Original Article

Design and In-Silico Evaluation of Specific Primers for the *HBZ* Gene of HTLV-1 to Establish a Semi-Nested PCR Method

Mehdi Zandi[1], Zohreh Sharifi[1], Mehdi Ajorloo[1]

[1]Biological Products and Blood Safety Resaerch Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Received: 2025/01/08
Accepted: 2025/03/09

http://dx.doi.org/10.61186/bloodj.22.1.19

Citation:
Zandi M, Sharifi Z, Ajorloo M. Design and In-Silico Evaluation of Specific Primers for the *HBZ* Gene of HTLV-1 to Establish a Semi-Nested PCR Method. J Iran Blood Transfus. 2025: 22 (1) : 19-29.

Correspondence: Sharifi Z, Associate professor of Biological Products and Blood Safety Resaerch Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran.
Tel: (+9821) 82052152
E-mail: *z.sharifi@tmi.ac.ir*

ABSTRACT

Background and Objectives

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is the only human oncogenic retrovirus associated with adult T-cell leukemia/lymphoma and tropical spastic paralysis. Common serological methods for detecting this virus are ELISA and Western blot. The *HBZ* gene, encoded by the negative strand of the HTLV-1 provirus, does not undergo continuous mutations, unlike other viral genes. In this study, the *HBZ* gene of HTLV-1 was used to design specific primers and develop a semi-nested PCR assay.

Materials and Methods

In a cross-sectional study, *HBZ* gene sequences from various virus isolates were extracted from the NCBI database and aligned using MEGA6 software. Using Gene Runner software, the primer design was performed from the conserved region common to all strains. To evaluate the primers, parameters such as GC content, melting temperature, hairpin, and dimer structures were used calculated by OligoAnalyzer software. To examine the exact binding site of the primers, SnapGene software was used to simulate the PCR reaction and electrophoresis. Primers were screened and synthesized using the BLASTN tool in NCBI. In the laboratory stage, genomic DNA was extracted from blood samples of HTLV-1 positive and healthy individuals and electrophoresed for Semi-nested PCR reaction and evaluation of PCR products.

Results

First, the HBZ protein coding sequences from 43 viral isolates with different geographical origins were aligned, and then primers were designed from the most similar conserved regions. The primers lacked hairpin and dimer structures. The GC percentage was between 45%-60%, and the melting temperature was between 64-67°C. BLAST results showed that the designed primers were 100% capable of identifying the target gene (HBZ), and no overlap with the genomic sequences of other viruses or humans was observed. After genomic DNA extraction and PCR, the length of the desired fragment was 493 bp in the first stage and 106 bp in the second stage, which was consistent with the predicted bioinformatics results.

Conclusions

The design of *HBZ* gene primers utilizing bioinformatics software and the successful development of a Semi-nested PCR assay were achieved. The laboratory results confirmed the bioinformatics predictions and demonstrated the effectiveness of this method for the accurate and rapid detection of the virus.

Key words: HTLV-1, Nested PCR, Leukemia

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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61186/bloodj.22.1.19]

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۲۲ شماره ۱ بهار ۱۴۰۴ (۲۹-۱۹)

مقاله پژوهشی

طراحی و ارزیابی این‌سیلیکو آغازگرهای اختصاصی ژن *HBZ* ویروس HTLV-1 جهت راه اندازی روش Semi-Nested PCR

مهدی زندی[۱]، زهره شریفی[۲] ، مهدی آجورلو[۳]

۱- کارشناس ارشد زیست فناوری ـ مرکز تحقیقات فرآورده های 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 استادیار مرکز تحقیقات فرآورده های بیولوژیک و سلامت خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۹

http://dx.doi.org/10.61186/bloodj.22.1.19

Citation:
Zandi M, Sharifi Z, Ajorloo M. Design and In-Silico Evaluation of Specific Primers for the *HBZ* Gene of HTLV-1 to Establish a Semi-Nested PCR Method. J Iran Blood Transfus. 2025: 22 (1) : 19-29.

نویسنده مسئول:
دکتر زهره شریفی. استاد مرکز تحقیقات فرآورده‌های بیولوژیک و سلامت خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
E-mail: z.sharifi@tmi.ac.ir

کد اخلاق:
IR.TMI.REC.1402.017

چکیده

سابقه و هدف

ویروس لنفوتروپیک سلول T انسانی نوع ۱ (HTLV-1)، تنها رتروویروس سرطان‌زای انسانی است که با بیماری‌های لوسمی/لنفوم سلول T بالغین و فلج اسپاستیک گرمسیری مرتبط می‌باشد. روش‌های سرولوژیکی رایج برای تشخیص این ویروس، الایزا و وسترن بلات می باشد. ژن *HBZ* ، که توسط رشته منفی پرووویروس HTLV-1 کد می‌شود، برخلاف سایر ژن‌های ویروسی، دچار جهش‌های مداوم نمی‌شود. در این مطالعه، ژن *HBZ* ویروس HTLV-1 برای طراحی آغازگرهای اختصاصی و توسعه آزمایش Semi-nested PCR مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه مقطعی، توالی ژن *HBZ* از ایزوله‌های گوناگون ویروس ازپایگاه داده NCBI استخراج شد و با نرم‌افزار MEGA6 هم‌ردیف گردید. طراحی آغازگر از ناحیه محافظت شده مشترک بین تمامی سویه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner انجام شد. جهت ارزیابی آغازگرها، پارامترهایی از قبیل درصد GC ، دمای ذوب ، ساختارهای سنجاق‌سری و دایمر از نرم‌افزارهای OligoAnalyzer و SnapGene استفاده شد. برای بررسی محل دقیق اتصال آغازگرها، جهت شبیه‌سازی واکنش PCR و الکتروفورز، از نرم‌افزارSnapGene استفاده شد. آغازگرها با استفاده از ابزار BLASTN در NCBI بررسی و سنتز شدند. در مرحله آزمایشگاهی، DNA ژنومی استخراج شده از نمونه‌های خون افراد HTLV-1 مثبت و سالم جهت واکنش Semi-Nested PCR و ارزیابی محصولات PCR ، الکتروفورز شد.

