



روش‌های رایج برای تشخیص ویروس لنفوتروپیک T انسانی نوع یک (HTLV-1)

فرخنده زبیدی^۱، منیره بلوری نژاد^۱، مجید درودی^{۱،۲،۳*}

۱- گروه بیوتکنولوژی پزشکی و نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲- مرکز تحقیقات پزشکی هسته ای دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۳- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی نیشابور، نیشابور، ایران

چکیده

نوع مقاله: مروری

مقدمه

ویروس انسانی لنفوتروپیک سلول T نوع ۱، اولین انکوویروس پوشش‌دار انسانی است که می‌تواند لنفومای لنفوسیت T بزرگسالان و فلج اسپاسمی موضعی مرتبط با HTLV-1 را به عنوان عارضه جدی عفونت نشان دهد. حدود ۲۰ میلیون نفر در سراسر جهان به ویروس HTLV-1 آلوده هستند. از آنجا که بیشتر افراد ناقل این ویروس بدون علائم بیماری هستند، شناسایی سریع ویروس برای تشخیص، درمان، و مختل کردن روند انتقال و گسترش ضروری می‌باشد. این ویروس با استفاده از تکنیک‌های ژنتیکی و سرولوژیکی شناسایی شده است. روش اصلی غربالگری، سنجش ایمونوسوربنت متصل به آنزیم (ELISA) است که معمولاً با آزمایش‌های تأییدی با استفاده از روش‌های وسترن بلات (WB) و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) دنبال می‌شود. در این مطالعه، روش‌های مختلفی برای تشخیص عفونت HTLV-1 مرور و بررسی شدند. پرکاربردترین روش‌ها برای تشخیص ویروس HTLV-1 در میان تمام تکنیک‌های ثبت شده، آزمایش‌های سرولوژیکی و مولکولی هستند. بدون آزمایش‌های تأییدی، تکنیک الایزا محدودیت‌های زیادی دارد که قابلیت اطمینان به یافته‌ها را کاهش می‌دهد. تجزیه و تحلیل بیشتر این روش‌ها با توجه به فراوانی HTLV-1 و محدودیت‌های تکنیک‌های تشخیص موجود، مورد نیاز است. اکنون می‌توان از نوآوری‌های فنی پیشرفته مانند حسگرهای زیستی برای انجام تشخیص HTLV-1 استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها

ویروس لنفوتروپیک T انسانی نوع یک، HTLV-1، حسگرهای زیستی، روش‌های مولکولی، روش‌های سرولوژیکی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۵/۹

*نویسنده مسئول: مجید درودی،

گروه علوم پایه پزشکی نیشابور،

دانشگاه علوم پزشکی، نیشابور، ایران

تلفن: +98 9153064830

پست الکترونیک:

majiddarroudi@gmail.com



مقدمه

ویروس انسانی لنفوتروپیک سلول T نوع یک اولین انکورترتروویروس^۱ پوشش‌دار انسانی از خانواده رتروویریده^۲ است که سلول‌های لنفوسیت نوع T انسان را آلوده می‌کند و کشف و جداسازی آن در آزمایشگاه Robbert Gall و همکارانش^۳ در سال ۱۹۸۰ گزارش شد (۱). پس از آن سه نوع دیگر از خانواده‌ی HTLV شناسایی شدند که HTLV-2، HTLV-3 و HTLV-4 نام دارند (۲). اهمیت این ویروس به دلیل ارتباط آن با دو بیماری مهم نظیر لوسمی و لنفومای لنفوسیت T در بزرگسالان^۴ و فلج-ضعف اسپاسمی موضعی وابسته به HTLV-1^۵ می‌باشد (۳). این ویروس پوشش‌دار است و اندازه آن حدود ۸۰ تا ۱۰۰ نانومتر می‌باشد و یکی از اعضای خانواده رتروویروس‌ها و جنس دلتا رتروویروس است. سطح ویروس HTLV-1، با پوشش پروتئینی متشکل از دو زیر واحد که از فراورده‌های ژنی *ENV* می‌باشد، پوشیده شده است. هر ویرون از دو زنجیره RNA مشابه به اندازه ۷ تا ۱۲ کیلو باز تشکیل شده است (۱). ژنوم ویروس HTLV-1 دیپلوئیدی است و شامل دو نسخه یکسان از RNA تک‌ رشته‌ای با قطبیت مثبت نسبت به هم می‌باشد. طول ژنوم پروویروسی HTLV-1، ۹ کیلو باز است و حاوی ژن‌های ساختاری *GAG*، *POL* و *ENV* است که با توالی‌های تکراری در هر دو انتهای ۵' و ۳' احاطه شده اند (۵). ژنوم HTLV-1 همچنین دارای یک ناحیه *PX* شامل شش فریم خوانش است: پنج فریم در رشته مثبت و یکی در رشته منفی. از این شش ژن، *TAX*، *REX* و *HBZ* به عنوان پروتئین‌های تنظیمی، نقش کلیدی در عفونت و تکثیر HTLV-1 دارند (۶، ۷). *TAX* یک پروتئین فعال کننده ترجمه ژنی است و *REX* نیز در انتقال

mRNA ویروس از هسته به سیتوپلاسم نقش دارد. سایر ژن‌های تنظیم‌کننده *P8*، *P12*، *P13* و *P30* در سطوح بسیار پایین بیان می‌شوند و پروتئین حاصل از آن‌ها نقش جزئی در رونویسی HTLV-1 در داخل بدن دارد (۷، ۸).

