

چکیده

مقدمه: ویروس *TT (TTV)* یک ویروس بدون پوشش با *DNA* تک رشته‌ای حلقوی است که مطالعات صورت گرفته با استفاده از سیستم‌های *PCR* (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز) حساس، همراه با پرایمرهای طراحی شده برای مناطق بسیار محافظت شده ژنوم ویروسی (*UTR*) حاکی از شیوع بسیار بالای (بیش از ۹۰٪) آلودگی *TTV* در بین جمعیت‌های عمومی سراسر جهان می‌باشد. بررسی‌ها نتوانسته‌اند نقش *TTV* را در بدن و همچنین ارتباط آن را با بیماری کبدی یا هر گونه بیماری خاص دیگری آشکار سازند. به طور کلی هیچ تظاهر کلینیکی که بتوان آن را مستقیماً به *TTV* نسبت داد وجود ندارد؛ اگر چه فرضیه‌هایی مبنی بر بیماری‌زا بودن ژنوتیپ‌های خاص، همچنین ارتباط بین میزان ویروس و وضعیت ایمنی میزبان ارائه شده‌اند. هدف از این مطالعه، بررسی میزان شیوع آلودگی *TTV* در جمعیت عمومی (افراد داوطلب اهداکننده خون) شهر اصفهان است.

روش کار: بدین منظور ۱۳۲ نمونه سرمی از افراد به ظاهر سالم (۱۲۲ نمونه) و هیپاتی (۱۰ نمونه؛ شامل ۶ نمونه مثبت *Anti-HCV* و ۴ نمونه مثبت *HBS-Ag*) در ۶ نوبت از تاریخ ۸۲/۱۰/۹ تا ۸۳/۴/۳۰ از بانک خون سازمان انتقال خون شهر اصفهان تهیه گردیدند. *DNA* از سرم افراد استخراج شد و با استفاده از پرایمرهای جامع در معرض *PCR* قرار گرفت. همچنین محصول *PCR* تعدادی از نمونه‌ها از ژل آگارز استخراج و توالی آنها تعیین گردید.

یافته‌ها: از ۱۳۲ سرم مورد آزمایش، ۱۰۵ نمونه (۷۳٪ تا ۸۶٪ با فاصله اطمینان ۹۵٪) (۱۰ تا از ۱۰ نمونه هیپاتی و ۹۵ تا از ۱۲۲ نمونه سالم) برای *DNA* ویروس *TT* مثبت تشخیص داده شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از معمول بودن ویرمیای *TTV* در جمعیت شهر اصفهان همانند دیگر نقاط جهان است. تعیین ژنوتیپ‌های موجود در جمعیت شهر اصفهان پیشنهاد گردید.

کل واژگان: ویروس *TT*، شیوع، هیپاتیت.

مقدمه

ALT) را نشان می‌دادند و عاری از ویروس‌های هیپاتیت A تا G بودند، شناسایی کردند (۲). *TTV* ویروسی بدون پوشش با *DNA* تک رشته‌ای حلقوی است که طول ژنومش حدوداً ۳/۸ kb و قطر آن ۳۲-۳۰ نانومتر می‌باشد (۵-۳). این ویروس از انتشار بالایی در سراسر جهان برخوردار است و مطالعات صورت گرفته با استفاده از سیستم‌های *PCR*^۳ حساس، همراه با پرایمرهای طراحی شده برای مناطق بسیار محافظت شده ژنوم ویروسی (*UTR*)^۴، حاکی از شیوع بسیار بالای (بیش از ۹۰٪) آلودگی *TTV* در بین جمعیت‌های عمومی سراسر جهان می‌باشد (۹-۶). اگر چه در ابتدا تصور می‌شد که *TTV* تنها به وسیله انتقال خون منتقل می‌شود، با توجه به شیوع بسیار زیاد آن در جمعیت‌های عمومی سراسر جهان، همچنین تشخیص آن در نمونه‌های بیولوژیکی مختلف (پلاسما، مدفوع، بزاق، ترشحات گردن رحم، مایع آمنیوتیک، شیر، پوست، اشک و ...) احتمال