یافته‌ها

ابتدا توالی‌های کدکننده پروتئین HBZ از ۴۳ ایزوله ویروسی با منشا جغرافیایی مختلف با همدیگر هم‌ردیف شدند، سپس آغازگرها از نواحی محافظت‌شده با بیشترین شباهت طراحی شدند. آغازگرها فاقد ساختارهای سنجاق‌سری و دایمر بودند .درصد GC بین ۶۰٪-۴۵٪ و دمای ذوب بین ۶۷-۶۴ درجه سانتی‌گراد بود. نتایج BLAST نشان داد که آغازگرهای طراحی شده، ۱۰۰٪ قادر به شناسایی ژن هدف (HBZ) بوده و هم‌پوشانی با توالی‌های ژنومی سایر ویروس‌ها یا انسان‌ها مشاهده نشد. پس از استخراج DNA ژنومی و انجام PCR ، طول قطعه مورد نظر در مرحله اول، ۴۹۳ و در مرحله دوم، ۱۰۶ جفت باز بود و با نتایج پیش‌بینی شده بیوانفورماتیکی مطابقت داشت.

نتیجه گیری

طراحی آغازگرهای ژن *HBZ* با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی و توسعه آزمایش Semi-Nested PCR با موفقیت انجام شد. نتایج آزمایشگاهی، پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیکی را تایید کرده و کارآیی این روش را برای تشخیص دقیق و سریع ویروس نشان داد.

کلمات کلیدی: **HTLV-1، Nested PCR ، لوسمی**

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61186/bloodj.22.1.19]

مقدمه

ویروس لنفوتروپیک سلول T انسانی نوع ۱ (HTLV-1) به خانواده رتروویروس‌ها تعلق دارد و نخستین بار در دهه ۱۹۸۰ توسط پوئز کشف شد (۱). این ویروس با ادغام ژنوم خود در DNA میزبان، موجب عفونت‌های مزمن می‌گردد و ارتباط مستقیمی با بیماری‌های خطرناکی مانند لوسمی/لنفوم سلول T بالغین (ATL)، میلوپاتی مرتبط با HTLV-1 (HAM/TSP) و التهاب لایه میانی چشم دارد (۲). تخمین زده می‌شود ۲۵ میلیون نفر در سراسر جهان به HTLV آلوده هستند. میزان شیوع آن به‌طور ویژه در مناطق بومی مانند جنوب ژاپن، بخش‌هایی از آفریقا، آمریکای مرکزی، آمریکای جنوبی و خاورمیانه بالاست (۲). شهرهای مشهد، نیشابور و سبزوار در شمال شرقی ایران از جمله مناطق اندمیک ویروس به شمار می‌آیند (۳). انتقال ویروس از طریق راه‌های مختلفی مانند تماس جنسی، استفاده از سرنگ مشترک، انتقال خون و از مادر به نوزاد (معمولاً از طریق شیردهی) انجام می‌شود (٤). تشخیص زود هنگام و دقیق عفونت HTLV-1 برای مدیریت مؤثر بیماران و پیشگیری از گسترش آن اهمیت حیاتی دارد (۵). با این حال، روش‌های تشخیصی کنونی مانند الایزا و وسترن بلات، دارای محدودیت‌هایی از نظر حساسیت و اختصاصیت هستند. همچنین این روش‌ها در دوره کمون ویروس و در مراحل اولیه ابتلا، زمانی که تیتر آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های ویروسی قابل اندازه‌گیری نیست، کارآمد نمی‌باشند (۵). مطالعه‌های گذشته نشان داده‌اند در بسیاری از موارد، با وجود مثبت بودن نتایج الایزا، نتایج آزمایش وسترن بلات که به عنوان آزمایش تأییدی استفاده می‌شود، نامشخص گزارش شده است. این موارد نشان‌دهنده نیاز به توسعه روش‌های دقیق‌تر و حساس‌تر است (٦). روش‌های مولکولی به دلیل توانایی تشخیص مستقیم مواد ژنتیکی ویروس در ژنوم میزبان، جایگاه ویژه‌ای در تشخیص عفونت‌های ویروسی پیدا کرده‌اند. PCR ، یک روش مولکولی بسیار حساس و دقیق است که با استفاده از چرخه‌های دمایی، امکان تکثیر نواحی خاصی از DNA را فراهم می‌آورد (٦). آغازگرها در این فرآیند نقش کلیدی داشته و به عنوان نقطه شروع برای ساخت DNA عمل می‌کنند. آغازگرها به طور خاص از سمت ۳' انتهای DNA نوکلئوتیدها را اضافه می‌کنند، این ویژگی بیوشیمیایی باعث می‌شود فرآیند تکثیر به صورت دقیق و قابل کنترل انجام شود. جهت طراحی آغازگرها، انتخاب نواحی محافظت شده در ژنوم و تنظیم دقیق توالی‌ها به منظور افزایش اختصاصیت و حساسیت، از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشند. روش Nested PCR به عنوان یکی از روش‌های پیشرفته با دو مجموعه آغازگر خارجی و داخلی، توانسته است دقت و حساسیت بیشتری را در مقایسه با روش‌های معمولی PCR ارائه دهد (۷). در مطالعه‌های مختلف، آغازگرها غالباً برای ژن *Tax* ویروس طراحی شده‌اند، اما در برخی موارد به ویژه در موارد ابتلای جدید، با وجود مثبت بودن نتایج سرولوژیک، ژن *Tax* با استفاده از PCR شناسایی نشده است که می‌تواند به علت رخداد جهش‌های متعدد در این ژن باشد (۸). این امر نشان می‌دهد که بررسی چندین ناحیه از ژنوم ویروس برای افزایش دقت و اطمینان از تشخیص ضروری است.

در این مطالعه، طراحی و بهینه‌سازی آغازگرها با بهره‌گیری از نرم‌افزارهای پیشرفته بیوانفورماتیکی انجام شده است که امکان شناسایی و هدف‌گیری دقیق نواحی ژنی را فراهم کرده است. پروتئین HBZ از یک ناحیه بسیار محافظت شده رشته منفی پرووویروس HTLV-1 کد می‌شود، که افزایش بیان آن با افزایش بار پرووویروسی همراه می‌باشد. انتخاب ژن *HBZ* به دلیل نقش مهم آن در پاتوژنز و بیان آن درتمامی موارد ابتلا به لوسمی/لنفوم سلول T بالغین (ATL) و سایر بیماری‌های مرتبط با HTLV-1 انجام شده است. علاوه بر این، بیان ژن *HBZ* در حامل‌های آلوده به HTLV-1 نیز قابل تشخیص است. با توجه به اهمیت ژن *HBZ* ، در این مطالعه با استفاده از روش‌های In Silico آغازگرهای اختصاصی برای ناحیه محافظت شده ژن *HBZ* ویروس HTLV-1 طراحی گردید. جهت ارزیابی روش semi-nested PCR ، از نرم‌افزار SnapGene برای شبیه‌سازی عملکرد آغازگرها در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد و در نهایت تشخیص ویروس HTLV-1 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ناحیه محافظت شده ژن *HBZ* ویروس HTLV-1 در آزمایشگاه انجام گردید.