تکثیر در سلول میزبان، عفونت‌زایی ویروس HTLV-1 و پاسخ سیستم ایمنی

ویروس HTLV-1 مانند سایر رتروویروس‌ها، با ورود به سلول میزبان، با کمک آنزیم ترنسکریپتاز معکوس^۵ ویروسی و یک پرایمر tRNA سلولی که به همراه ژنوم از قبل درون ویرون گردهمایی شده است، تبدیل به DNA دورشته‌ای شده و سپس cDNA آن‌ها، به وسیله آنزیم اینتگراز (*Int*) درون DNA کروموزومی سلول میزبان الحاق می‌شوند که در این حالت پروویروس^۶ نامیده می‌شوند (۹، ۱۰). در ادامه، RNAهای ژنومی و mRNA و پروتئین‌های ویروس با استفاده از DNA پروویروسی الحاق شده، برای تولید ویرون‌های پروژنی به کار گرفته می‌شوند. از آن جا که ژنوم رتروویروس‌ها به وسیله ماشین رونویسی میزبان تولید می‌شود، بسیاری از ویژگی‌های mRNA طبیعی چون ساختار *cap* در انتهای ۵' و ساختار PolyA در انتهای ۳' را دارند. تشکیل DNA پروویروسی به ویروس قدرت حفظ عفونت پایدار در برابر پاسخ سیستم ایمنی و نیز توانایی انتقال عمودی را می‌دهد. به طور کامل مشخص نیست که چه چیزی خطر ابتلا به این بیماری‌های مرتبط با HTLV-1 را تعیین

⁴ Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (ATLL)

⁵ Reverse transcriptase

⁶ Provirus

¹ Oncoretrovirus

² Retroviridae

³ National Institutes of Health, USA

می‌کند. با این حال، ارتباط میزان پروویروس بالا^۱ (تعداد نسخه‌های پروویروسی در هر ۱۰۰ سلول) در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، با خطر بیماری‌های میلوپاتی و نیز لوسمی T بزرگسالان شناخته شده است (۱۱، ۱۲).

ویروس HTLV-1 می‌تواند اکثر سلول‌های هسته‌دار پستانداران را در شرایط آزمایشگاهی آلوده کند، اما میزبان اصلی آن در داخل بدن، لنفوسیت‌های T انسانی هستند. سلول‌های CD4+ T نقش اصلی را در عفونت HTLV-1 ایفا می‌کنند، زیرا ۹۵ درصد از میزان پروویروس توسط این سلول‌ها حمل می‌شود (۱۳). فنوتیپ لوسمی سلول T بزرگسالان به طور معمول CD4+ است (۱۴). HTLV-1 همچنین سلول‌های CD8+ را در داخل بدن آلوده می‌کند که به طور میانگین ۵ درصد از میزان پروویروس را شامل می‌شوند (۱۳). این ویروس در داخل بدن موجود زنده به صورت آزاد در سرم دیده نمی‌شود و تنها به صورت داخل سلولی می‌باشد، عمدتاً از طریق تماس سلول به سلول از طریق سیناپس ویروسی منتقل می‌شود و کلون‌های جدید سلول T آلوده را در هر میزبان ایجاد می‌کند (۱۵). رسپتور جهت ورود HTLV-1 در سطح سلول نیز یک رسپتور شبیه GluT1 می‌باشد (۱۶).

پایداری ویروس HTLV-1 در حضور یک پاسخ ایمنی فعال و اختصاصی، چالش بزرگی برای ویروس‌شناسان و پزشکان محسوب می‌شود. در بیشتر افراد ناقل، پاسخ ایمنی منجر به حذف این ویروس نمی‌شود، اما ممکن است طول دوره‌ی بیماری را تعیین کند. چند هفته پس از مواجهه با ویروس، پاسخ آنتی بادی و ایمنی سلولی علیه تعدادی از پروتئین‌های ویروسی قابل مشاهده است (۱۷). در خصوص بیماران ATLL، مشاهدات نشان داده که دلیل شروع دیر هنگام و بدون علائم آن، پاسخ ایمنی ناچیز در شروع آلودگی، وجود

دوره نهفتگی^۲ طولانی ویروس در بدن و متعاقباً پایداری ویروس می‌باشد. بنابراین افراد ناقل، به عنوان منابع بالقوه برای انتقال ویروس محسوب می‌شوند و این امر ضرورت شناسایی سریع ویروس برای تشخیص، درمان، و مختل کردن روند انتقال و گسترش را تایید می‌کند (۱۹، ۲۰).

