

فراوانی و نقش ویروس Torque Teno در اهداکنندگان سالم و آلوده به ویروس های هپاتیت B و C در استان آذربایجان شرقی

دکتر مجید بوذری^۱، احد مختارزاده^۲

چکیده

سابقه و هدف

TTV برای نخستین بار در سال ۱۹۹۷ در خون بیماران ژاپنی با سطوح بالای آلانین ترانسفراز (ALT) که عاری از دیگر ویروس های عامل هپاتیت بودند، کشف شد. به منظور تعیین فراوانی آلودگی به TTV و نقش آن در آسیب های کبدی، نمونه های سرمی افراد به ظاهر سالم و افراد آلوده به ویروس های HBV و HCV از سازمان انتقال خون شهر تبریز تهیه گردید و مورد آزمایش قرار گرفت.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی و مقطعی بود. نمونه گیری از ۱۰۰ اهداکننده سالم، ۴۰ اهداکننده دارای نتایج مثبت HBsAg و ۴۰ اهداکننده Anti-HCV مثبت پس از غربالگری، در سازمان انتقال خون آذربایجان شرقی انجام شد. ابتدا سطح آنزیم های ALT و AST اندازه گیری و سپس DNA استخراج شد که با استفاده از آغازگرهای T801 و T935 جامع، PCR صورت گرفت. برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها از آزمون های دقیق فیشر، ANOVA، Kruskal-Wallis test، Dunn's و Tukey-Kramer استفاده شد.

یافته ها

محصول PCR یک باند ۱۹۹ bp بود که در ۶۵ درصد از نمونه های سالم، ۷۰ درصد از افراد آلوده به HBV و ۶۷/۵ درصد از افراد آلوده به HCV، مشاهده گردید. هم چنین اختلاف معنی داری در مقایسه سطوح آنزیم های ALT و AST در سه گروه مورد مطالعه مشاهده نگردید.

نتیجه گیری

با توجه به شیوع بسیار بالای آلودگی به TTV در بین افراد به ظاهر سالم و عدم تفاوت معنی دار سطح آنزیم های کبدی بین گروه شاهد (افراد سالم) و افراد آلوده به ویروس های هپاتیت B و هپاتیت C، به نظر می رسد که TTV یا حداقل زئونوتیپ های خاصی که در مطالعه حاضر مورد شناسایی قرار گرفتند، برای کبد انسان بیماری زا نبودند.

کلمات کلیدی: Torque Teno ویروس، اهداکنندگان خون، PCR

تاریخ دریافت: ۸۷/ ۲/ ۱۱

تاریخ پذیرش: ۸۷/ ۱۰/ ۳

۱- مؤلف مسؤول: PhD ویروس شناسی - استادیار دانشکده علوم دانشگاه اصفهان - خیابان هزار جریب - کدپستی: ۸۱۷۴۶-۷۳۴۴۱
۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی - دانشکده علوم دانشگاه اصفهان

مقدمه

تا سال ۱۹۹۰، پنج نوع ویروس هپاتیت، بر اساس حروف الفبا از A تا E شناسایی و نامگذاری گردیدند. در سال ۱۹۹۵ نیز ویروس GBV-C یا همان ویروس هپاتیت G شناسایی شد. به هر حال تاکنون عامل ۵۰٪ از بیماری‌های کبدی ناشناخته مانده است. ۱۰ تا ۲۰ درصد از بیماران کبدی دارای بیماری حاد کبدی هستند، ۵ تا ۱۰ درصد نیز بیماری مزمن کبدی را نشان می‌دهند که شامل هپاتیت مزمن، سیروز کبدی و هپاتوسلولار کارسینوما می‌باشد. تاکنون پیشرفت‌های قابل توجهی در مورد توصیف ویروس‌های هپاتوتروپیک انسانی صورت گرفته است اما هنوز بخش نسبتاً زیادی از علل هپاتیت حاد و مزمن ناشناخته مانده است که قابل استناد به این ویروس‌ها یا به ویروس‌هایی نظیر اترو ویروس‌های معین، آدنوویروس‌ها، پاروویروس B19 و غیره که گمان می‌رود گاه و بی‌گاه باعث آسیب‌های کبدی بدون بروز علائم خاص شوند، نمی‌باشند (۲، ۱).

در سال ۱۹۹۷، یک ویروس DNA دار جدید غیر وابسته به ویروس‌های هپاتیت شناخته شده، توسط نی‌شی‌زاوا و همکارانش از سرم یک بیمار ژاپنی با سابقه ابتلا به هپاتیت بعد از انتقال خون با منشأ ناشناخته که سطوح افزایش یافته آلانین آمینوترانسفراز (ALT) را نشان می‌داد جداسازی و به نام ویروس TT (TTV) معرفی گردید. نام TTV از حروف اول اسم بیماری که برای اولین بار در آن شناسایی شد (Torque Teno)، اقتباس شده است. TTV یک ویروس بدون پوشش، کروی و کوچک می‌باشد (۴، ۳).

TTV دارای دامنه گسترده‌ای از توالی متغیر و ناهمگون در میان ویروس‌های DNA دار می‌باشد. امروزه TTV تقریباً به ۴۰ ژنوتیپ تقسیم می‌شود که در ۵ گروه فیلوژنتیکی مجزا تقسیم‌بندی شده و به صورت ۱ تا ۵ نشان داده می‌شوند (۵، ۴).

