



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche
Infettivologia ed Epidemiologia
sezione Virologia

**Dottorato di ricerca in:
"Virologia fondamentale e clinica"**

CSD MED/07
Ciclo 2008-2010

LAVORO DI RICERCA

**Studio del ruolo delle cellule
ematopoietiche nella replicazione di TTV**

Direttore del Dottorato
Prof. Luca Ceccherini-Nelli

Dottoranda
Elisabetta Andreoli

INDICE

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI	4
RIASSUNTO	6
ABSTRACT	8
<i>INTRODUZIONE</i>	8
ANELLOVIRUS	10
TTV.....	10
CENNI STORICI.....	12
TASSONOMIA E NOMENCLATURA	13
PROPRIETA' DEL VIRUS	17
REPLICAZIONE.....	25
STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE	28
DIAGNOSI DI LABORATORIO.....	31
EPIDEMIOLOGIA	33
ASSOCIAZIONE CON LA PATOLOGIA.....	37
SENSIBILITA' AI FARMACI ANTIVIRALI	42
TTMV.....	45
TTMDV	46
NEOPLASIE EMATOLOGICHE	48
LEUCEMIE.....	48
LINFOMI.....	52
MIELOMI.....	55
TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO (TMO).....	55
CONDIZIONAMENTO.....	57
SCOPO	60

MATERIALI E METODI	61
SOGGETTI DI STUDIO.....	62
PRELIEVO E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI.....	63
ANALISI CHIMICO-CLINICHE E VIROLOGICHE DI <i>ROUTINE</i>	63
ESTRAZIONE DEL DNA VIRALE.....	63
REAL-TIME PCR.....	64
PCR GENOGRUPPO-SPECIFICHE	70
SEQUENZIAMENTO.....	75
ANALISI DELLE SEQUENZE.....	75
ANALISI STATISTICA.....	76
MODELLI MATEMATICI PER STUDIO DELLA CINETICA VIRALE	76
RISULTATI	77
CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO APLOIDENTICO	78
DETERMINAZIONE DEI TITOLI E DEI GENOGRUPPI DI TTV NEI PAZIENTI APLO - T DEPLETI	79
DETERMINAZIONE DEI TITOLI DI TTV NEI PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO ALLOGENICO TRATTATI CON UN RIDOTTO REGIME DI CONDIZIONAMENTO E CON TERAPIA NON MIELOABLATIVA	87
DETERMINAZIONE DEI TITOLI DI TTV NEI PAZIENTI CON ARTRITE REUMATOIDE SOTTOPOSTI A TERAPIA CON RITUXIMAB.....	93
DISCUSSIONE.....	98
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	104

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

AA	AMINOACIDO/I.
ALL	ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKAEMIA, LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA
ALT	ALANINE AMINOTRANSFERASE, ALANINA AMINOTRANSFERASI.
AML	ACUTE MYELOID LEUKAEMIA, LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA
CAV	CHICKEN ANEMIA VIRUS, VIRUS DELL'ANEMIA DEL POLLO.
CLL	CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA, LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA
CML	CHRONIC MYELOID LEUKAEMIA, LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA
DLCBL,	LINFOMA DIFFUSO A GRANDI CELLULE B
GST	GLUTATIONE S TRANSFERASI
HAART	HIGHLY ACTIVE ANTIRETROVIRAL THERAPY, TERAPIA ANTIRETROVIRALE
HBV	VIRUS DELL'EPATITE B
HCV	VIRUS DELL'EPATITE C
HIV	VIRUS DELL'IMMUNODEFICIENZA UMANA
HL	HODGKIN'S LYMPHOMA, LINFOMA DI HODGKIN
HVR	HIGH VARIABLE REGION, REGIONE IPERVARIABILE
ICTV	INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, COMMISSIONE
IFN	INTERFERONE
IMF	MIELOFIBROSI IDIOPATICA
IG	IMMUNOGLOBULINE
MM	MIELOMA MULTIPLO

NFkB	NUCLEAR FACTOR k-B
NK	CELLULE NATURAL KILLER
NT	NUCLEOTIDE/I.
ORF	OPEN READING FRAME, CORNICE DI LETTURA APERTA.
PBMC	PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS
PCR	POLYMERASE CHAIN REACTION, REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI.
PCV	PORCINE CIRCOVIRUS, CIRCOVIRUS PORCINO.
RDA	REPRESENTATIONAL DIFFERENCE ANALYSIS, ANALISI DI RAPPRESENTAZIONE DIFFERENZIALE.
RFLP	RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS, POLIMORFISMI DI LUNGHEZZA DEI FRAMMENTI DI RESTRIZIONE.
SAV	SMALL ANELLOVIRUS
SISPA	SEQUENCE-INDEPENDENT SINGLE-PRIMER AMPLIFICATION
TBI	TOTAL BODY IRRADIATION, IRRADIAZIONE TOTALE DEL CORPO
TLMV	TTV-LIKE-MINI-VIRUS.
TMO	TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO
TTMDV	TORQUETENOMIDIVIRUS
TTMV	TORQUETENO-MINI-VIRUS.
TTV	TORQUETENO VIRUS.
UTR	UNTRASLATED REGION, REGIONE NON TRADOTTA.

RIASSUNTO

Torquetenovirus (TTV) è il prototipo di una vasta gamma di agenti virali con caratteristiche genomiche simili che vengono continuamente isolati nell'uomo e negli animali e attualmente sono classificati nel genere *Anellovirus*. Questi virus sono caratterizzati dalle piccole dimensioni della particella virale, da un genoma a DNA circolare a polarità negativa di circa 3,8 kb e da un'elevata variabilità genetica. Sebbene siano stati svolti numerosi studi per comprendere il ruolo patogenetico del virus, attualmente non siamo in grado di associare TTV ad una specifica patologia (Bendinelli e Maggi, 2005).

Le modalità adottate per la replicazione del genoma dagli anellovirus rimangono al momento da chiarire; il rilevamento di intermedi replicativi e di trascritti virali in molti tessuti evidenzia una probabile capacità del virus di replicarsi in molti dei tessuti e organi che infetta (Okamoto et al., 2001). In particolare, studi in vitro hanno dimostrato che TTV è in grado di replicarsi nei linfo-monociti solo quando questi ultimi sono opportunamente stimolati. (Maggi et al., 2001; Mariscal et al., 2002) ma ad oggi non è stato ancora dimostrato con certezza se esista una sottopopolazione linfocitaria nella quale il virus si replichi e/o persista preferenzialmente. Al fine di approfondire

tale aspetto, in questo lavoro di tesi i livelli di TTV sono stati misurati nel plasma di 8 pazienti affetti da varie forme di leucemia e sottoposti a intensi o moderati regimi di condizionamento mieloablativi prima di ricevere il trapianto di midollo osseo. I livelli di TTV plasmatici sono stati inoltre determinati in altri 23 pazienti: 5 erano stati sottoposti a trapianto di midollo osseo dopo aver ricevuto un regime di condizionamento non mieloablativo (gruppo di controllo), gli altri 18 pazienti erano affetti da artrite reumatoide ed erano stati trattati con il farmaco Rituximab, un anticorpo monoclonale chimerico umanizzato che riconosce la molecola CD20 espressa dai linfociti B.

I risultati ottenuti in questo studio forniscono una chiara evidenza dell'importante ruolo svolto dalle cellule del sistema ematopoietico nel mantenimento della viremia di TTV.

ABSTRACT

Many aspects of the life cycle of torquetenoviruses (TTVs) are essentially unexplored. In particular, it is still a matter of speculation which cell type(s) replicates the viruses and maintains the generally high viral loads found in the blood of infected hosts. In this study, we sequentially measured the TTV loads in the plasma of 8 patients who were strongly or mild myelosuppressed and then transplanted with haploidentical hematopoietic stem cells. In addition, other 23 patients were enrolled and tested for their plasma content of TTV DNA: 5 patients undergoing haploidentical hematopoietic stem cell transplantation after receiving a non-myeloablative conditioning regimen (control group) and 18 patients affected by rheumatoid arthritis and treated with Rituximab, a human monoclonal antibody able to inhibit B lymphocyte replication. The findings provide clear quantitative evidence for an extremely important role of hematopoietic cells in the maintenance of TTV viremia.

SEZIONE I

INTRODUZIONE

ANELLOVIRUS

TTV

Piccolo, variabile e diffuso: tre aggettivi che descrivono le caratteristiche principali del Torque Teno Virus (TTV). Dal momento della scoperta, avvenuta nel 1997 tramite *representational difference analysis* (RDA), ad oggi, sono stati compiuti molti progressi riguardo la conoscenza del suo genoma; tuttavia poche e frammentarie sono le informazioni sulle sue caratteristiche strutturali e morfologiche e sul suo significato clinico. In realtà, quando si parla di TTV non ci si riferisce ad un solo virus, ma ad un insieme molto complesso di specie virali, complessivamente identificate come anellovirus e la cui classificazione è ancora oggetto di studio. Dopo 15 anni dalla scoperta, più di 200 sequenze complete o parziali di genomi virali assimilabili a TTV sono state caratterizzate nell'uomo e in diverse specie animali. Queste sequenze appartengono tutte a virus molto semplici, caratterizzati da un genoma circolare a singolo filamento di DNA, che tuttavia mostrano una variabilità genetica notevole con divergenze molto elevate a livello nucleotidico e aminoacidico tra i diversi isolati.

Caratteristiche peculiari degli anellovirus sono l'ampia distribuzione nell'uomo ed in alcune specie animali, l'alta prevalenza nella popolazione generale e la possibile coinfezione dell'ospite con ceppi multipli, spesso altamente divergenti.

L'elevata incidenza nella popolazione e, allo stesso tempo, la scoperta che TTV è in grado di infettare e cronicizzare in quasi tutti i tessuti umani, senza evidenti correlazioni con nessun tipo di patologia, ha spinto alcuni studiosi a proporli come

semplici commensali apatogeni (Griffiths, 1999; Mushahwar, 2000). Bisogna tuttavia ricordare che molti virus, che oggi sappiamo favorire malattie, in passato, in mancanza di iniziali evidenze sperimentali, sono stati erroneamente ritenuti apatogeni. Considerando poi i circovirus animali, a cui TTV è strutturalmente apparentato, e le patologie ad essi associate (il circovirus porcino provoca una grave sindrome da deperimento con immunodepressione nel maiale e il virus dell'anemia aviaria causa patologie ematologiche nel pollame), l'ipotesi di una non-patogenicità degli anellovirus sembra alquanto affrettata).

CENNI STORICI

La scoperta di TTV risale al 1997, quando nel sangue di un paziente con epatite criptogentica venne identificata una sequenza di 500 nucleotidi di origine sconosciuta (Nishizawa et al. 1997). Il clone, denominato N22, fu dimostrato appartenere ad un nuovo virus a DNA per il quale fu coniato il nome di TT (TTV) dalle iniziali del paziente. Il successivo clonaggio e sequenziamento da parte di Okamoto e collaboratori portò alla caratterizzazione di un genoma virale apparentemente completo della lunghezza di 3,739 kilobasi (kb) denominato TA278, che in considerazione delle piccole dimensioni e di altri caratteri del virione fu ritenuto appartenere alla famiglia delle *Parvoviridae* (Okamoto et al. 1998). Questa classificazione si rivelò ben presto errata, poiché nel 1999 un gruppo di ricercatori identificò una nuova regione ricca in guanine e citosine (GC), scoprendo la natura circolare del genoma (Miyata et al. 1999); questa caratteristica, insieme ad altre somiglianze strutturali e molecolari con il virus dell'anemia del pollo (CAV), ha spinto i ricercatori a considerare TTV come il primo circovirus umano (Okamoto et al., 1998; Miyata et al., 1999; Mushahwar et al., 1999). In seguito, sono stati amplificati numerosi isolati virali che dimostravano caratteristiche strutturali simili a TTV, ma da questo geneticamente molto divergenti. Fra gli isolati identificati vi sono i virus del gruppo PMV (Hallett et al., 2000), del gruppo SANBAN, che nella lingua giapponese significa il terzo (Hijikata et al., 1999) e i virus YONBAN (il quarto in giapponese), che mostrano meno del 50% di omologia con il prototipo TTV e un genoma di dimensioni leggermente diverse (Takahashi et al., 2000a). Anche il virus SEN (SENV), la cui scoperta risale all'anno 2000, inizialmente ritenuto

responsabile di forme di epatite criptogenetica (Primi et al., 2000), dimostrò ben presto la sua parentela col gruppo dei virus TT, in particolare con gli isolati SANBAN (Tanaka et al., 2001). Nello stesso anno, Takahashi e collaboratori (2000b), durante studi sulla variabilità genetica di TTV, identificarono casualmente sequenze di acidi nucleici che dimostravano solo una parziale omologia con il genoma di TTV. La caratterizzazione di questi amplificati portò all'identificazione del TTV like mini virus (TTLMV), oggi conosciuto come Torque teno midi virus (TTMV).

Successivamente, il gruppo di ricerca guidato da Peng ha descritto 4 nuovi isolati di TTV che hanno dimostrato un'omologia inferiore al 50% rispetto agli altri genotipi noti: per tale motivo sono stati classificati in un gruppo a se stante, denominato genogruppo 5 di TTV (Peng et al. 2002).

TASSONOMIA E NOMENCLATURA

Le prime osservazioni relative alle dimensioni del virione, l'assenza di *envelope* e la presenza di una molecola di DNA a singolo filamento, indussero gli studiosi a classificare TTV nella famiglia *Parvoviridae* (Okamoto et al. 1998). Tuttavia, la scoperta della presenza di un tratto ricco in GC e soprattutto della circolarità del genoma, ponevano seri dubbi sulla classificazione di TTV come membro di tale famiglia. Sorprendentemente, col progredire delle scoperte, TTV dimostrava sempre più forti somiglianze strutturali col virus dell'anemia del pollo (CAV), un membro delle *Circoviridae* e di conseguenza vi fu provvisoriamente inserito. Indagini successive hanno però evidenziato considerevoli differenze tra i virus del gruppo TTV e quelli animali, soprattutto nella

sequenza nucleotidica e nelle dimensioni del genoma. Diverse proposte sono state avanzate in breve tempo riguardo la tassonomia dei circovirus umani, tra cui quella di creare una nuova famiglia con TTV come unico rappresentante (*Circinoviridae*; Mushahwar et al., 1999) o quella di crearne una con TTV, CAV e TTMV (*Paracircoviridae*; Takahashi et al., 2000b; Okamoto et Mayumi, 2001). Dato il notevole aumento delle sequenze depositate in banca dati e l'identificazione di nuovi virus simili a TTV, l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) ha istituito la nuova famiglia degli Anelloviridae che consta al suo interno di 9 generi, ciascuno comprendente un diverso numero di specie (Tabella I.1).

Tabella. I.1 Nuova classificazione degli Anellovirus secondo l'ICTV

ORDINE	FAMIGLIA	GENERE	SPECIE	
Non assegnato	ANELLOVIRIDAE	Alphatorquevirus	Torquetenovirus 1-29	TTV
		Betatorquevirus	Torqueteno mini virus 1-9	TTMV
		Deltatorquevirus	Torqueteno tupaia virus	
		Epsilontorquevirus	Torqueteno tamarin virus	
		Etatorquevirus	Torqueteno felis virus	
		Gammatorquevirus	Torqueteno midi virus 1-2	TTMDV
		Iotatorquevirus	Torqueteno sus virus	
		Thetatorquevirus	Torqueteno canis virus	
		Zetatorquevirus	Torqueteno douroucouli virus	

Particolarmente complessa è anche la classificazione degli isolati di TTV all'interno del genere *Alphatorqueovirus*. Il criterio inizialmente adottato prevedeva la distinzione in genotipi, identificati da numeri arabi, per isolati con divergenze nucleotidiche maggiori del 30% e in sottotipi, identificati da lettere minuscole, quando la divergenza era compresa tra il 15% e il 29%. Le prime analisi filogenetiche hanno permesso di

identificare 23 genotipi di TTV, inizialmente riuniti in quattro maggiori gruppi filogenetici (Okamoto et al. 1999; Biagini et al. 1999; Mushahwar., 2000). Studi successivi, condotti non più sulla regione N22 ma su quella non tradotta (*Untranslated Region*, UTR) e sull'intero genoma, hanno portato all'identificazione di un numero ben maggiore di genotipi e sottotipi (più di 40 e 70 rispettivamente), numero destinato sicuramente ad aumentare, vista la rapidità con la quale vengono identificati nuovi isolati. Nel 2002, Peng e collaboratori proposero di raggruppare gli isolati allora conosciuti (72) in 5 genogruppi, identificati con i numeri da 1 a 5, con divergenze nucleotidiche inter-gruppo superiori al 50% (figura I.1). In questa nuova classificazione, il ceppo prototipo TA278 è stato inserito insieme ai genotipi dal 2 al 6 nel genogruppo 1. L'isolato PMV (Hallet et al. 2000) è il prototipo del genogruppo 2 che comprende in totale 5 genotipi. Più complessa e più numerosa la distribuzione degli isolati all'interno del genogruppo 3; l'isolato prototipo è il SANBAN, ma in questo genogruppo sono stati inseriti anche i ceppi SENV. L'isolato YONBAN, genotipo 21 di TTV, è il prototipo del genogruppo 4, mentre l'isolato JT33 è il prototipo del genogruppo 5 (Peng et al. 2000).

Gli anellovirus sono stati isolati anche in numerose specie animali: scimpanzé, macachi e altri primati, tupaia, cani, gatti, maiali (Leary et al. 1999; Okamoto et al. 2000a, 2002; Bigarre et al. 2005; Biagini et al. 2007). Gli anellovirus animali sono altamente divergenti da quelli umani sia per sequenze che per dimensioni del genoma, anche se alcuni fanno eccezione clusterizzando dal punto di vista filogenetico fra gli anellovirus umani (Figura. I.1; Biagini, 2009).

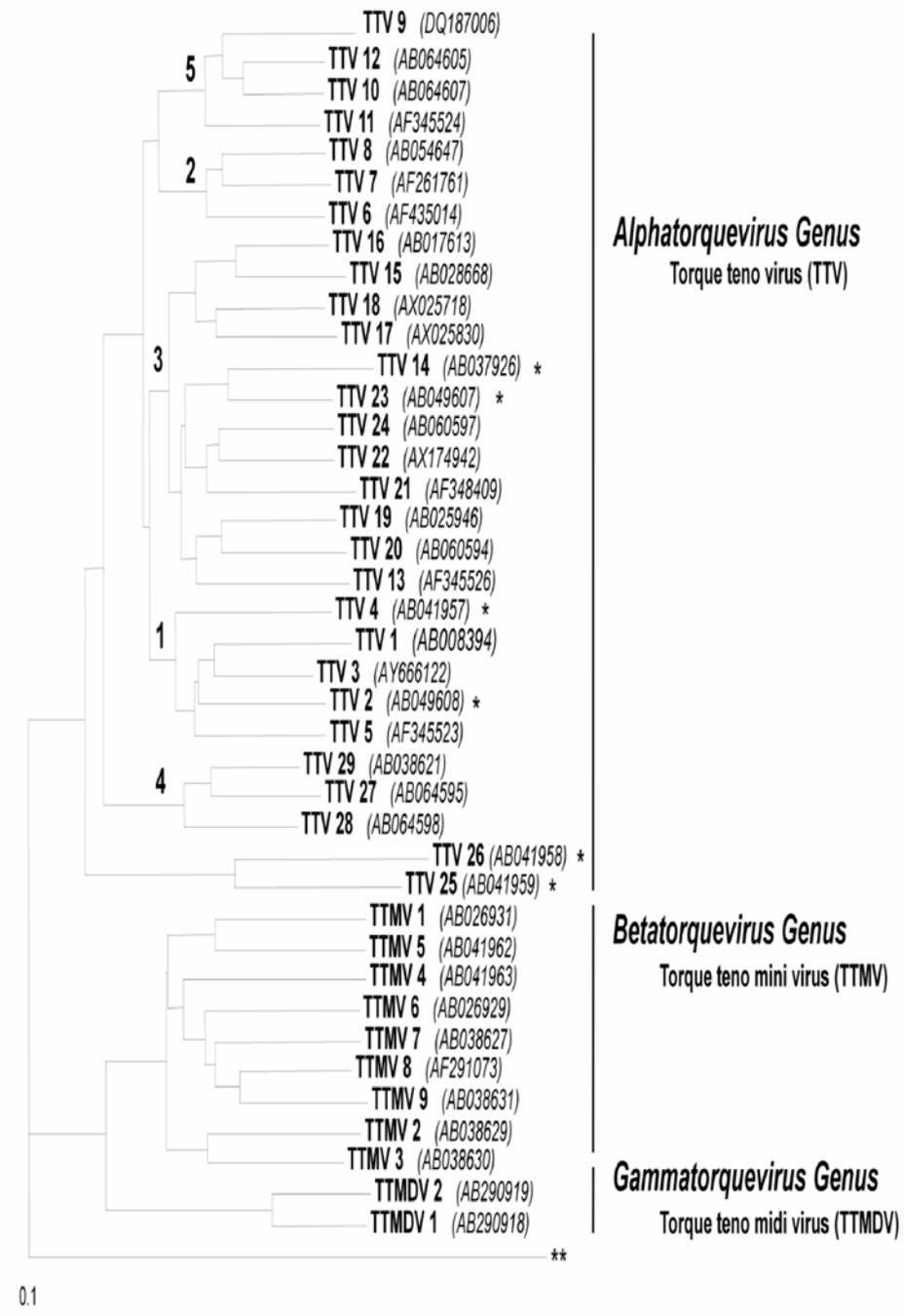


Figura I.1. Analisi filogenetica degli anellovirus dell'uomo

PROPRIETA' DEL VIRUS

La particella virale. A causa della mancanza di un sistema di replicazione *in vitro*, le informazioni in nostro possesso sulle caratteristiche fisico-chimiche degli anellovirus derivano da studi condotti con particelle virali purificate da plasma o da feci. Nella maggior parte dei lavori il genotipo 1 di TTV è stato quello più studiato e la descrizione delle caratteristiche morfologiche della particella virale è riferita essenzialmente a questo tipo. Comunque, alla luce delle conoscenze attuali, le caratteristiche morfologiche dei diversi genotipi di TTV non dovrebbero essere molto differenti. Il diametro del virione, compreso tra 30 e 32 nm per TTV, è stato determinato attraverso l'uso di filtri di policarbonato con pori di dimensione decrescente. Da esperimenti di ultracentrifugazione in gradiente di cloruro di cesio, la densità di TTV è risultata di 1,31-1,35 g/ml e in gradiente di saccarosio di 1,26 g/ml (Mushahwar et al. 1999; Okamoto et al. 1998). L'incubazione di sovrantante fecale con γ -globuline ha permesso la visualizzazione di TTV al microscopio elettronico; il virus è apparso di forma sferica, con un capsido a probabile simmetria icosaedrica e privo di *envelope* (Itoh et al. 2000; figura I.2). Il ritrovamento del genoma di TTV nella bile di soggetti infetti e la sua resistenza al trattamento con detergenti, solventi e calore secco confermarono ulteriormente l'assenza di un involucro lipidico esterno (Okamoto et al. 1998; Ukita et al. 1999). L'eliminazione del virus in materiali infetti è stata ottenuta solo in seguito ad esposizione a temperature molto elevate o tramite purificazione per immunoaffinità (Simmonds et al. 1998; Takayama et al. 1999). Le proteine strutturali del virus non sono ancora note ma, per la somiglianza con CAV, si ritiene che

il capside sia costituito da una sola proteina strutturale con disposizione icosaedrica. Non sono stati ancora identificati lipidi o carboidrati virali.

