و ۴). نتایج تکرارپذیری واکنش در سطح درون سنجی و بین سنجی بررسی و میانگین ضریب تغییرات CV نمونه‌های استاندارد، کمتر از ۵/۳ ٪ برای اینتراسی و ۵/۹٪ برای اینتراسی بود. مشاهدات حاکی از آن بود که LOD (Limit of detection) این آزمایش برابر با $1/2 \times 10^{1}$ Copies/µL بوده که نشان‌دهنده حساسیت بالای این روش می‌باشد. LOD این آزمایش بر اساس معیارهای موجود در راهنمای FDA جهت اعتبار سنجی روش‌های بیوآنالیتیکی تعیین گردید (۱۴).

بحث

ویروس HTLV عمدتاً از طریق انتقال عمودی مادر به نوزاد در دوران شیردهی، انتقال افقی، تماس جنسی و تزریق فرآورده‌های سلولی حاوی این ویروس منتقل می‌شود (۱۵). روش‌های تشخیصی ویروس HTLV-1 عمدتاً شامل آزمایش‌های سرولوژیکی هستند که به دنبال آنتی‌بادی‌های خاص علیه آنتی‌ژن‌های مختلف HTLV-1 می‌گردند. آزمایش‌های غربالگری معمولاً شامل الایزا (ELISA) یا آگلوتیناسیون ذرات (PA) هستند. آزمایش‌های تأییدی شامل ایمونوفلورسانس (IFA) و وسترن بلات (WB) می باشد، اما عمدتاً از وسترن بلات استفاده می‌شود (۱۶). با وجود برخی بهبودها در دقت آزمایش وسترن بلات طی دو دهه گذشته، هم‌چنان الگوهای سرولوژیکی نامشخص پس از تحلیل وسترن بلات

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]

رایج هستند (۱۷). در مقاله‌های متعددی از سنجش لود ویروس به عنوان یک فاکتور پیش‌آگهی و پایش بیماران تحت درمان نام برده شده است. به همین دلیل بررسی میزان لود ویروس با استفاده از ژن‌های ....*HBZ, tax, pol* ویروس می‌تواند مزایای زیادی از جمله تشخیص و بررسی پیشرفت بیماری‌های مرتبط با ویروس HTLV-1، ارزیابی اثربخشی درمان‌های ضد ویروسی، درک بهتر از مکانیسم‌های بیماری‌زایی ویروس و در نهایت توسعه درمان‌های جدید داشته باشد (۱۸).

در مطالعه حاضر روش TaqMan Real Time PCR برای ژن *HBZ* با هدف طراحی یک روش حساس به منظور تعیین پرووایرال لود ویروس HTLV-1 طراحی و راه‌اندازی شد. بدین منظور در ابتدا جهت رسم منحنی استاندارد، از پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *HBZ* ویروس، رقت‌های لگاریتمی تهیه گردید. پس از بهینه شدن شرایط آزمایش، نتایج حاکی از آن بود که LOD این آزمایش برابر با Copies/µL ۱۰^۱ ×۱/۲ بوده که نشان‌دهنده حساسیت بالای این روش می‌باشد.

واترز و همکاران در مطالعه خود بیان کردند که آزمایش qPCR (Quantitative PCR) معتبر شده، به عنوان یک آزمایش کارآمد که قادر به اندازه‌گیری پرووایرال لود باشد و هم‌چنین قابلیت تکرارپذیری داشته باشد، مورد نیاز است. از آن جایی که هنوز یک بیومارکر اختصاصی برای پیش‌بینی پیشرفت بیماری در افراد بدون علامت وجود ندارد و از طرفی میزان آنتی‌بادی اختصاصی علیه HTLV-1 با پرووایرال لود ویروس همبستگی دارد، می‌توان از پرووایرال لود به عنوان روشی برای پیش‌بینی نتایج عفونت و پیشرفت بیماری استفاده نمود (۱۹).

مطالعه‌ای توسط مانیکی سایتمو و همکاران، جهت بررسی میزان بیان ژن *HBZ* و ارتباط آن با لود ویروس HTLV انجام شد. به منظور رسم منحنی‌های استاندارد برای تعیین میزان بیان ژن‌های *Tax* و *HBZ* ویروس HTLV-1 ، هم‌چنین ژن مرجع hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT)، cDNA تهیه‌شده از سلول‌های MT-2 آلوده به HTLV-1 که به‌صورت سریالی رقیق‌سازی شده بود، استفاده شد. در این مطالعه ضریب همبستگی یا R^2= ۰/۹۹ گزارش شد (۱۸).