در طی چند دهه گذشته با کشف ۵ نوع اصلی ویروس‌های هیپاتیت (A تا E) و توسعه روش‌های تشخیصی حساس برای هر کدام، پیشرفت‌های قابل توجهی در مورد توصیف ویروس‌های هیپاتوتروپیک انسانی صورت گرفته است. به هر حال هنوز بخش نسبتاً کوچکی از موارد هیپاتی حاد و مزمن باقی مانده است که قابل استناد به این ویروس‌ها یا به ویروس‌هایی که گمان می‌رود برخی اوقات باعث آسیب‌های کبدی بدون بروز علائم مشخصه خاص شوند (انتروویروس‌های معین، آدنوویروس‌ها، پاروویروس B19 انسانی و غیره)، نیستند (۱). همزمان با تلاش جهت روشن کردن این فرم‌های ناشناخته، نیشی زاوا^۱ و همکارانش، برای نخستین بار در سال ۱۹۹۷، ویروس *TT (TTV)*^۲ را در سرم بیمارانی ژاپنی مبتلا به هیپاتیت بعد از انتقال خون با منشأ نامشخص که سطوح افزایش یافته آلانین آمینو ترانسفراز

³ Polymerase Chain Reaction

⁴ Untranslated region

¹ Nishizawa

² Torque Teno Virus

غیرکدکننده و بسیار محافظت شده ژنوم ویروسی (UTR) و جهت تکثیر یک قطعه ۱۹۹bp طراحی شده‌اند (۹). با استفاده از این پرایمرها، شناسایی تقریباً تمام ژنوتیپ‌های TTV امکان‌پذیر است. لازم به ذکر است که پرایمرهای مورد نظر (T801 و T935) توسط TIB MOLBIOL Syntheselabor آلمان ساخته شدند.

PCR اسیدهای نوکلئیک استخراج شده با استفاده از آنزیم Smar Taq DNA Polymerase (سیناژن، ایران) صورت گرفت و برنامه PCR شامل یک دوره دناتوره شدن در 94°C به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ دوره تکثیر شامل دوره‌های دناتوره شدن، الحاق و طویل شدن به ترتیب در 94°C به مدت ۲۰ ثانیه، 57°C به مدت ۲۵ ثانیه و 72°C به مدت ۳۰ ثانیه و یک دوره طویل 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 در معرض PCR قرار گرفتند. باید خاطرنشان شود که در همه آزمایش‌ها کنترل منفی به کار برده شد.

باند‌های حاصله بعد از الکتروفورز فرآورده‌های PCR در ژل آگارز ۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید، به وسیله نور UV مورد مشاهده قرار گرفتند. از DNA Ladder ۱۰۰bp (سیناژن، ایران) به عنوان مارکر جهت تعیین اندازه قطعات به دست آمده استفاده گردید.

برای استخراج DNA (قطعه ۱۹۹bp) از ژل آگارز، از کیت استخراج DNA (فرمنتاس، سیناژن، ایران) استفاده شد. جهت تأیید وجود TTV DNA در نمونه‌های مورد آزمایش، قطعه تکثیر شده به وسیله PCR، توسط شرکت SEQLAB (آلمان) تعیین توالی^۳ شد و توالی نوکلئوتیدی به دست آمده با توالی‌های موجود در EMBL، با استفاده از روش جستجوی WU-Blast-2 مقایسه گردید.