اپیدمیولوژی

مرسوم‌ترین راه‌های انتقال ویروس HTLV-1 انتقال از مادر به فرزند عموماً از طریق تغذیه طولانی مدت با شیر پس از شش ماه، ارتباط جنسی (عمدتاً از مرد به زن)، استفاده از محصولات خونی آلوده غنی از لکوسیت، و استفاده از سرنگ و سوزن آلوده در معتادین با تزریق داخل وریدی است (۲۳-۲۱). پیوند کبد، کلیه، و ریه نیز می‌تواند عاملی برای انتقال این ویروس باشد (۲۴، ۲۵). عفونت HTLV-1 همچنین می‌تواند از طریق تماس با میمون‌های آلوده به HTLV-1 ایجاد شود (۲۴، ۲۶). ۱۰ تا ۲۵ درصد از کودکانی که از مادران آلوده به HTLV-1 تغذیه می‌شوند، به این بیماری مبتلا می‌شوند (۲۷). این ویروس شدیداً از نوع مرتبط با سلول است و تماس بین سلول‌های آلوده به ویروس با سلول‌های T هدف غیر آلوده، برای انتقال مؤثر لازم است. براساس نتایج به دست آمده، انتقال ویروس از طریق فرآورده‌های خونی حاوی گلبول‌های سفید بین ۴۴ تا ۶۶ درصد گزارش شده است، در حالی که مشتقات پلاسمای اهداکنندگان آلوده به HTLV-1 هیچ نقشی در انتقال ویروسی ندارند (۲۳، ۲۸). بیشتر افراد آلوده به این ویروس در اغلب موارد تا آخر عمر بدون علامت می‌باشند، به همین دلیل اغلب از ابتلا خود به آن بی‌اطلاع هستند که به این افراد اصطلاحاً حاملین مزمن گفته می‌شود. با این حال در موارد اندکی بیماری‌های مهلک و ناتوان‌کننده‌ای مانند نوعی سرطان خون به نام لوسمی سلول T بزرگسالان (ATL^۳) و نیز نوعی بیماری پیشرونده عصبی به

³ Adult T-cell leukemia-lymphoma

¹ ProViral Load (PVL)

² Latent cycle



1 را دارند. مطالعات اپیدمی شناسی دیگر نیز از شیوع این ویروس در سایر شهرهای ایران مانند کرج، ارومیه، و چهارمحال و بختیاری خبر می‌دهند (۳۲، ۳۵). بیشترین تحقیقات در خصوص ویروس HTLV-1 در کشورهای ژاپن، برزیل، و ایران (شهر مشهد) صورت گرفته است. شهرستان مشهد از سال ۱۹۹۶ به عنوان یک منطقه‌ی همه‌گیر شناخته شده و تخمین زده شده که حدود ۲٪ از خون‌های اهدایی در این شهر آلوده هستند (۳۰). اما در مطالعات اخیر، علی‌رغم انجام آزمایش‌های خونی رایج، آمار مبتلایان افزایش یافته است. این نتایج و همچنین توانایی ویروس برای ورود به ژنوم میزبان و ایجاد عفونت نهفته^۲ و فرار از سیستم ایمنی، ضرورت استفاده از روش‌های تشخیصی زود هنگام به منظور جلوگیری از انتقال ویروس به افراد سالم را هشدار می‌دهد.

سیستم‌های رایج تشخیصی

سیستم‌های رایج تشخیصی مورد استفاده برای مطالعه جنبه‌های اپیدمیولوژیک عفونت HTLV-1 شامل روش‌های سرولوژیک بیوشیمیایی چون روش ایمونوجاذب مرتبط با آنزیم^۳، سنجش ایمنی نورتابی مرتبط با آنزیم شیمیایی^۴ و روش فلوسایتومتری به عنوان آزمایش‌های غربال گری اولیه^۵ و در ادامه، روش‌های وسترن بلات^۶ یا ایمونواسی خط اینوژنتیک^۷، و به میزان کمتری سنجش میزان ایمونوفلورسانس^۸؛ به عنوان آزمایش‌های تأییدی می‌باشند (۳۶). در ادامه و در صورت نیاز، جستجوی پروویروس وارد شده در DNA سلول‌های خون محیطی را می‌توان با روش‌های

نام میلوپاتی وابسته به HTLV-1 و فلج اسپاسمی گرمسیری (HAM/TSP^۱) ظاهر می‌شوند. معمولاً این بیماری‌ها سال‌ها پس از عفونت اولیه رخ می‌دهند (۲، ۳). همچنین ارتباط سرطان دهانه رحم نیز به عنوان یکی از سرطان‌های رایج در سراسر دنیا با اوج سنی ۴۸ تا ۵۵ سال، با این ویروس در مطالعات مختلفی مطرح و بحث شده است (۴).

گزارش‌ها حاکی از آن است که حدود ۱۰ تا ۲۰ میلیون نفر در سراسر جهان به ویروس HTLV-1 آلوده هستند. اگرچه پراکندگی این ویروس جهانی است اما آمریکای جنوبی، جنوب غربی ژاپن، مناطق غرب آفریقا، آسیای میانه، و ایران، مناطق اصلی با شیوع بالای ویروس HTLV-1 می‌باشند (۲۵، ۳۰، ۳۱). تخمین تعداد افراد مبتلا به HTLV-1 در سراسر جهان خصوصاً در مناطق پرجمعیت مانند چین، هند، مغرب و یا شرق آفریقا دشوار است. تعداد ناقلان سالم و بدون علامت در ژاپن، بیش از یک میلیون نفر برآورد شده است (۳۲، ۳۳). همچنین، اخیراً گزارش شده است که بیش از ۴۰ درصد از بومی‌های استرالیای مرکزی در بعضی جوامع دوردست، مبتلا به HTLV-1 هستند (۳۳).