مطالعه‌ای توسط کلودیا کازولی و همکاران در سال ۲۰۱۴ جهت بررسی لود ویروس HTLV-1/2 انجام شد. در این مطالعه آزمون‌های single-plex جداگانه‌ای برای ژن‌های *tax-1* از *HTLV-1* و *tax-2* و *pol-2* از *HTLV-2* طراحی شدند تا بار پرووایروسی HTLV-1 و HTLV-2 به طور کمی اندازه‌گیری شود. اختصاصیت آزمون‌های tax-2 و pol-2 با آزمایش DNA استخراج شده از سلول C۱۰، که یک رده سلولی آلوده به HTLV-۱ است و به عنوان کنترل منفی استفاده شد، تأیید گردید. در مورد آزمون HTLV-2 ، اختصاصیت با آزمایش سلول‌های C۳۴۴ که به طور پایدار به HTLV-2 آلوده هستند، بررسی شد. تعیین کمی بار پرووایروسی HTLV با انجام منحنی‌های استلندارد مرجع از طریق رقت‌سازی سریالی DNA استخراج شده از سلول‌های C۱۰ و C۳۴۴ انجام شد، با این فرض که هر سلول C۱۰ دارای یک ژنوم پرووایروسی و هر سلول C۳۴۴ دارای دو ژنوم پرووایروسی است نموداری با Slop= -۳/۴ و R^2= ۰/۹۹ رسم شد. ژن آلبومین انسانی که دارای دو نسخه در هر سلول است، برای طبیعی‌سازی نتایج در همان واکنش‌ها اندازه‌گیری شد (۲۰). در اکثر مطالعه‌هایی که مورد بررسی قرار گرفته است، جهت رسم منحنی استاندارد از رده سلولی استفاده شده بود، اما در مطالعه حاضر به دلیل عدم دسترسی به این رده سلولی، از پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *HBZ* ویروس HTLV-1 جهت رسم نمودار استاندارد استفاده شد. رسم منحنی استاندارد از طریق وکتور حاوی ژن *HBZ* نشان داد که این روش با شیب خط برابر با ۳.۲- و R^2= ۰/۹۷ و حد تشخیص ۱/۲×۱۰^۱ روشی با حساسیت و اختصاصیت بالاست که نتایج آن قابل مقایسه با نتایجی است که در آن برای رسم نمودار استاندارد از رده سلولی استفاده شده است.

در سال ۲۰۱۹ مطالعه‌ای به وسیله حمیده قاسم‌زادگان و همکاران در ایران انجام شد. این مطالعه با هدف طراحی آزمایش PCR Real Time به روش سایبرگرین جهت تعیین لود ویروس HTLV-1 با استفاده از ژن *Tax* راه‌اندازی شد. به همین منظور DNA ژنومی از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی استخراج سپس محصول PCR ژن *Tax* درون پلاسمید pTZ57 R/T قرار گرفت و با رقت‌سازی، منحنی استاندارد با شیب خط Slop =۳/۳ و R^2=۰/۹۹ رسم شد. در این مطالعه جهت طبیعی‌سازی نتایج از ژن *GAPDH* استفاده شد (۱۲).

مطالعه دیگری به وسیله هومین جی و همکاران در سال ۲۰۲۳ با هدف و توسعه و اعتبارسنجی یک آزمون TaqMan qPCR برای اندازه‌گیری بار پرووایروسی HTLV-1

In Press

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]

