

## شناسایی و شیوع TTV به روش PCR در پلاسمای اهداکنندگان و

### مصرف کنندگان خون در تهران، سال ۱۳۸۲-۱۳۸۳

دکتر طاهره زندیه<sup>۱</sup>، دکتر علی اکبر پورفتح‌اله<sup>۲</sup>، دکتر صدیقه امینی کافی آباد<sup>۳</sup>، شهرام سمیعی<sup>۴</sup>، فهیمه رنجبر کرمانی<sup>۵</sup>، کامران غفاری<sup>۶</sup>، مریم سبحانی<sup>۷</sup>، مهناز کواری<sup>۸</sup>، زهرا عطایی<sup>۹</sup>

#### چکیده

##### سابقه و هدف

امروزه انتقال خون به عنوان یک درمان حیاتی، نقش مهمی در پزشکی بالینی پیدا کرده است اما این روش درمانی همیشه با خطر انتقال عوامل عفونت‌زای ویروسی مانند هپاتیت و رتروویروس‌ها همراه می‌باشد. در سالان اخیر، تحقیقات زیادی با هدف شناسایی این عوامل صورت گرفته است. نتیجه این تحقیقات در سال ۱۹۹۷ موجب شناسایی ویروس TTV توسط نیشیزاوا گردید. هدف از انجام مطالعه با توجه به عدم وجود گزارش مشابه در ایران، بررسی و تشخیص TTV در جمعیت اهداکنندگان و مصرف‌کنندگان خون، تهیه کیت TTV-PCR و راه‌اندازی روش کار بود.

##### مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی (Descriptive) بود. در این مطالعه، ۲۵۰ بیمار مبتلا به تالاسمی ماژور، هموفیلی و دیالیزی همراه با ۲۵۰ اهداکننده خون مراجعه کننده به سازمان انتقال خون مورد بررسی قرار گرفتند. پس از استخراج DNA، با روش Semi nested- PCR یا PCR دو مرحله‌ای ناحیه مورد نظر از DNA ویروس تزايد (Amplify) پیدا کرد و سپس با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪، نتایج به صورت باندهای قابل رؤیت مشاهده گردید. اطلاعات توسط آزمون آماری کای دو (Chi-square) ارزیابی شد.

##### یافته‌ها

جمعیت آماری مورد مطالعه شامل ۲۵۰ بیمار بود که نتیجه آزمایش ۶۶/۹٪ از بیماران مثبت و ۳۳/۱٪ منفی بود. همچنین آزمایش TTV-PCR در ۲۵۰ اهداکننده خون به عنوان افراد سالم انجام شد و نتیجه آزمایش ۴۱٪ آن‌ها مثبت و ۵۹٪ آن‌ها منفی بود. با توجه به آزمون آماری ۲٪ ارتباط معنی‌داری بین نتایج آزمایش در گروه شاهد و بیماران وجود داشت (p=۰/۰۰۰۱).

##### نتیجه‌گیری

از نتایج به دست آمده می‌توان چنین استنباط نمود که TTV میزان شیوع بالایی در بین بیمارانی که خون دریافت می‌کنند و همچنین اهداکنندگان سالم خون دارد. علاوه بر این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً انتقال خون تنها راه انتقال این ویروس در جامعه انسانی نبوده و تحقیقات نشان داده که راه‌های دیگری نظیر راه مدفوعی - دهانی را نیز می‌توان برای این ویروس در نظر گرفت.

**کلمات کلیدی:** TTV، اهداکنندگان خون، دریافت کنندگان خون

تاریخ دریافت: ۱۴/۶/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۵/۲/۲۵

۱- مؤلف مسؤول: PhD فرآورده‌های بیولوژیک - دانشیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران - صندوق پستی ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

۲- PhD ایمونولوژی - دانشیار دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۳- متخصص آسیب‌شناسی تشریحی و بالینی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۴- کارشناس ارشد بیوشیمی - مربی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۵- کارشناس ارشد ژنتیک - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۶- کارشناس ارشد میکروب شناسی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۷- کارشناس میکروب شناسی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۸- کارشناس زیست شناسی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