Non si conoscono altre forme circolanti del virione, mentre è stata documentata l'esistenza nel sangue di particelle virali complessate ad immunoglobuline (Itoh et al., 2000).

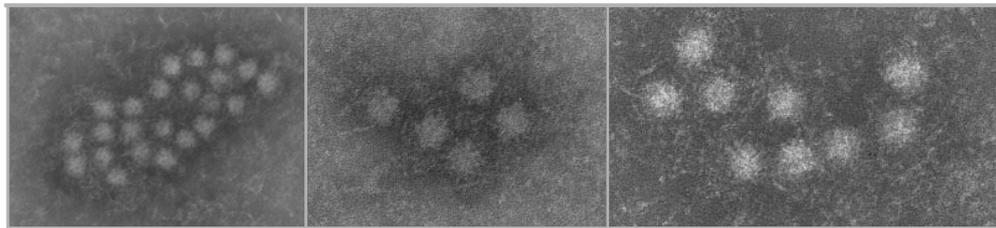


Figura I.2. Visualizzazione al microscopio elettronico di particelle di TTV, in forma di aggregati in seguito ad incubazione con γ -globuline umane specifiche per il genotipo 1a (da Itoh et al., 2000).

Il genoma e le proteine codificate. Le informazioni sulla struttura del genoma e sulle proteine codificate derivano essenzialmente dall'analisi delle sequenze e dal relativo confronto con i virus meglio caratterizzati della famiglia *Circoviridae*. Il genoma di TTV è costituito da una singola molecola di DNA circolare a polarità negativa, rispettivamente di circa 4000 e 3000 coppie di basi. Dall'analisi strutturale di tutte le sequenze conosciute, è emerso che il genoma dei due virus, pur essendo di diversa grandezza, condivide una simile organizzazione (figura I.3).

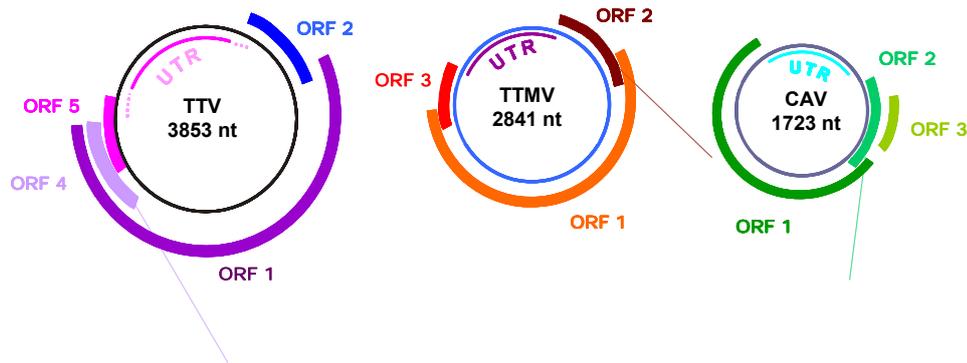


Figura I.3. Schema e confronto del genoma di TTV (isolato TA278), TTMV e CAV. Sono evidenziate le dimensioni del genoma e le regioni codificanti.

Differenze nelle dimensioni del suo genoma sono state osservate anche all'interno degli isolati del gruppo TTV, ma si tratta di piccole delezioni o inserzioni (Kamahora et al., 2000; Okamoto et al., 2000a; Muljono et al., 2001).

Il genoma risulta formato per due terzi da una regione codificante (*Open Reading Frame*, ORF) e per un terzo da una più piccola regione non tradotta (UTR) che sembra svolgere un ruolo molto importante nel controllo della replicazione virale e della trascrizione proteica (Kamada et al. 2004; Suzuki et al. 2004). L'analisi delle sequenze ha permesso di individuare sul filamento positivo, complementare al genoma virale, due geni maggiori (ORF 1 e 2) potenzialmente espressi con differenti cornici di lettura e parzialmente sovrapposti; la lunghezza e la localizzazione di questi geni può variare fra i differenti isolati. Il gene ORF 1, localizzato tra i nucleotidi 589 e 2898 sul ceppo TA278, presumibilmente codifica per la proteina del capsido virale lunga circa 770 amminoacidi (aa). Questa proteina oltre a svolgere funzioni strutturali, potrebbe essere coinvolta nel meccanismo replicativo. Infatti, nella sua porzione N-terminale

sono stati identificati motivi fortemente idrofilici e ricchi in arginina che potrebbero mediare il legame con il DNA; nella regione C-terminale sono stati invece riconosciuti i motivi amminoacidici tipici della proteina Rep, una replicasi presente nei virus a DNA che utilizzano un meccanismo a cerchio rotante per la replicazione del loro genoma. La proteina codificata dall'ORF 1 svolge quasi certamente un ruolo fondamentale anche nell'interazione con l'ospite, come dimostrato dal ritrovamento di tre regioni ipervariabili (*High Variable Regions*, HVR 1, 2 e 3) e di potenziali siti di glicosilazione che, variabili in numero e in localizzazione fra i differenti isolati, potrebbero modificare le proprietà biologiche ed antigeniche della proteina (Hijikata et al., 1999).

Il gene ORF 2, compreso tra i nucleotidi 353 e 712 di TA278, codifica per una proteina non strutturale (di circa 120 aa), anch'essa probabilmente coinvolta nella replicazione del virus. Questa convinzione deriva dal ritrovamento di 5 omologie di sequenza tra la ORF 2 e una proteina di CAV, la VP 2, che durante la replicazione del virus sembra svolgere importanti funzioni nei meccanismi intracellulari di trasmissione dei segnali (Peters et al., 2002).

Dall'analisi della sequenza di molti isolati di TTV, è stato inoltre osservato che il gene ORF 2 risulta spesso costituito da due ORF più piccole (denominate a e b) le cui capacità codificanti sono ancora tutte da definire; l'ORF 2a è risultata molto conservata fra i diversi genotipi (Tanaka et al., 2000b; Kakkola et al., 2002). Trascritti del filamento negativo del genoma di TTV sono stati ritrovati nelle cellule del midollo osseo (Okamoto et al., 2000d; 2001) e sono stati osservati anche in modelli sperimentali (Kamahora et al., 2000; Yokoyama et al., 2002). In

questi studi sono stati identificati tre distinti mRNA di 3.0, 1.2, e 1.0 kb con sequenze terminali comuni in 5' e 3'. L'analisi dei possibili siti di *splicing*, utilizzati per produrre questi mRNA, ha evidenziato la possibilità che esistano altre due ORF minori, dette ORF 3 (o ORF 2-4) e ORF 4 (o ORF 2-5). L'ORF 3, di circa 286 aa, sembra codificare per due proteine (p38 e p41) dotate di un differente grado di fosforilazione e per questo simili alla proteina NS5A del virus dell'epatite C (HCV; Asabe et al., 2001). Le somiglianze di questa ORF con il gene dell'apoptina di CAV hanno indotto alcuni studiosi ad indagare, in linee cellulari derivate da carcinoma epatocellulare umano, il comportamento di una proteina di 105 aa, codificata dalla sequenza della putativa ORF 3. Da questi esperimenti è emerso che tale proteina è in grado di indurre apoptosi solo nelle linee cellulari originate da tumori epatici mentre non ha effetto su quelle derivate da altre forme tumorali (Kooistra et al. 2004). Per quanto riguarda l'ORF 4 (circa 289 aa) si ritiene che anche essa sia implicata nella replicazione del virus o nella regolazione della trascrizione di proteine cellulari. Altre ORF possono essere dedotte dalla sequenza nucleotidica di alcuni isolati ma il loro significato funzionale è ancora sconosciuto (Yokoyama et al., 2002).

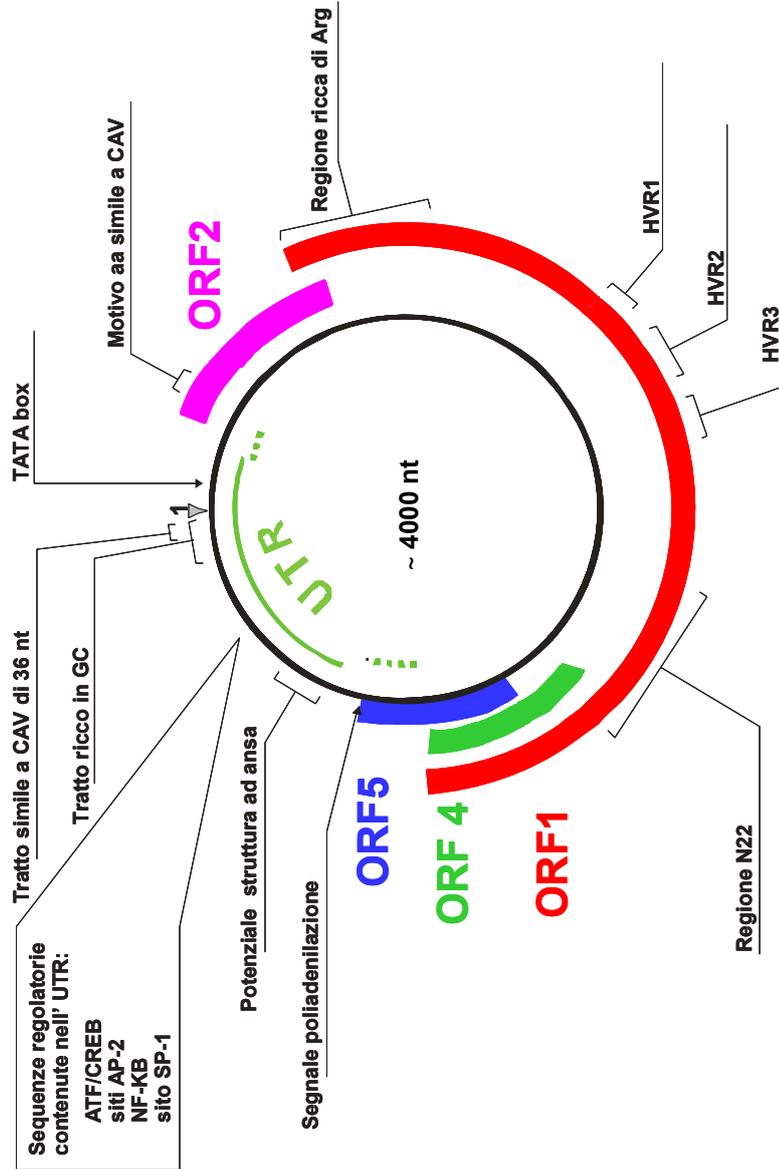


Figura I.4. Organizzazione genomica di TTV. UTR: regione non tradotta; ORF: cornici di lettura aperte; HVR: regioni ipervariabili; motivo aa: motivo aminoacidico; nt: nucleotidi.

La regione non codificante (UTR) di circa 1,2 Kb, comprende una porzione ricca in guanina e citosina (GC) e in alcuni tratti risulta assolutamente conservata tra tutti gli isolati noti al momento; è quindi probabile che svolga funzioni di estrema importanza per la vitalità del virus. Da elaborazioni al computer è stato osservato che in tutta la regione non tradotta, soprattutto nella regione ricca in GC, si può formare una complessa struttura secondaria con motivi ad ansa, notoriamente associati a funzioni regolatorie. Studi recenti hanno identificato la localizzazione del sito di inizio trascrizione dei 3 trascritti osservati, risultata essere 113 nt a valle rispetto al promotore basale, costituito dalla *TATA box* (Kamada et al. 2004). Tramite esperimenti di mutagenesi sono stati individuati elementi regolatori negativi e positivi (figura I.5) ed è stato osservato che l'attività di alcune sequenze di regolazione potrebbe essere cellulo-specifica; il segnale di attivazione più forte è stato osservato in linee cellulari di derivazione epatica e linfoblastoide (Suzuki et al. 2004).

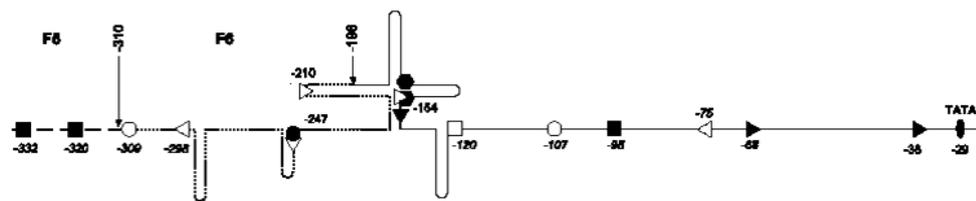


Figura I.5. Promotori ed *enhancer* di TTV in relazione alla struttura terziaria dell'UTR. Siti conservati per il legame dei fattori di trascrizione: cerchio vuoto, CREB; cerchio pieno, E2F; quadrato vuoto c-Ets, quadrato pieno, USF; esagono SP1; le posizioni sono indicate rispetto al sito di inizio trascrizione (+1 nt). Modificata da Kamada et al. 2004.

Variabilità genetica. Una delle caratteristiche che rendono unici gli anellovirus è la loro variabilità genetica, sorprendentemente elevata per virus a DNA. Livelli maggiori di variabilità sono stati osservati per le regioni codificanti (solo 32% di omologia amminoacidica fra l'isolato SANBAN e il prototipo TA278 nella ORF 1) e nell'ORF 1 sono state identificate 3 regioni altamente variabili che, in analogia con CAV, sono state definite *High Variable Regions* (HVRs). Queste regioni, di 22, 47 e 31 aa nel caso del genotipo 1, mostrano molte inserzioni e delezioni ed una divergenza fino al 70% a livello amminoacidico nei differenti isolati.

In uno studio nel tempo, è stato inoltre dimostrato che la variabilità all'interno di queste regioni è estremamente elevata durante la fase acuta dell'infezione, indicando un loro coinvolgimento nei meccanismi di elusione del sistema immunitario. Le regioni HVRs inoltre presentano maggiore diversità in soggetti con infezione cronica e si ritiene siano implicate nella formazione della quasispecie di TTV, così come l'HVR di HCV e la V3 del virus dell'immunodeficienza umana (HIV) (Nishizawa et al. 1999). Tuttavia, la variabilità all'interno delle HVRs non è uguale per tutti gli isolati: ad esempio, gli isolati di genotipo 12 e 13 non hanno mostrato significative variazioni di sequenza durante un periodo di osservazione di 5 anni (Ukita et al. 2000).

I motivi di questa elevata variabilità non sono ancora noti, ma sono stati chiamati in causa fenomeni di ricombinazione e la scarsa fedeltà di replicazione del DNA virale. Secondo alcuni autori, è possibile che fenomeni di ricombinazione avvengano tra isolati diversi, ipotizzando addirittura che potrebbero avvenire multipli eventi di ricombinazione all'interno di uno

stesso isolato virale (Worobey, 2000; Biagini et al., 2001b; Manni et al., 2002). La ricombinazione sarebbe facilitata oltre che dalle caratteristiche del genoma, anche dalla contemporanea presenza di differenti isolati virali che circolano nel sangue o infettano il singolo tessuto dell'ospite (Worobey, 2000; Niel et al., 2000; White et al., 2000). L'ipotesi della ricombinazione tuttavia non è unanimemente condivisa (Jelcic et al. 2004).

Le coinfezioni, anche con isolati appartenenti a genogruppi diversi sono molto frequenti, pari a circa il 65% in bambini al di sotto dei 7 anni e circa il 90% in soggetti adulti sani (Ukita et al., 2000; Saback et al., 2002). Per TTMV è stata dimostrata nel sangue di un soggetto immunocompromesso la contemporanea presenza di ben 15 isolati differenti (Vasconcelos et al., 2002). L'utilizzo da parte degli anellovirus di polimerasi cellulari dotate di una scarsa attività di correzione di bozze non è stato ancora dimostrato, anche se ipotizzabile. Infatti, la frequenza con cui avvengono le sostituzioni nucleotidiche in alcune regioni del genoma (7.3×10^{-4} per sito per anno nelle HVRs di SENV) risulta simile a quella di virus ad RNA e circa 10 volte maggiore di quella di virus a DNA come il virus dell'epatite B (HBV; Umemura et al., 2001b).

REPLICAZIONE

Le modalità di replicazione del genoma dei virus del gruppo TT non sono ancora note e le ipotesi finora formulate derivano dalle conoscenze sui circovirus animali, in particolare CAV e il circovirus porcino di tipo 2 (PCV2). Nel loro genoma, a differenza di quanto osservato per altri virus, non sono state identificate sequenze in grado di alterare il ciclo della cellula ospite (Todd et al. 2001). Si ritiene pertanto che il processo di

replicazione dei circovirus dipenda dallo stato di attivazione della cellula, e in particolare da proteine prodotte durante la fase S (Fields, 1996). Inoltre, la mancanza di sequenze codificanti per DNA polimerasi o alternativamente, per retrotrascrittasi note, suggerisce che per la replicazione vengano sfruttati gli enzimi di origine cellulare. Anche per la replicazione di TTV è stata documentata in diversi esperimenti la necessità di cellule stimolate (Maggi et al. 2001b; Mariscal et al. 2002). Ciò suggerisce che il processo replicativo avvenga almeno in parte nel nucleo, ma le modalità d'assemblaggio del virione sono del tutto sconosciute. L'assenza di uno strato lipidico esterno lascia comunque pensare che il rilascio delle particelle avvenga tramite lisi cellulare.

Per la replicazione del DNA, analogamente ai virus vegetali e batterici con DNA circolare a singolo filamento, è stato proposto un meccanismo a cerchio rotante che porta alla formazione di un intermedio replicativo a doppio filamento circolare. Il ritrovamento anche nel genoma di TTV di motivi conservati per le proteine REP sembra confermare tale ipotesi; in TTV tuttavia, non è stato identificato il nonanucleotide tipicamente presente in tutti i casi in cui è stata documentata una replicazione tramite cerchio rotante (Erker et al. 1999). I dubbi sull'assenza del nonanucleotide potrebbero essere superati considerando che l'intermedio replicativo di TTV a doppio filamento di DNA è stato ritrovato nel fegato e in cellule di midollo osseo (Okamoto et al. 2000d). Altri esperimenti sono stati condotti per verificare la capacità di TTV di replicare attraverso un intermedio ad RNA (come il virus dell'epatite B), ma non essendo stato trovato nel suo genoma alcun motivo codificante per una retrotrascrittasi

virale, si ritiene che tale modello di replicazione non sia adatto (Nishizawa et al. 1999).

Poco note sono anche le modalità di trascrizione degli RNA messaggeri (mRNA) di TTV; esperimenti di transfezione hanno permesso di osservare 3 mRNA diversi per dimensioni e codificanti per un numero ancora imprecisato di proteine. Questi messaggeri presentano polarità antigenomica e hanno un sito di poliadenilazione al 3' e un sito cap al 5'. In più, tramite un meccanismo di *splicing*, oltre alle ORF già conosciute, verrebbero prodotte altre due nuove ORF, dette ORF 4 e ORF 5, poste cu cornici di lettura differenti (Kamahora et al. 2000; figura I.6).

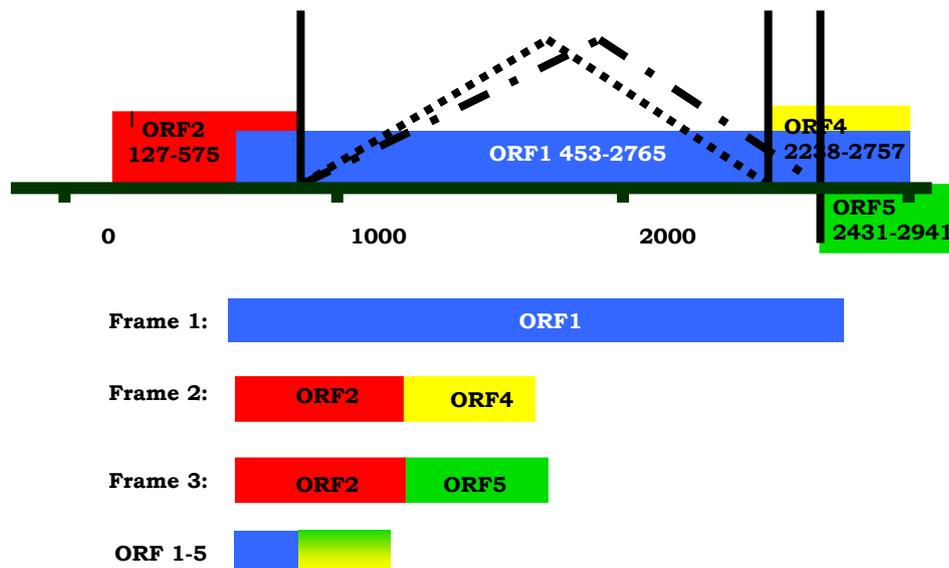


Figura I.6. Schema ipotetico dei meccanismi di *splicing* nel genoma di TTV e descrizione delle ORF prodotte.

STORIA NATURALE DELL'INFEZIONE

Le interazioni che gli anellovirus sono in grado di stabilire con l'ospite sono ancora poco conosciute.

In letteratura, sebbene rari, sono stati descritti casi di infezioni autolimitanti, con risoluzione dell'infezione anche dopo anni o mesi dal contagio (Lefrere et al., 1999; Matsumoto et al., 1999; Yuki et al., 1999); una rapida eliminazione del virus è stata osservata anche in scimpanzé infettati sperimentalmente (Mushahwar et al., 1999). La spiegazione di tale fenomeno non è ancora chiara e tra i possibili motivi sono stati considerati una ridotta immissione in circolo del virus, un aumento della sua eliminazione, una modificazione delle sequenze virali che non permettono più la rilevazione del DNA ed infine la possibilità che il virus stabilisca uno stato di latenza. A tal proposito è stato osservato che l'apparente scomparsa del virus dal plasma non è necessariamente associata alla completa eradicazione dell'infezione (Maggi et al. 2001c; Pollicino et al. 2002). E' inoltre necessario ricordare che l'andamento dell'infezione da TTV potrebbe essere diverso a seconda del genotipo infettante. A tal proposito, in uno studio condotto da Ohto e collaboratori (2002) è stata osservata la risoluzione spontanea dell'infezione in circa il 20% dei bambini infettati da TTV, ma con percentuali differenti a seconda del genotipo virale infettante; Wilson e collaboratori (2001) hanno invece riportato che il 77% dei soggetti tossicodipendenti infettati con l'isolato SENV era in grado di eliminare il virus dal plasma. Molti altri studi sono tuttavia necessari prima di poter affermare che i genotipi di TTV possiedano una differente capacità di persistenza.