به علت تشخیص این ویروس در نمونه‌های بیولوژیکی مختلف نظیر پلاسما، مدفوع، بزاق، ترشحات گردن رحم، مایع آمنیوتیک، ترشحات بینی و گلو، منی، شیر، پوست، ناخن، اشک و غیره احتمال می‌رود که راه‌های مختلفی

برای انتشار آن وجود داشته باشد (۱۳-۷). بررسی‌ها حاکی از شیوع بالای این ویروس در سرتاسر دنیا می‌باشد که یک حالت استثنایی و منحصر به فرد در بین ویروس‌ها است (۶). از سال ۱۹۹۷ تاکنون، مطالعه‌های زیادی درباره ساختار ژنتیکی، خصوصیات بیوفیزیکی، اپیدمیولوژی و اهمیت کلینیکی TTV صورت گرفته است (۶). به عنوان مثال بررسی‌های صورت گرفته توسط کوايستارا و همکارانش در سال ۲۰۰۴ نشان داد که TTV قابلیت القای آپوپتوزیس در هپاتوسیت‌های مشتق از سرطان کبد را دارد (۷). با وجود این به نظر می‌رسد که این بررسی‌ها کافی نیست و باید زمینه تحقیقات گسترده‌تری جهت شناسایی این ویروس نوظهور و نقش احتمالی آن در ایجاد بیماری‌ها فراهم گردد. شایان ذکر است زمانی که ویروس‌های هپاتیت کبد را آلوده می‌کنند، سبب آسیب کبد و بروز علائم کلاسیک هپاتیت همراه با زردی و رهایی آنزیم‌های کبدی از قییل ALT و AST در خون می‌شوند (۱۴، ۹، ۳). در افراد سالم و طبیعی، سطح این آنزیم‌ها در خون بسیار پایین است. با این وجود در افرادی که دچار التهاب در کبد می‌شوند، در اثر التهاب و آسیب رسیدن به غشای سلول‌های کبدی و یا مرگ سلول‌ها، این آنزیم‌ها به میزان زیادی وارد خون می‌شوند (۱۴، ۹، ۳). AST علاوه بر هپاتوسیت‌ها در میتوکندری سلول‌های قلبی، ماهیچه‌ای، کلیه و سلول‌های مغزی نیز وجود دارد. بنابراین جزو آنزیم‌های اختصاصی کبد نبوده، در بیماری‌های اندام‌های مذکور نیز مشاهده می‌شود. در حالی که ALT منحصر به سلول‌های کبدی است و در ناهنجاری‌ها و عفونت‌های کبدی به میزان زیادی وارد خون می‌شود. یکی از این موارد، آلودگی توسط ویروس‌های هپاتیت به خصوص ویروس‌های هپاتیت A، B و C است که سبب التهاب در بافت کبدی و آزاد شدن آنزیم‌های مذکور می‌شود (۱۵، ۱۴، ۹، ۳).

با توجه به این که ممکن است TTV در ایجاد و تشدید بیماری‌های دیگر نقش داشته باشد، در این تحقیق به بررسی میزان آلودگی اهداکنندگان خون به این ویروس پرداخته شد و سطوح آنزیم‌های کبدی ALT و AST در افراد سالم و افراد آلوده به ویروس‌های هپاتیت B و C

مختلف مورد مطالعه نیز جمع‌آوری شد. تمامی نمونه‌ها تا شروع انجام آزمایش‌ها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ابتدا برای بررسی سطح آنزیم‌های ALT و AST از کیت ترانس آمیناز شرکت من (ایران) استفاده شد.

پس از اندازه‌گیری سطح آنزیمی تمامی نمونه‌ها، استخراج DNA از تمامی نمونه‌ها صورت گرفت، بدین ترتیب که بعد از تیمار کردن ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه سرمی با پروتئیناز K (۰/۵ mg/ml)، در حضور NaCl (۰/۲ M) و SDS (۰/۲۵٪) برای ۲ ساعت، در ۶۵°C بر روی ترمومیکسچر با دور ۳۵۰ rpm، DNA با استفاده از فنل، کلروفرم و ایزوآمیل الکل استخراج و با اتانول رسوب داده شد. نهایتاً رسوب خشک DNA در ۱۰۰ تا ۱۵۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل یا محلول TE حل و در دمای ۲۰°C- ذخیره گردید. آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق، T801 و T935 بودند که به وسیله تاکاهاشی و همکارانش برای منطقه غیر کد کننده و بسیار محافظت شده ژنوم ویروسی (UTR) و جهت تکثیر یک قطعه ۱۹۹ bp طراحی شده‌اند. با استفاده از این آغازگرها، شناسایی تقریباً تمام ژنوتیپ‌های TTV امکان‌پذیر است (۱۳).

بررسی گردید تا از این طریق پی برده شود که آیا TTV به تنهایی قادر به آسیب کبدی و افزایش سطح آنزیم‌های کبدی است و یا این که می‌تواند به عنوان یک ویروس کمکی برای ویروس‌های هپاتیت B و C عمل کرده و باعث افزایش سطح آنزیم‌های مذکور نسبت به افرادی که فقط آلوده به هپاتیت B و C هستند، شود (۶، ۸، ۱۲، ۱۳).