**مقدمه**

امروزه انتقال خون به عنوان یک درمان حیاتی نقش مهمی در پزشکی بالینی پیدا کرده است اما این روش درمانی همیشه با خطر انتقال عوامل عفونت‌زای ویروسی مانند ویروس‌های عامل هپاتیت و رتروویروس‌ها همراه بوده و با وجود پیشرفت‌های اخیر در روش‌های تشخیصی و به کارگیری روش‌های مولکولی در تشخیص عوامل عفونت‌زا، هنوز عامل تعدادی از موارد هپاتیت‌های بعد از انتقال خون ناشناخته مانده است. در سال‌های اخیر، تحقیقات زیادی با هدف شناسایی این عوامل صورت پذیرفته که نتیجه این تحقیقات در سال ۱۹۹۷ موجب شناسایی ویروس TTV توسط نیشیزاوا گردید.

TTV یک ویروس DNA دار، تک رشته‌ای و بدون پوشش در انسان می‌باشد. این ویروس منحصر به فرد، ساختار ژنومیک و الگوی نسخه‌برداری ویژه‌ای دارد که تاکنون در فامیل سرکوویروس‌ها که نزدیک‌ترین فامیل به این ویروس هستند، تعیین نگردیده است. این ویروس با وجود این‌که DNA ویروس است ولی از نظر ژنتیکی بسیار هتروژن بوده و حداقل ۲۹ ژنوتایپ از این ویروس شناسایی شده که اخیراً به پنج گروه بزرگ فیلوژنیک طبقه‌بندی شده‌اند (۱، ۲). در رابطه با طبقه‌بندی ویروس، ضوابط حاکم مانند همان ضوابطی است که در طبقه‌بندی ویروس هپاتیت C (HCV) اعمال شده ولی به دلیل هتروژن بودن بیشتر TTV، انواعی که اختلاف توالی نوکلئوتیدی بیش از ۳۰٪ داشته باشند، ژنوتایپ و انواعی که اختلاف توالی حدود ۱۵٪ تا ۳۰٪ داشته باشند ساب‌تایپ محسوب می‌شوند، تنوع ژنتیکی TTV با گذشت زمان رو به افزایش بوده است زیرا روش‌های PCR به کار گرفته شده در بیشتر مطالعات به اندازه کافی بهینه نبوده و قادر به شناسایی تمام انواع TTV موجود در گردش خون نمی‌باشند و احتمالاً در آینده نزدیک با کوشش‌هایی که در جهت اصلاح این روش‌ها در حال انجام است، این نقص تا اندازه زیادی برطرف شده و ژنوتایپ‌های بیشتری از ویروس شناسایی خواهند شد. همچنین گزارش‌هایی منتشر شده که برخی گونه‌های حیوانی مثل پرمات‌های غیر انسانی مخزن انواعی از TTV هستند که قابل تفکیک از نوع انسانی

نمی‌باشند. در مورد نقش ویروس در ایجاد بیماری باید گفت که با وجود گذشت چندین سال از کشف ویروس، محققین تاکنون نتوانسته‌اند نقش پاتولوژیک مشخصی به این ویروس نسبت دهند. در ابتدای کشف ویروس از آن‌جایی که این ویروس برای اولین بار از بیمار مبتلا به هپاتیت با سطح بالایی از آنزیم‌های آمینوترانسفراز جدا گردید، بیشترین توجه به سوی ارتباط این ویروس با بیماری کبدی معطوف شد و تحقیقات زیادی در زمینه ارتباط این ویروس با بیماری کبدی از جمله هپاتیت‌های حاد، مزمن و برق‌آسا و همچنین بیماری کبدی کودکان انجام گرفت. ولی نتایج حاصل نقش ویروس را به عنوان یک عامل القاکننده و نه یک عامل سببی در ایجاد بیماری‌های کبدی نشان داده است. علاوه بر این بسیاری از عفونت‌های TTV با هپاتیت ارتباطی نداشته و در افراد گیرنده پیوند مغز استخوان (B.M) نشان داده شده که TTV می‌تواند در سلول‌های هماتوپوئیتیک، به میزان زیادی همانندسازی کند (۳-۵).