La cronicizzazione dell'infezione è invece un evento molto frequente, osservato in più dell'80% dei soggetti infettati da TTV e documentata in diversi lavori (Takayama et al., 1999; Ali et al., 2002; Lefrère et al. 1999; Matsumoto et al. 1999); le infezioni possono essere molto durature nel tempo, tanto che in un caso la persistenza di TTV è stata dimostrata per più di 20 anni (Matsumoto et al., 1999). I meccanismi implicati nella persistenza non sono noti, ma è stato escluso che il virus possa rimanere latente nella cellula ospite in forma episomiale o integrata (Tanaka et al., 2000a; Yu et al., 2002). L'incapacità del sistema immunitario dell'organismo ospite di controllare l'infezione potrebbe in parte spiegare la facilità con cui TTV persiste. In seguito all'infezione da TTV è stata osservata una rapida comparsa di immunoglobuline di tipo M (dopo circa 10-12 settimane dall'infezione), dimostrabili nel sangue per 5-11 settimane, insieme ad una più lenta, ma anche più duratura, produzione di IgG (intorno alla 15°-17° settimana), che invece tendono a persistere per anni (Tsuda et al., 2001). Rimane ancora da dimostrare la capacità neutralizzante di questi anticorpi ed evidenze contrastanti sono state ottenute soprattutto per le IgG, la cui presenza a volte è stata associata con l'assenza o la scomparsa della viremia plasmatica, a volte non sembra aver prodotto nessun effetto sulla persistenza del virus (Tsuda et al., 1999; Ott et al., 2000). A parziale conferma di ciò, la dimostrazione che, in pazienti cronicamente infetti, la maggior parte di TTV circola complessato ad IgG (Nishizawa et al., 1999). L'esistenza di infezioni multiple con più isolati di TTV suggerisce inoltre che gli effettori immuni siano incapaci di proteggere dalle superinfezioni sostenute da sottotipi eterologhi del virus. Le cellule del sistema immunitario potrebbero anzi

contribuire alla disseminazione virale ai vari tessuti. Gli acidi nucleici degli anellovirus sono stati amplificati in molti tessuti e fluidi biologici (bile, saliva, seme, lacrime, fluido duodenale e secrezioni vaginali, polmone, milza, pancreas, rene, linfonodi, muscolo scheletrico e tiroide), indicando che essi sono disseminati in tutto l'organismo e possono stabilire un'infezione persistente in vari distretti corporei (Deng et al., 2000; Biagini et al., 2001a; Tajiri et al., 2001; Okamoto et al., 2001; Suzuki et al., 2001). Sorprendente è stato il ritrovamento di ben 24 isolati nella milza di un paziente affetto da tumore (Jelcic et al. 2004). L'intermedio di replicazione di TTV o l'attività di trascrizione è stata ritrovata in molti tessuti, dimostrando che esso è in grado di replicare in tutte le cellule che infetta e non solo in quelle epatiche o del midollo osseo (Okamoto et al., 1998; 2000b; 2000d; 2000e; 2001; Kikuchi et al., 2000; Lopez-Alcorocho et al., 2000; Rodriguez-Inigo et al., 2000; Comar et al., 2002). Come per altri virus a DNA, è tuttavia probabile che la capacità di replicazione di TTV dipenda dallo stato di attivazione della cellula ospite. Studi in vitro hanno dimostrato che TTV è in grado d'infettare i linfo-monociti ma che la replicazione del virus avviene solo quando queste cellule sono attivamente stimolate (Maggi et al., 2001b; Mariscal et al., 2002). Un evento precoce dell'infezione da TTV è la disseminazione del virus nel sangue, come estesamente osservato sia in scimpanzé infettati sperimentalmente che in soggetti trasfusi con sangue infetto. In tutti questi casi, la viremia diveniva evidenziabile dopo 5-8 settimane dall'esposizione e restava spesso dimostrabile per tutto il periodo di osservazione (Mushahwar et al., 1999; Tawara et al., 2000; Tsuda et al., 2001). I titoli di TTV osservati nel plasma di diversi soggetti mostrano un ampio range di

variabilità, oscillando fra 10^2 e 10^8 copie di DNA/ml. Inoltre, i livelli plasmatici medi nelle infezioni croniche sono paragonabili a quelli di altri virus persistenti, come HCV, HIV e HBV (Pistello et al. 2001). Nel tempo, i titoli viremici possono variare notevolmente per alcuni individui, mentre in altri tendono a rimanere stabili. In un precedente lavoro, applicando un modello matematico simile a quello utilizzato per gli studi su HIV e HCV, in pazienti positivi per HCV e cronicamente infettati da TTV, è stato possibile studiare la cinetica di TTV in risposta alla terapia con interferone (IFN). Dallo studio è emerso che l'emivita di TTV nel plasma è di circa 6 ore, che ogni giorno vengono prodotti almeno 10^{10} virioni e che più del 90% del virus plasmatico subisce un turnover giornaliero (Tabella I.2; Maggi et al., 2001c).

TABELLA I.2. Dinamica della viremia plasmatica di TTV confrontata con quelle di altri virus persistenti

Virus	Emivita del virione	N° minimo di virioni prodotti al giorno	Referenza
HBV	1.2 giorni	$> 1.7 \times 10^{13}$	Whalley <i>et al.</i> 2001
HCV	2.7 ore	$> 1.3 \times 10^{12}$	Neumann <i>et al.</i> 1998
HIV	< 1 ora	$> 9.8 \times 10^9$	Ramratnam <i>et al.</i> 1999
TTV	6.5 ore	$> 3.8 \times 10^{10}$	Maggi <i>et al.</i> 2001c

DIAGNOSI DI LABORATORIO

L'identificazione degli anellovirus è attualmente possibile solo facendo ricorso a tecniche di amplificazione molecolare degli acidi nucleici, data la mancanza di efficienti sistemi di coltivazione e di saggi per la ricerca di antigeni virali. A causa dell'elevata variabilità genetica inter-ed-intra isolato, la scelta della regione genomica da amplificare si è rivelata di

fondamentale importanza. Infatti, il motivo delle più basse frequenze di TTV osservate nei primi studi è sostanzialmente riconducibile alla metodica utilizzata (20%, Itoh et al. 1999; 9%, Irving et al. 1999). La regione scelta inizialmente come bersaglio dell'amplificazione era la porzione N22 del gene ORF 1 (PCR N22); questo frammento, in seguito, non si è rivelato conservato fra tutti gli isolati di TTV e la metodica ben presto è apparsa valida solo per l'amplificazione dei genotipi 1-6 (Muljiono et al., 2001). Le conoscenze sempre più approfondite del genoma hanno indicato la regione dell'UTR (PCR UTR) come regione ottimale per l'amplificazione del genoma di tutti gli isolati di TTV tanto che questo sistema di amplificazione è stato definito universale (Okamoto et Mayumi, 2001). Tale regione è anche il bersaglio delle amplificazioni quantitative attraverso metodiche di real-time PCR o PCR competitiva, (Kato et al., 2000; Nakagawa et al., 2000; Maggi et al., 2001a; 2001c; Moen et al., 2002).

Gli isolati virali individuati e quantificati con la Real- Time PCR universale possono essere in seguito caratterizzati con PCR genogruppo-specifiche dedotte da diverse regioni del genoma virale (Maggi et al. 2001b) che richiedono comunque la conferma tramite sequenziamento.

Attualmente non è possibile eseguire la diagnosi sierologia d'infezione acuta o pregressa. Nei pochi studi effettuati, sono stati eseguiti saggi di immunoblotting o di immunoprecipitazione combinata alla PCR e utilizzando come antigeni particelle virali intere o frammenti della proteina ORF 1 o ORF 2 espressi in batteri (Nishizawa et al., 1999; Tsuda et al., 1999; 2001; Handa et al., 2000; Ott et al., 2000). Le metodiche non hanno dati risultati riproducibili e nei diversi

studi sono stati trovati valori di prevalenza molto differenti (dal 10% al 98% dei soggetti sani sono risultati positivi per anticorpi anti-TTV di tipo G; Handa et al., 2000; Ott et al., 2000; Tsuda et al., 2001; Kakkola et al. 2002), suggerendo che il tipo di antigene adoperato è in grado di influenzare enormemente la *performance* del saggio sierologico.

EPIDEMIOLOGIA

Una delle caratteristiche peculiari dell'infezione degli anellovirus è la loro estrema diffusione in tutte le popolazioni del mondo (Prescott *et* Simmonds., 1998). Nonostante le limitazioni dei protocolli di amplificazione utilizzati, nei primi studi di prevalenza circa un terzo della popolazione risultò positiva a TTV, con diverse percentuali a seconda della regione geografica analizzata. La frequenza di individui positivi più alta fu trovata tra le popolazioni africane e sud americane, mentre in Asia il virus risultò mediamente prevalente. Nei paesi industrializzati, Stati Uniti e Nord Europa, la frequenza di TTV si dimostrò molto bassa. Oggi è noto che la metodica utilizzata nei primi studi era in grado di amplificare solo i genotipi 1-6 e i risultati ottenuti potrebbero indicare una loro diversa distribuzione. Con l'avvento della PCR universale, sia nella versione qualitativa che in quella quantitativa, TTV è stato ritrovato in circa 2/3 della popolazione mondiale con modeste variazioni fra le differenti aree geografiche (Matsubara et al., 2001; Niel et Lampe, 2001): in particolare, la prevalenza di TTV tende ad essere più moderata in Nord America ed Oceania (circa 40%) e più elevata in Asia (> 90%), con picchi di prevalenza che si avvicinano sensibilmente al 100% in Giappone, Arabia Saudita e Singapore (figura I.7).

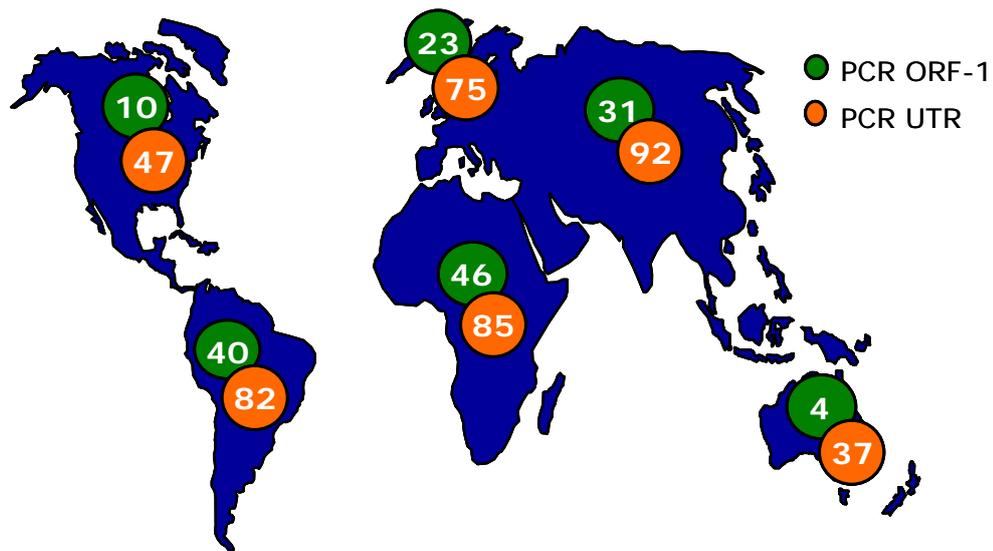


Figura I.7. Prevalenza di TTV nella popolazione. Le percentuali indicate si riferiscono ai dati ottenuti amplificando regioni dell'ORF 1 (verde) e dell'UTR (rosso), da Bendinelli et al. 2001.

La percentuale di prevalenza degli anellovirus appare poco influenzata dal sesso e dalle condizioni socio-economiche della popolazione esaminata mentre è stato osservato un certo incremento con l'età (Suzuki et al., 2000; Umemura et al., 2001a) anche se l'infezione risulta altamente diffusa già nella prima infanzia (Vasconcelos et al., 2002).

E' stato inoltre osservato che popolazioni segregate, che hanno scarsi contatti con le restanti regioni del mondo, esibiscono livelli di viremia particolarmente elevati (Prescott et Simmonds., 1998). Tuttavia, la ricerca del genoma come unico mezzo diagnostico, permette di rilevare solo le forme attive dell'infezione, sia acute che croniche, ma non è in grado di evidenziare le forme pregresse ed è dunque probabile che i reali livelli di prevalenza siano ancora più elevati rispetto a quelli osservati. A conferma di ciò, il ritrovamento di sequenze virali in assenza di viremia (Maggi et al. 2001c; Pollicino et al. 2002).

Una così elevata prevalenza dell'infezione presuppone che gli anellovirus siano altamente contagiosi e che la loro diffusione avvenga attraverso molteplici modalità di trasmissione, tra cui quella parenterale e quella oro-fecale. La maggior diffusione di questi virus nei soggetti trasfusi o esposti al sangue e il loro frequente ritrovamento nelle feci dei soggetti infetti, porta a ritenere che la via parenterale e quella oro-fecale siano anche le più efficaci (Gallian et al., 2000; Luo et al., 2000; Lin et al., 2000; Nakagawa et al., 2000; Tawara et al., 2000; Azzi et al., 2001).

La dimostrazione del DNA degli anellovirus nel sangue cordale, nelle secrezioni vaginali, nel seme e nella saliva suggerisce la possibile esistenza di altre vie di trasmissione sia pur con frequenza ed efficienza ancora poco chiare (Gerner et al., 2000; Kazi et al., 2000; Inami et al., 2000; Liu et al., 2000; Martinez et al., 2000; Matsubara et al., 2000; 2001; Schroter et al., 2000; Stark et al., 2000; Biagini et al., 2001a; Chan et al., 2001; Fornai et al., 2001; Krekulova et al., 2001; Pirovano et al., 2002a). TTV è stato ritrovato, con titoli più elevati, nelle secrezioni e nelle cellule nasali, rispetto al corrispondente campione di plasma, di bambini con sintomi respiratori acuti. Queste circostanze indicano la via aerea come ulteriore possibile modalità di trasmissione nonché l'eventualità che il tratto respiratorio possa essere un sito primario di replicazione e colonizzazione dell'ospite (Maggi et al. 2003).

Il ritrovamento di sequenze molto simili a quelle dei circovirus umani in numerosi animali da allevamento (bovini, suini, ovini e pollame) e da compagnia (cani e gatti) suggerisce inoltre, la possibilità di una trasmissione interspecie dell'infezione (Leary et al., 1999; Okamoto et al., 2002).

Pochi studi hanno investigato la prevalenza dei differenti genotipi di TTV, e le metodiche utilizzate in questi lavori si sono rivelate spesso incapaci di amplificare tutti i genotipi conosciuti. Tuttavia, i risultati finora ottenuti sembrano suggerire che certi genotipi siano più diffusi di altri e che esistano differenze nella loro distribuzione geografica (Gallian et al. 2000; Mikuni et al. 2002; Peng et al. 2002). Ad esempio, il genotipo 1 ed alcuni genotipi di SENV appaiono più diffusi in Asia che nei paesi occidentali: in uno studio, il 10% dei donatori di sangue in Giappone è risultato positivo per SENV-D e SENV-H rispetto al 2-3% dei donatori positivi in USA e Italia (Shibata et al., 2001; Umemura et al., 2001a). Non è noto se i diversi genotipi vengano trasmessi con differente efficienza: Pirovano e collaboratori (2002b) hanno riportato una maggior prevalenza di SENV-A e SENV-B in soggetti HIV positivi ed in particolare fra i soggetti tossicodipendenti piuttosto che fra quelli infettati per via sessuale; recentemente, genotipi di TTV appartenenti al genogruppo 2 sono stati ritrovati in soggetti HIV e HBV positivi, ma non in donatori di sangue (Devalle e Niel, 2004).

ASSOCIAZIONE CON LA PATOLOGIA

La patologia associata all'infezione da anellovirus rappresenta ancora un punto oscuro, nonostante i numerosi studi compiuti in tal senso. Anche se l'espressione dell'ORF 1 del genotipo 1 in topi transgenici con conseguente produzione di una proteina ricombinante provoca cambiamenti patologici nei reni (Yokoyama et al. 2002), e frammenti subgenomici di TTV potrebbero influenzare l'evoluzione di alcune malattie, così come avviene per i geminivirus delle piante (Leppik et al. 2007), l'elevata prevalenza degli anellovirus nella popolazione generale, la loro capacità di instaurare infezioni durature e la loro enorme variabilità genetica rendono difficile l'interpretazione dei dati via via ottenuti. Per tali ragioni è notevolmente complicato stabilire una relazione tra TTV e la patologia osservata nell'individuo infettato (Griffiths, 1999; Mushahwar, 2000). Tali condizioni spiegano perchè alcuni ricercatori hanno suggerito che questi virus possano comportarsi come comuni commensali della flora microbica umana o che siano, più semplicemente, apatogeni (Griffiths, 1999; Mushahwar, 2000). Altri studiosi invece sono di parere opposto. Sebbene a volte contrastanti, le osservazioni finora condotte suggeriscono un possibile coinvolgimento di TTV nella eziopatogenesi di alcune malattie. Infatti, le circostanze della scoperta influenzarono notevolmente la direzione intrapresa nei primi studi, nei quali veniva ricercata un'associazione tra TTV e la patologia epatica. Dopo la scoperta del virus, sequenze di TTV furono ritrovate in 3 di 5 pazienti con epatite post-trasfusionale a etiologia sconosciuta (Nishizawa et al. 1997). Inoltre, TTV ottenuto da un siero di un bambino di 11 mesi con epatite acuta e inoculato in uno scimpanzé, induceva un brusco aumento delle

transaminasi epatiche (Tawara et al. 2000) e sono state riportate numerose correlazioni fra viremia di TTV ed andamento delle transaminasi (Cleavinger et al. 2000; Forns et al. 1999; Itoh et al. 1999; Kanda et al. 1999b; Lefrère et al. 1999; Luo et al. 1999; Naoumov et al. 1998; Okamura et al. 2000; Shibata et al. 2000). Alcuni studi dimostravano un maggior tropismo per il fegato e quindi una maggior capacità patogena a questo livello solo di alcuni genotipi di TTV, in particolare del genotipo 1 (Okamura et al. 2000; Moriyama et al. 2001; Tokita et al. 2001a; 2001b; 2001c; Tokita et al. 2002b) e dei genotipi 12 e 16 (Unemura et al. 2001a). Tuttavia, se da una parte alcuni studi aumentavano le evidenze a favore di una relazione tra la presenza di TTV e varie patologie epatiche (Kanda et al. 1999; Okamura et al. 2000; Tanaka et al. 2000; Tuveri et al. 2000; Takayama et al. 1999), molti altri sembravano contraddire questa relazione (Hijikata et al. 1999; Naoumov et al. 2000; Niel et al. 1999; Viazov et al. 1998). Inoltre, non sempre negli scimpanzé naturalmente o sperimentalmente infettati con TTV si osservavano sintomi o segni riconducibili ad un danno epatico (Mushahwar et al. 1999). L'associazione con altri virus dell'epatite come il virus dell'epatite C (HCV) ed il virus dell'epatite B (HBV) non sempre ha fatto registrare un peggioramento delle condizioni del paziente (Lefrère et al. 1999; Matsumoto et al. 1999; Berg et al. 1999; Kao et al. 2000). Al contrario, Tokita et al. (2002) hanno riportato che alti titoli di TTV erano indipendentemente associati con lo sviluppo di epatocarcinoma ed avevano valore prognostico nei pazienti con epatite cronica da HCV. Tale osservazione si può spiegare ipotizzando da una parte un'influenza negativa di TTV nella progressione della malattia

cronica e dall'altra che l'incremento dei titoli di TTV sia causato dall'inefficienza del sistema immunitario già compromesso dall'infezione da HCV, come avviene ad esempio nel caso dei soggetti HIV positivi dove a bassi valori dei CD4+ corrispondono alti titoli di TTV (Christensen et al. 2000; Shibayama et al. 2001). E' anche probabile che TTV giochi un ruolo nello sviluppo della cirrosi e delle sue complicanze dato che il virus è maggiormente prevalente nei pazienti con cirrosi scompensata e HCC piuttosto che in quelli con epatite cronica (Zein et al, 1999). Ad oggi, pur considerando le evidenze sopra riportate, la maggior parte degli studiosi non considera TTV un virus responsabile di forme di epatite (Matsumoto et al. 1999; Kao et al. 2000; Shang et al. 2000; Ali et al. 2002).

L'osservazione che gli anellovirus non solo sono in grado di infettare tessuti diversi da quello epatico ma sono anche in grado di replicarvisi, ha indirizzato gli studiosi a ricercare l'associazione anche con altri tipi di patologie. Da segnalare una possibile associazione dell'infezione da TTMV con gravi patologie dell'apparato renale (Gallian et al., 2002) o la capacità di TTV d'indurre *in vitro* alterazioni in cellule renali simili a quelle osservate nella sindrome nefrosica (Yokoyama et al., 2002). Ulteriore conferma giunge dallo studio condotto da Szladek e collaboratori (2003), i quali hanno osservato la persistenza del genogruppo 1 di TTV in un gruppo di pazienti sottoposti a trapianto renale.