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی مقطعی بود و جامعه مورد بررسی تعدادی از اهداکنندگان خون مراجعه کننده به پایگاه ثابت انتقال خون تبریز در سال‌های ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ بودند. برای انجام این تحقیق، مقدار ۵ میلی‌لیتر خون از ۱۰۰ اهداکننده سالم که از نظر Anti-HIV، HBsAg و Anti-HCV منفی بودند به صورت تصادفی ساده در شش نوبت تهیه گردید. علاوه بر این ۴۰ نمونه HBsAg مثبت و تعداد ۴۰ نمونه Anti-HCV مثبت از مراجعه کنندگان اهدا خون پس از آزمایش غربالگری نیز به صورت غیر تصادفی از سازمان انتقال خون آذربایجان شرقی تهیه گردید. اطلاعات مربوط به سن، جنس و گروه خونی گروه‌های

جدول ۱: فراوانی افراد آلوده به TTV و مقایسه بین گروه‌های مختلف مورد مطالعه از نظر آلودگی با TTV

p value	آلوده به HCV		آلوده به HBV		سالم		گروه‌های مورد مقایسه
	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	
۰/۶۹۲	-	-	۷۰	۲۸	۶۵	۶۵	سالم با HBV
۰/۸۴۵	۶۷/۵	۲۷	-	-	۶۵	۶۵	سالم با HCV
۱	۶۷/۵	۲۷	۷۰	۲۸	-	-	HCV با HBV

جدول ۲: توزیع فراوانی آلودگی به ویروس TT در رده‌های مختلف سنی و گروه‌های مختلف خونی در اهداکنندگان سالم، آلوده به HBV و آلوده به HCV

آلودگی با ویروس		گروه خونی						گروه سنی	
		A	B	AB	O	۱۸-۳۰	۳۱-۴۳	۴۴-۵۶	
		تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	
سالم	TTV+	۲۵(۶۵/۸)	۱۹(۶۵/۵)	۷(۷۰)	۱۴(۶۰/۸)	۲۸(۵۹/۵)	۲۰(۶۶/۶)	۱۷(۷۳/۹)	
HBV	TTV+	۹(۶۴/۳)	۱۰(۱۴/۴)	۴(۸۰)	۵ (۷۱/۴)	۱۰(۶۲/۵)	۱۲(۷۰/۶)	۶ (۸۵/۷)	
HCV	TTV+	۹(۶۴/۳)	۹ (۶۹/۲)	۳(۶۰)	۶ (۷۵)	۱۳(۶۸/۴)	۷ (۶۳/۶)	۷ (۷۰)	

تکثیر اسیدهای نوکلئیک استخراج شده در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مقادیر واکنش PCR شامل ۳ میکرولیتر از DNA استخراج شده، ۱ واحد از آنزیم DNA تک پلی مرارز (سیناژن، ایران)، $0.4 \mu\text{M}$ از هر یک از آغازگرها، $240 \mu\text{M}$ از هر یک از dNTPs، 20 mM از Tris-HCl، 3 mM از MgCl_2 ، 50 mM از KCl و 20 mM سولفات آمونیوم بود. برنامه PCR شامل یک دوره دناتوره شدن در 94°C به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ دوره تکثیر شامل دوره‌های دناتوره شدن، الحاق و طولیل شدن به ترتیب، در 94°C به مدت ۲۰ ثانیه، در 57°C به مدت ۲۵ ثانیه و در 72°C به مدت ۳۰ ثانیه و یک دوره طولیل شدن نهایی در 72°C به مدت ۵ دقیقه بود.

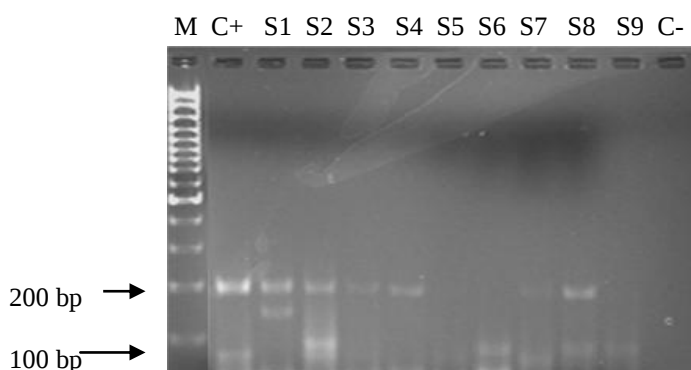
در این مطالعه نمونه‌های منفی دوباره مورد آزمایش قرار گرفتند، یعنی هم محصول PCR نمونه‌های منفی و هم خود نمونه‌های DNA استخراج شده، برای بار دوم با روش PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. باید خاطر نشان شود که در همه آزمایش‌ها نمونه کنترل منفی و هم چنین نمونه کنترل مثبت که طی تحقیق قبلی (میزان شیوع ویروس نوپدید TT در جمعیت اصفهان) تهیه شده و تعیین توالی نیز گشته بود (Accession number in gene bank: DQ133465) استفاده شد (۱۶).

پس از انجام PCR، بر روی محصولات PCR الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪ صورت گرفت و باندهای ۱۹۹ bp تحت نور UV و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر دستگاه ژل داکومننت مشاهده گردید.

