گوارش، ۱۳۸۳؛ سال نهم: ۹-۱۰۶

فراوانی نسبی آلودگی با ویروس TT در ایرانیان اهداکننده خون و ارتباط آن با سطح سرمی آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)

دکتر اکرم پورشمس[۱*]، دکتر کوروش عظیمی[۲]، دکتر لیلا کیانی[۲]، دکتر مهدی صرافی[۲]، دکتر محمد فرهادی لنگرودی[۳]، دکتر رضا ملک‌زاده[۴]

[۱] استادیار، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۲] پژوهشگر، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۳] پاتولوژیست، آزمایشگاه شهرآرا، تهران

[۴] استاد، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

خلاصه

مقدمه

ویروس TT یک DNA Virus است که در اواخر سال ۱۹۹۷ از خون مبتلایان به هپاتیت با علت نامعلوم کشف شد. از آن زمان تاکنون مطالعات متعددی در کشورهای مختلف برای بررسی شیوع آلودگی به این ویروس و ارتباط آن با پیدایش هپاتیت انجام شده است. هدف این مطالعه بررسی فراوانی آلودگی با این ویروس در اهداکنندگان خون ایرانی و ارتباط آن با افزایش آنزیم‌های کبدی است.

مواد و روشها

۳۱۲ نفر از اهداکنندگان خون در پایگاه مرکزی انتقال خون تهران، به‌صورت تصادفی برای ورود به مطالعه انتخاب شدند. با روش semi-nested PCR آلودگی به ویروس TT در سرم مشخص گردید. آنزیم کبدی ALT در افراد آلوده به ویروس TT که HBsAg و Anti-HCV منفی داشتند و سرم آنها برای اندازه‌گیری ALT وجود داشت، اندازه‌گیری و با گروه کنترل (اهداکنندگانی که از نظر TTV، HBsAg و Anti-HCV منفی بودند) مقایسه شد.

نتایج

۷۰ نفر (۲۲/۴٪) از افراد مورد مطالعه، به ویروس TT آلودگی داشتند. در ۸ نفر (۱۸/۲٪) از ۴۴ نفری که TTV مثبت بودند و در ۸ نفر (۱۰/۹٪) از ۷۳ نفری که TTV منفی بودند، ALT، بالاتر از حد طبیعی بود. اختلاف معنی‌داری از نظر آلودگی با ویروس TT و افزایش ALT مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری

شیوع آلودگی با ویروس TT در اهداکنندگان خون ایرانی بیشتر از اهداکنندگان خون در آمریکا (۱٪) و کشورهای اروپای غربی است. آلودگی با این ویروس مشابه آلودگی اهداکنندگان خون در چین (۲۸٪)، اما کمتر از تایلند (۳۷٪) و ایتالیا (۴۲/۴٪) است. در این مطالعه ارتباطی بین آلودگی با ویروس TT و افزایش آنزیم‌های کبدی مشاهده نشد و با توجه به مطالعات مشابه به نظر می‌رسد ویروس TT عامل مهمی برای ایجاد هپاتیت نباشد. *گوارش*، ۱۳۸۳؛ سال نهم: ۹-۱۰۶

واژه‌های کلیدی: ویروس TT، هپاتیت پس از انتقال خون، ALT سرم، ایران

مقدمه

در دهه‌های اخیر تلاش زیادی برای شناسایی علل هپاتیت صورت گرفته است. علل هپاتیت بر حسب زمان مطالعه و عوامل بهداشتی-اقتصادی کشورهای مختلف، متفاوت است. مطالعات انجام شده روی بیماران علامت‌دار منجر به شناسایی ویروس‌های هپاتیت B و C به عنوان شایعترین علل هپاتیت مزمن در کشورهای آسیای میانه[۱، ۲]، آفریقا [۳]، آسیای شرقی[۴]، کشورهای غربی[۵، ۶] و ایران شد[۷]. هنوز هم علت هپاتیت و سیروز در تعداد قابل توجهی از بیماران شناخته نشده است و احتمالاً ویروس‌های ناشناخته‌ای عامل این نوع هپاتیت‌ها و سیروز در تعداد قابل توجهی از بیماران می‌باشند. سیروز با علت