مواد و روش‌ها

۱- طراحی اینسیلیکو آغازگر:

نرم‌افزارهای مختلفی جهت طراحی آغازگرهای مورد استفاده در انواع واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) وجود دارد. این نرم‌افزارها کاربردهای بسیاری از جمله

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61186/bloodj.22.1.19]

تجزیه و تحلیل کامل DNA و پروتئین، پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین، طراحی آغازگر، مدل‌سازی مولکولی، توسعه استراتژی‌های شبیه‌سازی و تجزیه و تحلیل آنزیم‌های محدود کننده اندونوکلئاز دارند.

شناسایی توالی هدف:

جهت طراحی آغازگرهای اختصاصی، توالی‌های ژن *HBZ* از پایگاه داده NCBI GenBank استخراج شد. NCBI (National Center for Biotechnology Information) یکی از بزرگ‌ترین منابع اطلاعات بیولوژیکی است که دسترسی به توالی‌های ژنتیکی، داده‌های بیولوژیکی و ابزارهای تحلیل آن‌ها را فراهم می‌کند. این پایگاه داده شامل بانک گسترده‌ای می‌باشد که توالی‌های ژنی انواع ارگانیسم‌ها را ذخیره و به اشتراک می‌گذارد. علاوه بر این، این پایگاه داده به طور منظم اطلاعات خود را هر ٢٤ ساعت با دیگر پایگاه‌های داده معتبر از جمله EMBL (European Molecular Biology Laboratory) و DDBJ (DNA Data Bank of Japan) به اشتراک می‌گذارد تا داده‌ها و منابع به‌روز و جامع‌تر باشند. در این مطالعه، ٤٣ فایل توالی کامل ژن *HBZ* استخراج گردید که شامل توالی‌های مربوط به تمامی گونه‌های ویروس HTLV-1 از سراسر جهان، به ویژه گونه‌های ایرانی، برزیلی و آفریقایی بودند.

هم‌ردیفی توالی‌ها:

هم ردیفی توالی‌ها به منظور شناسایی نواحی محافظت شده و متغیر در ژنوم ویروس HTLV-1 انجام شد. این فرآیند به شناسایی سویه‌های مختلف ویروس و طراحی آغازگرهای دقیق‌تر برای آزمایش تشخیصی semi-nested PCR کمک می‌کند. در این مطالعه، با استفاده از نسخه ٦/٠ نرم‌افزار MEGA و به کمک الگوریتم ClustalW، توالی‌های کدکننده پروتئین HBZ از ٤٣ فایل مختلف با منشأهای جغرافیایی مختلف هم ردیف شدند، تا نواحی محافظت شده در این توالی‌ها شناسایی شوند. این نرم‌افزار به کمک الگوریتم‌های مختلف هم‌ردیف‌سازی مانند ClustalW و Clustal Omega ، امکان هم‌ردیف‌سازی دقیق توالی‌های DNA را فراهم می‌آورد. ClustalW یک الگوریتم مشهور برای هم‌ردیف‌سازی چند تایی توالی‌ها است که از روشی مبتنی بر مقایسه جفتی استفاده می‌کند. این الگوریتم به طور خودکار توالی‌های DNA ، RNA و پروتئین را با یکدیگر مقایسه و هم‌ردیف می‌کند تا تفاوت‌های بین آن‌ها مشخص شوند. در ClustalW ، ابتدا جفت‌های توالی با استفاده از ماتریس‌های مشابهت مقایسه می‌شوند، سپس نتیجه این مقایسه‌ها به صورت ماتریس‌های فاصله برای تمام توالی‌ها نمایش داده می‌شود. در نهایت، بر اساس این ماتریس‌ها، بهترین ترتیب هم‌ردیفی انتخاب شده که کمترین فاصله را بین توالی‌ها ایجاد کند، با استفاده از هم ردیفی٤٣ توالی استخراج شده، نواحی محافظت شده و مشترک بین تمامی سویه‌ها مشخص گردید که هدف اصلی طراحی آغازگر قرار گرفت.

طراحی آغازگرها:

پس از مشخص کردن توالی‌های مشترک حاصل از هم‌ردیفی مرحله قبل ، طراحی آغازگر برای semi- PCR nested انجام شد. در روش Nested PCR دو مجموعه آغازگر استفاده می‌شود. یک جفت آغازگر خارجی که در واکنش اول مورد استفاده قرار می‌گیرد و محصول این مرحله، جهت افزایش اختصاصیت، توسط یک جفت آغازگر داخلی که قسمت‌های درونی‌تر ژن هدف را تکثیر می‌کنند در مرحله دوم PCR می‌شوند. در روش semi-nested PCR یک آغازگر در بین هر دو مرحله به طور مشترک مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای این مطالعه یک آغازگر پیشرو خارجی، یک آغازگر پیشرو داخلی و یک آغازگر پیرو که به طور مشترک در هر دو مرحله مورد استفاده قرار می‌گیرد، طراحی گردید. تمامی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner نسخه ٥.٠.٣٣ طراحی شدند. این نرم‌افزار قابلیت‌های متنوعی برای طراحی، تجزیه و تحلیل و ویرایش توالی‌های DNA دارد. از جمله ویژگی‌های برجسته آن می‌توان به طراحی آغازگر با توجه به معیارهای مختلف مانند طول، درصد GC و دمای ذوب (Tm) اشاره کرد. نرم‌افزار Gene Runner با پیش‌بینی ساختار ثانویه (مانند ساختارهای حلقه‌ای) تأثیر زیادی در طراحی آغازگر دارد. اگر ساختارهای ثانویه به درستی پیش‌بینی شوند، می‌توان از تشکیل دایمرهای آغازگر یا تعاملات جانبی که ممکن است کارآیی یا دقت واکنش PCR را کاهش دهند، جلوگیری کرد. این قابلیت پیش‌بینی ساختاری به ویژه در طراحی آغازگرها برای نواحی پیچیده ژنی اهمیت زیادی دارد. جدول زیر آغازگرهای طراحی شده برای ژن *HBZ* جهت راه‌اندازی آزمایش semi-nested

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61186/bloodj.22.1.19]

PCR را نشان می‌دهد (جدول ۱).