یافته‌ها

در آزمایش ژل الکتروفورز محصولات PCR، باندهای ۱۹۹ bp مورد نظر در رابطه با ۱۲۰ نمونه از ۱۸۰ نمونه مورد آزمایش مشاهده شد (شکل ۱ و جدول ۱). همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، اختلاف آماری معنی‌داری بین فراوانی آلودگی به TTV در گروه‌های مختلف مشاهده نگردید. با توجه به نتایج محاسبات آماری اختلاف آماری، معنی‌داری بین گروه‌های مختلف خونی از نظر آلودگی به TTV در اهداکنندگان سالم، اهداکنندگان آلوده به HBV و اهداکنندگان آلوده به HCV مشاهده

نگرديد(جدول ۲). هم چنين اختلاف آماری معنی داری بين رده های مختلف سنی از نظر آلودگی به TTV در اهداکنندگان سالم، اهداکنندگان آلوده به HCV مشاهده نگرديد. لازم به ذکر است که افراد HBsAg و Anti-HCV مثبت، جزو مراجعه کنندگان به مرکز انتقال خون بوده اند و به دليل عدم داشتن علايم باليني بيماری حاد يا مزمن هپاتيت احتمالاً در مراحل ابتدای آلودگی نسبت به ويروس های B و C بوده اند. بر اساس تجزيه و تحليل آماری، تغييرات مشاهده شده در سطوح آنزيم های کبدی ALT و AST در افراد سالم آلوده به TTV و غير آلوده به TTV اختلاف معنی داری ندارند(جدول ۳). اختلاف ميانگين افراد سالم آلوده به TTV با افراد آلوده به HBV و غير آلوده به TTV، آلوده به HBV و TTV، آلوده به HCV و TTV، آلوده به HCV و غير آلوده به TTV و هم چنين بين افراد سالم غير آلوده به TTV با افراد آلوده به HBV و TTV، آلوده به HBV و TTV، آلوده به HCV و TTV و غير آلوده به HCV و TTV و غير آلوده به TTV، از نظر آماری معنی دار بود($p < 0/05$ - $p < 0/001$). از نظر آماری اختلاف مشاهده شده بين افراد آلوده به HBV و TTV با افراد آلوده به HBV و غير آلوده به TTV، آلوده به HCV و TTV و غير آلوده به HCV و TTV، معنی دار نبود. افراد آلوده به HBV و غير آلوده به TTV اختلاف آماری معنی داری با افراد آلوده به HCV و



شکل ۱: نتایج حاصل از PCR بر روی نمونه‌ها، M مارکر، C+ کنترل مثبت، C- کنترل منفی، S1 تا S9 نمونه‌های مورد مطالعه. نمونه‌های S8، S7، S4، S3، S2، S1 نمونه‌های مثبت، S9، S6، S5 نمونه‌های منفی

جدول ۳: مقایسه سطوح آنزیم‌های کبدی ALT و AST در اهداکنندگان سالم، اهداکنندگان دارای نتایج غربالگری مثبت HBs Ag و Anti-HCV مثبت

آنزیم کبدی AST			آنزیم کبدی ALT			گروه‌های مورد مطالعه
p value	Mean ± SD	Mean ± SD	p value	Mean ± SD	Mean ± SD	
NS	۱۹/۵۰ ± ۸/۹۰	۲۰/۱۵ ± ۹/۰۷	NS	۱۷/۸۳ ± ۹/۲۰	۱۸/۶۹ ± ۸/۳۹	سالم TTV ⁺ با سالم TTV ⁻
p < ۰/۰۰۱	۴۰/۱۴ ± ۱۸/۸۸	۲۰/۱۵ ± ۹/۰۷	p < ۰/۰۰۱	۳۹/۵۵ ± ۲۳/۶۰	۱۸/۶۹ ± ۸/۳۹	سالم TTV ⁺ با سالم HBV TTV ⁺
p < ۰/۰۱	۳۸/۱۰ ± ۳۱/۶۰	۲۰/۱۵ ± ۹/۰۷	p < ۰/۰۱	۳۷/۰۹ ± ۲۶/۷۷	۱۸/۶۹ ± ۸/۳۹	سالم TTV ⁺ با سالم HBV TTV ⁻
p < ۰/۰۰۱	۴۰/۶۴ ± ۲۰/۱۲	۲۰/۱۵ ± ۹/۰۷	p < ۰/۰۰۱	۳۹/۹۶ ± ۲۱/۶۵	۱۸/۶۹ ± ۸/۳۹	سالم TTV ⁺ با سالم HCV TTV ⁺
p < ۰/۰۱	۳۷/۴۶ ± ۲۰/۲۳	۲۰/۱۵ ± ۹/۰۷	p < ۰/۰۵	۳۴/۸۲ ± ۲۰/۳۰	۱۸/۶۹ ± ۸/۳۹	سالم TTV ⁺ با سالم HCV TTV ⁻
p < ۰/۰۰۱	۴۰/۱۴ ± ۱۸/۸۸	۱۹/۵۰ ± ۸/۹۰	p < ۰/۰۰۱	۳۹/۵۵ ± ۲۳/۶۰	۱۷/۸۳ ± ۹/۲۰	سالم TTV ⁺ با سالم HBV TTV ⁻
p < ۰/۰۱	۳۸/۱۰ ± ۳۱/۶۰	۱۹/۵۰ ± ۸/۹۰	p < ۰/۰۱	۳۷/۰۹ ± ۲۶/۷۷	۱۷/۸۳ ± ۹/۲۰	سالم TTV ⁻ با سالم HBV TTV ⁻
p < ۰/۰۰۱	۴۰/۶۴ ± ۲۰/۱۲	۱۹/۵۰ ± ۸/۹۰	p < ۰/۰۰۱	۳۹/۹۶ ± ۲۱/۶۵	۱۷/۸۳ ± ۹/۲۰	سالم TTV ⁻ با سالم HCV TTV ⁺
p < ۰/۰۱	۳۷/۴۶ ± ۲۰/۲۳	۱۹/۵۰ ± ۸/۹۰	p < ۰/۰۵	۳۴/۸۲ ± ۲۰/۳۰	۱۷/۸۳ ± ۹/۲۰	سالم TTV ⁻ با سالم HCV TTV ⁻
NS	۳۸/۱۰ ± ۳۱/۶۰	۴۰/۱۴ ± ۱۸/۸۸	NS	۳۷/۰۹ ± ۲۶/۷۷	۳۹/۵۵ ± ۲۳/۶۰	سالم HBV TTV ⁻ با سالم HBV TTV ⁺
NS	۴۰/۶۴ ± ۲۰/۱۲	۴۰/۱۴ ± ۱۸/۸۸	NS	۳۹/۹۶ ± ۲۱/۶۵	۳۹/۵۵ ± ۲۳/۶۰	سالم HBV TTV ⁺ با سالم HCV TTV ⁺
NS	۳۷/۴۶ ± ۲۰/۲۳	۴۰/۱۴ ± ۱۸/۸۸	NS	۳۴/۸۲ ± ۲۰/۳۰	۳۹/۵۵ ± ۲۳/۶۰	سالم HBV TTV ⁺ با سالم HCV TTV ⁻
NS	۴۰/۶۴ ± ۲۰/۱۲	۳۸/۱۰ ± ۳۱/۶۰	NS	۳۹/۹۶ ± ۲۱/۶۵	۳۷/۰۹ ± ۲۶/۷۷	سالم HBV TTV ⁻ با سالم HCV TTV ⁺
NS	۳۷/۴۶ ± ۲۰/۲۳	۳۸/۱۰ ± ۳۱/۶۰	NS	۳۴/۸۲ ± ۲۰/۳۰	۳۷/۰۹ ± ۲۶/۷۷	سالم HBV TTV ⁻ با سالم HCV TTV ⁻
NS	۳۷/۴۶ ± ۲۰/۲۳	۴۰/۶۴ ± ۲۰/۱۲	NS	۳۴/۸۲ ± ۲۰/۳۰	۳۹/۹۶ ± ۲۱/۶۵	سالم HCV TTV ⁻ با سالم HCV TTV ⁺