* *نویسنده مسئول: دکتر اکرم پورشمس- تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، کدپستی ۱۴۱۱۴*
تلفن و نمابر: ۸۰۱۲۹۹۲
E-mail: pourshams@ams.ac.ir

نامعلوم (cryptogenic) علت ۵٪ از بیماریهای مزمن کبدی در آمریکا[۸] و چهارمین علت پیوند کبد در آن کشور است[۹]. تلاش برای کشف ویروسهای جدید عامل هپاتیت همچنان ادامه دارد. در دسامبر سال ۱۹۹۷، Nishizawa و همکاران سرم پنج بیمار ژاپنی مبتلا به هپاتیت پس از تزریق خون را که با بیوپسی کبد و بررسیهای لازم علتی برای هپاتیت آنها پیدا نشده بود، مورد آزمایش قرار دادند. آنها موفق به جدا کردن ویروسی از نوع DNA در سرم سه بیماری شدند که سطح افزایش یافته آنزیمهای آمینوترانسفراز داشتند[۱۰]. ویروس شناسایی شده، به مناسبت اینکه ابتدای نام و نام خانوادگی اولین بیماری که ویروس از سرم وی جدا شده بود با T شروع می‌شد، ویروس TT نامیده شد[۱۰]. پس از آن محققین زیادی از کشورهای مختلف مطالعه بر روی فراوانی آلودگی با این ویروس و نقش آن در ایجاد بیماریهای کبدی را آغاز کردند. پژوهشگران مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد نیز تصمیم گرفتند تا شیوع آلودگی با این ویروس را در اهداکنندگان خون ایرانی و رابطه آن را با پیدایش هپاتیت مورد بررسی قرار دهند.

مواد و روشها

۳۱۲ نفر از اهداکنندگان خون در تابستان سال ۱۳۷۹ در پایگاه مرکزی انتقال خون تهران (پایگاه وصال) در طی یک هفته به‌طور تصادفی وارد یک مطالعه مقطعی شدند. در زمان اهدای خون سابقه عوامل خطر ابتلای هپاتیت توسط یک پزشک عمومی که در بانک خون حضور داشت پرسیده می‌شد و یک نمونه خون برای اندازه‌گیری سطح سرمی آنزیمهای کبدی AST و ALT و بررسی ویروس TT گرفته می‌شد. نمونه‌ها بلافاصله در یخچال بانک خون در دمای ۶-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری و عصر همان روز با استفاده از یخ و با حفظ دمای ۶-۲ سانتی‌گراد به آزمایشگاه شهرآرا ارسال می‌شد. در آنجا بخشی از سرم برای بررسی TTV در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و بخشی برای اندازه‌گیری آنزیمهای کبدی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد. تستهای HBsAg و Anti-HCV به‌صورت متداول توسط انتقال خون به روش Enzyme Immunoassay انجام می‌شد. در آن دسته از اهداکنندگان که Anti-HCV مثبت داشتند، با انجام PCR (HCV RNA) تشخیص هپاتیت C اثبات می‌شد. کسانی که HBsAg مثبت یا HCV RNA مثبت داشتند به‌ترتیب مبتلا به هپاتیت B و C در نظر گرفته می‌شدند. ALT و AST با استفاده از کیت پارس آزمون و با دستگاه هیتاچی توسط یک کارشناس آزمایشگاه انجام شد. ALT بالاتر از ۴۰ واحد در لیتر، به‌عنوان افزایش ALT در نظر گرفته می‌شد. برای شناسایی ویروس TT از روش semi-nested PCR استفاده شد. پس از جداسازی سرم، ۱۰۰ میکرولیتر آن در میکروتیوب استریل قرار می‌گرفت و پس از مواجهه با میکروویو به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در فشار ۸۰۰ وات، ۱۰-۵ میکرولیتر از فاز زیرین آن برداشته می‌شد و در ۲۰ میکرولیتر از بافر تریس-اسید کلریدریک با pH=۸/۰۱ و به غلظت ۱۰ میلی مول در لیتر که حاوی یک میلی در لیتر اتیلن دی آسین تترا استیک اسید بود حل می‌شد. سپس آن محلول به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده و بلافاصله روی یخ قرار داده و سرد می‌شد. برای محلول اصلی PCR از معرفهای شرکت BM (بوهرنیکر- ماتهایم - رش) به اسامی Ampli Tag، dNTP و باف tag استفاده شد. در مرحله اول PCR از پرایمر NG059 استفاده شد.