انجام شد. در این مطالعه جهت رسم منحنی استاندارد از PcDNA3.1(-)HTLV-1RPPH1 plasmid استفاده شد. ژن انسانی RPPH-1 و بخش‌های pol و tax از ویروس HTLV-1 با استفاده از gDNA، سلول‌های Hut۱۰۲ تکثیر و استخراج شده، سپس درون وکتور pcDNA3.1(-)-Rluc-Fluc verctor قرار گرفتند. رقت‌های سریالی از وکتور مورد نظر جهت رسم منحنی استاندارد تهیه و نموداری با slope = ۳/۲، R^2=۰/۹۹ و ۱۰۳/۰۰۳ =efficiency به دست آمد. حد تشخیص (LOD) در این مطالعه برای غلظت سلول‌های Hut۱۰۲ ، معادل ۰/۰۲۱۸ ٪ (با فاصله اطمینان ۹۵٪ بین ۰/۰۱۷۹ ٪ تا ۰/۰۲۹۸ ٪) به دست آمد. در این مطالعه جهت بررسی اختصاصیت این واکنش، gDNA استخراج‌شده از نمونه‌های منفی برای HTLV-1 (که شامل ۳ نمونه مبتلا به HBV ، ۳ نمونه مبتلا به HCV، ۳ نمونه مبتلا به Treponema pallidum، ۳ نمونه مبتلا به HIV و ۱۲ نمونه افراد سالم بودند) و هم‌چنین رده سلول‌های MOT (آلوده به HTLV-2) با استفاده از این آزمایش مورد بررسی قرار گرفتند (Hut۱۰۲ که حاوی ژنوم HTLV-1 بود به عنوان کنترل مثبت استفاده شد).

تمامی نمونه‌های منفی برای HTLV-1 و هم‌چنین رده سلولی MOT (آلوده به HTLV-2) ، تنها ژن *RPPH*۱ را با این روش تکثیر دادند که نشان‌دهنده اختصاصیت ۱۰۰٪ این واکنش می باشد (۱۳).

در هر دو مطالعه مورد بررسی، همانند مطالعه حاضر از وکتور جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شده با این تفاوت که ژن کنترل داخلی مورد استفاده در این مطالعه *ERV-3* بوده، در حالی که در سایر مطالعه‌ها از ژن‌های *GAPDH*، *RPPH1* و آلبومین به عنوان ژن مرجع استفاده شده است. هم‌چنین اکثر مطالعه‌ها، ژن‌های *Tax* و *pol* ویروسHTLV را مورد بررسی قرار دادند اما در مطالعه حاضر ژن *HBZ* جهت تعیین لود ویروس مورد بررسی قرار گرفت که این وجه تمایز مطالعه حاضر با مطالعه‌های قبلی به شمار می‌رود.

مطالعه‌های بیشتر می‌تواند به درک عمیق‌تری از عفونت‌های ویروسی و پاسخ‌های ایمنی مرتبط منجر شود. در همین راستا، پیشنهاد می‌شود ژن‌هایی از جمله *LTR* ، *Env* و سایر ژن‌های کلیدی ویروس HTLV ، به منظور تعیین بار ویروسی و بررسی ارتباط آن با بیماری‌زایی، مورد مطالعه قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

این آزمایش با دارا بودن کمترین حد تشخیص (LOD) که ۱/۲ ×$۱۰^{۱}$ Copies/µL در هر واکنش بود و هم‌چنین استفاده از ژن *HBZ* که نقش اساسی در تنظیم فعالیت‌ها و انکوژنز ویروس HTLV دارد، می‌تواند به عنوان گزینه مناسبی جهت تعیین میزان لود ویروس و ارتباط آن با بیماری‌زایی ویروس مورد استفاده قرار گیرد.

حمایت مالی

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

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر دارای کد اخلاق IR.TMI.REC.1402.016 از کمیته اخلاق مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تهران ، ایران است.

عدم تعارض منافع

نویسندگان اظهار می‌کنند هیچ‌گونه تعارض منافعی در این مطالعه وجود نداشته است.

نقش نویسندگان

ریحانه تیموری: نگارش اولیه مقاله و تحلیل اطلاعات

دکتر زهره شریفی: نظارت بر اجرای طرح پژوهشی و نگارش مقاله

دکتر مهدی آجورلو: طراحی مطالعه، نظارت بر اجرای طرح و نگارش نهایی مقاله

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ایران می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از این مؤسسه به دلیل حمایت‌های مالی، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

In Press

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]

References:

1- 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 U S A. 1980 Dec;77(12):7415-9. https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7415

2- Naderi M, Talebi S, Buyzan A, Yousefi Nojookambari N, Yazdansetad S. The Interaction of Cell-Human T-cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) in the Development of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma: The Molecular Aspects of Leukemogenesis. Razi Journal of Medical Sciences. 2022;29(6):25-37.https://rjms.iums.ac.ir/article-1-7259-en.html