نتایج

همانطور که انتظار می‌رفت محصول PCR یک فرآورده ۱۹۹bp بود (شکل ۱) که در ۱۰۵ نمونه (شامل هر ۱۰ نمونه هپاتیتی و ۹۵ نمونه سالم) از ۱۳۲ سرم مورد آزمایش (یعنی ۷۹/۵٪ نمونه‌ها) تشخیص داده شد. سایر اطلاعات در رابطه با توزیع موارد مثبت و منفی در جدول ۱ آمده است. لازم به ذکر است که در سری اول آزمایش‌های PCR، باند مربوط به فرآورده ۱۹۹bp، در ۷۵ نمونه از ۱۳۲ سرم مورد آزمایش مشاهده گردید. چون

می‌رود که راه‌های مختلفی برای انتشار آن وجود داشته باشد (۱۷-۱۰). بررسی‌ها نتوانسته‌اند نقش TTV را در بدن، همچنین ارتباط آن را با بیماری کبدی یا هرگونه بیماری خاص دیگری آشکار سازند (۲ و ۵ و ۱۱ و ۲۸-۱۸)؛ چنانچه در بعضی از بررسی‌ها نقش TTV در بیماری کبدی مثبت (۲۰ و ۲۳ و ۲۷) و در دیگر مطالعات منفی (۲۲ و ۲۸ و ۲۹) پیشنهاد شده است. در این مورد فرضیه‌های زیادی وجود دارد؛ مثلاً پیشنهاد شده است که تیپ‌ها یا تحت تیپ‌های معینی از TTV ممکن است هیپاتوتروپیک باشند (۲۴ و ۳۰ و ۳۱). همچنین ارتباط بین میزان ویروس و وضعیت ایمنی میزبان مورد بررسی قرار گرفته است (۸ و ۳۲ و ۳۳).

امروزه هیچ تظاهر بالینی که بتوان آن را مستقیماً به TTV نسبت داد، وجود ندارد. به هر حال کشف TTV به تازگی صورت گرفته است، درگیری آن در پاتولوژی مشخص و ارتباطش با میزبان به صورت فرضیه است و هنوز موارد ناشناخته زیادی درباره آن وجود دارد.

با توجه به این که در آینده ممکن است نقش تیپ‌های خاصی از این ویروس به عنوان عامل بیماری‌زا مشخص شود، بررسی وضعیت آلودگی به این ویروس در هر جامعه‌ای از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این ارتباط، در این مطالعه میزان شیوع آلودگی TTV در جمعیت عمومی (افراد داوطلب اهداکننده خون) شهر اصفهان مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

۱۳۲ نمونه سرمی از افراد به ظاهر سالم (۱۲۲ نمونه) و هپاتیتی (۱۰ نمونه) شامل ۶ نمونه مثبت Anti-HCV و ۴ نمونه مثبت HBS-Ag) در ۶ نوبت از تاریخ ۸۲/۱۰/۹ تا ۸۳/۴/۳۰ از بانک خون سازمان انتقال خون شهر اصفهان تهیه گردیدند و تا زمان استفاده در دمای 20°C - نگهداری شدند.

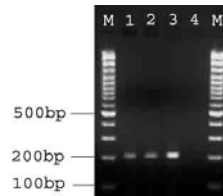
بعد از تیمار شدن ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه سرمی با پروتئیناز K (۰/۵mg/ml) در حضور NaCl (۰/۲M) و SDS (۰/۲۵٪) برای ۲ ساعت در 65°C DNA با استفاده از فنل / کلروفرم / ایزوآمیل الکل استخراج و با اتانول رسوب داده شد. نهایتاً رسوب خشک DNA در ۱۰۰ تا ۱۵۰ میکرولیتر از آب مقطر استریل یا محلول TE^۱ حل و در دمای 20°C - ذخیره گردید.