Sense: 5' ACA, GAC, AGA, GGA, GAA, GGC, AAC, ATG-3'

Anti sense: 5'CTG, GCA, TTT, TAC, CAT, TTC, CAA, AGT, T-3

برای ۳۵ سیکل، ابتدا دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۶۰ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه استفاده شد. در مرحله دوم، ۵ میکرولیتر از تولید مرحله اول با معرف اصلی PCR مخلوط و با استفاده از پرایمر (Sense: 5' GGC, AAC, ATG, YTR, TGG, ATA, GAC, NG061 ('TGG,-3' و پرایمر NG063 برای ۲۵ سیکل با شرایط قبلی تکثیر شد.

از شاهدهای منفی و مثبت برای تأیید نتایج و پرهیز از آلودگی یا عدم اتصال استفاده شد. نمونه‌های منفی به‌صورت اتفاقی (۳۰٪ آنها) و تمامی نمونه‌های مثبت به‌صورت مجدد مورد آزمایش جهت تأیید قرار گرفتند.

تولید مرحله دوم با اتیدیوم بروماید ۱٪ آغشته و در ژل آگاروز ۴٪ به مدت ۱۵ دقیقه الکتروفورز انجام شد. پس از قرار دادن ژل در دستگاه ترانس‌ایلومیناتور و تابش اشعه فرابنفش با دستگاه gel documentation system مورد مشاهده قرار گرفت. اطلاعات با کدفیش‌های مربوط جمع‌آوری شد و با نرم‌افزار SPSS نسخه 10.1 مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

۲۴۲ نفر مرد و ۷۰ زن وارد مطالعه شدند. میانگین سنی جمعیت مورد مطالعه ۳۸/۶ سال با انحراف معیار ۱۱/۲ سال بود. جوانترین فرد ۱۷ ساله و مسن‌ترین آنها ۶۶ ساله بود. ۷۰ نفر شامل ۵۳ مرد و ۱۷ زن (۲۲/۴٪) TTV مثبت بودند. فراوانی نسبی TTV مثبت در مردان (۲۱/۹٪) و زنان (۲۴/۳٪) از نظر آماری تفاوت

معنی‌داری نداشت.

میانگین سنی افراد TTV مثبت ۳۷/۴ سال با انحراف معیار ۱۰/۸ سال بود. فراوانی نسبی موارد TTV مثبت در افراد کمتر از ۵۰ سال (۲۵۰ نفر)، ۲۳/۲٪ و در افراد بالاتر از ۵۰ سال (۱۶۲ نفر)، ۱۹/۳٪ بود که نظر آماری معنی‌دار نبود. ۲ نفر از ۴ نفر (۳ مرد و ۱ زن) مبتلا به هپاتیت C، TTV مثبت بودند. ۵ نفر (۳ مرد و ۲ زن) HBsAg مثبت بودند که همگی آنها TTV منفی بودند. جدول ۱، فراوانی نسبی عوامل خطر مواردی از هپاتیت را که از طریق خون انتقال می‌یابند در جمعیت مورد مطالعه نشان می‌دهد.