NS = not significant

جدول ۴: مقایسه سطوح آنزیم‌های کبدی ALT و AST در گروه‌های مختلف خونی در اهداکنندگان سالم، اهداکنندگان دارای نتایج غربالگری مثبت HBs Ag و Anti-HCV مثبت

اهداکنندگان سالم		اهداکنندگان آلوده به HBV		اهداکنندگان آلوده به HCV		نوع گروه خونی و آلودگی با TTV
p	IU/L: Mean ± SD	p	IU/L: Mean ± SD	p	IU/L: Mean ± SD	
۰/۷۶۶ *	۱۹/۵۷ ± ۸/۰۵	۰/۸۰۹ *	۴۸/۲۲ ± ۳۰/۶۶	۰/۹۹۶ *	۴۳/۳۴ ± ۳۱/۴۰	TTV ⁺ A ALT
	۲۰/۵۷ ± ۹/۰۹		۳۵/۱۱ ± ۱۹/۷۱		۳۴/۲۹ ± ۱۴/۳۸	TTV ⁺ B ALT
	۱۵/۰۰ ± ۴/۰۱		۴۶/۱۸ ± ۲۶/۱۷		۴۳/۱۶ ± ۱۴/۸۵	TTV ⁺ AB ALT
	۲۰/۱۰ ± ۱۰/۲۹		۲۷/۱۸ ± ۱۲/۹۳		۴۱/۸۱ ± ۱۸/۷۳	TTV ⁺ O ALT
	۱۷/۵۵ ± ۷/۶۸		۳۸/۰۵ ± ۳۳/۸۳		۳۸/۲۲ ± ۲۲/۹۳	TTV ⁻ A ALT
	۲۰/۵۳ ± ۱۰/۹۶		۴۷/۴۵ ± ۲۳		۳۲/۶۸ ± ۲۵/۵۱	TTV ⁻ B ALT
	۱۱/۷۳ ± ۴/۸۲		-		۳۸/۴۴ ± ۱۶/۸۲	TTV ⁻ AB ALT
	۱۷/۲۹ ± ۱۰/۳۵		۲۵/۳۵ ± ۱۹/۹۶		۲۶/۹۹ ± ۱۹/۴۹	TTV ⁻ O ALT
	۱۹/۳۱ ± ۸/۰۹		۴۵/۲۱ ± ۲۳/۴۴		۴۰/۹۱ ± ۲۲/۲۳	TTV ⁺ A AST
	۲۰/۵۷ ± ۹/۰۹		۳۴/۶۹ ± ۱۳/۵۹		۴۰/۸۶ ± ۲۳/۳۰	TTV ⁺ B AST
	۲۰/۱۰ ± ۱۰/۲۸		۴۶/۹۹ ± ۲۱/۵۹		۳۸/۳۷ ± ۲۰/۵۲	TTV ⁺ AB AST
	۲۱/۱۰ ± ۱۰/۸۵		۳۴/۲۵ ± ۱۷/۴۸		۴۱/۰۴ ± ۱۶/۱۰	TTV ⁺ O AST
	۱۶/۸۶ ± ۷/۶۹		۳۷/۱۶ ± ۲۴/۶۸		۴۴/۳۵ ± ۲۰/۴۲	TTV ⁻ A AST
	۱۹/۲۱ ± ۷/۳۳		۵۳/۶۹ ± ۴۵/۷۰		۴۱/۱۲ ± ۲۶/۱۹	TTV ⁻ B AST
	۱۶/۶۶ ± ۳/۷۸		-		۲۸/۴۷ ± ۱۲/۸۰	TTV ⁻ AB AST
	۲۴/۶۰ ± ۱۱/۸۳		۲۳/۳۴ ± ۹/۶۲		۲۱/۹ ± ۹/۱۰	TTV ⁻ O AST

* اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد. ALT: آلانین آمینوترانسفراز AST: آسپاراتات آمینو ترانسفراز A، B، AB، O: گروه‌های خونی

TTV و افراد آلوده به HCV و عدم آلوده به TTV، را نشان ندادند. هم چنین اختلاف آماری معنی داری بین افراد آلوده به HCV و TTV با افراد آلوده به HCV و غیر آلوده به TTV مشاهده نگردید. مقایسه سطوح آنزیم های کبدی ALT و AST در گروه های مختلف خونی در اهداکنندگان سالم، اهداکنندگان آلوده به HBV و اهداکنندگان آلوده به HCV در آذربایجان شرقی نیز صورت گرفت، برای این مقایسه نمونه های مربوط به افراد سالم، افراد آلوده به HBV و افراد آلوده به HCV ابتدا بر اساس معیار آلودگی به TTV تفکیک شدند و سپس گروه های حاصل بر اساس گروه های خونی مختلف طبقه بندی گردیدند (جدول ۴).

اختلاف آماری معنی داری بین گروه های خونی مختلف آلوده به TTV و سطوح آنزیم های کبدی ALT و AST مشاهده نگردید.

بحث

از ابتدای کشف TTV، به علت گزارش دو مورد در زمینه ارتباط ویروس TT با هپاتیت و نقش احتمالی آن در ایجاد هپاتیت، بیشتر تحقیقات معطوف به بررسی ارتباط ویروس TT با ویروس های هپاتیت و هپاتیت های با منشأ ناشناخته گردیده است. نی شی زاوا و همکارانش نشان دادند که TTV-DNA در سرم افراد مبتلا به هپاتیت بعد از انتقال خون با منشأ ناشناخته ارتباط نزدیکی با سطح آنزیم آلانین ترانسفراز (ALT) سرمی دارد (۳). اوکاموتو و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که سطح TTV-DNA در بافت کبدی افراد آلوده ۱۰ تا ۱۰۰ برابر بیشتر از سرم این افراد است (۴).

این یافته ها پیشنهاد کرد که این ویروس در کبد تکثیر می یابد. به هر حال هیچ یک از مطالعات بعدی نتوانستند ارتباط مستقیم TTV را با هپاتیت های با منشأ ناشناخته و یا با سرطان کبدی اثبات بکنند. اکثریت افرادی که پس از انتقال خون نسبت به TTV-DNA مثبت می شوند، سطح آنزیم ALT نرمالی را نشان می دهند و علائمی از هپاتیت مزمن در این افراد مشاهده نمی شود، اگرچه ویرمیای TTV برای چندین سال ادامه دارد (۸، ۹). به این ترتیب به نظر می رسد که TTV نسبت به ویروس های اصلی عامل هپاتیت یعنی HBV و HCV، یک ویروس بی ضرر باشد. علاوه بر

این در چندین سری از بیماران HCV که تواماً با TTV آلوده شده بودند، افزایش شدت آسیب های هیستولوژیکی و بیوشیمیایی کبد نشان داده شد (۱۵، ۶). این موضوع می تواند بیان کند که ویروس می تواند اثر پاتوژنیسته خود را در موارد خاص و یا به عنوان ویروس کمکی اعمال نماید. در مطالعه دیگری نشان داده شد که TTV در میان افراد دریافت کننده خون نسبت به افراد عادی به طور چشمگیری بالا می باشد (۲۶/۴ درصد در مقایسه با ۴/۷ درصد)، خطر آلودگی نیز به طور مستقیم با تعداد دفعات انتقال خون ارتباط مستقیم دارد (۱۷). این نیز حاکی از اصلی ترین راه شیوع ویروس TTV، یعنی از طریق خون و فرآورده های خونی می باشد. به علت تکثیر و همانند سازی TTV در کبد، تعدادی از محققان پیشنهاد کرده اند که ممکن است TTV باعث آسیب کبد در فرصت ها و موقعیت های خاص شود (یعنی TTV یک ویروس فرصت طلب تلقی شده است). به عبارت دیگر TTV نیز مانند تعداد زیادی از ویروس های دیگر هم چون اتر ویروس ها، آدنو ویروس ها، سیتومگالو ویروس، ویروس اپشتاین بار، ویروس سرخک، ویروس سرخجه، و ویروس انفلوانزا که معمولاً به عنوان علت اختلالات کبدی زودگذر با شدت های مختلف در دسته های کوچکی از بیماران شناخته شده هستند، نامزدی برای علت هپاتیت های با منشأ نامشخص می باشد. هم چنین پیشنهاد شده است که ممکن است تیپ ها، تحت تیپ ها یا انواع معینی از TTV، هپاتوتروپیک باشند (۵، ۶). نتایج حاصل از این تحقیق نیز حاکی از شیوع بالای این ویروس در جمعیت استان آذربایجان شرقی است. این در حالی است که میزان شیوع در افراد مبتلا به هپاتیت B و C، تفاوت معنی داری را با شیوع آن در افراد سالم نشان نمی دهد. نتایج به دست آمده با استفاده از آغازگرهای جامع T801 و T935 که قادر به شناسایی تمامی ژنوتایپ های ویروس می باشد، نشان می دهد فراوانی این ویروس در این استان مشابه سایر نقاط مورد مطالعه در دنیا، بالا می باشد (۶).