پرایمرها: پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق، T801 و T935 بودند که به وسیله تاکاهاشی^۲ و همکارانش برای منطقه

¹ Tris-HCl buffer (10mM, pH=8.0) Containing 1mM EDTA

² Takahashi

³ Sequencing



شکل ۱- نتایج حاصل از الکتروفورز قطعات DNA به دست آمده در آزمایش PCR مربوط به سرم‌های مورد آزمایش با استفاده از پرایمرهای T801 و T935 (M مارکر ۱۰۰bp - 1، 2 و 3: نمونه‌های مثبت TTV با باندهایی در موقعیت ۱۹۹bp - 4: کنترل منفی فاقد DNA)

در شکل ۲ مقایسه توالی نوکلئوتید به دست آمده از قطعه تکثیر شده (فرآورده ۱۹۹bp) با توالی مربوط به اولین ژنوم جدا شده ژاپنی TTV، یعنی TA278 (قابل دسترسی با شماره AB008394 در DDBJ، EMBL و GenBank) نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود تشابه توالی زیادی (۸۷٪) بین توالی به دست آمده و توالی مربوط به سویه TA278 وجود دارد.

در جدول ۲، هشت سویه TTV شامل AF159224، AJ620220، AJ620219، AJ620226، AF159225، AJ620221، AJ620222 و AJ620225 که دارای بیشترین تشابه (≥۹۲٪) با توالی DNA به دست آمده از آزمایش PCR هستند، نشان داده شده است. در شکل ۳ نیز توالی‌های مربوط به همان هشت سویه با توالی نوکلئوتیدی به دست آمده

احتمال می‌رفت که تعداد کپی‌های مربوط به TTV DNA، در نمونه استخراج شده و یا سرم کم باشد و به همین خاطر باند قابل ملاحظه‌ای در روی ژل ایجاد نشده باشد، تمام نمونه‌های منفی، برای بار دوم مورد آزمایش قرار گرفتند، یعنی هم محصول PCR نمونه‌های منفی و هم نمونه‌های DNA استخراج شده مجدداً در معرض PCR قرار گرفتند.

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های سرمی مورد آزمایش قرار گرفته

نمونه	سن (سال)	تعداد	TTV مثبت	TTV منفی	درصد نمونه‌های مثبت
سالم	۱۸-۳۰	۵۰	۲۸	۱۲	۷۶
	۳۰-۴۰	۴۳	۳۳	۱۰	۷۶/۷۴
	۴۰-۵۰	۱۷	۱۴	۳	۸۲/۳۵
	≥۵۰	۱۲	۱۰	۲	۸۳/۳۳
HBs-Ag مثبت	۲۰-۴۱	۴	۴	-	۱۰۰
Anti-HCV مثبت	۲۵-۶۳	۶	۶	-	۱۰۰
کل	-	۱۳۲	۱۰۵	۲۷	۷۹/۵