۸ نفر (۵۷/۱٪) از ۱۴ نفری که سابقه دریافت خون داشتند، TTV مثبت و ۶۲ نفر (۲۰/۸٪) از ۲۹۸ نفری که سابقه دریافت خون نداشتند، TTV مثبت بودند. از نظر آماری، تفاوت معنی‌داری از نظر سابقه دریافت خون در افراد TTV مثبت و افراد TTV منفی وجود داشت، اما فراوانی نسبی موارد TTV مثبت در کسانی که سابقه عمل جراحی و حجامت را دارا بودند با سایر افرادی که سوابق مذکور را نداشتند تفاوت معنی‌داری نداشت.

جدول ۲، سطح سرمی آنزیم‌های ALT و AST را در دو گروه TTV مثبت و TTV منفی نشان می‌دهد.

میانگین مقادیر AST و ALT در دو گروه TTV مثبت و TTV منفی، تفاوت معنی‌داری نداشت.

بحث

آلودگی به ویروس TT در اکثر کشورها شایع است. ویروس TT به‌ترتیب در ۴۲/۴٪، ۵۱/۶٪، ۲۸٪، ۳۷٪، ۶/۲٪ و ۱/۹٪ از

جدول ۱: فراوانی نسبی عوامل خطر هپاتیت در دو گروه TTV مثبت و TTV منفی

عامل خطر	TTV (+) (۷۰ نفر)		TTV (-) (۲۴۲ نفر)		جمع (۳۱۲ نفر)	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱) عمل جراحی	۲۹	٪۴۱/۴	۷۵	٪۳۱	۱۰۴	٪۳۳/۳
◄ یک بار					۷۵	٪۲۴
◄ دو بار					۱۸	٪۵/۸
◄ سه بار					۶	٪۱/۹
◄ چهار بار یا بیشتر					۵	٪۱/۶
۲) حجامت به روش سنتی	۶	٪۸/۶	۳۸	٪۱۵/۷	۴۴	٪۱۴/۱
۳) دریافت خون	۸	٪۱۱/۴	۶	٪۲/۵	۱۴	٪۴/۵
۴) خالکوبی	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۵) مصرف مواد مخدر تزریقی	۰	۰	۰	۰	۰	۰

جدول ۲: سطح سرمی آنزیم‌های ALT و AST در دو گروه TTV مثبت و TTV منفی

متغیر / گروه	TTV (-) (۷۳ نفر)	TTV (+) (۴۴ نفر)	جمع (۱۱۷ نفر)
میزان حداقل ALT (واحد در لیتر)	۴	۵	۴
میزان حداکثر ALT (واحد در لیتر)	۷۰	۱۵۵	۱۵۵
میانگین و انحراف معیار برای ALT (واحد در لیتر)	۱۵ ± ۱۹/۶	۱۴ ± ۲۸/۳۴	۱۵ ± ۲۲/۸
فراوانی نسبی ALT بیشتر از ۴۰ واحد در لیتر	۸ نفر (۱۰/۹٪)	۸ نفر (۱۸/۲٪)	۱۶ نفر (۱۳/۷٪)
میزان حداقل AST (واحد در لیتر)	۱۷	۲۱	۱۷
میزان حداکثر AST (واحد در لیتر)	۲۰۱	۱۸۰	۲۰۱
میانگین و انحراف معیار برای AST (واحد در لیتر)	۳۲/۹ ± ۴۹/۶	۴۰ ± ۵/۶	۳۵/۷ ± ۵۲/۲

اهداکنندگان خون در ایتالیا، ترکیه، چین، تایلند، ایسلند و اسکاتلند وجود دارد[۱۶-۱۱].