جدول ۱: توالی آغازگرهای طراحی شده برای ژن HBZ ویروس HTLV-1

توالی آغازگرهای طراحی شده		طول قطعه تکثیر شونده
پیشرو خارجی	5'-GCTTGACGGTTTGCTATCCTTA-3'	٤٩٤ bp
پیشرو داخلی	5'-GGAGTCCTTGGAGGCTGAAC-3'	١٠٦ bp
پیرو مشترک	5'-TTATTGCAACCACATCGCCTC-3'	–

ارزیابی آغازگرها:

آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار OligoAnalyzer تحلیل شدند. این نرم‌افزار به بررسی پارامترهای مهمی مانند دمای ذوب (Tm)، تشکیل ساختارهای سنجاق سری (Hairpin)، و ایجاد دایمر (Self-dimerization) پرداخت. عدم تطابق در توالی آغازگر (Mismatch) و هدف یکی از عوامل مهم کاهش کارآیی واکنش PCR است، به ویژه در ناحیه ۳' آغازگر که برای اتصال و عملکرد صحیح پلیمراز ضروری است. در این مطالعه، آغازگرهای طراحی شده به منظور ارزیابی عدم تطابق با استفاده از ابزار OligoAnalyzer بررسی شدند. این ابزار امکان شناسایی هرگونه اتصال غیر اختصاصی، ساختارهای ثانویه، و ناسازگاری‌های احتمالی را فراهم کرد. هم‌چنین در این مطالعه، به منظور بررسی اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده، از ابزار تحت وب NCBI- blastn استفاده گردید (جدول ۲).

توالی‌های آغازگرهای طراحی شده وارد این ابزار شدند و در برابر بانک داده‌های ژنومی موجود در NCBI بررسی شدند. هدف از این تجزیه و تحلیل، اطمینان از هم‌ردیفی آغازگرها با ژن هدف (*HBZ*) و شناسایی نواحی غیر اختصاصی احتمالی بود.

در نهایت، از نرم‌افزار SnapGene نسخه ۷.۲.۱ برای شبیه‌سازی عملکرد آغازگرها در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد. قابلیت شبیه‌سازی ژل الکتروفورز این نرم‌افزار، برای بررسی طول قطعات تکثیر شده با آغازگر به کار رفت. این ویژگی امکان پیش‌بینی دقیق محصول PCR و مقایسه آن با نتایج واقعی آزمایشگاهی را فراهم کرد.

جدول ۲: خصوصیات آغازگرهای طراحی شده برای ژن HBZ ویروس HTLV-1

آغازگر	طول قطعه	دمای ذوب	GC%
پیشرو خارجی	٢٢ bp	٦٦/٤	٪ ٤٥/٥
پیشرو داخلی	٢١ bp	٦٤/٩	٦٠٪
پیرو مشترک	٢١ bp	٦٧/٨	٪ ٤٧/٦

۲- بررسی در آزمایشگاه:

ساخت و ذخیره‌سازی آغازگرها:

برای اطمینان از صحت آغازگرها، اطلاعات مربوط به توالی آن‌ها پیش از ساخت دوباره مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت، آغازگرهای طراحی شده، ساخته شدند (شرکت ندای فن، تهران، ایران). پس از ساخت، آغازگرها با غلظت مشخصی (۱۰۰ میکرومولار) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند تا از تخریب و کاهش کارآیی آن‌ها در فرآیندهای بعدی جلوگیری شود.

استخراج DNA از نمونه‌ها:

در این مطالعه، از ۵ نمونه خون اهداکننده HTLV-1 منفی، ۵ نمونه خون اهداکننده HTLV-1 مثبت که غربالگری اولیه برای شناسایی ویروس HTLV-1 با استفاده از آزمایش ELISA انجام شده بود و نتایج این آزمایش توسط روش وسترن بلات با کیت دیاگنوستیکا MP تأیید گردیده بود و ٤ نمونه مربوط به افراد مبتلا به سایر ویروس‌های انسانی(HIV ، HCV ، HBV و HSV)، استفاده شد. DNA ژنومی از بافی‌کوت نمونه خون افراد در لوله‌های حاوی EDTA با استفاده از کیت DNJia plus Blood and Cell kit (LOT: 506923112710040) تولید شرکت روژه تکنولوژی استخراج شد. غلظت DNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر نانو دراپ اندازه‌گیری گردید.

انجام واکنش PCR:

واکنش PCR با استفاده از مستر میکس آماده از شرکت آمپلیکون (دانمارک) و به وسیله آغازگرهای طراحی و سنتز شده انجام شد. مقدار DNA الگو در هر واکنش به صورت دقیق تنظیم گردید. برای بهینه‌سازی دمای اتصال آغازگرها و جلوگیری از اتصال غیر اختصاصی، از تنظیمات ترموسایکلر با گرادیان شیب غلظتی و

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61186/bloodj.22.1.19]

روش Touchdown PCR استفاده شد. این روش به صورت مرحله‌ای دما را کاهش داد. در ابتدا دمای بالا را برای افزایش اختصاصیت آغازگرها به کار گرفته و در نهایت دما بهینه تثبیت گردید.

مراحل دمایی برای هر دو مرحله از واکنش semi-nested PCR مشابه بود و شامل واسرشت اولیه، چرخه‌های تکراری واسرشت، اتصال و گسترش و در نهایت گسترش نهایی بود. برای دستیابی به نتایج دقیق و قابل‌اعتماد، تنظیمات دمایی و غلظت‌ها بر اساس آزمایش‌های متعدد اولیه، تعیین و بهینه‌سازی گردید (جداول ۳ و ٤).