جهت اطمینان بیشتر، DNA از سرم‌هایی که بعد از آزمایش دوم PCR منفی تشخیص داده شدند، استخراج گردید و دوباره در معرض PCR قرار گرفت. ۳۰ نمونه از ۵۷ نمونه‌ای که در بار اول منفی تشخیص داده بودند، بعد از آزمایشات بعدی از نظر وجود قطعه ۱۹۹bp، مثبت تشخیص داده شدند.

```

1: 1 GCTACGTCACCTAACCACGTGACTCCCGCAGGCCAACCAGAGT-CTATGTCGTGCACTTCC 59
2: 6 GCTACGTCACCTAACCACGTGACACCCACAGGCCAACC-GAATGCTATGTCATCCATTTCC 64
***** ** * ***** * * * ***** * * * *****

1: 60 TGGGCATGGTGTACGTGATAATAAAGCGGTGCACCTTCCGAATGGCTGAGTTTTCACG 119
2: 65 TGGGCCGGGTCTACGTCTCATATAAAGTAAGTGCACCTTCCGAATGGCTGAGTTTTCACG 124
***** * * * ***** * * * ***** *****

1: 120 CCCGTCCGCAGCGGCAACACCACGGAGGGGTGATCTCCGCGTCCCGAGGGCGGGTGCCGTA 179
2: 125 CCCGTCCGCAGCGGTGAAGCCACGGAGGGAGATCTCCGCGTCCCGAGGGCGGGTGCCGAA 184
***** * * * ***** *****

1: 180 GGTGAGTTTACACACCCGCGAG 199
2: 185 GGTGAGTTTACACACCCGAAG 204
***** * *

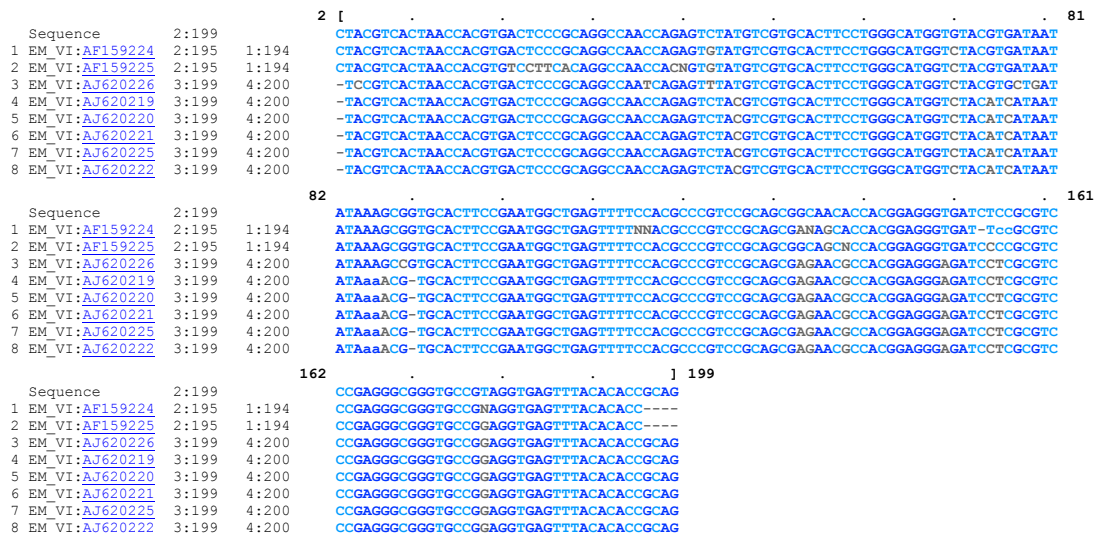
```

شکل ۲- مقایسه توالی نوکلئوتیدی DNA حاصل از آزمایش PCR (شماره 1) با توالی مربوط به اولین سویه TTV، یعنی TA278 (قابل دسترسی با شماره AB008394 در DDBJ، EMBL و GenBank) (شماره 2) با استفاده از نرم افزار WU-blast-2 در محیط EMBL. * نشان دهنده نوکلئوتیدهای همانند است.

جدول ۲- هشت سویه از ویروس TT که در جستجوی WU-blast-2 در محیط EMBL دارای بیشترین تشابه با توالی نوکلئوتیدی به دست آمده، هستند.

ردیف	شماره دسترسی ^۱	منشأ	طول ^۲	همانندی ^۳
۱	AF159224	TT virus strain TTmBJ unknown gene (Japan, 1999).	۱۹۴	۹۴
۲	AF159225	TT virus strain TTm5 unknown gene (Japan, 1999).	۱۹۴	۹۳
۳	AJ620226	TT virus ORF1 and ORF2, isolate tth4 (Germany, 2004).	۳۷۷۲	۹۲
۴	AJ620219	TT virus ORF1 and ORF2, isolate tth9 (Germany, 2004).	۳۷۵۵	۹۲
۵	AJ620220	TT virus ORF1 and ORF2, isolate tth16 (Germany, 2004).	۳۷۵۶	۹۲
۶	AJ620221	TT virus ORF1 and ORF2, isolate tth17 (Germany, 2004).	۳۷۵۷	۹۲
۷	AJ620225	TT virus ORF1 and ORF2, isolate tth31 (Germany, 2004).	۳۷۵۷	۹۲
۸	AJ620222	TT virus ORF1 and ORF2, isolate tth25 (Germany, 2004).	۳۷۵۸	۹۲

۱- Accession number in the DDBJ,EMBL and GenBank databases ۲- طولی از ژنوم ویروس که تعیین توالی شده است. ۳- Identity



شکل ۳- مقایسه توالی نوکلئوتیدی DNA به دست آمده با توالی های مربوط به ۸ سویه TTV که در جدول ۲ نشان داده شده‌اند.