کشور ایران خصوصاً استان خراسان، یکی از مناطق اصلی با شیوع بالای ویروس HTLV-1 است. تخمین زده شده که در مجموع ۳/۴-۰/۳ از جمعیت ایران حامل این ویروس هستند (۳۴). نتایج پژوهش‌های متعددی که در سال‌های اخیر در مورد شهرهای استان خراسان در شمال شرق ایران انجام شده است، نشان داده که جمعیت مشهد با فراوانی ۳٪-۲ (۳۰)، سبزوار ۱/۶۶٪ (۲۹)، نیشابور ۵٪-۳/۴ (۳۶)، و تربت حیدریه ۱/۲۵٪ (۳۲)، شیوع بالایی از ویروس HTLV-

⁵ Screening tests

⁶ Western Blot (WB)

⁷ Innogenetics Line immunoAssay (INNO-LIA™)

⁸ ImmunoFluorescence Assay (IFA)

¹ HTLV-1-associated myelopath/ tropical spastic paraparesis

² latency

¹⁴ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

⁴ Chemiluminescence Enzyme-linked Immunoassay (CLEIA)

مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کیفی و/یا کمی^۱؛
به عنوان تست استاندارد و مرجع^۲ انجام داد.

الایزا

روش الایزا به سبب استاندارد بودن و تعداد زیاد کیت‌های تجاری موجود، به عنوان آزمایش غربالگری اولیه‌ی HTLV-1 به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. طی این روش هر دو عفونت HTLV-1 و HTLV-2، با حساسیت و دقت خوب توسط کیت‌های تجاری، تشخیص داده می‌شوند. در ساخت این کیت‌ها غالباً از پروتئین‌های نوترکیب مشتق شده از پروتئین بین غشایی GD21 در HTLV-1 و HTLV-2، پپتیدهای سنتزی از HTLV-1 (از جمله MTA-I یا rgp46-I)، و گلیکوپروتئین‌های HTLV-2 (از جمله K55 یا rgp46-II) استفاده می‌شوند (۲۸). به کمک روش الایزا حضور آنتی بادی HTLV-1 در پلاسما یا سرم، آشکار می‌شود، اما به علت بروز واکنش متقاطع با پروتئین‌های HTLV-2 و شباهت زیاد پروتئین‌های ساختاری این دو نوع ویروس، نتایج مثبت کاذب نیز حاصل می‌شود. که البته روش Immuno-capture-PCR برای حل این مسئله مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵). همچنین وجود زمان نسبتاً طولانی از عفونت میزبان تا تولید آنتی بادی و یا آنتی بادی ناکافی برای شناسایی، از دیگر چالش‌های تشخیصی با سنجش ایمنی محسوب می‌شوند. از این رو، انجام آزمایش‌های تاییدی پس از الایزا، از جمله وسترن بلات و روش‌های مولکولی جهت تشخیص عفونت ضروری می‌باشد. گزارش‌ها نشان می‌دهند که نتایج مربوط به سنجش آلودگی HTLV-1 در شهرهای نیشابور و تهران قابل اعتماد نیستند، زیرا پس از انجام آزمایش الایزا، از تست‌های تاییدی استفاده نشده است. (۳۶، ۳۷).

وسترن بلاتینگ

وسترن بلاتینگ یک روش سنجش ایمنی و روش تاییدی برای تشخیص آنتی بادی‌های پروتئین‌های gag (p24) و env (gp46 و/یا gp68) HTLV است. نسخه‌های جدیدتر کیت‌های وسترن بلات با گنجاندن یک گلیکوپروتئین نوترکیب خارجی برای ویروس‌های HTLV-1 یا HTLV-2 (به ترتیب MTA-1 و K-55) تشخیص این دو نوع ویروس را متمایز می‌سازد (۳۸). انجام تست وسترن بلات به عنوان یک روش ایمنی سنجی اختصاصی، نتایج مثبت کاذب حاصل از الایزا را مرتفع می‌کند و در واقع به دنبال تشخیص آنتی بادی‌های اختصاصی می‌باشد، بنابراین، این روش در افراد دارای نقص ایمنی و نوزادان مؤثر نیست و همچنین در صورتی که عفونت به تازگی رخ داده باشد، کارایی ندارد. احتمال پاسخ منفی کاذب وجود دارد و در نهایت احتمال بروز نتایج نامطلوب به دلیل واکنش متقاطع وجود دارد. نتایج مثبت کاذب نیز ممکن است با هریک از روش‌های غربالگری رخ دهد که چنین نتایجی باعث افزایش هزینه تست‌های تاییدی می‌شوند. بنابراین وسترن بلات روش مناسبی برای تشخیص HTLV-1 نیست (۳۹).

روش‌های مولکولی

تشخیص عفونت HTLV-1، تایید نتایج سرولوژیکی، و تعیین ژنوتیپ سویه‌های پروویروسی از طریق تکثیر DNA پروویروسی طی فرایند PCR و qPCR انجام می‌شود. از آن جا که HTLV-1 یک ویروس مرتبط با سلول است، تعیین میزان RNA ویروسی آسان نیست. تعیین میزان پروویروس بر اساس تکثیر DNA پروویروسی است که معمولاً از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، لکوسیت‌های خون محیطی تغلیظ شده، یا بیوپسی پوست به دست می‌آید. همچنین می‌توان آن را از شیر مادر، مایعات جنسی، ادرار، و

² Gold standard test

¹ qualitative and/or quantitative POLYmerase Chain Reaction (qPCR)