جدول ۳: حجم مواد مورد نیاز در هر دو مرحله آزمایش semi-nested PCR

مواد	حجم
مستر میکس آمپلیکون ۲x	۱۰ میکرولیتر
آغازگر جلوبرنده (۱۰ میکرومولار)	۰/۵ میکرولیتر
آغازگر معکوس (۱۰ میکرومولار)	۰/۵ میکرولیتر
آب مقطر استریل	۷ میکرولیتر
DNA الگو (۱۰۰–۱ نانوگرم)	۲ میکرولیتر
حجم نهایی	۲۰ میکرولیتر

جدول ٤: برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر برای هر دو مرحله آزمایش semi-nested PCR

مرحله	دما	زمان	تعداد چرخه
دناتوراسیون اولیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۵ درجه سانتی‌گراد	٤۵ ثانیه	٤۰
آنیلینگ	٦۲ درجه سانتی‌گراد	٤۵ ثانیه	
گسترش	۷۲ درجه سانتی‌گراد	٤۵ ثانیه	
گسترش نهایی	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه	۱

تحلیل محصول PCR:

محصولات PCR جهت بررسی صحت و کیفیت، تحت تحلیل ژل الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ ٪ قرار گرفتند. برای جداسازی قطعات، از ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ٤۵ دقیقه استفاده شد.در مرحله اول semi-nested PCR، که طول قطعه مورد نظر ٤۹۳ جفت باز بود، محصولات با استفاده از نشانگر ۱۰۰ bp الکتروفورز شدند. در مرحله دوم، به دلیل کوتاه‌تر بودن قطعه (۱۰٦ جفت باز)، نشانگر ۵۰ bp برای ارزیابی به‌کار رفت.جهت آشکارسازی، از رنگ Green Viewerاستفاده شد که در مرحله آماده‌سازی ژل به آن افزوده شده بود. بررسی نهایی نتایج با دستگاه ژل داک و نرم‌افزار مربوطه انجام شد.

یافته‌ها

۱- نتایج بیوانفورماتیکی:

برای بررسی شباهت‌ها و تفاوت‌های توالی‌ها، از ابزار هم ردیفی چندتایی MEGA6 استفاده شد. نتایج هم‌ردیفی نشان داد که ناحیه مورد نظر برای طراحی آغازگرها در ژن *HBZ* پس از هم ردیفی بیشترین شباهت را در میان ٤۳ توالی مختلف داشت. این ناحیه به دلیل حفظ ویژگی‌های بیولوژیکی در گونه‌های مختلف ویروس، به‌عنوان توالی هدف انتخاب شد (شکل ۱). پس از انتخاب ناحیه هدف، طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner (ver.5.0.33) انجام شد و ویژگی‌های آن‌ها شامل دمای ذوب(Tm) ، طول آغازگر، غلظت GC و ساختار ثانویه بررسی گردید. به منظور ارزیابی بیشتر آغازگرهای طراحی شده، آغازگرها با استفاده از ابزار blastn در پایگاه داده NCBI بررسی شدند. نتایج BLAST نشان داد که این آغازگرها هم‌پوشانی قابل‌توجهی با توالی‌های ژنومی سایر ویروس‌ها یا انسان‌ها ندارند. به ویژه در مقایسه با ویروس‌های هم‌خانواده یا مشابه، تطابقی با توالی‌های غیر هدف پیدا نشد.

این نتیجه نشان‌دهنده دقت بالا و خاصیت انتخابی آغازگرها برای شناسایی دقیق ویروس HTLV-1 بود. جهت پیش‌بینی عملکرد PCR ، از نرم‌افزار SnapGene استفاده شد. در این مرحله، نقشه PCR برای هر دو مرحله semi-nested PCR طراحی گردید. برای مرحله اول که طول قطعه هدف ٤۹۳ نوکلئوتید بود، پیش‌بینی نرم افزار نشان داد که محصول PCR در شرایط آزمایشگاهی به درستی تکثیر خواهد شد. هم‌چنین مرحله دوم، که هدف ۱۰٦ نوکلئوتید بود، به دقت شبیه‌سازی شد (شکل ۳).

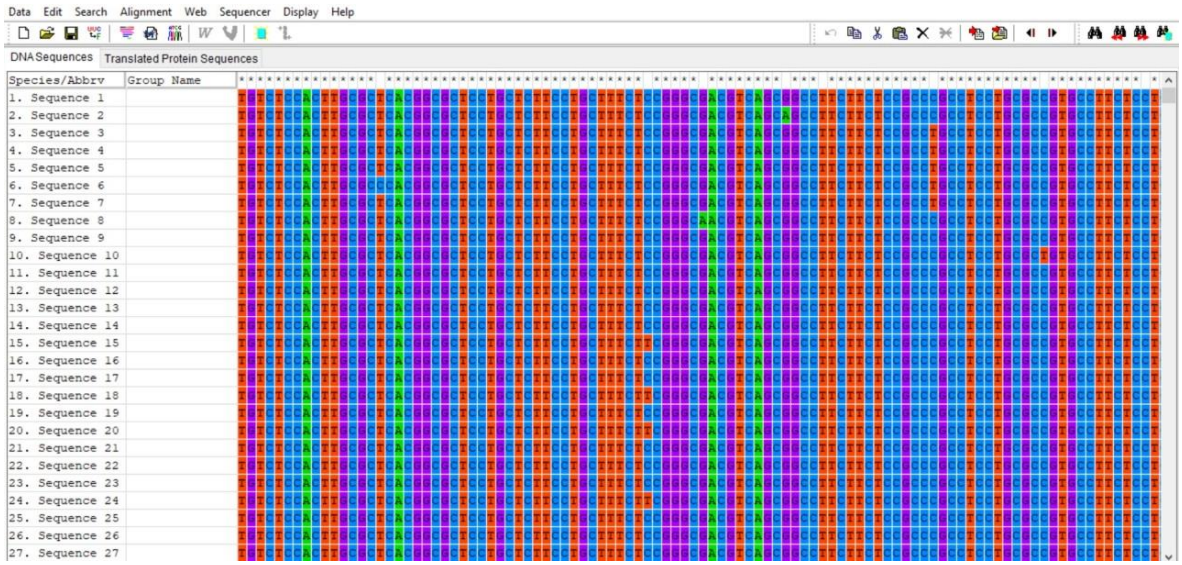
۲- نتایج آزمایشگاهی:

نتایج آزمایشگاهی تأیید کرد که باندهای مورد نظر در ژل الکتروفورز برای نمونه‌های مثبت در هر دو مرحله