شیوع این ویروس با استفاده از آغازگرهای فوق در کشورهای مصر، ژاپن، میانمار، نپال، عربستان، سنگاپور، فنلاند، انگلیس و بولیوی به ترتیب ۸۵، ۹۳، ۹۶، ۸۲، ۱۰۰

ایران، مربوط به روش تحقیق و استفاده از آغازگرهای جامع در PCR بوده است. علاوه بر این در رابطه با میزان آنزیم‌های کبدی از قبیل ALT و AST، حاکی از عدم تفاوت معنی‌دار سطح این آنزیم‌ها در سرم خون افراد آلوده و غیر آلوده در هر ۳ گروه مورد مطالعه بود. بدین ترتیب به نظر می‌رسد که این ویروس در گروه‌های مورد مطالعه پاتوژن نبوده است. لازم به ذکر است که افراد HBsAg و Anti-HCV مثبت، جزو مراجعه کنندگان به مرکز انتقال خون بوده‌اند و به دلیل عدم وجود علائم بالینی حاد یا مزمن هپاتیت، احتمالاً در مراحل ابتدایی آلودگی نسبت به ویروس‌های هپاتیت B و C بوده‌اند.

نتیجه‌گیری

در مجموع به نظر می‌رسد برای کسب اطلاعات بیشتر بهتر است ژنوتایپ‌های این ویروس در بیماران خاص نظیر افراد مبتلا به هپاتیت حاد و مزمن تعیین گردد و با ژنوتایپ‌های موجود در افراد سالم مقایسه شود تا فهم کاملی از اهمیت بالینی این ویروس حداقل در مورد اثر آن در کبد به دست آید.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله از آقایان دکتر رحیم دهخدا، سید اسماعیل ترابی، خالد بهرام و سرکار خانم حقیقی در پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون تبریز به خاطر همکاری‌های صمیمانه شان در تهیه نمونه‌های خونی تقدیر و تشکر می‌نمایند.

۹۸، ۷۳، ۵۷ و ۸۲ درصد گزارش شده است (۶). در اصفهان نیز شیوع این ویروس ۷۹/۵ درصد گزارش شده است (۱۶). این در حالی است که شیوع این ویروس با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای مناطق کد کننده ویروس (ORF) نظیر ناحیه N22 در مصر، ژاپن، عربستان، فنلاند، انگلیس، ایالات متحده آمریکا و بولیوی به ترتیب ۲۹، ۵۸، ۱۹، ۱۷، ۱۰، ۱۱ و ۲۰ درصد گزارش شده است (۶). فراوانی ویروس در تهران ۴۱ درصد، ۴/۴ و ۱۱ درصد و ۲۲/۴ درصد و در اهواز ۲۳/۷ درصد گزارش شده است (۲۱-۱۸). در مجموع با توجه به مقایسه نتایج مذکور مشاهده می‌شود که سیستم‌هایی که از آغازگرهای طراحی شده بر اساس مناطق کد کننده ویروس استفاده کرده‌اند، شیوع بسیار پایینی از این ویروس را در نقاط مختلف دنیا و منجمله ایران نشان داده‌اند و این نشان‌دهنده توانایی بسیار پایین این آغازگرها در شناسایی میزان واقعی شیوع این ویروس است (۲۱-۱۹، ۶). زیرا این آغازگرها قادر به شناسایی تعداد محدودی از ژنوتایپ‌های ویروس می‌باشند. این در حالی است که سیستم‌هایی که از آغازگرهای جامع طراحی شده بر اساس مناطق حفاظت شده ژنوم ویروس (UTR) استفاده کرده‌اند، شیوع بسیار بالایی از این ویروس را در نقاط مختلف دنیا گزارش کرده‌اند که علت آن توانایی این آغازگرها در شناسایی اکثر ژنوتایپ‌های ویروسی می‌باشد (۱۷، ۶).

بنابراین فراوانی بالای مشاهده شده در این تحقیق در مقایسه با فراوانی پایین مشاهده شده در سایر تحقیقات در

References :