ویروس TT در ۱٪ اهداکنندگان خون و ۱۵٪ بیماران سیروز کریپتوژنیک آمریکا گزارش شده است[۱۷]. مطالعاتی که تاکنون انجام شده رابطه‌ای را بین آلودگی با ویروس TT و پیدایش بیماری کبدی نشان نداده‌اند[۱۷، ۱۳-۱۱]. در مطالعه‌ای از ایران، ۷۵ بیمار مبتلا به هپاتیت مزمن و ۷۲ بیمار سیروز کبدی با اتیولوژی مشخص یا کریپتوژنتیک از نظر آلودگی به ویروس TT مورد بررسی قرار گرفتند. ویروس TT در ۱۸/۲٪ از موارد هپاتیت یا سیروز کریپتوژنیک، ۱۴/۷٪ موارد هپاتیت مزمن با علل شناخته شده و ۲۰/۸٪ بیماران سیروتیک با هر علتی یافت شد[۱۸]. در مطالعه دیگری از ایران که روی ۴۰ بیمار مبتلا به هپاتیت مزمن B، ۴۰ بیمار هپاتیت مزمن C، ۴۰ بیمار با سیروز کریپتوژنیک و ۴۰ فرد سالم به‌عنوان گروه شاهد انجام شد، شیوع TTV به‌ترتیب ۵۶٪، ۳۰٪، ۲۹٪ و ۱۵٪ گزارش شد. در مطالعه مذکور، TTV مثبت به‌طور معنی‌داری در بیماران هپاتیت مزمن B نسبت به گروههای دیگر بالاتر بوده است، اما ویروس TT عاملی برای سیروز کریپتوژنیک محسوب نمی‌شده است[۱۹]. مطالعه حاضر نشان می‌دهد آلودگی به ویروس TT در ایران شایع است، اما ارتباطی بین آلودگی با ویروس TT و افزایش آنزیم‌های کبدی و هپاتیت وجود ندارد. با توجه به شیوع بالای ویروس TT در جمعیت عادی و فقدان دلایل علمی برای ارتباط ویروس TT با هپاتیت حاد و مزمن کبدی می‌توان TTV را ویروس انسانی غیر پاتوژن به حساب آورد.

مراجع

1. Ayoola EA, Al-Mofleh IA, Al-Faleh FZ *et al.* Prevalence of antibodies to hepatitis C virus among Saudi patients with chronic liver disease. *Hepato gastroenterology* 1992; **39**: 337-9.
2. Doganci L, Haznedaroglu T. Prevalence of hepatitis A, B and C in Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; **11**: 661-2.
3. Strickland GT, Elhefni H, Salman T *et al*. Role of hepatitis C infection in chronic liver disease in Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 2002; **15**: 1356-61.
4. Merican I, Guan R, Amarapuka D *et al*. Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; **15**: 1356-61.
5. Hammel P, Marcellin P, Martinot-Peignouy M *et al*. Etiology of chronic hepatitis in France: predominant role of hepatitis C virus. *J Hepatol* 1994; **21**: 618-93.
6. Austin GE, Jensen B, Leete J *et al*. Prevalence of hepatitis C virus seropositivity among hospitalized US veteranas. *Am J Med Sci* 2000; **319**: 353-9.
7. زیاد علیزاده بهروز، طاهری حسن، ملک‌زاده رضا و همکاران. تعیین فراوانی علل ابتلا به هپاتیت مزمن در بیماران مراجعه کننده به چند مرکز درمانی در شهر تهران، گوارش، ۱۳۷۷، سال سوم، ۲۳-۱۳.
8. Kodali VP, Gordon SC, Silverman AL *et al.* Cryptogenic liver disease in the united states: further evidence for non-A, non-B and non-C hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1994; **89**: 1836-9.
9. Belle SH, Beringer KC, Detre KM. Recent findings concerning liver transplantation in the united states. In: Terasaki PI, Cecka JM editors. Clinical Transplants 1996. Los Angeles: UCIA Tissue typing laboratory; 1997. p. 15-30.
10. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K *et al.* A nowel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res commun* 1997; **241**: 92-7.
11. Artini M, Cariani E, Almerighi C *et al.* Prevalence and genomic variability of transfusion transmitted virus in Italian cryptogenic chronic liver disease and healthy blood donors. *Dig liver Dis* 2002; **34**: 570-6.
12. Erensoy S, Sayiner AA, Turkoglu S *et al.* TT virus infection and genotype distribution in blood donors and a group of patients from Turkey. *Infection* 2002; **30**: 299-302.
13. He C, Nomura F, Yukimasai N *et al.* Transfusion-transmitted virus infection in china: prevalence in blood donors and in patient with liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; **14**: 899-903.
14. Udomsakdi-Auewarakul C, Auewarakul P, Permpikul P, Issuaragrisil S. TT virus infection in Thailand: prevalence in blood donors and patients with aplastic anemia. *Int J Hematol* 2000; **72**: 325-8.
15. Love A, Stanzeti B, Li L *et al.* TT virus infections among blood donars in Iceland: prevalence, genotypes, and lack of relationship to serum ALT levels. *Transfusion* 2000; **40**: 306-9.
16. Simmonds P, Davidson F, Lycett C *et al.* Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* 1998; **352**: 191-5.
17. Charlton M, Adjei P, Poterucha J *et al.* TT- Virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure and cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* 1998; **28**: 839-42.
18. حیدر نژادیان جعفر. بررسی فراوانی آلودگی با TTV در بیماران مبتلا به هپاتیت مزمن و سیروز کبدی طی سالهای ۸۰-۱۳۷۹ در یک کلینیک فوق تخصصی. پایان‌نامه دکترای تخصصی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.
19. زالی محمدرضا، ذجاجی همایون، محمدعلیزاده امیر هوشنگ و همکاران. ارتباط TTV با بیماری مزمن کبدی در ایران. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره سالیانه جامعه پزشکان متخصص داخلی ایران، ۱۳۸۳: ۶۶.