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61186/bloodj.22.1.19]

PCR قابل شناسایی‌اند. در مرحله اول، باند مربوط به قطعه ٤٩٣ جفت بازی و در مرحله دوم، باند مربوط به قطعه ١٠٦ جفت بازی به وضوح شناسایی شدند (شکل ٤). نمونه مثبت به طور صحیح در هر دو مرحله PCR مثبت تشخیص داده شدند و این امر صحت و دقت بالای روش طراحی شده را تأیید کرد. همچنین، در آزمایش بر روی نمونه‌های منفی که شامل نمونه‌های اهداکنندگان سالم که از نظر ویروس HTLV-1 منفی بودند همچنین نمونه‌های افراد مبتلا به سایر ویروس‌های انسانی(HIV ، HCV ، HBV و HSV) نتایج تمامی موارد منفی گزارش شد، که نشان‌دهنده ویژگی بالای آزمایش و عدم تقاطع با ویروس‌های دیگر بود.

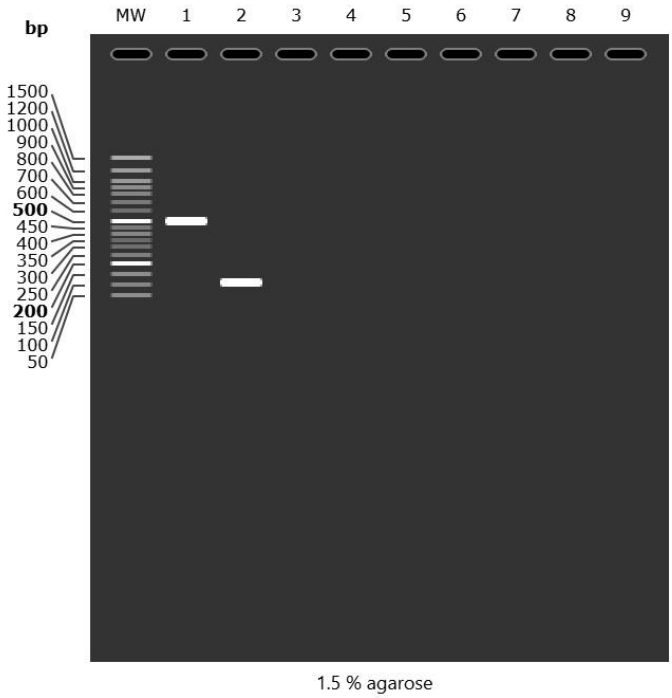


شکل ۱: نتایج هم‌ردیفی ژن *HBZ* با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 . بر اساس هم‌ردیفی توالی‌های حفاظت شده در تمام ایزوله‌ها برای طراحی آغازگر انتخاب شدند.

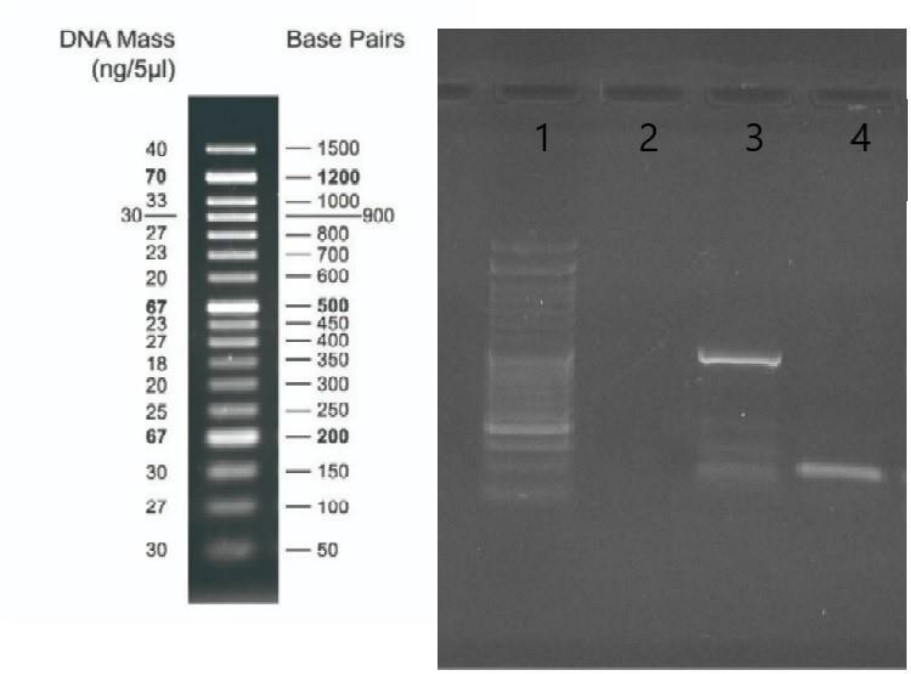
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☑	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(50) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453097.1
☑	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(65) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453132.1
☑	Human T-cell leukemia virus type I isolate MhD ATL3, complete genome	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	9035	MH399767.1
☑	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(39) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453098.1
☑	Human T-cell leukemia virus type I isolate ATL MhD1, complete genome	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	9035	MH392265.1
☑	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(2) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453143.1
☑	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(37) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453140.1
☑	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(5) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453103.1
☑	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(77) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453126.1
☑	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(87) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453122.1
☑	Human T-cell leukemia virus type I isolate MhD ATL5, complete genome	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	9035	MH399769.1
☑	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(45) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453128.1
☑	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(16) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453099.1
☑	Human T-cell leukemia virus type I isolate MhD ATL2, complete genome	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	9035	MH395864.1
☑	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(92) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	809	809	80%	0.0	99.77%	621	MN453137.1
☑	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(88) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	806	806	82%	0.0	99.11%	621	MN453121.1

شکل ۲: نتایج بلاست آغازگرهای طراحی شده برای ژن *HBZ* توسط نرم‌افزارآنلاین NCBI-BLAST . همان طور که در شکل مشاهده می‌شود، آغازگرهای طراحی شده با بیش از ۹۹٪ موارد ژن *HBZ* ویروس HTLV-1 تشابه داشتند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61186/bloodj.22.1.19]



شکل۳: تصویر ارائه شده توسط نرم‌افزار SnapGene ، شبیه‌ساز ژل الکتروفورز محصول هر دو مرحله آزمایش semi-nested PCR باآغازگرهای طراحی شده در کنار نشانگر bp ۵۰، ستون ۱ مربوط به قطعه ٤٩٣ جفت بازی مرحله اول و ستون ۲ مربوط به قطعه ۱۰٦ جفت بازی مرحله دوم آزمایش semi-nested PCR.