Numerose evidenze suggeriscono un ruolo di TTV e degli anellovirus nell'eziopatogenesi delle malattie respiratorie, soprattutto durante la prima infanzia. Il virus sembra in grado di replicare nel tratto respiratorio, come dimostrato dal ritrovamento in questo distretto sia di intermedi replicativi sia

di più elevati titoli virali (Okamoto et al. 2001; Bando et al. 2001; Maggi et al. 2003). In un neonato, la comparsa di rinite coincideva con l'infezione da TTV (Biagini et al. 2003) e in uno studio condotto su bambini ospedalizzati per bronchiectasie o malattie respiratorie acute sono stati osservati titoli di TTV più alti rispetto ai controlli sani (Maggi et al. 2003; Pifferi et al. 2006) e comunque più elevati in pazienti con broncopneumite rispetto a quelli dei soggetti affetti da malattie respiratorie meno gravi (Maggi et al. 2003). Inoltre titoli elevati di TTV sono stati osservati nel sangue di bambini con valori spirometrici alterati, suggerendo un eventuale coinvolgimento di TTV nella patogenesi dell'asma (Pifferi et al. 2005). Recentemente è stato ipotizzato che TTV possa influenzare negativamente la prognosi della fibrosi polmonare idiomatica e possa essere una complicanza nell'insorgenza del tumore polmonare (Bando et al. 2008). Gli strumenti al momento disponibili per lo studio di TTV non permettono di stabilire se TTV sia la causa o il risultato delle malattie del tratto respiratorio (di cui molte sono a etiologia sconosciuta) anche se è stato ipotizzato un ruolo immunomodulante del virus che sarebbe in grado di indirizzare la risposta immunitaria in senso Th2, che come è noto rappresenta un meccanismo di sviluppo dell'asma (Pifferi et al. 2005). Numerose ed interessanti sono le correlazioni osservate tra TTV e patologie del sistema linfoide. Recenti studi hanno dimostrato che i livelli più elevati del virus circolano in pazienti immunocompromessi come quelli con AIDS o con altre malattie intercorrenti (Shibayama et al., 2001; Simmonds, 2002) suggerendo che la replicazione di TTV possa essere controllata dal sistema immunitario, il cui indebolimento causerebbe un incremento dei titoli virali. In pazienti HIV positivi è stata

ritrovata una correlazione inversa fra i titoli di TTV e la conta delle cellule CD4+ (Christensen et al., 2000; Shibayama et al., 2001; Touinssi et al., 2001). L'incremento dei livelli di TTV non avviene in tutti i pazienti HIV positivi; ciò suggerisce che in seguito alla deplezione dei linfociti CD4+, indotta da HIV, verrebbero prodotti fattori necessari per l'incremento del titolo di TTV (Moen et al., 2002). L'ipotizzato ruolo dell'infezione da TTV nella progressione dell'AIDS è comunque ancora tutto da dimostrare. Un considerevole aumento dei titoli di TTV è stato osservato anche in pazienti sottoposti a trapianto epatico o in terapia con farmaci immunosoppressivi (Shang et al., 2000).

Le analogie con i circovirus animali hanno suggerito inoltre la possibilità che alcune delle complicanze ematologiche osservate in pazienti immunocompromessi come la neutropenia, la trombocitopenia e l'anemia possano essere, direttamente o indirettamente, correlate con la presenza e l'incremento dei livelli di TTV nel midollo osseo (Kikuchi et al., 2000; Tokita et al., 2001c; Simmonds, 2002). Non mancano, tuttavia anche in questo caso, osservazioni di segno completamente opposto (Poovorawan et al. 2001). Il ritrovamento di TTV nei linfociti circolanti, nei linfonodi di pazienti con linfomi a cellule B e con linfomi di Hodgkin suggerisce che il virus, modulando le cellule T infette, possa giocare un ruolo nella patogenesi del linfoma (Garbuglia et al. 2003). Il DNA di TTV è stato ritrovato in numerosi tessuti neoplastici (de Villiers et al. 2002) ma non esiste ad oggi nessuna plausibile associazione causale tra infezione da TTV e trasformazione cellulare o tumorigenesi.

Infine, nessuna correlazione è emersa con crioglobulinemia, psoriasi, lupus eritematoso sistemico (Cacoub et al. 2003; Maggi et al. 1999), mentre parziali associazioni sono state

osservate in pazienti affetti da diabete, fibrosi polmonare idiopatica, artirte reumatoide ed emodializzati (Gallian et al. 1999; Bando et al. 2001; Boysen et al. 2003).

L'ampia variabilità genetica degli anellovirus e la loro somiglianza con i circovirus animali hanno suggerito l'ipotesi che i diversi genotipi dimostrino un differente ruolo in relazione a determinate patologie, così come osservato per i circovirus porcini, dei quali solo il tipo 2 si comporta come un patogeno franco (Chae, 2004). Se questa ipotesi fosse vera, le conclusioni tratte dalla maggioranza dei lavori pubblicati sarebbero vanificate, essendo esse basate su metodiche universali, incapaci di discriminare i diversi genotipi infettanti. A favore di questa opinione, stanno emergendo un numero sempre crescente di prove, come la correlazione osservata tra la presenza del genotipo 1a di TTV con le transaminasi in soggetti con patologie epatiche e il ritrovamento, sempre del genotipo 1, in pazienti con epatite fulminante o con aggravamento delle condizioni cliniche (Okamura et al., 2000; Shibata et al., 2000; Moriyama et al., 2001; Tokita et al., 2001a; 2001b; 2001c; 2002). Isolati appartenenti al genogruppo 3 (SENV-D e SENV-H) sono stati ritrovati più frequentemente nel siero di pazienti con epatite posttrasfusionale non-A non-G che in soggetti sani (Umemura et al., 2001a); tuttavia, in altri lavori gli isolati SENV sono stati ritrovati con prevalenza paragonabile sia nei pazienti che nei controlli (Kao et al. 2002; Mikuni et al. 2002 Yoshida et al. 2002).

SENSIBILITA' AI FARMACI ANTIVIRALI

Data la natura del virus, enormemente diffuso nella popolazione e apparentemente apatogeno, non ci sono

esperienze dirette riguardo la sensibilità di TTV ai farmaci. La maggior parte delle conoscenze attuali derivano da studi effettuati in pazienti coinfectati da altri virus, in particolare HCV e per tale motivo quasi tutte le osservazioni riguardano il comportamento della viremia di TTV in corso di terapia con IFN. Le risposte osservate per TTV sono risultate paragonabili a quelle di HCV. Dopo una o due settimane di trattamento, la terapia con IFN induce in circa il 50% dei pazienti una scomparsa della viremia plasmatica di TTV e livelli virali bassi o nulli per tutta la durata del trattamento (Kao et al., 2000; Dai et al., 2002). Nel rimanente 50%, in alcuni casi, la terapia con IFN non esercita effetti misurabili sui livelli della viremia, mentre in altri casi il titolo virale varia notevolmente durante il periodo di osservazione, per ritornare al termine del trattamento paragonabile ai livelli basali (Akahane et al., 1999; Berg et al., 1999; Chayama et al., 1999; Maggi et al., 1999). Non è escluso comunque che in molti casi la ricomparsa di TTV dopo la terapia possa essere dovuta ad una nuova reinfezione (Ali et al., 2002). Vi sono scarsi elementi per definire quali siano i parametri responsabili dei diversi pattern di risposta. Tuttavia, bassi livelli di viremia plasmatica pre-trattamento ed isolati di TTV filogeneticamente distanti dal prototipo 1a si sono dimostrati parametri predittivi di una migliore risposta all'IFN (Akahane et al., 1999; Chayama et al., 1999). Così come osservato per HCV, la combinazione IFN più ribavirina mostra una maggiore efficacia nell'indurre una risposta a lungo termine di TTV (Berg et al., 1999). Non è conosciuto se esistano differenze nella suscettibilità all'IFN fra i differenti genotipi di TTV, evento comunque ritenuto probabile. Infatti, osservazioni recenti indicano gli isolati SENV particolarmente sensibili

all'azione dell'IFN con il 60-80% dei pazienti infettati che mostrava la scomparsa del virus circolante dopo il trattamento farmacologico (Umemura et al., 2002; Wong et al., 2002). La variazione dei livelli di TTV è stata osservata anche nei pazienti HIV positivi trattati con farmaci antiretrovirali. Né questa terapia sembra avere effetto sulla viremia da TTV, né la presenza del virus sembra alterare la capacità di risposta ai farmaci antiretrovirali (Watanabe et al., 2000; Kawanaka et al., 2002).

TTMV

La sua scoperta avvenne accidentalmente durante alcuni studi su TTV e a causa delle sue più ridotte dimensioni del genoma fu inizialmente denominato TTV-like mini virus (TLMV; Takahashi et al. 2000b) e l'attuale nome Torquetenomini virus (TTMV) è stato introdotto solo nel 2005 (Biagini et al. 2005). Il virione appare di più piccole dimensioni rispetto a TTV e il genoma, una molecola circolare di DNA a singolo filamento con polarità negativa, è lungo 2800-2900 nt. L'organizzazione è simile a quella di TTV con una regione N-terminale ricca di arginina, motivi Rep nella ORF 1 e un motivo simile a CAV nella ORF 2 (Biagini et al. 2001b, 2007, Okamoto et al. 2000a; Takahashi et al. 2000b; figura I.8). TTMV mostra un'omologia di sequenza con TTV inferiore al 35% a livello nucleotidico e la variabilità delle sequenze di TTMV si aggira intorno al 40% a livello nucleotidico e al 70% a livello amminoacidico e sono raggruppate in diversi genogruppi. Come per TTV, TTMV risulta altamente frequente nella popolazione generale (Biagini et al. 2001b; Niel et al. 2001) con percentuali di prevalenza del 48-72% (Biagini et al. 2006b; Moen et al. 2002; Niel et al. 2001). Il DNA di TTMV è stato rinvenuto in molti fluidi e tessuti dell'ospite infettato come plasma, PBMC, feci, saliva, midollo osseo, milza, fluido vaginale (Biagini et al. 2001b; Fornai et al. 2001; Thom et al. 2003; Vasconcelos et al. 2002). Al momento non è stata identificata nessuna correlazione con patologie umane sebbene sia stato ipotizzato un ruolo di TTMV in alcune gravi disfunzioni renali. La diagnosi è eseguibile solo tramite amplificazione dell'acido nucleico virale mediante saggi di PCR o real-time PCR che prevedono l'amplificazione di una porzione dell'UTR (Biagini et al. 2001a).

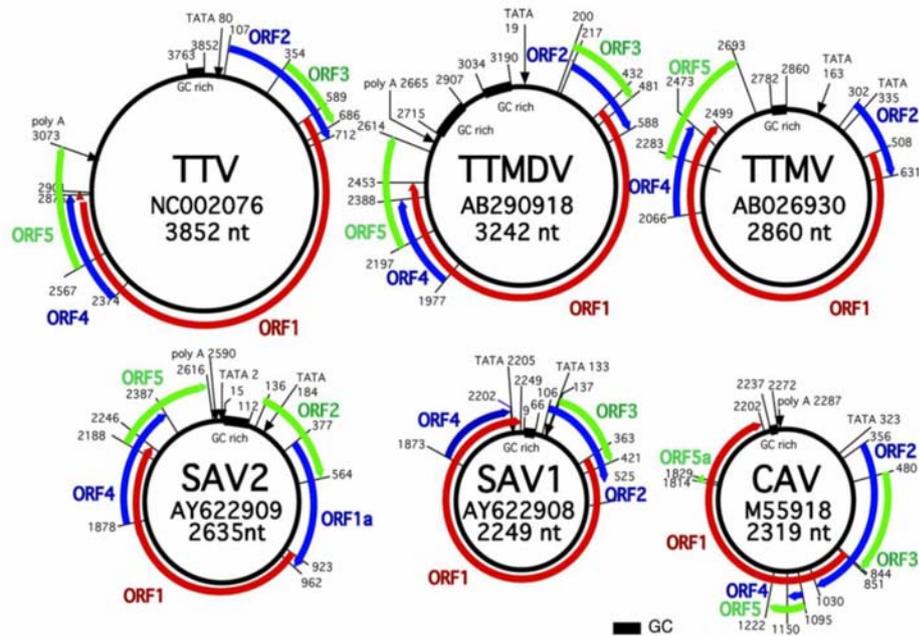


Figura I.8 Organizzazione e dimensioni dei genomi virali di isolati rappresentativi dei vari generi degli anellovirus umani confrontati con CAV (Davidson e Shulman, 2008)

TTMDV

Utilizzando la *sequence independent single primer amplification* (SISPA) nel 2005 Jones e collaboratori identificarono nel sangue di pazienti con sintomi da recente infezione virale, due ceppi di virus simili a TTV. A causa delle ridotte dimensioni del loro DNA furono denominati Small anellovirus SAV-1 e SAV-2. Il genoma è circolare con polarità negativa ed è lungo rispettivamente 2249 nt con 3 ORF e 2635 nt con 5 ORF. In particolare la ORF 2 presenta un motivo simile a CAV come riscontrato nei TTV e nei TTMV (Andreoli et al. 2006; Figura I-8). Anche i SAV sono caratterizzati da un'ampia variabilità genomica che raggiunge il 41% tra i vari isolati e il loro DNA è stato amplificato in molti fluidi biologici come saliva, PBMC (Biagini et al. 2006) e aspirati nasofaringei (Chung et al. 2007). La loro prevalenza nei soggetti sani varia dal 20 al 35 %

(Biagini et al. 2006; Chung et al. 2007). Recentemente, combinando la SISPA con il rolling-circle amplification (RCA), Biagini e collaboratori (2007) hanno identificato altri isolati correlati a SAV ma caratterizzati da genomi ancora più corti. Inoltre altri studiosi nel tentativo di amplificare sequenze del SAV da sieri umani si sono imbattuti in isolati che presentavano genomi molto più lunghi di quanto atteso con dimensioni di 3242-3253 nt e con tutte le caratteristiche dei TTV. I SAV precedentemente descritti sono infatti risultati essere dei mutanti deleti o artefatti generati durante l'amplificazione di questi isolati più lunghi che hanno dimensioni intermedie tra i TTV e i TTMV e che per questo motivo sono stati denominati Torquetenomidi virus (TTMDV) (Ninomiya et al. 2007a).

NEOPLASIE EMATOLOGICHE

Le neoplasie ematologiche originano dal sistema reticolo-endoteliale e linfatico e comprendono un insieme eterogeneo di malattie che differiscono per etiologia, prognosi e frequenza. La classificazione dei tumori ematologici è sempre stata particolarmente difficile e nel corso degli anni sono stati proposti diversi criteri per raggruppare le neoplasie ematologiche in modo da identificare categorie di malattie omogenee. E' comunque da tutti accettata la distinzione in leucemie, linfomi e mielomi.

LEUCEMIE

Le leucemie sono tumori originati dall'invasione del midollo ad opera di un clone neoplastico con conseguente distruzione delle cellule emopoietiche normali, caratterizzati dalla presenza nel sangue circolante di leucociti alterati. La classificazione FAB (French American British) per le leucemie, raggruppa le cellule neoplastiche in relazione al grado di maturazione e alle caratteristiche cliniche. Le leucemie sono definite linfoblastiche se il clone leucemico origina dalla linea linfoide, mieloblastiche se origina dalla linea mieloide. Importante è anche la distinzione in leucemie acute o croniche in base alla maturità delle cellule tumorali. I quattro tipi più comuni di leucemia sono:

- Leucemia linfoblastica acuta (Acute Lymphoblastic Leukaemia - ALL)
- Leucemia mieloide acuta (Acute Myeloid Leukaemia - AML)
- Leucemia linfocitica cronica (Chronic Lymphocytic Leukaemia - CLL)

- Leucemia mieloide cronica (Chronic Myeloid Leukaemia – CML; (Romagnani et al. 2000).

La leucemia acuta insorge quando il tumore colpisce le cellule nelle primissime fasi del loro sviluppo. Ne deriva che le cellule rimangono immature perdendo ogni tipo di funzionalità. Il paziente affetto da una forma acuta di leucemia ha pertanto maggiori probabilità di contrarre infezioni, emorragie e anemia e quasi sempre richiede cure immediate. Nelle forme di leucemie croniche le cellule tumorali presentano un maggior grado di differenziazione. A volte queste cellule conservano gran parte della normale funzionalità e quindi anemia, emorragie e infezioni sono meno probabili. Non sempre infatti i pazienti richiedono cure immediate e alcuni addirittura non hanno bisogno di nessun tipo di intervento terapeutico (Bernasconi, 2004).

Leucemia linfoblastica acuta (*Acute lymphoblastic leukaemia* – ALL). La ALL è la forma più comune di leucemia dell'infanzia ma può colpire anche gli adulti. E' una malattia linfoproliferativa sistemica originata da una trasformazione neoplastica dei linfoblasti che genera una progenie di cellule indifferenziate a fenotipo B o T. Le cellule neoplastiche rimpiazzano il normale tessuto emopoietico midollare, circolano nel sangue periferico e determinano infiltrazione degli organi linfoidi. Fortunatamente la ALL risponde molto bene alla terapia tanto che si osservano percentuali di remissione completa intorno all'80% sia nei bambini che negli adulti. Si parla di remissione completa, quando la quota di blasti scende sotto il 5% della popolazione midollare totale valutabile (Bernasconi, 2004).

Leucemia mieloide acuta (*Acute myeloid leukaemia* – AML). La AML è una neoplasia clonale che colpisce i progenitori della famiglia mieloide interessando quindi i granulociti, i monociti, i globuli rossi e le piastrine. E' molto più frequente in età avanzata e interessa entrambi i sessi con una lieve predominanza per quello maschile. In base all'etiologia si possono identificare tre tipi diversi di leucemie mieloidi:

- **primarie** o “de novo” ad insorgenza primitiva;
- **secondarie** ad una precedente sindrome mielodisplastica;
- **secondarie** all'esposizione di sostanze tossiche e/o a precedenti chemioterapie.

La prognosi della malattia è molto influenzata dall'età del paziente, infatti nei soggetti giovani si ottengono l'80% di remissioni complete ed una sopravvivenza libera da malattia in circa il 30% dei casi. Nell'anziano la AML ha in genere una prognosi sfavorevole dovuta in massima parte all'alta incidenza di lesioni citogenetiche a cariotipo complesso, all'esistenza di una precedente fase mielodisplastica, alla presenza della proteina *multidrug resistance* MDR-1 spesso causa della mancata efficacia della chemioterapia (Romagnani et al. 2000). Quando sottoposti agli schemi terapeutici convenzionali, i pazienti con età superiore ai 60 anni hanno dal 40 al 60% di probabilità di ottenere una remissione completa (Deschler et Lubbert, 2006).

Leucemia linfocitica cronica (*Chronic lymphocytic leukaemia* – CLL). La CLL è una neoplasia ematologica cronica o a decorso lento caratterizzata nel 98% dei casi, dalla proliferazione e

accumulo nel sangue, midollo e tessuti linfatici, di piccoli linfociti che, pur mostrando un avanzato grado di maturazione, hanno una scarsa capacità replicativa, scarsa funzionalità e prolungata capacità di sopravvivenza. La CLL è la leucemia più diffusa negli adulti e l'età media di insorgenza è intorno ai 65 anni. La sua progressione può essere molto lenta tanto che la malattia rimane latente per anni, senza sintomi evidenti. La diagnosi viene spesso posta casualmente in corso di accertamenti diagnostici eseguiti per altre ragioni. Molti pazienti conducono una vita normale per lunghi anni e non è sempre necessario il ricorso a regimi terapeutici volti all'eradicazione e/o controllo della malattia (Romagnani et al, 2000).

Leucemia mieloide cronica (*Chronic myeloid leukaemia* – CML). La CML è una malattia neoplastica relativamente rara (1-2 casi annui/100.000 abitanti) prevalente nell'adulto-anziano, caratterizzata da una proliferazione dei granulociti e megacariociti. La malattia, in origine monoclonale, può coinvolgere le linee mieloide, monocitica, eritroide, megacariocitica e talora anche il compartimento linfoide mentre non è stato mai osservato il coinvolgimento delle cellule stromali del midollo. Segno distintivo della CML è la presenza, nel 95% dei casi, di un cromosoma anomalo noto come cromosoma Philadelphia (Ph) dal nome della città americana dove fu osservato per la prima volta. Il cromosoma Ph si forma in seguito ad una traslocazione tra il cromosoma 9 ed il cromosoma 22 causando la fusione di due geni (il gene BCR del cromosoma 22 ed il gene ABL del cromosoma 9), normalmente separati: il gene ibrido BCR-ABL che si viene a formare gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo di questa malattia,

inducendo un aumento della capacità proliferativa delle cellule leucemiche e rendendole resistenti ai normali sistemi di controllo della moltiplicazione cellulare. Nel rimanente 5 % dei casi di in cui non si osserva il cromosoma Ph è comunque possibile dimostrare, con tecniche di biologia molecolare, la presenza del gene di fusione BCR-ABL (Bernasconi, 2004).

La CML presenta un decorso clinico caratteristicamente bifasico. Nella fase iniziale della malattia, detta fase cronica, la malattia ha un decorso indolente. Le cellule leucemiche proliferano in modo incontrollato, ma conservano la capacità di maturare e di produrre cellule del sangue funzionali. Durante questa fase il controllo della malattia è abbastanza agevole. Inevitabilmente dopo un periodo di tempo variabile da alcuni mesi a qualche anno, alla fase cronica segue una fase acuta o blastica in cui non c'è maturazione delle cellule tumorali e la malattia assume le caratteristiche di leucemia acuta. L'evoluzione dalla fase cronica alla fase acuta può essere progressiva (fase accelerata, in cui aumentano progressivamente i blasti nel midollo), o brusca (crisi blastica; Lopez, 2005).

LINFOMI

Il linfoma è definito come una neoplasia a carico del tessuto linfoide (linfociti T e B e loro precursori). Pur avendo numerose caratteristiche sia fenotipiche che citogenetiche a comune con la leucemia, il linfoma se ne differenzia per la presenza nel corpo di masse tumorali distinte, generalmente localizzate in un tessuto linfoide periferico. I linfomi sono la terza più frequente neoplasia a livello mondiale e la quinta causa di morte per cancro. Attualmente i linfomi sono classificati

secondo i criteri pubblicati nel 2001 e aggiornati nel 2008 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità. Tale classificazione propone 5 grandi categorie per inquadrare le numerose forme di disordini neoplastici linfoidi ma rimane sempre molto utile la distinzione in linfomi di Hodgkin (HL) e linfomi non Hodgkin (NHL). Negli HL istologicamente è presente una grande cellula binucleata chiamata cellula di Reed-Sternberg che non è evidenziabile negli NHL (Lopez, 2005).

Linfomi di Hodgkin (*Hodgkin's Lymphoma*, HL). Il HL colpisce le ghiandole linfatiche, soprattutto quelle del collo, e in genere la sua manifestazione è lenta. Due sono le classi di età considerate più a rischio di malattia: i giovani con età fra 20 e 30 anni e gli anziani con età superiore a 70 anni, ma esistono casi anche nell'infanzia. L'etiologia dell'HL non è ben chiara, anche se è noto da tempo il ruolo di alcuni agenti infettivi e in particolare del virus di Epstein Barr (EBV), il cui genoma è stato ritrovato in un'elevata percentuale di cellule tumorali; titoli anticorpali più alti rispetto ai controlli sono stati osservati nei pazienti con HL. Come altri fattori di rischio sono stati chiamati in causa alcuni stati immunodepressivi congeniti o acquisiti e la predisposizione genetica. I protocolli terapeutici con cicli di chemioterapia e/o radioterapia possono essere associati ad interventi chirurgici volti alla rimozione della massa tumorale. La remissione completa si raggiunge in molti soggetti (Romagnani et al. 2000).