توسعه در تحقیقات حسگر زیستی برای تشخیص

HTLV-1

امروزه علاقه زیادی به توسعه حسگرهای مختلف برای تشخیص سریع و قابل اعتماد برای ویروس‌ها با حداقل دست‌کاری نمونه و کمترین نیاز به مهارت آزمایشگاهی وجود دارد. با این حال، توجه کمی به استفاده از حسگر زیستی برای تشخیص HTLV-1 شده است (۴۵). فانی و همکاران در سال ۲۰۲۱ یک زیست‌حسگر DNA الکتروشیمیایی را با استفاده از ولتاژمتری پالس تفاضلی در جهت شناسایی ویروس HTLV-1 در نمونه‌های حقیقی سرم خون طراحی کردند. در این پژوهش حسگر DNA تک‌رشته‌ای بر روی الکترودی با ترکیب کربن اصلاح شده با نانوکامپوزیت اکسید گرافن، پلی پیرول و نانوذرات طلا تثبیت شد. سپس این حسگر DNA تک‌رشته‌ای با DNA هدف هیبرید شدند و با اندازه‌گیری پاسخ اکسیداسیون الکتروشیمیایی نمک مونوهیدرات آنتراکینون-۲-سولفونیک اسید (AQMS) مورد مطالعه قرار گرفت. منحنی کالیبراسیون محدوده خطی گسترده‌ای از ۰/۱ فمتومولار تا ۱۰۰ میکرومولار، با حد تشخیص ۲۰ اتومولار نسبت به غلظت DNA هدف را نشان داد. همچنین این بستر توانایی سنجش DNA هدف را از DNA استخراج شده از نمونه سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، دارا می‌باشد. به علاوه، ویژگی زیست‌حسگر پیشنهادی توسط یک نمونه مثبت HTLV-1، یک نمونه مثبت HSV-1، یک نمونه مخلوط (HTLV-1 و HSV-1) و یک نمونه منفی بررسی شد، که گزینش پذیری و حساسیت بسیار خوبی را نشان می‌دهد. علاوه بر این، انحراف استاندارد نسبی این زیست‌حسگر از آزمون‌های تکرارپذیری نشان‌دهنده قابلیت استفاده مجدد و پایداری خوب آن می‌باشد (۴۶).

بزاقت نیز تشخیص داد (۴۰، ۴۱). لازم به ذکر است که حصول یک کمیت قابل اتکا از PVL ویروس، برای درک نتایج بالینی از طریق qPCR و ارزیابی مداخلات درمانی بیماران آلوده به HTLV-1 بسیار مهم است. نتایج چند تحقیق نشان داد که PVL ویروس در بیماران TSP/HAM نسبت به مبتلایان بدون علامت به طور معنی‌داری بالاتر است (۳۹، ۴۲، ۴۳). همچنین بررسی‌های دیگر نشان داد که انتقال جنسی ویروس و انتقال از طریق شیر مادر با میزان PVL مرتبط است (۴۴، ۴۵). از این جهت PCR و qPCR، در بیمارستان‌ها و آزمایشگاه‌ها به عنوان روش‌های تشخیصی مرجع و استاندارد در حوزه تشخیص، پیش‌آگهی و پیشرفت عفونت‌های مربوط به HTLV-1 به کار گرفته می‌شوند (۴۶).

روش‌های مولکولی PCR و RT-PCR از دقت، حساسیت، و تکرارپذیری بالایی خصوصاً در مقایسه با روش‌های سرولوژیکی برخوردارند. RT-PCR یک تکنیک بسیار حساس با مقیاس تشخیص گسترده، با رنج ۱۰ تا ۱۰^۶ کپی در هر واکنش می‌باشد. با این حال، تشخیص زودهنگام مبتلایان به HTLV-1 با PCR، به سبب دوره نهفتگی طولانی این ویروس، با چالش‌های تشخیصی مواجه است (۴۴). همچنین علی‌رغم اینکه روش RT-PCR یک روش شناسایی بسیار دقیق و قابل اعتماد محسوب می‌شود، اما روش‌های مولکولی علاوه بر هزینه‌های آزمایشگاهی زیاد و نیاز به زمان و تخصص بالا، کاربری آسان نیز ندارند (۴۵، ۴۶). بنابراین به سبب وجود موانع روش‌های تشخیصی سرولوژیکی و مولکولی برای تشخیص در مراحل اولیه آلودگی، نیاز به ساخت و طراحی روش‌های نوین تشخیصی مانند زیست‌حسگرها^۱ ضروری به نظر می‌رسد.

بحث و نتیجه گیری

هدف این مقاله مروری، خلاصه کردن روش های تشخیص ویروسی مرسوم و اخیراً توسعه یافته ای بود که برای تشخیص HTLV-1 استفاده شده اند. ما متوجه شدیم که روش های مرسوم نمی توانند خواسته ها و چالش های تشخیص سریع در تجزیه و تحلیل ویروسی را برآورده کنند.

ELISA، WB و PCR متداول ترین روش ها برای تشخیص HTLV هستند. اگرچه مطالعات قبلی گزارش کرده اند که وسترن بلات به دلیل استفاده از پروتئین های نو ترکیب خاص برای HTLV-1 و HTLV-2 حساس تر از ELISA است، وسترن بلات به دستگاه های پیچیده ای نیاز دارد که از نظر فنی کار با آن ها سخت می باشد و نیاز به تخصص در تفسیر دارد. با این وجود، PCR و qPCR در مقایسه با روش های سرولوژیکی بسیار حساس و اختصاصی هستند، اما محدودیت هایی دارند. در واقع، اگر پرایمرهای DNA هدف کافی و کاملاً منطبق باشند، این سنجش های مولکولی با استفاده از آغازگرها و پروب ها تقویت می شوند و ویروس تشخیص داده می شود. همچنین، این تکنیک ها به اطلاعات توالی بخشی از DNA که قرار است تکثیر شود نیاز دارند. محدودیت دیگر آزمایش های مولکولی، تفسیر نتایج نمونه های PCR مثبت است که می تواند چالش برانگیز باشد.