بحث و نتیجه گیری

سیکل‌های این برنامه PCR، ممکن است به علت کم بودن تعداد کپی TTV DNA باند قابل ملاحظه‌ای در روی ژل ایجاد نگردد. از این رو فرآورده‌های PCR نمونه‌های منفی دوباره در معرض PCR قرار گرفتند تا از مثبت یا منفی بودن نمونه‌ها اطمینان حاصل شود و همانطور که انتظار می‌رفت تعدادی از نمونه‌ها بعد از PCR دوم، مثبت شدند. از طرفی چون ممکن است تعداد کپی‌های DNA مربوط به TTV در نمونه استخراج

در سیستم PCR همراه با پرایمرهای T801 و T935، از آنزیم Ampli Taq Gold DNA Polymerase استفاده شده و شامل ۵۵ سیکل تکثیر بوده است (۶ و ۹ و ۱۲ و ۱۴ و ۱۶). در این مطالعه به علت عدم دسترسی به آنزیم مذکور از آنزیم Smar Taq DNA Polymerase استفاده شد و چون این آنزیم احتمالاً در سیکل‌های بالاتر از ۴۰ غیرفعال می‌شود، برنامه PCR روی ۴۰ دوره تکثیر تنظیم شد. با توجه به تعداد کم

تشخیص TTV در هر ۱۰ نمونه هپاتیتی، ممکن است نشانگر سینرژسم این ویروس با ویروس‌های هپاتیتی باشد ولی چون تعداد نمونه‌های هپاتیتی مورد آزمایش اندک می‌باشد نمی‌توان در این باره به‌درستی نتیجه‌گیری کرد. با توجه به شیوع بسیار بالای آلودگی TTV در بین افراد به‌ظاهر سالم سراسر جهان پیشنهاد شده است که TTV یک ویروس DNA غیرپاتوژنیک در انسان‌هاست (۹-۶ و ۲۲ و ۲۸ و ۲۹)، اگر چه نقش پاتوژنیک آن هنوز در حال بررسی است و پیشنهاداتی مبنی بر بیماری‌زا بودن سویه‌ها یا ژنوتیپ‌های خاصی از TTV وجود دارد (۲۴) و ۳۰ و ۳۱). در نتیجه بررسی‌های مداوم و پایداری در رابطه با میزان شیوع و خصوصیات TTV مورد نیاز است تا برداشت کاملی از اهمیت بالینی این ویروس به‌دست آید.

تشکر و قدردانی

در پایان از راهنمایی‌های جناب آقای دکتر منوچهر توسلی (استادیار محترم بخش ژنتیک گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان) و جناب آقای دکتر هوشنگ طالبی (استادیار محترم گروه آمار دانشگاه اصفهان) و مسؤولین محترم سازمان انتقال خون شهر اصفهان جهت در اختیار گذاشتن نمونه‌های سرمی تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