- 1- Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, *et al.* Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1995; 1: 564-9.
- 2- Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, *et al.* Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: A transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271: 505-8.
- 3- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 92-7.
- 4- Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iizuka H, *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepato Res* 1998; 10: 1-16.
- 5- Biagini P. Human circoviruses. *Vet Microbiol* 2004; 98: 95-101.
- 6- Bendinelli M, Pistello M, Maggi F, Fornai C, Freer G, Vatteroni ML. Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(1): 98-113.
- 7- Kooistra K, Zhang YH, Henriquez NV, Weiss B, Mumberg D, Noteborn MH. TT virus-derived apoptosis-inducing protein induces apoptosis preferentially in hepatocellular carcinoma-derived cells. *J General Virol* 2004; 85(6): 1445-1450.
- 8- Fornai C, Maggi F, Vatteroni ML, Pistello M, Bendinelli M. High prevalence of TT virus (TTV) and TTV-like minivirus in cervical swabs. *J Clin Microbiol* 2001; 39, 2022-2024.
- 9- Gad A, Tanaka E, Orii K, Kafumi T, Serwah AEH, El-Sherif A, *et al.* Clinical significance of TT virus infection in patients with chronic liver disease and volunteer blood donors in Egypt. *J Med Virol* 2000; 60: 177-181.
- 10- Ishikawa T, Hamano Y, Okamoto H. Frequent detection of TT virus in throat swabs of pediatric patients. *Infection* 1999; 27: 298.
- 11- Matsubara H, Michitaka K, Horiike N, Kihana T, Yano M, Mori T, *et al.* Existence of TT virus DNA and TTV-like mini virus DNA in infant cord blood: mother-to-neonatal transmission. *Hepato Res* 2001; 21: 280-287.
- 12- Osiowy C, Sauder C. Detection of TT virus in human hair and skin. *Hepato Res* 2000; 16: 155-162.
- 13- Takahashi K, Hoshino H, Ohta Y, Yoshida N, Mishiro S. Very high prevalence of TT virus (TTV) infection in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers. *Hepato Res* 1998; 12: 233-239.
- 14- The Universal Virus Database [home page on the internet] version 4. Buchen-Osmond, C. (Ed) ICTVdB Management 00.107.0.01. Anellovirus. In: ICTVdB New York: Columbia University; 2006. Available from: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>).
- 15- Ukita M, Okamoto H, Kato N, Miyakawa Y, Mayumi M. Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A-G hepatitis. *J Infect Dis* 1999; 179: 1245-1248.
- 16- Bouzari M, Shaykh Baygloo N, Zandieh T. Prevalence of TT virus in general population of Isfahan. *Hakim Research Journal* 2007; 4(9): 52-58.
- 17- Tangkijvanich P, Hirsch P, Theamboonlers A, Nuchprayoon I, Poovorawan Y. Association of hepatitis viruses with hepatocellular carcinoma in Thailand. *J Gastroenterol* 1999; 34(2) : 227-233.
- 18- Zandieh T, Pourfathollah A.A, Aminikafiabad S, Samiei Sh, Ranjbar Kermani F, Ghafari K, *et al.* Measurement of TTV prevalence rate by PCR method in plasma of blood donors and recipients in Tehran. *SJIBTO* 2006; 3(2): 153-160.
- 19- Hekmat Doost A, Ghaziani T, Esteghamat FS, Alavian SM, Mohaghegh Shalmani H, Zali MR. TT virus infection in Iranian patients with autoimmune Hepatitis and their controls. *Res Med* 2006; 28(3): 163-167.
- 20- Pourshams A, Azimi K, Kiani L, Sarrafi M, Farhadi Langroodi M, *et al.* TT Virus Infection Among Iranian Blood Donors: Its Prevalence and Relationship to Serum Alanine Aminotransferase (ALT) Level. *Govaresh* 2004; 2(9): 106-109.
- 21- Jalai Far M.A, Zandieh T, Imam S.J, Galehdari H, Pourfathollah A.A, Baba Ahmadi M. TTV prevalence in Ahwaz blood donors by using semi-nested PCR. *SJIBTO* 2007; 3(5): 389-395.

Frequency of TTV and its role in HBV and HCV infected blood donors in East Azarbayejan province of Iran

Bouzari M.¹(PhD), Mokhtarzadeh A.¹(MS)

¹Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Iran

Abstract

Background and Objectives

In 1997, a novel DNA virus, unrelated to the known hepatitis viruses, was isolated from the serum of a patient with posttransfusion acute hepatitis with elevated alanine aminotransferase of unknown etiology, and it was named TT virus (TTV). In this study, the frequency of TTV and its role in induction of liver damages were evaluated in three groups of healthy, HBV and HCV-infected blood donors in Tabriz.

Materials and Methods

In this descriptive study, sampling was done on 100 healthy donors, 40 HBsAg positive and 40 positive Anti-HCV in East Azarbayjan Blood Transfusion Center. The levels of ALT and AST in the sera were measured; DNA was then extracted and PCR was performed using T801 and T935 consensus primers. One-way ANOVA, Tukey-Kramer, Kruskal-Wallis, Dunn's and Fisher's Exact tests were finally used for statistical analyses.

Results

TTV was detected in 65%, 70% and 67.5% of the healthy, HBV and HCV-infected blood donors, respectively. In each group of blood donors, the levels of ALT and AST were not significantly different in TTV infected versus non-infected individuals.

Conclusions

Given the high frequency of infection in healthy individuals and considering the level of hepatic enzymes in TTV infected individuals, it seems that the virus or at least certain genotypes present have not been pathogenic for the infected individuals tested.

Key words: Torque teno virus, Blood donors, Alanine Amniotransferase, Polymerase Chain Reaction

SJIBTO 2009; 5(4): 247-255

Received: 30 Apr 2008

Accepted: 23 Dec 2008

Correspondence: Bouzari M., PhD of Virology. Assistant professor of Faculty of Science, University of Isfahan. Hezarjerib St. Postal code: 81746-73441, Isfahan, Iran. Tel: (+98311) 7932459; Fax : (+98311) 7932456
E-mail: bouzari@sci.ui.ac.ir