برخی از مطالعات، که در آنها شیوع بالایی از عفونت نشان داده شده است، اهمیت تشخیص زودهنگام را برای کنترل انتقال HTLV-1 و جلوگیری از گسترش HTLV-1 گزارش کرده اند. همانطور که در بالا ذکر شد، با توجه به اشکالات روش های تشخیصی رایج در عفونت در مراحل اولیه، استفاده

از برخی روش های پیشرفته مانند حسگرهای زیستی به عنوان روش های مناسب برای تشخیص HTLV توصیه می شود.

در سال های اخیر، روش های حسگر زیستی برای شناسایی ویروس ها مورد استفاده قرار گرفته اند که بر خلاف روش های مرسوم، پیچیدگی کمتری برای استفاده داشته و عاری از فرآیندهای آزمایشی طولانی مدت هستند. با توسعه و گسترش ساخت زیست حسگرها به عنوان ابزارهای تشخیصی دقیق و سریع با کاربری ارزان، آسان و اقتصادی در تشخیص حجم کم نمونه، می توان شناسایی افراد ناقل عفونت های مختلف از جمله مبتلایان به ویروس HTLV-1 را جهت کنترل شیوع عفونت و نهایتاً کاهش هزینه های درمان در سطح کلان، ممکن ساخت. معمولاً در ساخت نانوحسگرها از فناوری نانو برای افزایش کارایی و دقت، استفاده می گردد که به عنوان مثال می توان به نانوذراتی همچون کربن کوانتوم دات ها، نانوذرات نقره و گرافن کوانتوم دات ها اشاره کرد (۴۷، ۴۸، ۴۹، ۵۰). با توجه به تکنیک های نانوحسگر زیستی که امکان تشخیص سریع ویروس هدف، با اختصاصیت و حساسیت بالا را فراهم می کنند، پزشک می تواند به سرعت تصمیم بگیرد که آیا درمان مورد نیاز است یا خیر و بیمار نیز متحمل هزینه کمتری در تشخیص بیماری خود می شود. بنابراین نانوحسگرهای زیستی می توانند به عنوان سیستم تشخیصی حساس، سریع و دقیقی جهت شناسایی ویروس HTLV-1 معرفی شوند.

تشکر و قدردانی

این کار توسط دانشگاه علوم پزشکی مشهد و دانشگاه علوم پزشکی نیشابور حمایت شده است.

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;77(12 II):7415-9.



2. Norouzi M, Zarei Ghobadi M, Golmimi M, Mozhgani SH, Ghourchian H, Rezaee SA. Quantum Dot-Based Biosensor for the Detection of Human T-Lymphotropic Virus-1. *Anal Lett.* 2017;50(15):2402–11.
3. Fani M, Rezayi M, Meshkat Z, Rezaee SA, Makvandi M, Abouzari-Lotf E, et al. Current approaches for detection of human T-lymphotropic virus Type 1: A systematic review. *J Cell Physiol.* 2019;234(8):12433–41.
4. Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(6 I):2031–5.
5. Gessain A, Vernant JC, Maurs L, Barin F, Gout O, Calender A de, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet.* 1985;326(8452):407–10.
6. Morgan OS, Mora C, Rodgers-Johnson P, Char G. HTLV-1 AND POLYMYOSITIS IN JAMAICA. *Lancet [Internet].* 1989;334(8673):1184–7.
7. Nishioka K. HTLV-I Arthropathy and Sjögren Syndrome. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr* 1996;13.
8. Nishioka K. Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I. *Lancet.* 1989;1:441.
9. Gonçalves DU, Proietti FA, Ribas JGR, Araújo MG, Pinheiro SR, Guedes AC, et al. Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1 associated diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(3):577–89.
10. Bangham CRM. Human T Cell Leukemia Virus Type 1: Persistence and Pathogenesis. *Annu Rev Immunol.* 2018;36(November 2017):43–71.
11. Kubota R. Pathogenesis of human T-lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Clin Exp Neuroimmunol.* 2017;8(2):117–28.
12. Cook LB, Rowan AG, Melamed A, Taylor GP, Bangham CRM. HTLV-1-infected T cells contain a single integrated provirus in natural infection. *Blood.* 2012;120(17):3488–90.
13. Yamano Y, Nagai M, Brennan M, Mora CA, Soldan SS, Tomaru U, et al. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8+ T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Blood.* 2002;99(1):88–94.
14. Enose-Akahata Y, Vellucci A, Jacobson S. Role of HTLV-1 Tax and HBZ in the pathogenesis of HAM/TSP. *Front Microbiol.* 2017;8(DEC):1–10.
15. Nozuma S, Kubota R, Jacobson S. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and cellular immune response in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol.* 2020;26(5):652–63.
16. Melamed A, Laydon DJ, Khatib H Al, Rowan AG, Taylor GP, Bangham CRM. HTLV - 1 drives vigorous clonal expansion of infected CD8 + T cells in natural infection. *Retrovirology.* 2015;4–13.
17. Tsukasaki K, Hermine O, Bazarbachi A, Ratner L, Ramos JC, Jr WH, et al. Definition , Prognostic Factors , Treatment , and Response Criteria of Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma : A Proposal From an International Consensus Meeting. 2009;27(3):453–9.
18. Mozhgani SH, Zarei-Ghobadi M, Teymoori-Rad M, Mokhtari-Azad T, Mirzaie M, Sheikhi M, et al. Human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1) pathogenesis: A systems virology study. *J Cell Biochem.* 2018;119(5):3968–79.