در مطالعه‌ای که بر روی بیماران مبتلا به کانسر صورت گرفت محققین توانستند TTV-DNA را از منونوکلئوهای خون محیطی و مغز استخوان این افراد به دست آورند. نتایج برخی تحقیقات نشان داده که ژنوتایپ گروه یک (G1) ویروس TTV می‌تواند در تشدید ترومبوسیتوپنی ناشی از ویروس HCV نقش داشته باشد. همچنین TTV در بیمارانی که در معرض خطر عفونت با بقیه ویروس‌های منتقله از طریق خون می‌باشند مانند هموفیلی‌ها، تالاسمی‌های ماژور، آنمی آپلاستیک، همودیالیزی‌ها، دریافت کنندگان داروهای درون رگی به میزان بالایی وجود دارد (۶-۱۰).

هدف مطالعه عبارت از بررسی و تشخیص TTV در جمعیت اهداکنندگان و مصرف کنندگان خون در تهران و تعیین میزان فراوانی آن در جامعه ایران و مقایسه با کشورهای پیشرفته و جهان می‌باشد.

**مواد و روش‌ها**

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. نمونه پلاسمای ۲۵۰ بیمار مبتلا به تالاسمی ماژور، هموفیلی و بیماران

دیالیزی مراجعه کننده به بخش خونگیری سازمان انتقال خون جمع آوری گردید. روش نمونه گیری از نوع غیر احتمالی آسان بوده و از هر بیمار ۵ میلی لیتر خون در شرایط استریل در یک لوله خلأ حاوی ضد انعقاد جمع آوری و بلافاصله پس از جداکردن سلول ها، پلاسما در دو میکروتیوب تقسیم گردید. یکی از میکروتیوب ها در فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد جهت انجام آزمایش PCR و میکروتیوب دیگر در -۳۰ درجه سانتی گراد جهت انجام آزمایش های سرولوژیکی تا زمان انجام آزمایش ها، نگهداری گردید.

محدوده سنی بیماران تالاسمی بین ۲ تا ۴۴ سال بود که ۶۱٪ مذکر و ۳۹٪ مؤنث بودند و ۲۳٪ آن ها طحال برداری شده بودند. محدوده سنی بیماران هموفیلی بین ۱۰ تا ۶۴ سال بود که ۹۵٪ مذکر و ۵٪ مؤنث بودند و همه آن ها فرآورده های خونی دریافت نموده بودند. محدوده سنی بیماران دیالیزی بین ۱۷ تا ۶۸ سال بود که ۶۳٪ مذکر و ۳۷٪ مؤنث بودند و ۴۶٪ آن ها خون دریافت نموده بودند. هم زمان نمونه پلاسما ۲۵۰ نفر اهداکننده خون که به پایگاه انتقال خون مراجعه می کردند به عنوان افراد سالم جمع آوری گردید.

DNA ویروس از نمونه پلاسما با استفاده از کیت روش کشور آلمان استخراج گردید. برای این کار تمام محلول ها باید شفاف بوده و در صورت مشاهده رسوب، لازم است آن ها در ۲۵-۱۵ درجه حرارت یا حمام آب ۳۷ درجه تا حل رسوب گرم شوند و با کمک بافر لیزکننده در حضور پروتئیناز K لیز گردند. در مرحله بعد، DNA با کمک نمک اختصاصی به رشته های شیشه ای اتصال یافت و ناخالصی های دیگر مثل نمک ها، پروتئین ها و غیره شسته و حذف گردید و سپس DNA توسط بافر کم نمک از ستون جدا گردید. مراحل کار بر اساس دستورالعمل کیت بود.