Linfoma non Hodgkin. (*Non Hodgkin's Lymphoma*, NHL). Si tratta di un insieme eterogeneo di neoplasie maligne che interessano le cellule linfatiche della linea B o T. L'alterazione

neoplastica può svilupparsi a partire da qualsiasi punto del normale processo di sviluppo e differenziamento cellulare e di conseguenza tali patologie si presentano con caratteristiche citologiche e immunofenotipiche molteplici. I NHL sono più frequenti nei maschi e l'incidenza aumenta esponenzialmente tra i 20 e gli 80 anni ma le forme più gravi della malattia colpiscono soprattutto i giovani adulti. L'etiologia dei linfomi non è ancora ben nota, tranne in forme particolari; è tuttavia evidente che più fattori, come predisposizione genetica, infezioni, particolari condizioni di immunodeficienza e esposizione ad agenti fisici e chimici, contribuiscono alla comparsa dei NHL (Lopez, 2005).

I NHL possono essere localizzati nelle ghiandole linfatiche, nel midollo osseo o in qualsiasi tessuto molle dell'organismo e spesso presentano una disseminazione più o meno generale. La classificazione dei linfomi è particolarmente difficile a causa della complessità ed eterogeneità con cui i NHL si manifestano. La WHO, nell'ambito della suddivisione in linfomi a cellule B o a cellule T, suddivide i NHL in forme che derivano dai progenitori e forme che originano dalle cellule periferiche, con caratteristiche corrispondenti rispettivamente alle fasi più precoci e a quelle più avanzate dei processi maturativo-differenziativi delle linee cellulari B e T. Inoltre, tra i NHL di derivazione periferica è stata proposta la distinzione in forme disseminate/leucemiche, primitivamente nodali vs prevalentemente extranodali. La WHO non prevede la tradizionale suddivisione dei NHL in forme a basso, intermedio e alto grado di malignità, basata su parametri esclusivamente morfologici (Kiel Classification) oppure prevalentemente clinici (Working Formulation, Campo et al. 2011)

MIELOMI

Mieloma multiplo (*Multiple Myeloma*, MM). Il MM è una malattia neoplastica caratterizzata dalla proliferazione e accumulo nel midollo osseo di linfociti e di plasmacellule sintetizzanti immunoglobuline monoclonali (componente M) che, direttamente o indirettamente, possono causare danni a vari organi ed apparati (ossa, reni, nervi periferici, sistema immunitario). Il MM rappresenta approssimativamente l'1% delle patologie maligne e circa il 10% delle neoplasie ematologiche. E' una neoplasia caratteristica dell'età adulta-anziana, infatti la sua frequenza aumenta con l'età e raggiunge un picco tra i 60 e i 70 anni di vita. I soggetti di sesso maschile sono più colpiti rispetto alle donne. L'etiologia del mieloma multiplo è sconosciuta. E' tuttavia ormai accertato che la componente genetica è scarsamente rilevante, mentre numerosi studi epidemiologici hanno invece chiamato in causa fattori ambientali come fumo, esposizione ad elevati livelli di pesticidi, a solventi e a radiazioni. Nello sviluppo del MM sembra inoltre molto importante la stimolazione cronica del sistema monocito-macrofagico, che si verifica durante processi infettivi o flogistici cronici o di natura autoimmune, possa rivestire un ruolo di primaria importanza nell'etiologia della malattia. A seconda dell'evoluzione della malattia e delle condizioni del paziente la cura è basata sulle diverse possibilità di combinazioni di chemioterapia, radioterapia e trapianto di midollo osseo (Sirohi et Powles, 2004).

TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO (TMO)

Il trapianto di midollo osseo negli ultimi decenni è stato impiegato con sempre maggiore frequenza in tutto il mondo fino

a diventare parte integrante nel trattamento di numerose patologie ematologiche e non, che un tempo risultavano fatali. L'assegnazione del Premio Nobel, nel 1990, a E. Donnall Thomas, uno dei pionieri nel TMO nell'uomo, sottolinea l'importanza terapeutica di questa procedura. L'obiettivo del TMO è l'eliminazione della malattia del paziente tramite l'esposizione a chemio/radioterapia a dosi sovramassimali seguita dal ripristino delle normali funzioni del midollo osseo grazie all'infusione delle cellule staminali prelevate da un donatore compatibile o dal paziente stesso (Laddaga et al. 1995).

I fenomeni immunologici coinvolti nel trapianto di midollo osseo sono essenzialmente il rigetto del trapianto da parte del ricevente verso le cellule trapiantate che si traduce nella *Graft Versus Host Disease* (GVHD) e l'aggressione delle cellule dell'ospite verso le cellule tumorali che si traduce nel *graft-versus-leukaemia* (GVL). L'esito del TMO, come di qualsiasi altro trapianto d'organo, dipende dal grado di compatibilità delle caratteristiche immunologiche fra donatore e ricevente; la tipizzazione del sistema maggiore di istocompatibilità (*Human leukocyte antigen*, HLA) di entrambi i soggetti coinvolti nel trapianto appare dunque di fondamentale importanza. In base al grado di compatibilità del sistema HLA, il trapianto viene definito come autologo, singenico od allogenico. Si parla di trapianto autologo quando il paziente coincide con il donatore: le cellule staminali "sane" sono prelevate dal midollo o dal sangue periferico del paziente durante la fase di remissione della malattia o prima del trattamento mieloablativo e sottoposte a complesse tecniche di ripulitura (*purging*) farmacologiche o immunologiche al fine di eliminare le cellule

tumorali e lasciare solo le cellule staminali che verranno poi reinfuse. Poiché le cellule staminali trasfuse sono dello stesso paziente, nel trapianto autologo non c'è rischio per la GVHD ma non si verifica neanche l'effetto la GVL, rendendo elevate quindi le probabilità di recidiva che peraltro può essere dovuta anche ad un purging incompleto. Nel trapianto singenico il donatore è un gemello omozigote del paziente e quindi con sistema HLA-identico. Anche in questo caso non si ha nessun fenomeno di rigetto, né verso il midollo trapiantato né verso la malattia. Il trapianto allogenico è quello in cui ricevente e donatore hanno un sistema HLA diverso. Spesso si tratta di consanguinei ma una possibile alternativa è rappresentata dai donatori volontari (*Unrelated Donors*, UD) compatibili (alloidentici) o parzialmente compatibili (*Matched Unrelated Donors*, MUD, o *Mis-Matched Unrelated Donors*, MMUD), oppure da familiari parzialmente compatibili (aploidentici) e da cellule staminali ottenute da cordone ombelicale. Nel trapianto allogenico il ricevente riconosce il midollo trapiantato come estraneo e pertanto si verifica, con diversa gravità a seconda del grado di compatibilità dei sistemi HLA del donatore e del ricevente, la GVHD che rende necessario intraprendere una terapia immunosoppressiva. In questo caso però ci può essere anche la GVL, reazione che a volte risulta di fondamentale importanza nell'eradicazione della malattia (Lopez, 2005).

CONDIZIONAMENTO

Con il termine “regime di condizionamento” si intende il trattamento chemio/radioterapico cui sono sottoposti i pazienti prima di ricevere l'infusione di cellule staminali ematopoietiche. Sin da quando sono stati introdotti e fino a non molti anni fa, i

regimi di condizionamento al trapianto sono stati fondati sull'impiego di schemi ad impronta fortemente mieloablativa, nonché dotati di capacità immunosoppressiva, soprattutto per i pazienti avviati ad un TMO allogenico che mostrano un più alto rischio di GVHD. Il condizionamento mieloablativo è nato con il triplice scopo di eradicare la malattia di base, creare spazio nel midollo per le cellule staminali del donatore, sopprimere il sistema immunitario del ricevente per evitare il rigetto e favorire l'attecchimento, ma è gravato da un'elevata tossicità extraematologica che si estrinseca in una significativa mortalità legata alla procedura. In seguito a tale trattamento l'emopoiesi del paziente, diversamente delle chemioterapie convenzionali, è distrutta in modo irreversibile e non si ha quasi mai il recupero ematologico spontaneo. Si viene quindi a creare una situazione di aplasia, ovvero di assenza totale di parenchima midollare con conseguente pancitopenia periferica, cioè di mancanza di globuli bianchi, eritrociti e piastrine nel sangue.

I regimi di condizionamento mieloablativi tradizionalmente si sono basati sulla combinazione di irradiazione totale corporea (total body irradiation, TBI) e farmaci citostatici (ciclofosfamide, etoposide, melphalan, citosin-arabinoside) o, in alternativa, è stato utilizzato il busulfano in combinazione con gli stessi agenti chemioterapici impiegati insieme alla TBI (Silvestrini, 2005).

Col passare degli anni si è visto che la "creazione di spazio midollare" non deve necessariamente essere un obiettivo primario del condizionamento in quanto sono probabilmente le stesse cellule staminali infuse che vanno a crearsi il loro proprio spazio. E' divenuto inoltre ben evidente che l'eradicazione della malattia di base non è esclusivamente

dovuta alla mieloablazione perchè un ruolo maggiore è giocato dalle cellule allogeniche del donatore che mediano la GVL. Queste evidenze hanno stimolato la ricerca per ottenere la guarigione senza essere mieloablativi, con l'obiettivo di ridurre la mortalità associata al TMO e di aprire la possibilità al trapianto ad un numero sempre maggiore di pazienti (Raimondi, 2010). Sono stati così introdotti dei regimi di condizionamento con ridotta attività mieloablative o nulla attività mieloablative. Questo approccio trapiantologico è stato possibile grazie alla disponibilità di farmaci efficacemente immunosoppressori gravati da limitata tossicità extra-midollare come la fludarabina, alla possibilità di modulare le radiazioni somministrate e dall'impiego di alte dosi (megadosi) di cellule staminali emopoietiche, attraverso cui ottenere uno stabile attecchimento emopoietico, risparmiando significativa mortalità e morbilità peri-trapiantologica (Silvestrini, 2005).

SCOPO

A più di 10 anni dalla scoperta di TTV, permangono numerosi aspetti da chiarire circa le modalità replicative adottate dagli anellovirus. Gli studi sinora condotti suggeriscono che le cellule del sistema ematopoietico potrebbero svolgere un ruolo fondamentale nel tropismo degli anellovirus. Non è ancora chiaro tuttavia se esista una sottopopolazione linfocitaria nella quale il virus preferenzialmente replica e/o persiste. Scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di indagare il comportamento di TTV nel plasma di pazienti sottoposti a terapia mieloablative e non, al fine di comprendere il ruolo delle cellule del sistema ematopoietico nel sostenere la replicazione del virus.

SEZIONE II

MATERIALI E METODI

SOGGETTI DI STUDIO

Per questo studio sono stati arruolati in totale 31 soggetti sottoposti a regimi terapeutici in grado di alterare la capacità riproduttiva delle cellule del sistema ematopoietico. In particolare, sono stati presi in esame:

- A) 4 soggetti, 3 femmine e 1 maschio, affetti da varie forme di leucemia acuta e sottoposti ad un intenso regime di condizionamento,
- B) 4 soggetti, 3 femmine e 1 maschio, affetti da varie forme di neoplasie ematiche e sottoposti ad un regime di condizionamento a ridotta intensità,
- C) 5 soggetti, 2 femmine e 3 maschi, affetti da varie forme di neoplasie ematiche e sottoposti ad un regime di condizionamento non mieloablativo,
- D) 18 soggetti, 13 femmine e 5 maschi, affetti da artrite reumatoide e sottoposti a trattamento con Rituximab, un anticorpo monoclonale chimerico umanizzato che riconosce la molecola di transmembrana CD20 espressa dai linfociti B normali determinandone il loro abbattimento,

Tutti i pazienti erano in cura presso le cliniche dell'Università di Pisa.

Tutti i soggetti sono risultati negativi per il virus dell'epatite B HBV, come dimostrato dall'assenza dell'antigene di superficie (HBsAg) e negativi per anticorpi contro il virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 e 2 (HIV).

Lo studio è stato reso possibile dalla sottoscrizione del consenso informato per l'utilizzo dei campioni da parte di ogni soggetto.

PRELIEVO E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

I campioni di sangue di ciascun individuo, ottenuti sterilmente in provette contenenti EDTA, subito dopo il prelievo sono stati centrifugati a 620xg per 10 minuti al fine di separare il plasma dalla parte corpuscolata. In seguito a tale operazione, dalla frazione superiore della provetta è stato prelevato il plasma, successivamente suddiviso in aliquote e conservato a -80° C fino al momento dell'utilizzo.

ANALISI CHIMICO-CLINICHE E VIROLOGICHE DI ROUTINE

Tutti i campioni di sangue ottenuti stati sottoposti alle indagini normali virologiche e sierologiche di *routine*.

I campioni di sangue periferico dei pazienti trapiantati sono stati testati con numerosi anticorpi diretti verso i seguenti cluster di differenziazione: CD45, CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD56 e CD57 (BD Bioscience, USA). I dati sono stati valutati grazie a un flussocitometro FACS Calibur e analizzati con CellQuest 3.1 (BD Bioscience, USA) presso l'Ospedale S. Chiara di Pisa.

ESTRAZIONE DEL DNA VIRALE

L'estrazione del DNA virale è stata eseguita manualmente utilizzando il kit commerciale QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Chatsworth, CA). La prima fase dell'estrazione è una lisi alcalina, ottenuta aggiungendo al campione un tampone contenente guanidina isotiocianato e la proteinasi K. Il volume del tampone e la concentrazione finale della proteinasi dipendono dalla quantità di campione utilizzata per l'estrazione (da 200 a 400 µl di fluidi biologici e da 1 a 10 milioni di cellule). La miscela ottenuta è stata agitata vigorosamente e incubata per 10 minuti a 56 °C. La precipitazione degli acidi nucleici è stata ottenuta aggiungendo un volume di etanolo (96-100 %)

proporzionale alla quantità di campione utilizzato per l'estrazione. Nel passaggio successivo, la miscela è stata trasferita in colonnine contenenti al loro interno una membrana e filtri di gel di silice con elevata affinità per gli acidi nucleici (QIAamp spin columns; QIAGEN). Le colonnine sono state sottoposte a passaggi in serie con soluzioni a differenti condizioni di salinità e di pH favorevoli al legame alla membrana dell'acido nucleico. Il DNA trattenuto è stato infine eluito con un apposito tampone (10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 9) che, oltre a consentire il rilascio del DNA dalla membrana, ne previene anche la degradazione. Gli estratti così ottenuti sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'uso.

REAL-TIME PCR

La tecnologia TaqMan è stata utilizzata per la determinazione della carica virale di TTV. Questa tecnica si avvale dell'uso di una sonda complementare alla sequenza target posta tra i siti di legame dei primers e marcata alle due estremità con due differenti fluorocromi, al 5' il reporter (6-carbossi-fluoresceina, FAM) ed al 3' il quencher (6-carbossi-tetrametil-rodamina, TAMRA). La sonda durante l'amplificazione è degradata dall'attività nucleasica 5'-3' della polimerasi AmpliTaqGold™ e ciò determina l'allontanamento del quencher dal reporter e quindi il conseguente rilascio di fluorescenza da parte di quest'ultimo (figura II.1). La quantità di fluorescenza emessa dipende dai ripetuti cicli di PCR e dalla conseguente degradazione della sonda e risulta essere direttamente proporzionale alla quantità di DNA target presente nel campione in esame. L'incremento dell'intensità del segnale emesso è misurato ed interpretato dal sistema iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories). Tale apparecchiatura è dotata di un software

che rileva l'emissione di fluorescenza o ΔRn previa normalizzazione sulla base di un background ottenuto dall'analisi dei primi 3-15 cicli di amplificazione e di un controllo ottico passivo costituito da un terzo colorante non coniugato (rodamina, ROX) presente in concentrazione costante nel tampone di reazione. Il primo ciclo di amplificazione in cui si ha un incremento statisticamente significativo del ΔRn costituisce il ciclo soglia o Ct. Quest'ultimo parametro viene determinato, all'interno di ciascuna reazione, anche per una serie di standard per i quali è noto il numero di copie. Ne deriva una curva di taratura dalla quale viene dedotta la concentrazione dei diversi campioni in esame.

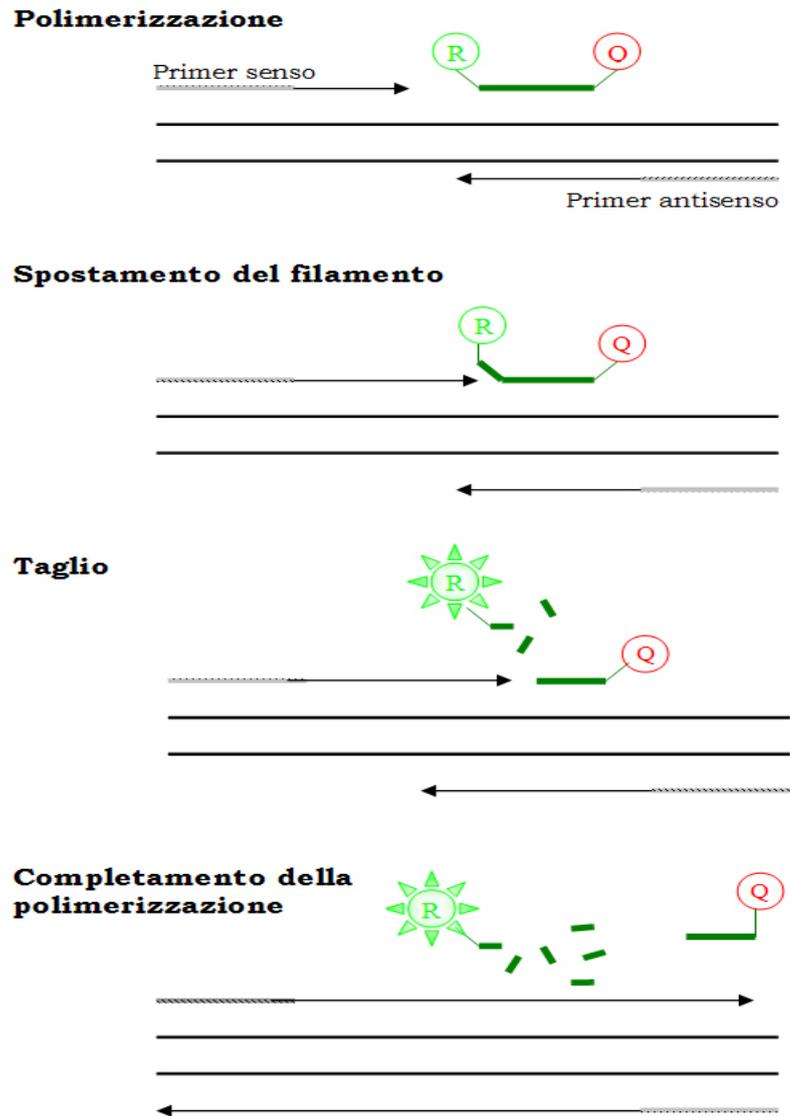


Figura II.1: Schema generale della real-time PCR (R, reporter; Q, quencher)

Per quanto riguarda TTV, la reazione di real-time PCR è stata disegnata su un frammento UTR del genoma virale che risulta essere estremamente conservato fra tutti di genotipi del virus fino ad oggi identificati (figura II.2 e figura II.3).

{TX011}	-----	-----	-----	-----	-----	-----
{JA20}	-----	-----	-----	-----	-----	-----
{BDH1}	-----a-----	-----	-----a-----	-----	-----	-----
{TA278}	-----a-----	-----	-----a-----	-----	-----	-----
{JA9}	-----a-----	-----	-----a-----	-----	-----	-----
{TK16}	-----a-----	-----g-----	-----a-----	-----	-----	-----
{TP1-3}	-----a-----	-----	-----a-----	-----	-----	-----
{TRM1}	-----a-----	-----	-----a-----	-----	-----	-----
{CHN1}	-----a-----	-----	-----a-----	-----	-----	-----
{GH1}	-----a-----	-----	-----g-----	-----	-----	-----
{CHN2}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{TTV021}	-----a-----	-----	-----	-----a-----	-----	-----
{JA10}	-----a-----	-----	-----g-----	-----	-----	-----
{JA4}	-----a-----	-----	-----g-----	-----	-----	-----
{T3PB}	-----t-----	-----	-----a-----	-----	-----	-----
{JA2B}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{US32}	-----a-----	-----	-----g-----	-----	-----	-----
{JA1}	-----a-----	-----	-----g-----	-----	-----	-----
{US35}	-----a-----	-----	-----g-----	-----	-----	-----
{TCHN-D2}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{TCHN-D1}	-----a-----	-----	-----g-----	-----	-----	-----
{L01}	-----a-----	-----	-----	-----a-----	-----	-----
{JT33F}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{CT44F}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	c
{CT39F}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	c
{S039}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{TCHN-G2}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{TJN02}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{IR1031}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{TCHN-F}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{Saf-09}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{TUS01}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	c
{TUPB}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	c
{SENV-B}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	c
{TCHN-G1}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{TJN01}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	c
{SENV-D}	-----a-----	-----	-----c-----	-----	-----c-----	-----
{SENV-F}	-----a-----	-----	-----t-----	-----	-----c-----	-----
{SAa38-}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{SENV-C}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{SENV-H}	-----t-----	-----	-----	-----	-----	-----
{KC009}	-----t-----	-----	-----a-----	-----	-----a-----	-----
{KC197}	-----t-----	-----	-----a-----	-----	-----a-----	-----
{KC186}	-----t-----	-----	-----a-----	-----	-----a-----	-----
{LC011}	-----a-----	-----	-----a-----	-----	-----a-----	-----
{JT41F}	-a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{JT14F}	-a---a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{CT43F}	-----a-----	-----	-----a-----	-----	-----	-----
{JT05F}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{L02}	-----a-----	-----	-----g-----	-----	-----	-----
{JT19F}	-----t-----	-----	-----	-----	-----	-----
{TT}	-a---a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{JT34F}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	c
{CT23F}	-----a-----	-----	-----	-----a-----	-----t-----	-----
{CT25F}	-a---a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{SENV-A}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{SENV-E}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{TYM9}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{CT30F}	-----t-----	-----	-----	-----	-----	-----
6a	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
1C1	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{SENV-G}	-----a-----	-----	-----a-----	-----	-----	-----
{TCHN-A}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{SAa-01}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{L03}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{SA-j30}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{SAa-10}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{TCHN-C2}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{PMV}	-----a-----	-----	-----a-----	-----	-----t-----	-----
{Kt-10F}	-----a-----	-----	-----a-----	-----	-----	-----
{Kt-08F}	-----a-----	-----	-----	-----	-----	-----
{KAV}	-a---a-----	-----	-----a-----	-----t-----	-----	-----
Consensus	<u>GTGCCGGAGGTGAG</u>	<u>TTTACACACC</u>	<u>GCAGTCAAGG</u>	<u>GGCAATT-CG</u>	<u>GGCTCGGGAC</u>	<u>TGGCC-GGGC T</u>
	AMTS		AMTPU		AMTAS	

Figura II.2. Allineamento di 72 isolati di TTV nella regione bersaglio per la real time PCR (AMTS, primer senso, AMTPU, sonda taqman; AMTAS, primer antisenso). I trattini indicano accordo con la sequenza consensus, i puntini indicano nessun nucleotide presente.