20. Aye MM, Matsuoka E, Moritoyo T, Umehara F, Suehara M, Hokezu Y, et al. Histopathological analysis of four autopsy cases of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: Inflammatory changes occur simultaneously in the entire central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2000;100(3):245–52.
21. Takenouchi N, Yamano Y, Usuku K, Osame M, Izumo S. Usefulness of Proviral Load Measurement for Monitoring of Disease Activity in Individual Patients with Human T-Lymphotropic Virus Type I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *J Neurovirol.* 2003;9(1):29–35. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13550280390173418>
22. Hayashi D, Kubota R, Takenouchi N, Nakamura T, Umehara F, Arimura K, et al. Accumulation of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-infected cells in the cerebrospinal fluid during the exacerbation of HTLV-I - Associated myelopathy. *J Neurovirol.* 2008;14(5):459–63.
23. Keshvari M, Hajibeigi B, Azarkeivan A, Keyvani H, Behnavi B, Saiedi Hosseini SY, et al. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus among Iranian adult thalassemic patients. *Transfus Med.* 2014;24(4):227–32.
24. Abedi F, Mozhgani SH, Rahimzadegan M, Gudarzi H, Valizadeh N, Rezaee SA. Prevalence and phylogenetic study of human T-lymphotropic virus 1 in patients with thalassemia in the northeast of Iran. *Future Virol.* 2017;12(5):253–8.
25. Takatsuki K. Adult T cell leukemia in Japan. *Top Hematol.* 1977 [cited 2022 Aug 2];73–7.
26. Fani M, Rezayi M, Meshkat Z, Rezaee SA, Makvandi M, Ahmadi Angali K. A Novel Electrochemical DNA Biosensor Based on a Gold Nanoparticles-Reduced Graphene Oxide-Polypyrrole Nanocomposite to Detect Human T-Lymphotropic Virus-1. *IEEE Sens J.* 2020;20(18):10625–32.
27. Matsuoka M, Mesnard JM. HTLV-1 bZIP factor: the key viral gene for pathogenesis. *Retrovirology.* 2020 Dec;17(1):1-8.
28. 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.
29. 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.
30. Rafatpanah H, Hedayati-Moghaddam MR, Fathimoghaddam F, Bidkhor HR, Shamsian SK, Ahmadi S, et al. High prevalence of HTLV-I infection in Mashhad, Northeast Iran: A population-based seroepidemiology survey. *J Clin Virol.* 2011;52(3):172–6.
31. Franco-Paredes C, Jacob JT, Hidron A, Rodriguez-Morales AJ, Kuhar D, Caliendo AM. Transplantation and tropical infectious diseases. *Int J Infect Dis.* 2010;14(3):e189–96.
32. Rafatpanah H, Torkamani M, Valizadeh N, Vakili R, Meshkani B, Khademi H, et al. Prevalence and phylogenetic analysis of HTLV-1 in a segregated population in Iran. *J Med Virol.* 2016;88(7):1247–53.
33. Satake M, Iwanaga M, Sagara Y, Watanabe T, Okuma K, Hamaguchi I. Incidence of human T-lymphotropic virus 1 infection in adolescent and adult blood donors in Japan: a nationwide retrospective cohort analysis. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(11):1246–54.
34. Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, et al. Analysis Of Htlv-I Proviral Load In 202 Ham/Tsp Patients And 243 Asymptomatic Htlv-I Carriers: High Proviral Load Strongly Predisposes To Ham/Tsp. *J Neurovirol.* 1998;4(6):586–93.
35. Einsiedel LJ, Pham H, Woodman RJ, Pepperill C, Taylor KA. The prevalence and clinical associations of HTLV-1 infection in a remote Indigenous community. *Med J Aust.* 2016;205(7):305–9.
36. Salehi M, Mostafavi SKS, Ghasemian A, Gholami M, Kazemi-Vardanjani A, Rahimi MK. Seroepidemiology of HTLV-1 and HTLV-2 infection in Neyshabur city, North-Eastern Iran, during 2010-2014. *Iran Biomed J.* 2017;21(1):57–60.