مرحله تکثیر قطعه مورد نظر در دو مرحله و با روش Semi-nested-PCR انجام گردید (۱۱). مرحله اول با استفاده از آغازگرهای (sense: 5'-ACA GAC AGA GGA GAA GGC AAC ATG - 3') NG059 و (antisense: 5'-CTG GCA TTT TAC CAT TTC CAA AGT T - 3') NG063 و مرحله دوم با استفاده از

آغازگرهای (5'-GGC AAC ATG TTA TGG و 3'-ATA GAC TGG) NG061 انجام شد. پس از استخراج DNA، با روش Semi-nested-PCR یا PCR دو مرحله ای ناحیه مورد نظر از DNA ویروس، Amplify شده و سپس با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪ نتایج به صورت باندهای قابل رؤیت مشاهده گردید. همراه نمونه ها، کنترل مثبت که از مرکز تحقیقات بیمارستان طالقانی تهیه شده بود و کنترل منفی (آب مقطر و یا بافر) گذاشته شد.

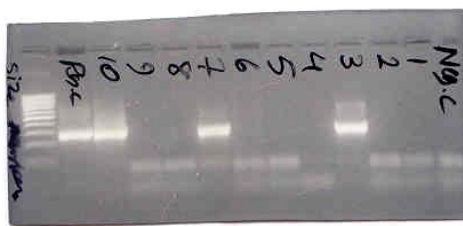
برنامه داده شده به دستگاه ترموسایکل شامل سه مرحله بود، مرحله اول ۹ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد در یک سیکل، مرحله دوم شامل سه قسمت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه بود که در طی مراحل سیکل تکرار گردید، و بالاخره مرحله سوم ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه در یک سیکل بود.

مرحله دوم PCR مشابه مراحل اول ولی با کاهش سیکل ها به ۲۵ بود. اندازه محصولات تکثیر شده در مرحله اول (bp) ۲۸۶ جفت باز و در مرحله دوم ۲۷۱bp بود. محصولات به دست آمده از مرحله دوم با ژل آگارز با غلظت ۲٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد بررسی، و نتایج با دستگاه ترانس ایلومیناتور مشاهده گردید. اطلاعات توسط آزمون آماری کای دو ارزیابی شد.

#### یافته ها

همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود، در نمونه های منفی و کنترل منفی هیچ باندهای مشاهده نگردید ولی در نمونه های مثبت و کنترل مثبت باندهای محدود ۲۷۱bp مشاهده شد.

نتیجه آزمایش ۶۶/۸٪ (۱۶۷ نفر) از بیماران مثبت (۶۹/۵٪ از بیماران تالاسمی، ۷۳٪ از بیماران هموفیلی و ۵۷/۷٪ از بیماران دیالیزی TTV<sup>+</sup> بودند) و ۳۳/۲٪ (۸۳ نفر) منفی بود و نتیجه آزمایش ۴۱٪ (۱۰۳ نفر) اهداکنندگان به عنوان کنترل مثبت و ۵۹٪ (۱۴۷ نفر) آن ها منفی بود (نمودار و جدول ۱). با توجه به آزمون آماری  $\chi^2$  ( $p=0/0001$ ) ارتباط معنی داری بین نتایج آزمایش در گروه شاهد و بیماران مشاهده شد.

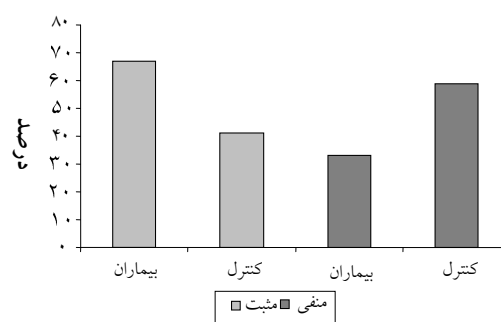


شکل ۱: باندهای مربوط به بیماران همراه کنترل مثبت و منفی و سائز مارکرپس از الکتروفورز

پلاسما مورد آزمایش قرار گرفتند. بررسی به عمل آمده نشان داد که آزمایش TTV-PCR در ۱۰۳ نفر (۴۱٪) مثبت و در ۱۴۷ نفر (۵۹٪) منفی بود.