I primers e la sonda sono stati progettati utilizzando il programma “Primers Express Software” (versione 1.0; AB) ed hanno la sequenza riportata in tabella II.1.

TABELLA II.1. Oligonucleotidi utilizzati per la real time PCR di TTV.

Nome	Sequenza (5'-3')	Posizione (nt) ^a	Dimensioni frammento
AMTS ^b	GTGCCGAGGTGAGTTTA	177-194	63 bp
AMTAS	AGCCGGCCAGTCC	226-239	
AMTPU	FAM-TCAAGGGGCAATTCGGGCT-TAMRA ^c	205-223	

^a: Le posizioni nucleotidiche (nt) sono riferite all'isolato AB017610.

^b: AMTS, primers senso; AMTAS, primers antisenso; AMTPU, sonda.

^c: FAM, reporter; TAMRA, Quencer.

La miscela di amplificazione (50 µl totali) è composta, oltre che dai primers (0,9 µM ciascuno) e dalla sonda (0,2 µM), da una Universal Master Mix contenente la polimerasi AmpliTaq Gold, l'AmpErase uracil-N-glycosilase (UNG) e i nucleotidi con dUTP al posto del dTTP. A questa miscela sono aggiunti 5µl del DNA estratto pari ad una concentrazione di 10-100 ng. L'amplificazione è condotta utilizzando il sistema ABI 7700 secondo il seguente profilo ciclico: 1 ciclo a 50°C per 2 minuti (fase di attivazione della UNG), 1 ciclo a 95°C per 10 minuti (fase di attivazione della Ampli Taq Gold polimerasi) e 40 cicli a 95°C per 15 secondi (fase di denaturazione) e 60°C per 1 minuto (fase di ibridazione dei primers ed estensione).

Nello studio tutti i campioni sono stati esaminati in triplicato nella stessa seduta di amplificazione e la maggior parte di essi sono stati analizzati partendo da due differenti estrazioni di DNA. Inoltre, se i valori quantitativi ottenuti nelle tre repliche mostravano un coefficiente di variazione superiore al 50%, la

determinazione non era ritenuta attendibile ed il campione veniva di nuovo estratto e riesaminato.

Prima del suo utilizzo, la metodica di real-time è stata estensivamente sperimentata per verificarne le *performances* in termini di linearità, specificità e sensibilità. A tal fine sono stati prodotti degli standard di riferimento opportunamente quantificati che sono stati utilizzati nei diversi esperimenti.

Il sistema si è dimostrato in grado di quantificare con ottima precisione in un range di 5-6 log (da 10^3 a 10^8 copie) con differenze minime fra il numero di copie analizzate e il numero di copie calcolate (tra 880 e 1200 per gli standard di 10^3 copie e tra 810.000 e 1.360.000 per gli standard di 10^6 copie) e con variazioni intra e inter-saggio nei cicli soglia che non superava rispettivamente il 2,4% e il 3,1%. Risultati simili, con variazioni dei titoli inferiori a 0,6 log, sono stati ottenuti anche quando l'analisi è stata effettuata su campioni biologici estratti e processati separatamente in diverse ed indipendenti reazioni. La specificità del saggio è stata confermata attraverso l'analisi di sequenza dei prodotti dell'amplificazione mentre, con le procedure standard utilizzate, il limite di sensibilità inferiore del sistema è stato stimato essere pari a 1.0×10^3 copie di TTV DNA per ml di plasma o per μg di DNA estratto.

Preparazione degli standard per la real-time PCR. Il DNA di TTV è stato estratto dal siero di un paziente ed amplificato mediante nested PCR con primers dedotti dalla UTR del genoma virale. L'amplificazione è stata condotta utilizzando dapprima due primers esterni al frammento di interesse (primer senso: 5'-GTTTTCCACGCCCGTCCGC-3'; posizione nt 105-133; primer antisenso, 5'-AGAGCCTTGCCCATAGCC-3';

posizione nt 236-253, ceppo di riferimento AB017610) e successivamente gli stessi primers usati nella real-time (AMTS e AMTAS). L'amplificato ottenuto è stato inserito in un vettore plasmidico e transfettato in cellule competenti. I cloni ottenuti sono stati sequenziati e quantificati mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm. Dalla misura della densità ottica, nota la lunghezza in nucleotidi del vettore ricombinante, è stato possibile determinare il numero esatto di copie ottenute con la purificazione e preparare, attraverso una serie di diluizioni successive, degli standard di riferimento a numero noto di copie di DNA.

PCR GENOGRUPPO-SPECIFICHE

La determinazione dei genogruppi di TTV è stata realizzata con l'uso di 5 differenti reazioni di PCR progettate su regioni diverse del genoma del virus. I primers sono stati progettati utilizzando il programma Primer Premier (Versione 5.00; Premier Biosoft International, Palo Alto, CA); particolare attenzione è stata rivolta nel cercare di evitare combinazioni di primers con strutture a forcina o formanti dimeri. Per tutte le amplificazioni è stato utilizzato lo stesso protocollo: uniche differenze i primers e la temperatura di annealing che saranno descritte nei paragrafi seguenti. Brevemente, per il primo step, 5 µl di DNA estratto sono stati aggiunti a 45 µl della miscela di reazione contenente il tampone (10 mM Tris-HCL ph 8,2, 50 mM kCl, 1,5 mM MgCl₂), 200 µM di ogni desossiribonucleotide trifosfato (dNTPs), 0,6 µM di ciascun primer e 2,5 U di Taq DNA polimerasi. Preparata la miscela sono stati effettuati 35 cicli con il seguente profilo termico:

1. fase di denaturazione: 94°C per 30 secondi,

2. fase di appaiamento: temperatura di annealing per 30 secondi,
3. fase di estensione: 72 °C per 45 secondi.

Al termine dei 35 cicli la temperatura è stata mantenuta a 72°C per 15 minuti affinché la Taq polimerasi completasse eventuali frammenti tronchi.

Il secondo step è stato effettuato trasferendo 5 µl del prodotto del primo step in nuovi tubi di reazione contenenti una miscela simile a quella del primo step ma con primers interni al frammento già amplificato. L'unica differenza nel secondo step è stato il numero dei cicli, 25 anziché 35. Le reazioni sono state eseguite in termociclatori Perkin-Elmer 9600 (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) e i prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 3%, colorato con etidio bromuro. La dimensione dei prodotti di amplificazione è stata valutata per comparazione con un marker molecolare di riferimento.

La validità delle reazioni di PCR è stata determinata tramite la presenza di un controllo positivo mentre, la presenza di contaminanti è stata esclusa inserendo in ogni reazione un numero di controlli negativi pari al 33% del totale dei campioni analizzati. Ogni campione è stato amplificato in doppio e in caso di discordanza il campione è stato nuovamente estratto e amplificato due volte.

PCR genogruppo 1. Un protocollo di nested PCR è stato messo a punto per l'amplificazione specifica degli isolati di TTV appartenenti al genogruppo 1. I primers sono stati disegnati nella regione ORF1 e in tabella II.3 sono riportate le sequenze,

la posizione rispetto al ceppo di riferimento e le temperature di annealing della reazione (figura II.3).

TABELLA II.3. Oligonucleotidi utilizzati per la genotipizzazione di TTV di genogruppo 1.

Nome	Sequenza (5'-3') ^a	Step	Temp. annealing	Posizione (nt) ^b	Dimensioni frammento
G1-1	AACGARGACCTAGACCTITGTAGATA	I	50 °C	1348-1366	346 bp
TTV2	CAGTTAGTGGTGAGCCGAA			1126-1145	
TTV5	ACAGCCCCCAGCATACATCC	II	50 °C	1138-1157	220 bp
G1-4	GTGAGCCGAACGGATATTG			1309-1328	

^a: I: inosine; R: A or G;

^b: Le posizioni nucleotidiche (nt) sono riferite all'isolato AB017610

PCR genogruppo 2. Anche per l'amplificazione degli isolati appartenenti a questo genogruppo è stata studiata una nested PCR. La regione prescelta come target per l'amplificazione è l'ORF 1. La sequenza dei primers, la loro posizione rispetto al ceppo di riferimento e la temperatura di annealing del primo e del secondo step sono riportate in tabella II.4 (figura II.3).

TABELLA II.4. Oligonucleotidi utilizzati per la genotipizzazione di TTV di genogruppo 2.

Nome	Sequenza (5'-3') ^a	Step	Temp. annealing	Posizione (nt) ^b	Dimensioni frammento
G2-1	AATATGACMCCTTTGGAGGIGG	I	52 °C	945-966	434 bp
G2-2	TGAGCAGAACGGAAACCGCAAG			1357-1378	
G2-3	CTGGAGIAGATCGAAGR TAGA	II	52 °C	1030-1050	260 bp
PMV4	CTGTAAATAGAGTGGGGGG			1271-1289	

^a: I: inosine; M: A or C; R: A or G;

^b: Le posizioni nucleotidiche (nt) sono riferite all'isolato AF261761.

PCR genogruppo 3. A causa dell'enorme variabilità degli isolati appartenenti a questo genogruppo, la migliore strategia di amplificazione è risultata una multiplex-nested PCR e sia nel primo che nel secondo step è stata utilizzata la stessa coppia di primer senso (G3-1a e G3-1b). I primers antisenso utilizzati nel primo step e nel secondo step sono rispettivamente G3-2 e G3-4. Bersaglio dell'amplificazione è la regione ORF 1. Temperatura d'annealing, sequenza e localizzazione dei primers sono riportate in tabella II.5 (figura II.3).

TABELLA II.5. Oligonucleotidi utilizzati per la genotipizzazione di TTV di genogruppo 3.

Nome	Sequenza (5'-3') ^a	Step	Temp. annealing	Posizione (nt) ^b	Dimensioni frammento
G3-1a	AAYGACCAGCTAGACCTIGCCAGATA			1054-1079 ¹	
G3-1b	AAYACTCAGCTAGACCTIGCYAGAT	I	55°C	997-1021 ²	334-344 bp
G3-2	TTWGTGGTGRGCIGAACGG			1295-1316 ¹ 1238-1259 ²	
G3-1a	AAYGACCAGCTAGACCTIGCCAGATA			1054-1079 ¹	
G3-1b	AAYACTCAGCTAGACCTIGCYAGAT	II	55 °C	997-1021 ²	263 bp
G3-2	TGKGTGTACCAITTRTCTWCAA			1379-1387 ¹ 1321-1340 ²	

^a: I: inosine; M: A o C; R: A o G; K: G o T; Y: T o C; W: A o T.

^b: Le posizioni nucleotidiche (nt) sono riferite all'isolato 1: AB025946 e 2: AB050448.

PCR genogruppo 4. Per l'amplificazione degli isolati appartenenti a questo genogruppo è stato possibile progettare una nested PCR. I primers sono stati studiati in una regione a cavallo tra l'UTR e l'ORF 2; la loro sequenza e posizione rispetto al ceppo di riferimento è riportate in tabella II.6, insieme alla temperatura d'annealing e lunghezza del frammento amplificato (figura II.3).

TABELLA II.6. Oligonucleotidi utilizzati per la genotipizzazione di TTV di genogruppo 4.

Nome	Sequenza (5'-3') ^a	Step	Temp. annealing	Posizione (nt) ^b	Dimensioni frammento
G4-1	CCATTTTGTGCAGCCCG	I	52 °C	103-119	317 bp
G4-2	CGGCGGACTCCACGGCAT			402-419	
G4-3	AGCCCGCCAATTTCTGTT	II	52 °C	114-131	295 bp
G4-4	ACGGCATGAYTTTGTGTCCTG			388-408	

^a: Y: t or C.

^b: Le posizioni nt sono riferite all'isolato AB038622.

PCR genogruppo 5. Così come per il genogruppo 4, i primers progettati per questo genogruppo riconoscono sequenze bersaglio nella regione dell'UTR e nell'ORF 2. Il protocollo studiato prevede due step di amplificazione, condotti a 58 °C il primo e a 55 °C il secondo. In tabella II.7 è riportata la sequenza di ciascun primer e la posizione rispetto al ceppo di riferimento (figura II.3). La lunghezza del frammento ottenuto dopo il secondo step può variare da 271 a 306 nucleotidi a causa di delezioni che possono essere presenti, per alcuni isolati, all'interno del frammento amplificato.

TABELLA II.7. Oligonucleotidi utilizzati per la genotipizzazione di TTV di genogruppo 5.

Nome	Sequenza (5'-3') ^a	Step	Temp. annealing	Posizione (nt) ^b	Dimensioni frammento
G5-1	CCAAGTCAAAGAAAAACACCT	I	58 °C	305-328	418 bp
G5-2	CGCCTCCTACTCTTCGTCGTC			704-722	
G5-3	AGCCCGCCAATTTCTGTT	II	55 °C	373-393	271-306 bp
G5-4	ACGGCATGAYTTTGTGTCCTG			650-670	

^a: Y: T or C.

^b: Le posizioni nt sono riferite all'isolato AB064606.

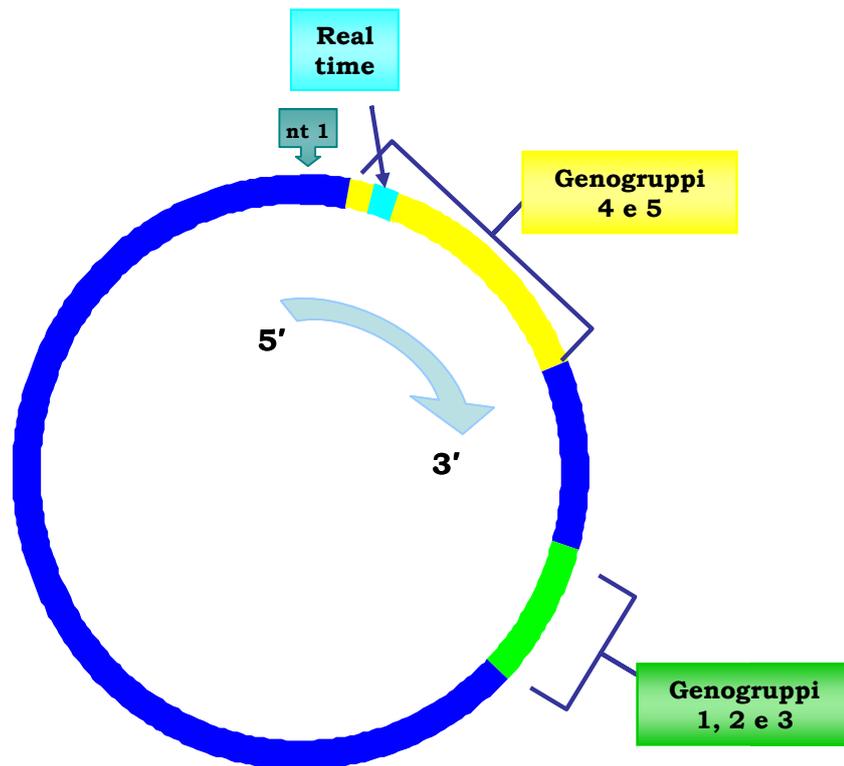


Figura II.3. Genoma di TTV: rappresentazione schematica delle regioni bersaglio d'amplificazione.

SEQUENZIAMENTO

I prodotti di amplificazione delle PCR gruppo-specifiche, previa purificazione tramite estrazione da gel d'agarosio, sono stati sequenziati in entrambe le direzioni, usando il kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems) ed il sequenziatore automatico a capillare ABI 373 (AB). Per la visualizzazione e la manipolazione delle sequenze è stato utilizzato il programma BioEdit, versione 6.0.7 (BioEdit Sequences Alignment Editor, Isis Pharmaceuticals).

ANALISI DELLE SEQUENZE

La sequenza consensus per ciascun amplificato, ottenuta dal confronto tra il filamento senso e quello antisenso, è stata

confrontata in banca dati al fine di verificare la specificità dell'amplificazione (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

ANALISI STATISTICA

Le differenze fra le medie e le distribuzioni sono state stimate mediante il test t di Student a due code. L'associazione fra le variabili è stata determinata con il coefficiente di correlazione. Tutti i test sono stati eseguiti adoperando il programma SPSS versione 8.0 per windows.

MODELLI MATEMATICI PER LO STUDIO DELLA CINETICA VIRALE

L'analisi della cinetica di TTV è stata eseguita facendo riferimento ad un valido modello matematico elaborato in precedenza da Neumann e collaboratori. L'applicazione di tale modello ha permesso di stimare parametri molto importanti quali la velocità della clearance virale e il tempo in cui si verifica il calo della viremia dopo l'inizio del trattamento farmacologico. La stima minima della produzione giornaliera di virus è stata ottenuta moltiplicando la clearance del virus (c) con il carico virale in condizione di steady state (V_0) e con il volume dei fluidi corporei extracellulari; questo volume è stato stimato $3 \cdot 10^3$ ml per tutti i pazienti assumendo che il siero e i fluidi extracellulari nei diversi compartimenti fossero in equilibrio.

SEZIONE III

RISULTATI

CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO APLOIDENTICO

Nello studio sono stati arruolati 4 soggetti adulti, 3 femmine e 1 maschio di età compresa tra 41 e 58 anni affetti da varie forme di leucemia acuta (tabella III.1). I pazienti hanno ricevuto un trapianto aploidentico dopo essere stati sottoposti ad un intenso regime di condizionamento (pazienti Aplo – T depleti).

TABELLA III.1. Parametri principali dei pazienti Aplo - T depleti

Paziente	Età (anni) / Sesso	Diagnosi clinica ^a	Cellule CD34+ trapiantate (10 ⁶ cellule/Kg)	Sopravvivenza (giorni)
CD	54 / M	T-ALL	23,60	30
GMP	47 / F	ALL	9,41	174
PA	41 / F	B-ALL	11,70	111
RR	58 / F	AML	5,90	267

^a T-ALL, leucemia linfoblastica acuta a cellule T; ALL, leucemia linfoblastica acuta; B-ALL, leucemia linfoblastica acuta a cellule B; AML, leucemia mieloide acuta.

Il protocollo terapeutico del regime di condizionamento prevedeva al giorno 0 l'irradiazione totale del corpo (total body irradiation, TBI) con elevate dosi di radiazioni (10 Gy), tra il secondo e il terzo giorno la somministrazione di 5 mg/Kg/die di thiotepa, tra il terzo e il settimo giorno di 40 mg/m²/die di fludarabina e tra il quarto e l'ottavo giorno di 1,2 mg/Kg/die di globuline anti-timociti (tabella III.2). Al decimo giorno dall'inizio

del regime di condizionamento i pazienti sono stati sottoposti a trapianto tramite trasfusione delle cellule CD34+ ottenute da cellule staminali ematopoietiche prelevate da donatori con sistema HLA aploidentico (tabella III.2).

TABELLA III.2. Regime di condizionamento dei pazienti Aplo - T depleti

Giorno	Trattamento	Dose
0	TBI ^a	10 Gy
2 - 3	thiotepa	5 mg / Kg / die
3 - 7	fludarabina	40 mg / m ² / die
4 - 8	globuline anti-timociti	1,2 mg / Kg / die
10	Trapianto con cellule staminali aploidentiche CD34+	Da 5,90 a 23,60 * 10 ⁶ cellule / Kg

^aTBI, irradiazione totale del corpo.

DETERMINAZIONE DEI TITOLI E DEI GENOGRUPPI DI TTV NEI PAZIENTI APLO - T DEPLETI

La ricerca e quantificazione della viremia di TTV è stata effettuata mediante una real time PCR ad alta sensibilità definita “universale” perché disegnata su un frammento del genoma virale altamente conservato e quindi in grado di rilevare tutti i tipi di TTV ad oggi conosciuti (Maggi et al, 2001a e 2001b). I campioni di sangue periferico sono stati raccolti

immediatamente prima dell'inizio del regime di condizionamento e a tempi prestabiliti nei 30 giorni successivi, il plasma è stato suddiviso in aliquote e conservato a -80°C fino al momento dell'estrazione del DNA. Tutti i campioni di ciascun paziente sono stati amplificati in triplicato nella medesima seduta di real time PCR e per ciascun campione sono state esaminate almeno due estrazioni indipendenti. Il DNA estratto ottenuto al tempo 0 è stato esaminato per la presenza dei genogruppi di TTV utilizzando un pannello di cinque nested PCR, ciascuna specifica per un singolo genogruppo (Maggi et al, 2005). Nei 4 pazienti esaminati sono stati ritrovati titoli di TTV in un range compreso tra 4,7 e 6,8 log copie per ml di plasma e sono stati osservati da 1 a 3 genogruppi diversi (tabella III.3). In particolare, tutti i pazienti risultavano positivi per il genogruppo 1, che è altamente rappresentato nella nostra regione (Maggi et al, 2005), il genogruppo 2 non è stato ritrovato in nessun paziente mentre i genogruppi 3 e 5 sono stati ritrovati solo nel paziente CD. Il paziente GMP era l'unico soggetto positivo per il genogruppo 4. In accordo con i dati di letteratura la contemporanea presenza di tre genogruppi è stata osservata nel paziente che dimostrava i titoli di TTV più elevati (Maggi et al, 2005).

TABELLA III.3. Titoli e genogruppi di TTV nei pazienti Aplo - T depleti

Paziente	TTV nel plasma Pre-TBI	
	Log copie / ml	Genogruppi
CD	6,8	1, 3, 5
GMP	4,7	1, 4
PA	5,3	1
RR	5,0	1

Come rappresentato in figura III.1, in tutti e 4 i pazienti i titoli di TTV subiscono un drastico decremento dopo la TBI. Tale decremento persiste fino almeno al ventiduesimo giorno con livelli di TTV prossimi al limite di sensibilità della metodica ($2 \cdot 10^2$ copie di TTV DNA per ml di plasma) anche se, in nessun caso, sono stati osservati campioni con titoli inferiori a tale limite. I pazienti CD, GMP e RR fanno registrare un calo di circa 4 log e solo il paziente PA ha un calo inferiore, di circa 3 log. In particolare, al momento del massimo calo, il decremento maggiore è stato osservato per il paziente CD la cui quantità di TTV è risultata pari a $9 \cdot 10^{-5}$ volte quella basale mentre la riduzione minore dei titoli di TTV è stata misurata nel paziente PA, con una viremia pari a $3 \cdot 10^{-3}$ volte quella iniziale.