3- Keikha M, Karbalaei Zadeh Babaki M, Marcondes Fonseca LA, Casseb J. The Relevance of HTLV-1-associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis in Iran: A Review Study. Reviews in Clinical Medicine. 2019;6(2):60-5.https://doi.org/10.22038/rcm.2019.38759.1266

4- Mohanty S, Harhaj EW. Mechanisms of Innate Immune Sensing of HTLV-1 and Viral Immune Evasion. Pathogens. 2023 May 19;12(5):735.https://doi.org/10.3390/pathogens12050735

5- Letafati A, Bahari M, Salahi Ardekani O, Nayerain Jazi N, Nikzad A, Norouzi F, Mahdavi B, Aboofazeli A, Mozhgani SH. HTLV-1 vaccination Landscape: Current developments and challenges. Vaccine X. 2024 Jul16;19:100525.https://doi.org/10.1016/j.jvacx.2024.100525

6- Herrmann D, Meng S, Yang H, Mansky LM, Saad JS. The Assembly of HTLV-1-How Does It Differ from HIV-1? Viruses. 2024 Sep 27;16(10):1528.https://doi.org/10.3390/v16101528

7- Enose-Akahata Y, Vellucci A, Jacobson S. Role of HTLV-1 Tax and HBZ in the Pathogenesis of HAM/TSP. Front Microbiol. 2017 Dec 21;8:2563.https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02563

8- Giam CZ, Semmes OJ. HTLV-1 Infection and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma-A Tale of Two Proteins: Tax and HBZ. Viruses. 2016 Jun 16;8(6):161. https://doi.org/10.3390/v8060161

9- El Hajj H, Bazarbachi A. Interplay between innate immunity and the viral oncoproteins Tax and HBZ in the pathogenesis and therapeutic response of HTLV-1 associated adult T cell leukemia. Front Immunol. 2022 Jul 22;13:957535. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.957535

10- Cassar O, Gessain A. Serological and Molecular Methods to Study Epidemiological Aspects of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection. Methods Mol Biol. 2017;1582:3-24. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6872-5_1

11- Caterino-de-Araujo A, Campos KR. Defective particles of human T-lymphotropic virus and negative results in molecular assays. Infect Genet Evol. 2021 Dec;96:105141. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105141

12- 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. The Scientific Journal of Iranian Blood Transfusion Organization. 2019;16(3):194-200. https://bloodjournal.ir/browse.php?a_id=1248&sid=1&slc_lang=en

13- 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 Jan 17;20(1):9. https://doi.org/10.1186/s12985-023-01970-y

14- Eusebio-Ponce E, Anguita E, Paulino-Ramirez R, Candel FJ. HTLV-1 infection: An emerging risk. Pathogenesis, epidemiology, diagnosis and associated diseases. Rev Esp Quimioter. 2019 Dec;32(6):485-496. https://seq.es/abstract/rev-esp-quimioter-2019-october-25-2/

15- Zhao J, Zhao F, Han W, Xu X, Wang L, Li R, *et al*. HTLV screening of blood donors using chemiluminescence immunoassay in three major provincial blood centers of China. BMC Infect Dis. 2020 Aug 6;20(1):581. https://doi.org/10.1186/s12879-020-05282-2

16- A Strategy for Screening and Confirmation of HTLV-1/2 Infections in Low-Endemic Areas. Front Microbiol. 2020 Jun 3;11:1151. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01151

17- Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J, Saito K , Arimura K, *et al*. *In vivo* expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). Retrovirology. 2009 Feb 19;6:19. https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-19

18- Waters A, Oliveira AL, Coughlan S, de Venecia C, Schor D, Leite AC, *et al*. Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: addressing the issue of indeterminate HTLV results. J Clin Virol. 2011 Sep;52(1):38-44. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.05.022

19- Casoli C, Pilotti E, Bertazzoni U. Proviral load determination of HTLV-1 and HTLV-2 in patients' peripheral blood mononuclear cells by real-time PCR. Methods Mol Biol. 2014;1087:315-23. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-670-2_25

20- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Silver Spring, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); May 2018. https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf

In Press

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]