همچنین ۱۶۷ نفر (۶۶/۸٪) از بیماران به عنوان دریافت‌کنندگان مکرر خون حامل این ویروس در خون خود بودند. با توجه به حضور میزان بالایی از عفونت TTV در افراد گیرنده خون و فرآورده‌های خونی، ضروری به نظر می‌رسد که مراکز تحقیقاتی انتقال خون با توجه به معیارهای استاندارد ارتباط ویروس جدید را با انتقال خون مورد بررسی و تحقیق قرار داده و انتقال ویروس از طریق دریافت خون و محصولات خونی یا مشتقات پلاسمایی مورد بررسی قرار گیرد. همچنین قدرت بیماری‌زایی ویروس باید بررسی شود به عنوان مثال HIV و HCV قدرت بیماری‌زایی قابل توجهی دارند و به همین دلیل بررسی خون‌های اهدایی از این نظر لازم می‌باشد ولی ویروس‌هایی مثل HTLV-II بیماری‌زایی شناخته شده‌ای ندارد و غربالگری آن به علت واکنش‌های متقاطع زیادی است که با ویروس HTLV-I دارد.

نکته مهم دیگر، بررسی میزان شیوع ویروس در جمعیت اهداکنندگان می‌باشد که نشان‌دهنده خطر ابتلا به عفونت در گیرندگان است. از طرفی میزان پایداری ویروس در بدن میزبان قابل اهمیت می‌باشد به عنوان مثال HCV در هپاتوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها عفونت پایداری ایجاد کرده ولی سطح ویرمی در پلاسما پایین می‌باشد، ویروس‌های دیگر که عفونت ناپایدار ایجاد می‌کنند مثل هپاتیت A و پاروویروس B19 تنها در دوره کوتاهی در گردش خون حضور دارند و به علت ویرمی کوتاه مدت تنها در دوره کوتاهی قادر به انتقال از طریق خون می‌باشند. آخرین نکته مهم وجود یک روش غربالگری مناسب است.



نمودار ۱: نتایج آزمایش TTV-PCR در بیماران مورد مطالعه و دریافت‌کنندگان خون

با توجه به نتیجه آزمون آماری  $\chi^2$ ، بین نتیجه آزمایش TTV-PCR و متغیر جنس و سن ارتباط معنی‌داری دیده نشد.

همچنین در این مطالعه، ارتباط معنی‌داری بین نتیجه آزمایش TTV-PCR و تعداد دفعات دریافت خون وجود ندارد.

جدول ۱: نتایج آزمایش TTV-PCR در جمعیت بیماران مورد مطالعه و اهداکنندگان خون

| TTV-PCR  | اهداکنندگان خون | بیماران    |
|----------|-----------------|------------|
| مثبت     | ۱۰۳ (۴۱)        | ۱۶۷ (۶۶/۸) |
| منفی     | ۱۴۷ (۵۹)        | ۸۳ (۳۳/۲)  |
| تعداد کل | ۲۵۰             | ۲۵۰        |

#### بحث

در این مطالعه ۲۵۰ نفر از اهداکنندگان خون سالم به عنوان گروه شاهد با استفاده از آغازگرهای انتخاب‌شده در این پژوهش از نظر حضور یا عدم حضور ژنوم TTV در

در رابطه با عفونت TTV تا به امروز، روش سرولوژیک مناسبی که بتواند در مقیاس وسیع کاربرد داشته باشد شناسایی نشده و به همین دلیل امکان شناسایی عفونت‌های گذشته ویروس وجود ندارد و مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته بر اساس شناسایی ژنوم ویروس به وسیله PCR است.

استخراج ژنوم ویروس از پلاسما و تکثیر آن با روش PCR، مفیدترین روش برای شناسایی این ویروس تا به امروز بوده است. روش مورد استفاده در این پژوهش Semi nested-PCR می‌باشد که دو مرحله‌ای بودن تکثیر DNA، موجب افزایش حساسیت در شناسایی تیتراهای پایین ویروس در نمونه است. همچنین به علت رقیق شدن ممانعت کننده‌ها، DNA ویروس به خوبی تکثیر می‌شود.