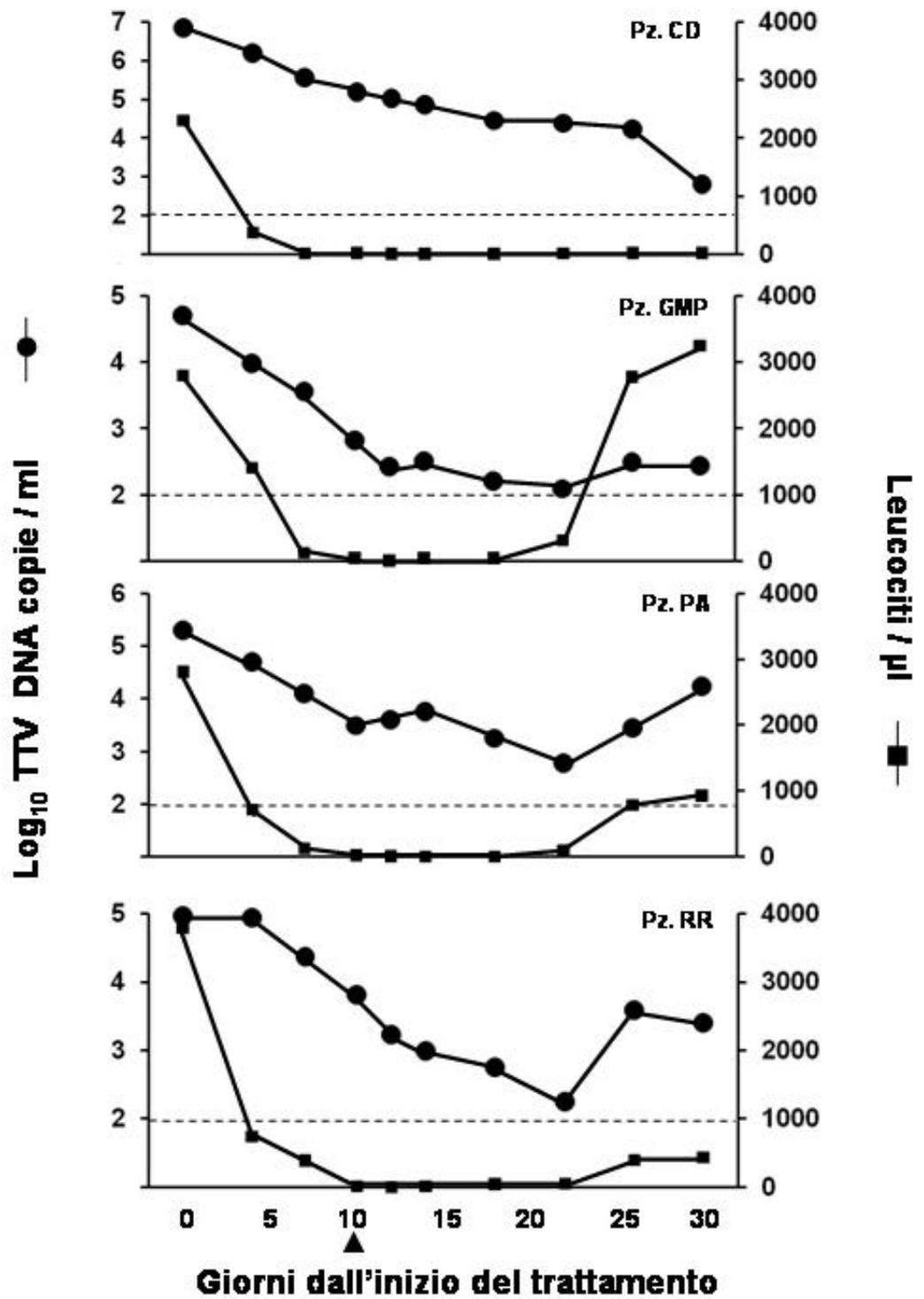


Figura III.1. Andamento dei titoli di TTV e del numero totale dei leucociti nei pazienti Aplo – T depleti. La freccia indica il giorno del trapianto.

La drastica diminuzione dei titoli di TTV non sembra inoltre essere influenzata dai diversi genogruppi presenti prima del trapianto anche se il basso numero di pazienti osservati non permette di trarre delle conclusioni definitive in tal proposito.

Al fine di investigare le dinamiche dell'infezione da TTV è stato esaminato l'andamento dei carichi virali osservati durante la fase di massimo declino (dal giorno 0 al giorno 12) utilizzando il modello matematico originariamente sviluppato da Neumann et al. (1998). L'applicazione di questo modello ha reso possibile il calcolo della percentuale di *clearance* e della vita media dei virioni. Tale calcolo ha permesso di determinare che la media della percentuale di *clearance* del TTV circolante è $3,8 \text{ die}^{-1}$ mentre la vita di TTV nel plasma si è dimostrata variabile da 3,6 a 4,8 h, con una media di 4,3 h (tabella III.4). Tale valore risulta leggermente inferiore rispetto a quello precedentemente calcolato in pazienti trattati con interferone alfa (Maggi et al, 2001b). Ciò probabilmente dipende dal fatto che l'irradiazione totale può aver portato ad un blocco completo della replicazione virale a differenza di quanto succede con l'uso dell'interferone.

TABELLA III. 4. Dinamiche di TTV nei pazienti Aplo – T depleti

Pazienti	Parametri virali		
	Clearance rate (c [die ⁻¹])	Emivita dei virioni ([die]) ^a	N° dei virioni plasmatici prodotti al giorno ^b
CD	3,8	0,18	$7,8 \times 10^{10}$
GMP	4,5	0,15	$6,7 \times 10^9$
PA	3,7	0,19	$2,1 \times 10^9$
RR	3,5	0,20	$9,6 \times 10^8$
Media \pm ES ^d	$3,8 \pm 0,2$ ^c	$0,18 \pm 0,01$	$2,0 \times 10^{10} \pm 1,0 \times 10^{10}$

^aCalcolato con l'equazione: $\ln(2)/c$.

^bLa produzione giornaliera dei virioni plasmatici è stata calcolata moltiplicando c per la viremia misurata al tempo 0 e per il volume dei fluidi extracellulari che sono stati impostati arbitrariamente pari a $3,0 \times 10^3$ ml.

^cES, errore standard.

Il paziente CD è deceduto per sindrome da fallimento multi organo poche ore prima di effettuare il prelievo al giorno 30 e quindi non è stato possibile determinare i titoli di TTV e la conta dei leucociti a quella data. Per i rimanenti 3 pazienti si osserva a partire dal ventiseiesimo giorno (figura III.1) un moderato ma costante incremento nella viremia di TTV e alla fine del periodo di osservazione dei 30 giorni i titoli virali risultano in genere considerevolmente inferiori rispetto al valore basale. Dalla figura III.1 è possibile apprezzare che l'incremento della viremia di TTV procede parallelamente alla ricomparsa dei

leucociti nel sangue periferico. Al momento del trapianto i pazienti si trovavano nella cosiddetta fase “aplastica” caratterizzata da assenza di parenchima midollare e pancitopenia periferica indotte dalla terapia di condizionamento. In condizioni di risposta ottimale, dopo 2-3 settimane il processo di attecchimento del trapianto è ben avviato e il numero delle cellule raggiunge livelli di sicurezza. Dai dati ottenuti, l’aumento della viremia di TTV sembrava avvenire a trapianto ben attecchito. Infatti, dopo il drastico calo della fase aplastica, la conta dei leucociti totali ritorna a valori comparabili a quelli basali dopo circa un mese dal trapianto.

Purtroppo solo per i pazienti GMP e RR è stato possibile estendere l’analisi fino a 110 giorni dopo l’inizio del trattamento, con campionamenti eseguiti anche nei giorni 50 e 80 (figura III.2). In questi due soggetti, nel secondo e terzo mese dopo il trapianto il numero dei leucociti totali rimane pressoché invariato mentre i titoli di TTV aumentano fino a superare quelli basali, suggerendo una maggiore produzione di TTV nelle cellule infettate e/o una più veloce cinetica del rilascio del virus nel plasma.

E’ importante ricordare tuttavia, che nonostante il numero di leucociti totali ritorni nella norma entro 100 giorni post-trapianto, il sistema immunitario dei pazienti non risulta ancora funzionalmente paragonabile a quello del pre-trapianto. E’ ben noto che proprio i 2-3 mesi successivi al trapianto di midollo rappresentano il periodo più critico per le riattivazioni virali e per l’acquisizione di nuove infezioni. Infatti, nonostante una conta cellulare normale, la composizione delle sottopopolazioni linfocitarie risulta atipica con l’espansione di alcuni particolari cloni cellulari che, a seguito della nuova

emopoiesi indotta dalla linfopenia, tendono ad espandersi rapidamente ripristinando numericamente, ma non funzionalmente, la massa di cellule circolanti.

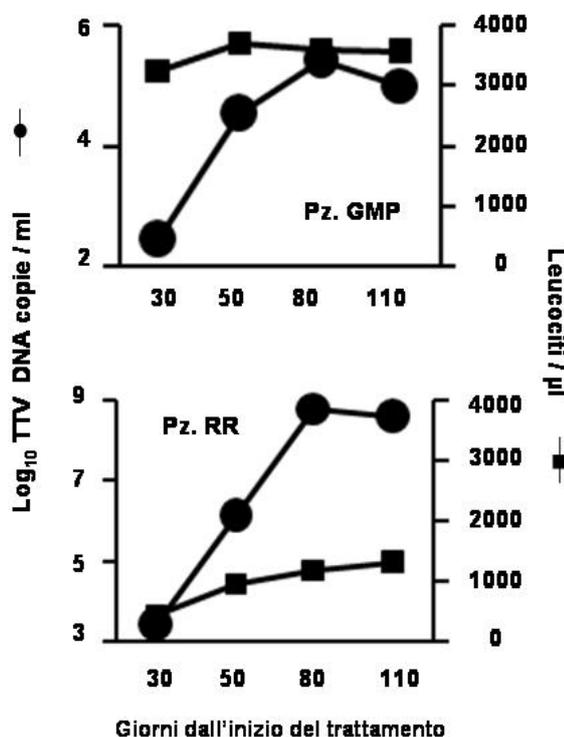


Figura III.2: Andamento dei titoli di TTV e del numero totale dei leucociti dal giorno 30 al giorno 110 nei pazienti GMP e RR.

E' interessante inoltre osservare che il numero e il tipo dei genogruppi di TTV ritrovati nel plasma successivamente al trapianto è risultato chiaramente diverso rispetto a quello osservato al baseline. In particolare il paziente GMP oltre ai genogruppi 1 e 3 già presenti prima di iniziare il regime di condizionamento, acquisisce anche i genogruppi 3 e 4, il paziente RR invece acquisisce i genogruppi 3, 4 e 5, mentre il paziente PA perde il genogruppo 1 (o persiste con livelli molto bassi, inferiori al limite di sensibilità della nested PCR) ma risulta positivo per il genogruppo 3 (tabella III.5).

TABELLA III.5. Titoli e genogruppi di TTV post trapianto nei pazienti Aplo - T depleti

Paziente	TTV (plasma) Post-TBI	
	Log copie / ml	Genogruppi
CD	ND ^a	ND
GMP	5,4 (80) ^b	1, 3, 4, 5
PA	4,2 (30)	3
RR	7,0 (110)	1, 3, 4, 5

^a ND, non determinato.

^b In parentesi i giorni post trapianto in cui si aveva il picco di TTV e in cui sono stati determinati i genogruppi di TTV.

I motivi alla base di queste variazioni possono essere molteplici. Uno potrebbe essere la riattivazione, ad opera del condizionamento o della procedura stessa del trapianto, di TTV preesistenti nel paziente e latenti in qualche particolare distretto corporeo. Un altro motivo potrebbe essere l'acquisizione di nuovi genogruppi attraverso le trasfusioni di emazie e piastrine a cui quasi tutti i pazienti sono stati sottoposti.

DETERMINAZIONE DEI TITOLI DI TTV NEI PAZIENTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO ALLOGENICO TRATTATI CON UN RIDOTTO REGIME DI CONDIZIONAMENTO E CON TERAPIA NON MIELOABLATIVA

Nei pazienti Aplo – T depleti è stato osservato che i titoli di TTV hanno una cinetica del tutto sovrapponibile all'andamento dei

leucociti totali suggerendo così che queste cellule (o alcune particolari sottopopolazioni) possano essere deputate alla replicazione di TTV. Al fine di indagare più approfonditamente il comportamento di TTV in seguito all'abbattimento dei leucociti totali circolanti, sono stati arruolati nello studio altri 9 pazienti sottoposti a trapianto allogenico (tabella III.6), 4 dei quali avevano ricevuto un ridotto regime di condizionamento (Allo – RRC) mentre gli altri 5 avevano ricevuto una terapia non mieloablativa (Miniallo – NMA).

TABELLA III.6. Parametri principali dei pazienti Allo – RRC e Miniallo – NMA

	Paziente	Età (anni) / Sesso	Diagnosi clinica ^a
Allo - RRC	CoA	59 / F	AML
	FE	57 / F	DLBCL
	BGP	47 / F	IMF
	RF	29 / M	HL
Miniallo - NMA	CapA	56 / F	MM
	VS	58 / F	MM
	CR	43 / M	MM
	MM	66 / M	IMF
	FA	50 / M	DLCBL

^a AML: Leucemia mieloide acuta, DLCBL, Linfoma diffuso a grandi cellule B, IMF: Mielofibrosi idiopatica, HL: Linfoma di Hodgkin, MM, mieloma multiplo.

Lo schema terapeutico (tabella III.7) cui sono stati sottoposti i pazienti Allo – RRC determina in genere una diminuzione dei leucociti totali ma di intensità minore rispetto a quello osservato nei pazienti Allo – T depleti, mentre quello attuato

nei pazienti Miniallo – NMA di solito non comporta una diminuzione significativa dei leucociti circolanti.

TABELLA III.7. Schema terapeutico pazienti Allo- RRC e Miniallo – NMA

	Giorno	Trattamento	Dose
	4	Thiotepa	10 mg / Kg / die
	Da 2	Ciclosporina	1 mg / Kg / die
Allo - RRC	6 / 7	Ciclofosfamide	50 mg / Kg / die
	8	Melphalan	30 mg / m ² / die
	9	Trapianto con cellule staminali aploidentiche CD34+	Da 5,90 a 23,60 * 10 ⁶ cellule / Kg
	Da 6	Ciclosporina	1 mg / Kg / die
Miniallo - NMA	5 / 7	Fludarabina	30 mg / m ² / die
	9	TBI ^a	200 cGy
	9	Trapianto con cellule staminali aploidentiche CD34+	Da 5,90 a 23,60 * 10 ⁶ cellule / Kg

^a TBI, irradiazione totale del corpo.

I campioni di plasma sono stati raccolti e conservati con le medesime modalità utilizzate per i pazienti Aplo – T depleti e la determinazione dei titoli di TTV è stata eseguita con la stessa

metodica di real time PCR universale già adoperata per il primo gruppo di pazienti.

Analizzando le dinamiche del numero totale dei leucociti circolanti nei primi 10-11 giorni dopo l'inizio del trattamento, si può osservare che i pazienti Allo – RRC mostrano un calo meno rapido rispetto ai pazienti Aplo - T depleti mentre nei pazienti Miniallo – NMA il numero dei leucociti totali rimane pressoché invariato (figura III.3).

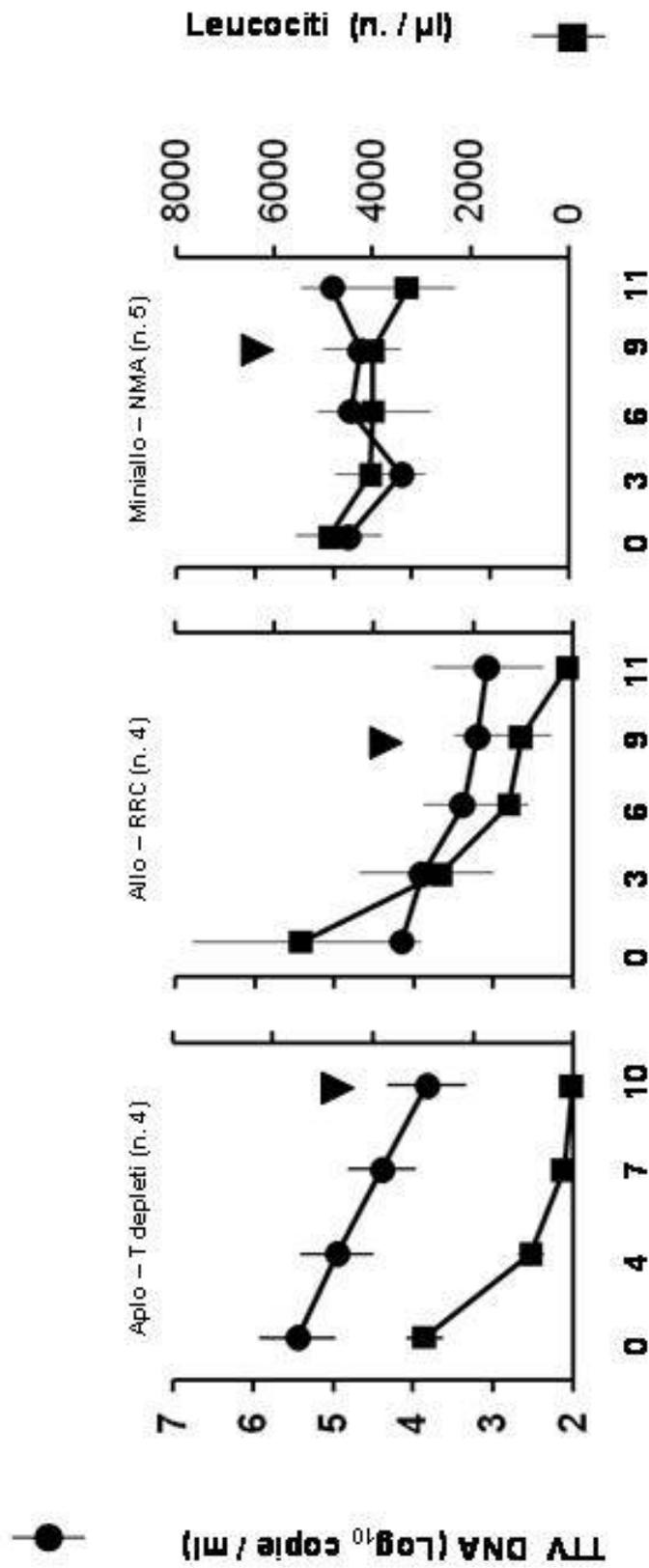


Figura III.3: Confronto dell'andamento dei titoli di TTV e del numero totale dei leucociti nei pazienti Aplo - T depleti, Allo - RRC e Miniiallo - NMA nei primi 10 - 11 giorni dopo l'inizio del trattamento. La freccia indica il giorno del trapianto

Sempre nei primi 11 giorni dall'inizio del trattamento nei pazienti Allo - RRC i livelli di TTV mostrano una flessione che però risulta essere più moderata rispetto a quella osservata negli Aplo - T depleti (circa 1 log per gli Allo - RRC e quasi 2 log per gli Aplo - T depleti, figura III.3) mentre nei pazienti Miniallo - NMA i valori di TTV non subiscono variazioni significative.

Come per i 2 pazienti GMP e RR (Aplo - T depleti), anche per i pazienti Allo - RRC e Miniallo - NMA è stato possibile estendere l'analisi fino a più di 100 giorni dopo l'inizio del trattamento (figura III.4). Anche in questo caso i titoli di TTV procedono di pari passo all'andamento dei leucociti totali e alla fine del periodo di osservazione risultano significativamente aumentati rispetto ai livelli pre-trattamento. A più di 3 mesi dal trapianto infatti, i titoli medi di TTV oscillavano intorno ai 6 log con un incremento medio rispetto al valore della viremia basale di quasi 2 logaritmi.

Le osservazioni condotte sui pazienti che hanno subito una ridotta terapia mieloablativa sono in linea con quanto già osservato nei soggetti Aplo - T depleti rafforzando quindi l'ipotesi che le cellule del sistema immunitario possano essere sede di replicazione di TTV.

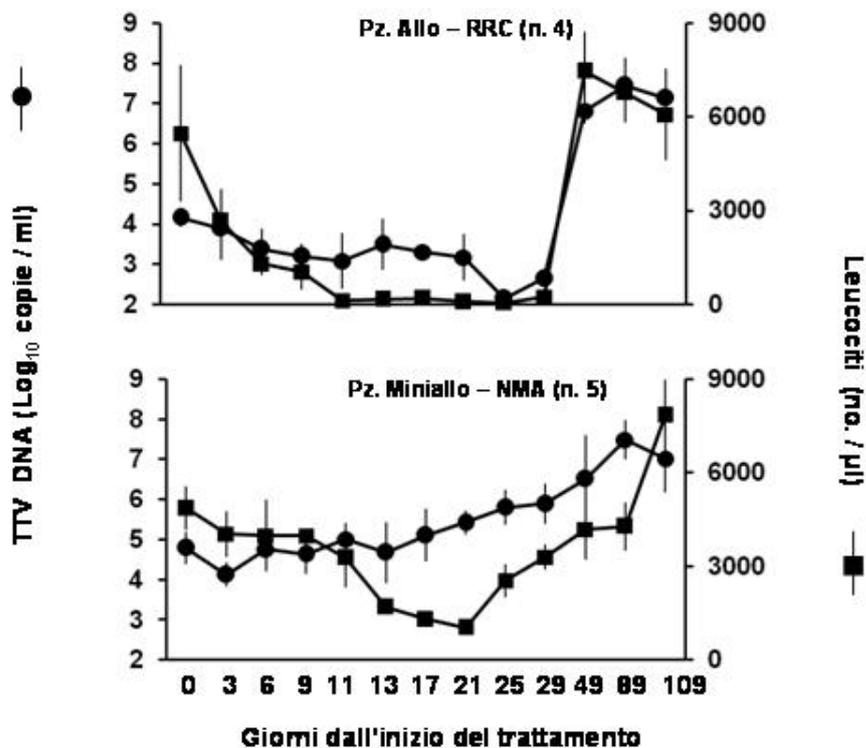


Figura III.4: Andamento dei titoli di TTV e del numero totale dei leucociti nei pazienti Allo - RRC e Miniallo - NMA nei 109 giorni successivi all'inizio del trattamento.