شکل ٤: تصویر ژل الکتروفورز محصول هر دو مرحله آزمایش semi-nested PCR با آغازگرهای طراحی شده از چپ به راست ستون اول مربوط به نشانگر bp ۵۰ ، ستون دوم مربوط به قطعه ٤٩٣ جفت بازی مرحله اول و ستون سوم مربوط به قطعه ۱۰٦ جفت بازی مرحله دوم آزمایش semi-nested PCR

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61186/bloodj.22.1.19]

بحث

این مطالعه پتانسیل استفاده از ژن *HBZ* را به عنوان یک هدف کارآمد جهت تشخیص ویروس HTLV-1 نشان داد و می‌تواند در طراحی آزمایش‌های PCR کمی و کیفی به کار رود. هم‌چنین، این مطالعه استفاده از روش semi-nested PCR راه‌اندازی شده را به عنوان یک ابزار تشخیصی حساس و اختصاصی جهت بررسی پرووِیروس HTLV-1 پیشنهاد می‌کند. در هر دو مرحله آزمایش PCR ، محصول تولیدی در اندازه‌های پیش‌بینی شده (۴۹۳ و ۱۰۶ جفت باز) در تمام نمونه‌های مثبت مشاهده شدند، در حالی که در تمامی نمونه‌های منفی و نمونه‌های حاوی سایر ویروس‌های شایع انسانی هیچ واکنش مثبتی دیده نشد.

در بسیاری از مطالعه‌ها، طراحی آغازگرها به عنوان ابزاری مهم برای تشخیص دقیق عفونت‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته است. از آغازگرها در شناسایی ویروس‌ها و باکتری‌ها از طریق روش‌های مبتنی بر PCR استفاده می‌شوند. در مطالعه‌ای که توسط بیگوم و همکاران منتشر شده است، به طراحی آغازگرهای ویژه برای شناسایی انواع مختلف ویروس دلتا SARS-CoV-2 پرداخته‌اند. در این مطالعه با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی توالی‌های محافظت‌شده ژنوم ویروس را شناسایی کرده و به طراحی آغازگرهای مناسب برای تشخیص سریع‌تر این ویروس پرداخته اند. هم‌چنین از داده‌های بیوانفورماتیکی برای بهینه‌سازی انتخاب آغازگرها استفاده کردند تا دقت و حساسیت آزمون PCR بهبود یابد (۹).

این مطالعه از نظر استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی و طراحی آغازگرهای هدفمند، مشابه مطالعه کنونی بود و در هر دو مطالعه، هدف ارتقاء دقت تشخیص از طریق طراحی آغازگر برای نواحی محافظت شده ژنوم ویروس بود. اما تفاوت اصلی هدف این دو مطالعه در این است که بیگوم و همکاران، بیشتر بر روی انتخاب آغازگرهایی برای شناسایی و تمیز دادن انواع مختلف ویروس دلتا SARS-COV-2 تمرکز کرده‌اند، در حالی که در مطالعه ما، هدف طراحی آغازگر برای ناحیه ژنومی HBZ ویروس HTLV-1 بود، که در طول زمان کم تر در معرض جهش قرار می‌گیرند و شناسایی دقیق آن می‌تواند چالش‌های مرتبط با تشخیص قطعی ویروس HTLV-1 را برطرف کند.

در مطالعه‌ای که توسط ساندرا گالگو و همکاران انجام شد، از ژن‌های tax/rex برای شناسایی پرویروس‌های HTLV-1 و HTLV-2 در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی استفاده شد. این مطالعه نشان داد که آزمایش Nested PCR دقت و حساسیت بالاتری در شناسایی این ویروس‌ها نسبت به روش‌های دیگر PCR دارد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از آزمایش Nested PCR می‌تواند به ویژه برای تشخیص HTLV در مناطق غیر اندمیک با بار ویروسی پایین و در بیماران با علائم خفیف یا مراحل اولیه عفونت بسیار مفید باشد. هم‌چنین، این روش در مقایسه با PCR تک مرحله‌ای توانایی تشخیص دقیق‌تر پرووِیروس را در نمونه‌هایی با غلظت کم DNA و حتی نمونه‌هایی با جواب‌های وسترن بلات نامشخص فراهم می‌کند (۱۰).

در مطالعه‌ای که توسط کاترینو دو اروجو و همکاران انجام شد، در ۶۹ نمونه خون ژن‌های LTR ،env و TAX ویروس HTLV با آزمایش PCR ارزیابی گردید. نتیجه این مطالعه نشان داد در برخی از موارد در نمونه‌هایی که جواب وسترن بلات نامشخص دارند، ژن TAX قابل شناسایی نبوده و می‌تواند علت ایجاد جواب منفی کاذب و یا نامشخص باشد، در حالی که سایر ژن‌های ویروسی به طور حفاظت شده وجود دارند و در نتیجه برای تشخیص ویروس HTLV نیاز است که بیش از یک بخش از ناحیه ژنی ویروس را جستجو کرد (۸).

بیشتر روش‌های مولکولی تشخیصی HTLV-1 بر اساس شناسایی ژن‌هایی هم‌چون *TAX* و *LTR* طراحی شده‌اند که به دلیل نقش اساسی این ژن‌ها در تکثیر و پاتوژنز ویروس، در شناسایی ویروس بسیار مفید هستند. با این حال، استفاده از این ژن‌ها در تشخیص HTLV-1 محدودیت‌هایی دارد که می‌تواند بر دقت و حساسیت نتایج تأثیر بگذارد. انتخاب ژن‌های LTR و env به عنوان مناطقی جهت طراحی آغازگر ممکن است اختصاصیت لازم را نداشته باشد و استفاده از این نواحی با احتمال ایجاد واکنش متقاطع با سایر رتروویروس‌ها همانند HIV-1 همراه می‌باشد که می‌تواند دقت نتایج را کاهش دهد. هم‌چنین در مواردی با بارویروسی پایین ممکن است عملکرد ضعیفی داشته باشد. در حال حاضر آزمایش‌های تشخیصی PCR کمی و کیفی اکثراً بر پایه تشخیص و تکثیر ژن *TAX* ویروس HTLV-1 ، طراحی شده‌اند. اگر چه این ژن مختص ویروس HTLV بوده و انتظار می‌رود که ژنوم ویروس با اختصاصیت بالا تکثیر شود، مطالعه‌های قبلی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61186/bloodj.22.1.19]

نشان داده‌اند که در مواردی ژن *TAX* توسط روش‌های مولکولی قابل شناسایی نیست که می‌تواند منجر به تولید نتایج منفی کاذب یا نامشخص گردد (۱۱، ۸).