آمار منتشر شده در مورد میزان شیوع TTV در بین بیماران و افراد سالم کشورهای مختلف، حکایت از انتشار جهانی این ویروس در اقشار مختلف دارد. در کشور ترکیه مطالعه انجام شده توسط ایرنسوی و همکاران در مبتلایان به تالاسمی ماژور نشان می‌دهد که ۶۱٪ از این بیماران مبتلا به ویرمی پلاسما می‌باشند (۱۲). با مقایسه گزارش‌ها، مشخص می‌شود که میزان شیوع TTV بیماران دریافت کننده خون در تهران (۶۶/۸٪) با میزان شیوع TTV هموفیلی‌های ژاپن (۶۵-۷۵٪)، تالاسمی‌های کشور ترکیه (۶۱٪) و بیماران دریافت کننده خون در کشور ایتالیا (۶۹/۱٪) بسیار نزدیک بوده، ولی با همودیالیزی‌های ژاپن (۵۱/۳٪) و مجارستان (۵۰/۴٪) اختلاف بیشتری نشان داده است.

به هر حال با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیقات مختلف می‌توان چنین استنباط نمود که بیش از نیمی از بیمارانی که به طور مکرر خون یا فرآورده‌های خونی دریافت می‌کنند و یا سابقه‌ای از انتقال خون داشته‌اند، حامل TTV در خون خود می‌باشند.

یکی از راه‌های مهم انتشار این ویروس، انتقال از طریق خون یا فرآورده‌های خون است. بنا بر مطالب گفته شده، بررسی میزان فراوانی افراد حامل این ویروس در جمعیت اهداکنندگان خون در جوامع مختلف امری منطقی و ضروری به نظر می‌رسد.

میزان شیوع TTV در بین اهداکنندگان سالم خون در تهران، همان‌طور که قبلاً اشاره شد ۴۱٪ می‌باشد. در کشورهای دیگر نیز با همین دسته آغازگر و با روش Semi nested، آمار متفاوتی از میزان شیوع این ویروس در جمعیت اهداکنندگان گزارش شده‌است. ۱۰٪ در اروپا، ۳۴٪ در کشور ژاپن، ۱۰٪ تا ۶۲٪ در آمریکای جنوبی، ۲۲٪ در ایتالیا، ۱۸/۵٪ در مجارستان و بالاخره ۱٪ در آمریکای شمالی (۱۷-۱۳).

همان‌طور که ملاحظه می‌گردد این ویروس در مناطق مختلف دنیا شایع می‌باشد، از این میان آمار منتشر شده در بعضی کشورها به نتایج ما نزدیک‌تر بوده است در حالی‌که با بعضی از آن‌ها اختلاف بیشتری دارد. نکته دیگری که می‌توان به آن توجه نمود اختلاف آمار بین مناطق مختلف یک کشور می‌باشد که می‌تواند به شرایط منطقه ارتباط داشته باشد مثلاً در ژاپن بین ۱۰٪ تا ۶۰٪ گزارش شده‌است. این تحقیق در اهواز نیز انجام شد که درصد شیوع بین اهداکنندگان ۲۰٪ و دریافت‌کنندگان خون ۵۷/۲٪ به دست آمد (۱۸).

همان‌طور که ملاحظه می‌شود میزان شیوع در اهداکنندگان و دریافت‌کنندگان خون در تهران بیشتر است که احتمالاً به دلیل تجمع زیاد جمعیت و ارتباط نزدیک مردم در تهران می‌باشد که باعث آلودگی بیشتر شده‌است. به هر حال شیوع بالای ویرمی بین افراد سالم جامعه که هیچ سابقه‌ای از انتقال خون نداشته‌اند می‌تواند بیانگر انتقال این ویروس از راه‌های دیگر غیر از انتقال خون باشد. با توجه به این که ماستوبورا و همکاران توانستند DNA این ویروس را از مدفوع بیمار عفونت یافته با همین ویروس ایزوله نمایند، شاید راه مدفوعی - دهانی نظیر آنچه که در مورد ویروس هپاتیت A وجود دارد نیز یکی از راه‌های انتقال این ویروس باشد (۱۹).