TT Virus Infection Among Iranian Blood Donors: Its Prevalence and Relationship to Serum Alanine Aminotransferase (ALT) Level

Pourshams A
Digestive Disease Research Center, Tehran University of Medical Sciences

Azimi K
Digestive Disease Research Center, Tehran University of Medical Sciences

Kiani L
Digestive Disease Research Center, Tehran University of Medical Sciences

Sarrafi M
Digestive Disease Research Center, Tehran University of Medical Sciences

Farhadi Langroody M
Shahrara Medical Laboratory, Tehran

Malekzadeh R
Digestive Disease Research Center, Tehran University of Medical Sciences

Corresponding Author:
Akram pourshams MD, Digestive Disease Research Center, Shariati Hospital, Kargar-e-Shomali Ave., Tehran, Iran.
Telefax: +98 21 8012992
E-mail: pourshams@ams.ac.ir

ABSTRACT

Introduction and Aims: TT virus (TTV) is a DNA virus and is proposed as a potential cause of non-A to E hepatitis. We aimed to investigate, for the first time, the prevalence of TTV in Iranian healthy blood donors.

Materials and Methods: Three hundred and twelve healthy Iranian blood donors were randomly selected and tested for TTV DNA by the seminested polymerase chain reaction method.

Serum alanine aminotransferase (ALT) levels were determined in those infected and uninfected individuals that adequate serum were available. HBsAg or HCV antibody-positive subjects were excluded.

Results: TT virus DNA was detected in 70 (22.4%) of the 312 subjects under study. ALT was elevated in 8 (18.2%) of the 44 TTV positive blood donors and in 8 (10.9%) of the 73 TTV negative blood donors. There was no significant difference between these two groups.

Conclusions: TTV viremia is common among Iranian blood donors. Its prevalence in Iran is higher than US (1%) and most West-European countries and is comparable to China (28%) but lower than Thailand (37%) and Italy (42.4%). Our data do not support the correlation between TTV viremia and elevated ALT level.
Govaresh 2004; **9**: 106-9

Keywords: TT virus, post transfusion hepatitis, serum ALT, Iran