با توجه به این مشکلات، استفاده از ژن‌های دیگری که در برابر جهش‌های توالی مقاوم‌تر هستند و کمتر تحت تأثیر تغییرات قرار می‌گیرند، می‌تواند در افزایش دقت و حساسیت روش‌های تشخیصی مؤثر باشد. یکی از این ژن‌ها، *HBZ* می‌باشد. پروتئین HBZ از روی رشته منفی پروویروس کد می‌شود و به طور ثابت در طول عفونت ویروسی بیان می‌گردد. این خصوصیات باعث شده‌اند که ژن *HBZ* به عنوان یک هدف مناسب برای طراحی آغازگرها در تشخیص HTLV-1 مورد توجه قرار گیرد. در این مطالعه، به منظور بهبود دقت تشخیص و رفع مشکلات مربوط به جهش‌ها و میس‌مچ‌های موجود در آغازگرهای طراحی شده برای ژن‌های *TAX* و *LTR* ، از ژن *HBZ* به عنوان هدف اصلی برای طراحی آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. پیشنهاد می‌شود در مطالعه‌های آینده، بررسی آغازگرهای طراحی شده، در مقیاس‌های بالینی و در جمعیت‌های بزرگ‌تر انجام شود. هم‌چنین، بررسی پرووایرال لود و بیان ژن *HBZ* در نمونه‌های افراد مبتلا می‌تواند در درک بهتر دلایل ایجاد جواب‌های نامشخص آزمایش وسترن بلات مفید باشد.

نتیجه‌گیری

استفاده از ژن *HBZ* برای تشخیص عفونت ویروس HTLV ، به دلیل نقش آن در پاتوژنز ویروس و خصوصیات منحصر به فرد آن، به عنوان نقطه تمایز این مطالعه با تحقیقات پیشین که سایر بخش‌های ژنوم ویروس را بررسی کرده‌اند، است. نتایج به دست آمده در هر دو مرحله بررسی اینسیلیکو و بررسی در محیط آزمایشگاه نشان می‌دهد که آغازگرهای طراحی شده برای ژن *HBZ* قادر به شناسایی ژن هدف بوده و در تمایز نمونه‌های مثبت از منفی کارآمد است. هم‌چنین آزمون semi-nested PCR طراحی شده در این مطالعه می‌تواند به عنوان یک روش مؤثر برای شناسایی عفونت ویروس HTLV مورد استفاده قرار بگیرد.

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 به تأیید کمیته اخلاق مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون رسیده است (کد اخلاق: IR.TMI.REC.1402.017).

عدم تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافعی در مطالعه حاضر وجود نداشته است.

نقش نویسندگان

مهدی زندی: نگارش اولیه مقاله و تجزیه و تحلیل اطلاعات

دکتر زهره شریفی: طراحی مطالعه، نظارت بر اجرای طرح و نگارش نهایی مقاله

دکتر مهدی آجورلو: نظارت بر اجرای طرح پژوهشی و نگارش مقاله

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد زیست فناوری مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی انتقال خون ایران است. بدین وسیله از این مؤسسه به خاطر حمایت‌های مالی آن تشکر می‌شود.

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 1980;77(12):7415-9. [DOI:10.1073/pnas.77.12.7415] [PMID]

2- Baratella M, Forlani G, Raval GU, Tedeschi A, Gout O, Gessain A, *et al*. Cytoplasmic Localization of HTLV-1 HBZ Protein: A Biomarker of HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). PLoS egl Trop Dis 2017;11(1):e0005285. [DOI:10.1371/journal.pntd.0005285] [PMID]

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61186/bloodj.22.1.19]

3- Hedayati-Moghaddam MR. A Systematic Review for Estimation of HTLV-I Infection in the Blood Donors of Iran. Iran J Basic Med Sci. 2013;16(3):196-201.
4- 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. [DOI:10.1038/sj.onc.1208968] [PMID]
5- Kia V, Forouzandeh Moghadam M, Paryan M, Raz A, Mirab cation of HBV and HTLV-I viruses by Melting curve Samiee S. Simultaneous detection and identifi analysis ofmultiplex Real-time PCR. Molecular and Biochemical Diagnosis Journal 2014;1(1):51-8.
6- Cánepa C, Salido J, Ruggieri M, Fraile S, Pataccini G,Berini C, *et al*. Low Proviral Load is Associated with Indeterminate Western Blot Patterns in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infected Individuals: Could Punctual Mutations be Related? Viruses 2015;7(11):5643-58. [DOI:10.3390/v7112897] [PMID]
7- Green MR, Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). Cold Spring Harb Protoc. 2019 Feb 1;2019(2). [DOI:10.1101/pdb.prot095182] [PMID]
8- Caterino-de-Araujo A, Campos KR. Defective particles of human T-lymphotropic virus and negative results in molecular assays. Infect Genet Evol 2021;96:105141. [DOI:10.1016/j.meegid.2021.105141] [PMID]
9- Begum KT, Wnaiza J, Absar N, Az S. In Silico Primer Design for Accurate Detection of SARS-CoV-2 Delta Variants. JBCG 2022;5:104. [DOI:10.17303/jbcg.2022.5.104]
10- Gallego S, Mangano A, Gastaldello R, Sen L, Medeot S. Usefulness of a Nested-polymerase chain reaction for molecular diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I/II. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004 Jun;99(4):377-80. [DOI:10.1590/S0074-02762004000400006] [PMID]
11- Blanco S, Frutos MC, Balangero MC, Gallego SV. Human T-Lymphotropic virus type 1 infection in absence of tax gene: A challenge for molecular diagnosis. Infect Genet Evol 2021;90:104765. [DOI:10.1016/j.meegid.2021.104765] [PMID]

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61186/bloodj.22.1.19]