37. Azarpazhooh MR, Hasanpour K, Ghanbari M, Rezaee SAR, Mashkani B, HedayatiMoghaddam MR, et al. Human t-lymphotropic virus type 1 prevalence in northeastern Iran, sabzevar: An epidemiologic-based study and phylogenetic analysis. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(9):895–901.
38. Safabakhsh H, Jalalian M, Karimi G. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type-1 (HTLV1) in Mashhad. *Glob J Health Sci*. 2014;6(5):99– 104.
39. Desdouits M, Cassar O, Maisonnobe T, Desrames A, Aouba A, Hermine O, et al. HTLV-1-associated inflammatory myopathies: Low proviral load and moderate inflammation in 13 patients from West Indies and West Africa. *J Clin Virol*. 2013;57(1):70–6.
40. Jalaeikhoo H, Soleymani M, Rajaeinejad M, Keyhani M. Prevalence of human Tlymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection in patients with hematologic disorders and non-hematologic malignancies in a tertiary referral hospital. *Arch Iran Med*. 2017;20(4):224–8.
41. Li HC, Biggar RJ, Miley WJ, Maloney EM, Cranston B, Hanchard B, et al. Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I. *J Infect Dis*. 2004;190(7):1275–8.
42. Roucoux DF, Wang B, Smith D, Nass CC, Smith J, Hutching ST, et al. A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II. *J Infect Dis*. 2005;191(9):1490–7.
43. 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.
44. Ghobadi MZ, Mozhgani SH, Hakimian F, Norouzi M, Rezaee SA, Ghourchian H. Long segment detection of HTLV-1 genome based on the fluorescence quenching technique. *Heliyon*. 2018;4(12):e00996.
45. Zarei-Ghobadi M, Mozhgani SH, Dashtestani F, Yadegari A, Hakimian F, Norouzi M, et al. A genosensor for detection of HTLV-I based on photoluminescence quenching of fluorescent carbon dots in presence of iron magnetic nanoparticle-capped Au. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–8.
46. Fani M, Rezayi M, Pourianfar HR, Meshkat Z, Makvandi M, Gholami M, et al. Rapid and label-free electrochemical DNA biosensor based on a facile one-step electrochemical synthesis of rGO-PPy-(L-Cys)-AuNPs nanocomposite for the HTLV-1 oligonucleotide detection. *Biotechnol Appl Biochem*. 2021;68(3):626–35.
47. Darroudi M, Yazdi ME, Amiri MS. Plant-mediated biosynthesis of nanoparticles. In 21st century nanoscience—A handbook 2020 Apr 8 (pp. 1-1). CRC Press.
48. Najjar M, Nasser MA, Allahresani A, Darroudi M. Green and efficient synthesis of carbon quantum dots from cordia myxa L. and their application in photocatalytic degradation of organic dyes. *Journal of Molecular Structure*. 2022 Oct 15;1266:133456.
49. Darroudi M, Zak AK, Muhamad MR, Huang NM, Hakimi M. Green synthesis of colloidal silver nanoparticles by sonochemical method. *Materials Letters*. 2012 Jan 1;66(1):117-20.
50. Roeinfard M, Zahedifar M, Darroudi M, Sadri K, Khorsand Zak A. Preparation of Technetium Labeled-Graphene Quantum Dots and Investigation of Their Bio Distribution. *Journal of Cluster Science*. 2021:1-9.
51. Cassar O, Gessain A. Serological and Molecular Methods to Study Epidemiological Aspects of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection. *Human T-Lymphotropic Viruses: Methods and Protocols*. 2017:3-24.
52. Tsukasaki K, Tobinai K. Human T-cell lymphotropic virus type I-associated adult T-cell leukemia–lymphoma: new directions in clinical research. *AACR*; 2014.

53. Brunetto GS, Massoud R, Leibovitch EC, Caruso B, Johnson K, Ohayon J, et al. Digital droplet PCR (ddPCR) for the precise quantification of human T-lymphotropic virus 1 proviral loads in peripheral blood and cerebrospinal fluid of HAM/TSP patients and identification of viral mutations. *Journal of neurovirology*. 2014;20(4):341-51.
54. De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The lancet oncology*. 2012;13(6):607-15.
55. Einsiedel L, Pham H, Talukder MR, Taylor K, Wilson K, Kaldor J, et al. Very high prevalence of infection with the human T cell leukaemia virus type 1c in remote Australian Aboriginal communities: Results of a large cross-sectional community survey. *PLoS neglected tropical diseases*. 2021;15(12):e0009915.

Common Diagnostic Methods for the Diagnosis of Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1)

Farkhonde Zibadi¹, Monire Bolurinejad¹, Majid Darroudi^{1,2,3,*}

1-Department of Medical Biotechnology and Medical Nanotechnology Department, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

2- Nuclear Medicine Research Center of Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

3- Department of Medical Biotechnology, Medical School, Neyshabur University of Medical Sciences, Neyshabur, Iran

Type of Article: Review Article

Received: 2023/3/10

Accepted: 2024/07/30

*Corresponding Author:

Majid Darroudi

Department of Medical
Biotechnology, Medical
School, Neyshabur
University of Medical
Sciences, Neyshabur, Iran

TEL: +98 9153064830

Email:

majiddarroudi@gmail.com

Abstract

Introduction

Human lymphotropic virus type 1 is the first human oncoretrovirus that can cause Adult T-cell Leukemia/ Lymphoma and HTLV-1 Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis as serious complications of infection. About 20 million people worldwide are infected with the HTLV-1 virus. Since most people carry this virus are asymptomatics, quick identification of the virus is essential for diagnosis, treatment, and disruption of transmission.

This virus has been detected using genetic and serological techniques. Main screening technique is the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which is typically followed by confirmatory tests using the western blotting (WB) and polymerase chain reaction (PCR) methods. In this study, the various methods for diagnosing HTLV-1 infection were reviewed. The most widely used technical assays for HTLV-1 among all the documented techniques of detection are serological and molecular tests. Without a confirming test, the ELISA technique has a number of restrictions that reduce the reliability of the findings. Further analysis of these methods' accuracy is required in light of the frequency of HTLV-1 and the constraints of the available detection techniques. It is now possible to use cutting-edge technical innovations like biosensors to conduct HTLV-1 diagnostics.

Keywords

Human T lymphotropic virus type 1, HTLV-1, Biosensors, Molecular methods, Serological methods

► Please cite this article as: Zibadi F, Bolurinejad M, Darroudi M. Common Diagnostic Methods for the Diagnosis of Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1). J Neyshabur Univ Med Sci 2022;10(3):78-89.