بنابراین به دلیل عدم درک کامل پاسخ‌های ایمنی ایجاد شده به واسطه حضور ویروس در بدن میزبان، تاکنون آنتی‌بادی برای این ویروس شناسایی نشده و هیچ‌یک از مطالعات اپیدمیولوژیک انجام گرفته قادر به تخمین میزان شیوع واقعی این ویروس نبوده‌است. مطالعات صورت گرفته با روش PCR، بر اساس شناسایی

ویرمی بوده و فقط قادر به تشخیص عفونت‌های زمان حال می‌باشد. دیگر این‌که آغازگرهایی که در حال حاضر برای شناسایی این ویروس مورد استفاده قرار گرفته فقط قادر به شناسایی تعدادی از ژنوتایپ‌های TTV بوده و با معرفی آغازگرهای بهینه شده و یا استفاده از پروتکل‌های مختلف PCR، شاهد افزایش شدیدی در میزان شیوع ویرمی با TTV خواهیم بود.

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه، زمینه کلینیکی بیماران شامل متغیرهای سن، جنس و تعداد دفعات دریافت خون با میزان شیوع

TTV مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های به دست آمده نشان داد که بین نتایج مثبت و منفی آزمایش TTV-PCR جمعیت هدف با جنسیت آن‌ها ارتباطی وجود ندارد در حالی‌که با سن و تعداد دفعات دریافت خون ارتباط معنی‌داری به دست آمد ( $p=0/01$ ) و ( $p=0/04$ ) و افزایش سن بیماران که با افزایش تعداد دفعات دریافت خون همراه است باعث افزایش میزان شیوع می‌شود.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از خانم ندا پسندیده اعلام می‌دارند.

## References :

- 1- Koto T, Mizokam M, Orito T, Nakano T, Tanoka Y. High prevalence of TT virus infection Japanese patients with liver disease and in blood donors. *J Hepato* 1999; 31: 221-27.
- 2- Matsubara H, Michitaka K, Horiike N. Existence of TTV DNA intra cellular body fluids from normal healthy Japanese Subjects. *J Inter virol* 2000; 43: 16-19.
- 3- Niel C. High detection rates of TTV-Like mini virus sequences in sera from Brazilian blood donors. *J Med Virol* 2001; 62: 199-205.
- 4- Vasconcelos H, Menezes M, and Niel C. TT virus infection in children and adults who visited a general hospital in the south of Brazil for routine procedure. *Mem Inst Oswaklo Cruz* 2001; 96(4): 519-22.
- 5- Leary T P, Erker C, Chalmers ML, Desai SM, Mushahwar I K. Optimizd PCR assay for the detection of TT virus. *J Virol Methods* 1999; 82: 109-112.
- 6- Okamoto H, Nishizawa T, Tadhashi M, Asabe M, Tsuda F. Heterogeneous distribution of TT virus of distinct fenotypes in multiple tissues from infected humans. *Virlogy* 2001; 6: 358-368.
- 7- Luo K, Hiang W, He H, Yang S, Wang Y. Experimental infection of nonenveloped. DNA Virus (TTV) in rhesus monkey. *J Med Virol* 2000; 61: 129-64.
- 8- Kondili LA, Pisani G, Beneduce F, Morace G, Gentili G. Prevalence of TT virus in healthy children and thalassemic Pediatric and young adult patients. *J Pediari G Astroenterol* 2001; 35(5): 629-32.
- 9- Nisishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated transminase level in posttransfusion hepatitis of unkown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 241: 92-99.
- 10- Lefrere JJ, Roudot TF, Lefrere F, Kahfer A, Maritti M. Natural history of the TT virus infection through follow-up of TTV DNA-positive multiple-transfused Patients. *Blood* 1999; 95: 347-51.
- 11- Okamura A, Yoshioka M, Kikuta H, Kubota M, Ma X. Detection of TT virus sequences in children with liver disease of unknown etiology. *J Med Virol* 2000; 62: 104-108.
- 12- Daniel P, Yu-Huei L, Claudia D M, Jen-Kuei. A prospective study on TTV virus infection in transfusion-dependent patients with b-thalassemia. *Blood* 1999; 5(1): 1502-1505.
- 13- Parquet MC, Yatsushashi H, Koga M. Prevalence and clinical characteristics of TT virus (TTV) in patients with sporadic actue hepatitis of unknown dtiology. *J. Hepatcl* 1999; 31: 985-9.
- 14- Nishiguohia S, Enomoto M, Shiomi S, Tanaka M, Fnkuda K. TT virus infection patients with chronic liver disease of unknown etlototy. *J Med Virol* 2000; 62: 392-98.
- 15- Concelos H, Menezes ME, Niel C. TTV virus infection in children & adults who visited a general hospital in the sought of Brazil for routine procedure. *Mem inst oswaldo Mem inst oswaldo cruz, Rio de Janeiro* 2001; 96: 519-522.
- 16- Masia G, Ingiammi A, Demelia L, Faa G, Manconi PE. TT virus infection in Italy prevalence and genolypes in healty subjects, viral diseases and asymptomatic infection by prevalence and genolypes in healty subjects, viral diseases and asymptomatic infection by parenterally transmitted viruses. *J Virol Hepatitis* 2001; 8: 384-390.
- 17- Huaang L, Jonassen TY, Hungnes O. High prevalence of TT virus-related DNA (90%) and diverse viral genotypes in norwegian blood donors. *J. Med Viril* 2001; 64: 381-386.
- 18- Zandieh T, Babaahmadi B, Pourfahooah A, Emam J, Jalalifar MA. Transfusion transmitted virus (TTV) infection in thalassemic patients. *Iranian J Publ Health* 2005; 34 (4): 24-28.
- 19- Matsubara H, Maichitaka K, Horiike N. Existence of TTV DNA intra cellular body fluids from normal healthy Japanese Subjects. *J Inter virol* 2000; 43 : 16-19.