- Bendinelli M, Pistello M, Maggi F, et al. Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 98-113.
- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 92-97.
- Itoh K, Takahashi M, Fukuda M, et al. Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 718-724.
- Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, et al. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J Virol* 1999; 73: 3582-3586.
- Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, et al. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3177-3182.
- Abe K, Inami T, Asano K, et al. TT virus infection is widespread in the general populations from different geographic regions. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2703-2705.
- Huang L, Jonassen TQ, Hungnes O, et al. High prevalence of TT virus-related DNA (90%) and diverse viral genotypes in Norwegian blood donors. *J Med Virol* 2001; 64: 381-386.
- Pistello M, Morrica A, Maggi F, et al. TT Virus levels in the plasma of infected individuals with different hepatic and extrahepatic pathology. *J Med Virol* 2001; 63: 189-195.
- Takahashi K, Hoshino H, Ohta Y, et al. 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.
- Fornai C, Maggi F, Vatteroni ML, et al. High prevalence of TT virus (TTV) and TTV-like minivirus in cervical swabs. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2022-2024.
- Gad A, Tanaka E, Orii K, 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.
- Inami T, Konomi N, Arakawa Y, et al. High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2407-2408.
- Ishikawa T, Hamano Y, Okamoto H. Frequent detection of TT virus in throat swabs of pediatric patients. *Infection* 1999; 27: 298.
- Matsubara H, Michitaka K, Horiike N, et al. Existence of TT virus DNA and TTV-like mini virus DNA in infant cord blood: mother-neonatal transmission. *Hepato Res* 2001; 21: 280-287.
- Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, et al. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non A-G hepatitis. *J Med Virol* 1998; 56: 128-132.
- Osiowy C, Sauder C. Detection of TT virus in human hair and skin. *Hepato Res* 2000; 16: 155-162.
- Ross RS, Viazov S, Runde V, et al. Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. *J Clin Virol* 1999; 13: 181-184.
- 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: 839-842.

- 19- Cheng J, Hada T, Fukui K, et al. Detection of TTV DNA in serum of patients with chronic liver disease and interferon efficacy. *Hepatol Res* 1999; 14: 97-104.
- 20- Ikeda H, Takasu M, Inoue K, et al. Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) in patients with acute or chronic liver disease of unknown etiology and in those positive for hepatitis C virus RNA. *J Hepatol* 1999; 30: 205-212.
- 21- Itoh K, Hirakawa K, Okamoto H, et al. Infection by an unenveloped DNA virus associated with non-A to -G hepatitis in Japanese blood donors with or without elevated ALT levels. *Transfusion* 1999; 39: 522-526.
- 22- Naoumov NV, Petrova EP, Thomas MG, et al. Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet* 1998; 352: 195-197.
- 23- Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, et al. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatol Res* 1998; 10: 1-16.
- 24- Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M. A novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A to G hepatitis. *Intervirology* 1999; 42: 196-204.
- 25- Pineau P, Meddeb M, Raselli R, et al. Effect of TT virus infection on hepatocellular carcinoma development: results of a Euro-Asian survey. *J Infect Dis* 2000; 181: 1138-1142.
- 26- Shang D, Lin YH, Rigopoulou I, et al. Detection of TT virus DNA in patients with liver disease and recipients of liver transplant. *J Med Virol* 2000; 61: 455-461.
- 27- Tanaka H, Okamoto H, Luengrojanakul P, et al. Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A to G hepatitis in hepatitis patients and healthy blood donors in Thailand. *J Med Virol* 1999; 56: 234-238.
- 28- Umemura T, Tanaka E, Ota M, et al. TT virus infection in an area of high endemicity for hepatitis C. *Hepatol Res* 1999; 13: 212-220.
- 29- Yamamoto T, Kajino K, Ogawa M, et al. Hepatocellular carcinomas infected with the novel TT DNA virus lack viral integration. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 339-343.
- 30- Itoh K, Takahashi M, Ukita M, et al. Influence of primers on the detection of TT virus DNA by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1999; 180: 1750-1751.
- 31- Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, et al. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* 1999; 259: 428-436.
- 32- Shibayama T, Masuda G, Ajiwawa A, et al. Inverse relationship between the titer of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *Aids* 2001; 15: 563-570.
- 33- Touinssi M, Gallian P, Biagini P, et al. TT virus infection: prevalence of elevated viremia and arguments for the immune control of viral load. *J Clin Virol* 2001; 21: 135-141.
- 34- Okamoto H, Kato N, Izoka H, et al. Distinct genotypes of a nonenveloped DNA virus associated with posttransfusion non-A to G hepatitis (TT virus) in plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 1999; 57: 252-258.
- 35- Takayama S, Yamazaki S, Matsuo S, et al. Multiple infection of TT virus (TTV) with different genotypes in Japanese hemophiliacs. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 208-211.