## Measurement of TTV prevalence rate by PCR method in plasma of blood donors and recipients in Tehran

Zandie T.<sup>1</sup>(PhD), Pourfathollah A.A.<sup>2</sup>(PhD), Aminikafiabad S.<sup>1</sup>(MD), Samiei Sh.<sup>1</sup>(MS), Ranjbar Kermani F.<sup>1</sup>(MS), Ghafari K.<sup>1</sup>(MS), Sobhani M.<sup>1</sup>(MS), Kovari M.<sup>1</sup>(BS), Ataei Z.<sup>1</sup>(BS)

<sup>1</sup>Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center

<sup>2</sup>Department of Hematology, Tarbiat Modarres University

### Abstract

#### Background and Objectives

Blood transfusion has a critical role in clinical practice, but there has always been a possibility for transmission of infections. A lot of research have been conducted recently to find the cause of these infections. In 1997, TTV was first found by Nishizawa. Our aim was to estimate the prevalence rate of TTV in healthy blood donors and recipients of blood components in Tehran and prepare PCR kits to detect this virus.

#### Materials and Methods

In this research, we studied the prevalence rate of TTV in 250 thalassemic, hemophilic and dialysis patients and 250 blood donors. After extraction of DNA and amplification by semi-nested polymerase chain reaction, the bands of DNA were observed in electrophoresis with 2% gel agarose.

#### Results

250 patients were studied 66.9% of whom were positive and 33.1% negative for TTV. TTV-PCR results were also studied in 250 blood donors 41% of whom were positive and 59% negative. There was a significant difference ( $p=0.0001$ ) between patients and the control group.

#### Conclusions

TTV has a high prevalence in recipients and blood donors. Blood transfusion probably is not the only way for transmission of TTV, and other ways such as oral-fecal route can also play a role for transmission of TTV.

**Key words:** TTV, Blood donor, Blood recipient  
SJIBTO 2006; 3(2): 153-160

Received: 10 Sep 2005

Accepted: 15 May 2006

Correspondence: Zandied T. PhD of Biologic Products. IBTO-Research Center  
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601580; Fax : (+9821) 88601580  
E-mail: Zandyeh@ibto.ir