DETERMINAZIONE DEI TITOLI DI TTV NEI PAZIENTI CON ARTRITE REUMATOIDE SOTTOPOSTI A TERAPIA CON RITUXIMAB

I regimi di condizionamento a cui sono stati sottoposti i pazienti con patologie ematologiche comportano una deplezione indiscriminata dei leucociti totali. Per poter comprendere in maniera più approfondita la natura del parallelo calo/aumento TTV-leucociti sopra descritta sarebbe opportuno analizzare le dinamiche virali in pazienti sottoposti a terapia in grado di abbattere specifiche sottopopolazioni leucocitarie. Per tale ragione sono stati arruolati nello studio 18 pazienti affetti da

artrite reumatoide sottoposti a trattamento con l'anticorpo monoclonale Rituximab (pazienti Art.Reum. – Rituximab) noto per la sua capacità di indurre una deplezione specifica dei linfociti B. Le caratteristiche dei pazienti e il tipo di terapia che essi hanno ricevuto sono riportate in Tabella III.8. L'analisi dei titoli di TTV in questi pazienti permetterà di comprendere se i linfociti B hanno un ruolo nel sostenere l'infezione da TTV.

TABELLA III.8. Caratteristica dei 18 pazienti Art.Reum. – Rituximab

Parametri	
Sesso (Maschio / Femmina)	5 / 13
Età (media \pm DS ^a)	59 \pm 13
Tempo dall'inizio della malattia (anni \pm DS)	10 \pm 6
No. di pazienti precedentemente trattati con altri anticorpi monoclonali umani (%)	10 (55)
No. di pazienti in terapia combinata con:	
Steroidi (%)	16 (89)
Metotressato (%)	8 (44)
Idrossiclorochina (%)	3 (17)
Leflunomide (%)	3 (17)
Aziatropina (%)	2 (11)
No. di pazienti con artrite in remissione dopo 6 mesi di terapia con rituximab (%)	11 (61)

^a DS: deviazione standard

Nei pazienti Art.Reum. – Rituximab è stato possibile monitorare l'andamento dei titoli di TTV e delle cellule del sistema immunitario per un periodo di circa 7 mesi. Anche per essi, il prelievo dei campioni e la determinazione dei titoli di TTV sono stati condotti secondo le modalità illustrate per i pazienti Aplo – T depleti. Durante il periodo di osservazione il numero di leucociti totali ha fatto registrare una leggera diminuzione mentre il numero dei linfociti B è diminuito considerevolmente (figura III.5). Differentemente dai pazienti sottoposti a trapianto di midollo, nei pazienti Art.Reum. – Rituximab i livelli di TTV non subiscono nessun calo ma addirittura, nei primi 2 mesi di trattamento, parallelamente alla diminuzione del numero dei linfociti B hanno fatto registrare un incremento significativo mantenendosi comunque sempre più alti rispetto al livello basale anche alla fine del periodo di osservazione (figura III.5).

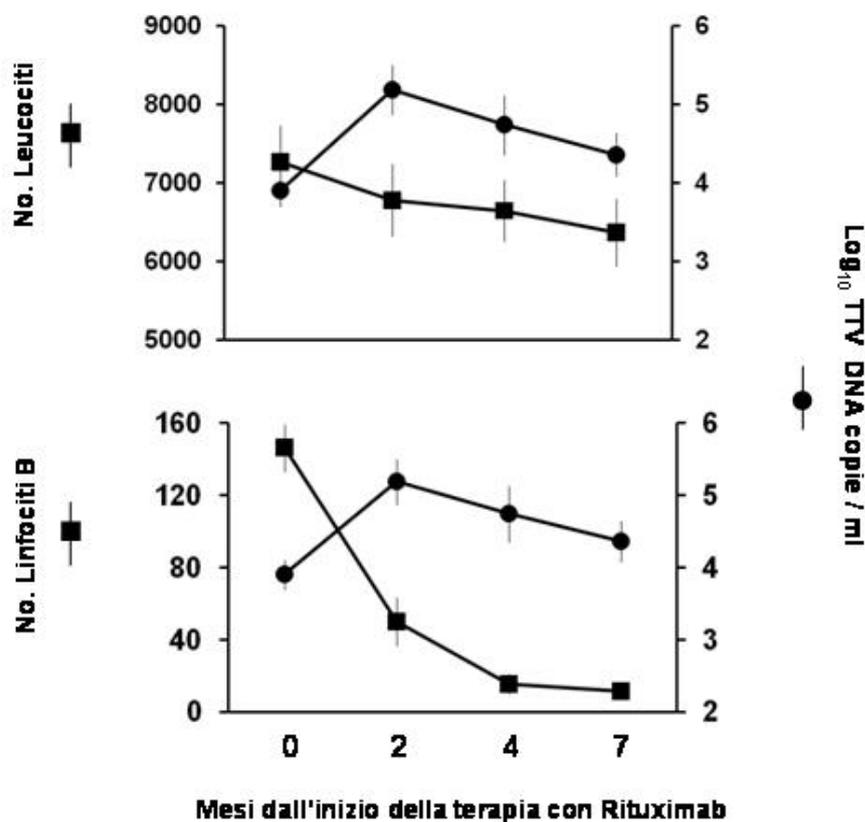


Figura III.5: Confronto dell'andamento dei titoli di TTV, del numero totale dei leucociti e dei linfociti B nei pazienti Art.Reum. - Rituximab.

Tali osservazioni suggeriscono che i linfociti B non sono sede di replicazione di TTV che invece potrebbe replicare nei linfociti T, come dimostrato anche da altri studi che attestano la capacità di TTV di replicare in vitro in PBMC stimolati con fitoemagglutinina (Maggi et al. 2001a; Mariscal et al. 2002; Desai et al. 2005).

A tal proposito sarebbe utile osservare il comportamento del virus in seguito all'abbattimento selettivo delle varie sottopopolazioni di linfociti T ma al momento non esistono farmaci così selettivi da permettere una tale tipo di studio.

Sono anche auspicabili studi con un numero maggiore di pazienti arruolati in modo tale da avere sufficienti osservazioni che siano indipendenti il più possibile dalle variabili dei singoli pazienti. Tale obiettivo tuttavia non è di facile realizzazione vista la gravità delle patologie per le quali è necessario attuare terapie mieloablative.

SEZIONE IV

DISCUSSIONE

Dal 1997, anno in cui fu scoperto il primo isolato di TTV, il prototipo degli anellovirus, sono stati condotti numerosi studi per comprendere il loro ruolo patogenetico e i meccanismi di replicazione e persistenza virale. Sebbene siano passati ormai circa 15 anni gli anellovirus rimangono ancora oggi dei virus “enigmatici”. Sono infatti molte le caratteristiche che fanno di essi virus unici nel mondo della virologia umana e che nello stesso tempo complicano gli studi volti a risolvere il loro rebus. Gli anellovirus infatti sono caratterizzati da un’elevata diffusione nella popolazione generale, un’ampia oscillazione dei titoli virali, una elevata eterogeneità genetica, una prolungata e/o un’ indefinita persistenza nell’ospite e un ampio tropismo tissutale (Lefrere et al. 1999; Bendinelli et al. 2001; Bendinelli e Maggi, 2005). Tali caratteristiche suggeriscono che gli anellovirus siano capaci di interagire in modo continuo e prolungato con gli effettori del sistema immunitario, come in effetti è stato ben documentato nei circovirus animali, molto simili agli anellovirus dell’uomo (Todd et al. 2001). Questi virus animali mostrano una stretta relazione con l’immunità dell’ospite inducendo spesso importanti e considerevoli alterazioni nella capacità di risposta immune dell’animale infettato. Studi recenti dimostrano che anche l’infezione da anellovirus nell’uomo è assai ben relazionata allo status di funzionalità immune. Numerosi autori hanno ritrovato il DNA di TTV nelle cellule del sangue periferico, spesso anche con titoli elevati del virus (Okamoto et al. 1999; 2000b; Maggi et al. 2001a; Mariscal et al. 2002; Takahashi et al. 2002; Yu et al. 2002; Zhong et al. 2002; Desai et al. 2005). In alcuni lavori è stato ipotizzato che i principali reservoir del virus siano i linfociti B (Yu et al. 2002), in altri i neutrofili (Takahashi et al.

2002), in altri ancora non sono state evidenziate differenze significative nella capacità di propagare il virus da parte delle diverse sottopopolazioni leucocitarie (Maggi et al. 2001a). Se da una parte sembra abbastanza scontato che gli anellovirus siano in grado di infettare e riprodursi nelle cellule del sistema immunitario, dall'altra non è ancora stato identificato con certezza il tipo cellulare in cui TTV possa replicare preferenzialmente. Una delle più importanti indagini in tal proposito è stata eseguita da Kanda e collaboratori che hanno descritto nei pazienti sottoposti a trapianto durante la fase di aplasia conseguente al regime di condizionamento una significativa diminuzione, fino al limite di sensibilità della metodica utilizzata, dei titoli di TTV (Kanda et al. 1999c). Intermedi di replicazione del virus sono stati poi trovati nei PBMC e nelle cellule del midollo (Okamoto et al. 2000b; 2000c; Zhong et al. 2002; Bendinelli e Maggi, 2005), suggerendo come TTV possa avere un tropismo maggiore per questa tipologia di cellule. Partendo da tali premesse lo scopo di questo lavoro è stato quello di investigare in maniera approfondita come varia il comportamento degli anellovirus, in particolare di TTV, nei pazienti sottoposti a schemi terapeutici differenti ma comunque tutti in grado di alterare profondamente la capacità riproduttiva e la funzionalità delle cellule del sistema immunitario. I pazienti ematologici rappresentano infatti un ottimo modello di osservazione poiché a causa della loro patologia ricevono terapie immunosoppressive in grado di azzerare completamente o in parte la produzione delle cellule di origine ematopoietica. Il primo gruppo di pazienti esaminati era stato sottoposto ad un pesante regime di condizionamento che ha causato una drastica caduta del numero dei leucociti totali. E' interessante

notare che anche i livelli di TTV hanno subito un rapido declino, suggerendo che le cellule del sistema immunitario siano coinvolte nella replicazione del virus. Il fatto che la caduta dei titoli di TTV sia quasi contemporanea alla diminuzione del numero dei leucociti totali è compatibile con i dati derivati dallo studio della cinetica virale, che hanno evidenziato, confermando quanto già osservato in un precedente lavoro (Maggi et al, 2001c), che TTV è un virus altamente dinamico, con una breve emivita e caratterizzato da un'elevata produzione giornaliera di virioni da parte delle cellule infettate. Per confermare e approfondire ulteriormente tali osservazioni l'andamento dei titoli di TTV è stato determinato sia in un nuovo e più numeroso gruppo di pazienti ematologici, sottoposti però a regimi di condizionamento di diversa entità, sia in un gruppo di pazienti affetti da artrite reumatoide trattati con l'anticorpo monoclonale Rituximab. Il razionale alla base del loro arruolamento era che questi soggetti sarebbero andati incontro ad alterazioni, di diversa ampiezza e natura in relazione al tipo di terapia ricevuta, nel numero e nella funzionalità delle cellule del sistema immunitario. Infatti, nei pazienti ematologici sottoposti a trapianto allogenico che avevano ricevuto una terapia mieloablativa di ridotta intensità (Allo – RRC) si è osservato un declino più lento del numero dei leucociti totali circolanti e anche in questo caso, l'andamento dei titoli di TTV ha mostrato un calo meno repentino risultando sovrapponibile alla cinetica di decadimento delle cellule leucocitarie. Ulteriore conferma a questa osservazione è arrivata dallo studio dei pazienti che hanno ricevuto un trapianto allogenico con un basso numero di cellule staminali (Miniallo – NMA) e che per tale ragione non sono stati sottoposti

a terapia mieloablativa. In essi non è stata osservata alcuna variazione significativa né nel numero dei leucociti totali né nei livelli plasmatici di TTV. A questo punto appare evidente che le cellule del sistema immunitario siano coinvolte nella replicazione di TTV o comunque nel mantenimento dei livelli plasmatici del virus. L'indagine è stata allora estesa a 18 pazienti affetti da artrite reumatoide trattati con Rituximab, un anticorpo monoclonale in grado di determinare la selettiva deplezione dei linfociti B. Questi pazienti sono stati seguiti per un periodo di circa 7 mesi durante i quali è stato osservato un calo significativo dei linfociti B mentre i titoli di TTV non solo non hanno fatto registrare nessun declino, ma addirittura sono aumentati rispetto ai livelli iniziali. Questo comportamento del virus probabilmente trova spiegazione nel fatto che i linfociti B non sono sede di replicazione del virus e in seguito alla loro caduta, nei pazienti trattati con Rituximab, si verifica una alterazione della popolazione linfocitaria a favore delle cellule T, probabile sede di replicazione di TTV (Maggi et al. 2001a; Mariscal et al. 2002; Desai et al. 2005). La riprova di quanto finora descritto si potrebbe ottenere studiando il comportamento del virus in soggetti sottoposti a deplezione selettiva di sottopopolazioni di linfociti T. Purtroppo al momento non esistono terapie in grado di determinare una specifica caduta di tali sottopopolazioni linfocitarie.

E' interessante sottolineare che l'aumento dei titoli di TTV è stato osservato a distanza di più di due mesi dall'inizio del regime di condizionamento anche nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo. In questi soggetti, sebbene il numero di leucociti totali un mese dopo il trapianto abbia raggiunto valori normali e rimanga costante per il rimanente periodo di

osservazione, il sistema immunitario risulta comunque alterato. Infatti, in seguito al periodo di aplasia midollare determinata dal regime di condizionamento, possono prendere il sopravvento alcune sottopopolazioni linfocitarie che non garantiscono una corretta funzionalità del sistema immunitario. Ciò potrebbe spiegare l'aumento dei titoli di TTV osservato a partire dal secondo mese dopo il trapianto che peraltro potrebbe essere causato anche da altre situazioni: una più veloce cinetica virale, una maggiore capacità di rilascio del virus nel sangue da parte delle cellule infettate, l'acquisizione di nuovi genogruppi di TTV in seguito alla procedura di trapianto, le numerose trasfusioni a cui di solito tali pazienti sono sottoposti oppure dalla riattivazione di ceppi latenti in sedi corporee extra linfocitarie. In effetti, l'esame della composizione dei genogruppi di TTV nei pazienti Aplo – T depleti, condotto prima e dopo il trapianto, ha evidenziato che in genere si osserva una variazione nella composizione dei genogruppi infettanti, che nella maggior parte dei casi corrisponde all'acquisizione di uno o più genogruppi. Va comunque sottolineato che nei pazienti da noi osservati, l'incremento della viremia di TTV non mostra alcuna correlazione con l'acquisizione, la perdita e/o la sostituzione di uno o più genogruppi, escludendo quindi che tale aumento sia dovuto ad una massiva replicazione di un virus super-infettante, di più recente acquisizione. I dati raccolti in questo lavoro di tesi, pur non giungendo ad una dimostrazione conclusiva, inducono fortemente a pensare che le cellule del sistema immunitario e i linfociti T in particolare possano essere sede di replicazione di TTV.

SEZIONE VI

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. **Akahane, Y., Sakamoto, M., Miyazaki, Y., Okada, S., Inoue, T., Ukita, M., Okamoto, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M.** 1999. Effect on interferon on a nonenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic hepatitis of unknown etiology. *Journal of Medical Virology* **58**, 196-200.
2. **Ali, S., Fevery, J., Peerlinck, K., Verslype, C., Schelstraete, R., Gyselinck, F., Emonds, M. P., Vermylen, J., Yap, S. H.** 2002. TTV infection and its relation to serum transaminases in apparently healthy blood donors and in patients with clotting disorders who have been investigated previously for hepatitis C virus and GBV-C/HGV infection in Belgium. *Journal of Medical Virology* **66**, 561-566.
3. **Andreoli, E., Maggi, F., Pistello, M** 2006. Small anellovirus in hepatitis C patients and healthy controls. *Emerging Infectious Disease* **12**, 1175-1176.
4. **Asabe, S., Nishizawa, T., Iwanari, H., Okamoto, H.** 2001. Phosphorylation of serine-rich protein encoded by open reading frame 3 of the TT virus genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **286**, 298-304.
5. **Azzi, A., De Santis, R., Morfini, M., Zakrzewska, K., Musso, R., Santagostino, E., Castaman, G.** 2001. TT virus contaminates first-generation recombinant factor VIII concentrates. *Blood* **98**, 2571-2573.
6. **Bando, M., Ohno, S., Oshikawa, K., Takahashi, M., Okamoto, H., Sugiyama, Y.** 2001. Infection of TT virus in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Medicine* **95**, 935-942.
7. **Bando, M., Takahashi, M., Ohno, S.** 2008. Torque teno virus DNA titre elevated in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* **95**, 935-942.
8. **Bandinelli, M., Pistello, M., Maggi, F., Fornai, C., Freer, G., Vatteroni, M. L.** 2001. Molecular properties, biology and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clinical Microbiology Reviews* **14**, 98-113.
9. **Bandinelli, M., Maggi, F.** 2005. TT virus and other Anelloviruses. In: Mahy B, ter Meulen V (eds) *Topley and Wilson-Microbiology and Microbial Infections*. Arnold Press, London
10. **Berg, T., Schreier, E., Heuft, H. G., Hohne, M., Bechstein, W. O., Leder, K., Hopf, U., Neuhaus, P., Wiedenmann, B.** 1999. Occurrence of a novel DNA virus (TTV) infection in patients with liver diseases and its frequency in blood donors. *Journal of Medical Virology* **59**, 117-121.
11. **Bernasconi, P.** 2004. *Onco-Ematologia Molecolare*, Pavia, I edizione, *Edizioni Medico-Scientifiche*.
12. **Biagini, P., Gallian, P., Attoui, H., Cantaloube, J. F., de Micco, P., de Lamballerie, X.** 1999. determination and phylogenetic analysis of

partial sequences from TT virus isolates. *Journal of General Virology* **80**, 419-424.

13. **Biagini, P., Gallian, P., Attoui, H., Touinssi, M., Cantaloube, J. F., de Micco, P., de Lamballerie, X.** 2001. Genetic analysis of full-length genomes and subgenomic sequences of TT virus-like mini virus human isolates. *Journal of General Virology* **82**, 379-383.

14. **Biagini, P., Charrel, R. N., de Micco, P., de Lamballerie, X.** 2003. Association of TT virus primary infection with rhinitis in a newborn. *Clinical Infectious Disease* **36**, 128-129.

15. **Biagini, P., de Micco, P., de Lamballerie, X.** 2006, Identification of a third member of the Anellovirus genus ("small anellovirus") in French blood donors. *Arch Virol* **151**, 405-408.

16. **Biagini, P., Uch, R., Belhouchet, M.** 2007 Circular genomes related to anelloviruses identified in human and animal samples by using a combined rolling-circle amplification / sequence-independent single primer amplification approach. *J Gen Virol* **88**, 2696-2701.

17. **Biagini, P.** 2009. Classification of TTV and related viruses (anelloviruses). *Curr Top Microbiol Immunol* **331**, 21-33.

18. **Bigarre, L., Beven, V., de Boisseson, C.** 2005. Pig anelloviruses are highly prevalent in swine herds in France. *J Gen Virol* **86**, 631-635.

19. **Boysen T., Christensen, J. K., Madsen, C. D., Eugen-Olsen, J., L. S., Moller-Sorensen, H., Webeer, A., Ladefoged, S. D., Krossgaard, K.** 2003. Presence and significance of TT virus in Danish patients on maintenance haemodialysis. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* **37**, 259-264.

20. **Cacoub, P., Rosenthal, E., Gerolami, V., Hausfater, P., Ghillani, P., Sterkers, Y., Thibault, V., Khiri, H., Piette, J. C., Halfon, P.** 2003. Transfusion-associated TT virus co-infection in patients with hepatitis C virus is associated with type II mixed cryoglobulinemia but not with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clinical Microbiology & Infectious* **9**, 39-44.

21. **Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES.** 2011. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. **117**, 5019-5032.

22. **Chae, C.** 2004. A review of porcine circovirus 2-associated syndrome and disease. *The veterinary Journal*, **168**, 41-49.

23. **Chan, P. K., Chik, K. W., Li, C. K., Tang, N. L., Ming, M. S., Cheung, J. L., Ng, K. C., Yuen, P. M., Cheng, A. F.** 2001. Prevalence and genotype distribution of TT virus in various specimen types from thalassaemic patients. *Journal of Viral Hepatitis* **8**, 304-309.

24. **Chayama, K., Kobayashi, M., Tsubota, A., Kobayashi, M., Arase, Y., Suzuki, Y., Saitoh, S., Murashima, N., Ikeda, K., Okamoto, H.,**

- Hashimoto, M., Matsuda, M., Koike, H., Kobayashi, M., Kumada, H.** 1999. Susceptibility of TT virus to interferon therapy. *Journal of General Virology* **80**, 631-634.
25. **Christensen, J. K., Eugen-Olsen, J., Sorensen, M., Ullum, H., Gjedde, S. B., Pedersen, B. K., Nielsen, J. O., Krogsgaard, K.** 2000. Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency virus. *Journal of Infectious Diseases* **181**, 1796-1799.
26. **Chung, J. Y., Han, T.H., Koo, J.W,** 2007. Small anellovirus infections in Korean children. *Emerg Infect Dis* **13**, 791-793.
27. **Cleavinger, P. J., Persing, D. H., Li, H., Moore, S. B., Charlton, M. R., Sievers, C., Therneat, T. M., Zein, N. N.** 2000. Prevalence of TT virus infection in blood donors with elevated ALT in the absence of known hepatitis markers. *American Journal of Gastroenterology* **95**, 772-776.
28. **Comar, M., Ansaldi, F., Morandi, L., Dal Molin, G., Foschini, P. M., Crocè, S. L., Bonin, S., Stanta, G., Tiribelli, C., Campello, C.** 2002. In situ polymerase chain reaction detection of transfusion-transmitted virus in liver biopsy. *Journal of Viral Hepatitis* **9**, 123-127.
29. **Dai, C. Y., Yu, M. L., Chuang, W. L., Hou, N. J., Hou, C., Chen, S. C., Lin, Z. Y., Hsieh, M. Y., Wang, L. Y., Chang, W. Y.** 2002. The response of hepatitis C virus and TT virus to high dose and long duration interferon-alpha therapy in naïve chronic hepatitis C patients. *Antiviral Research* **53**, 9-18.
30. **Davidson, I., Shulman, L. M.** 2008. Unraveling the puzzle of human anellovirus infections by comparison with avian infections with the chicken anemia virus. *Virus Research Review*, 1-15.
31. **De Villiers EM, Schmidt R, Delius H.** 2002. Heterogeneity of TT virus related sequences isolated from human tumour biopsy specimens. *J Mol Med* **80**, 44-50.
32. **Deng, X., Terunuma, M., Handema, R., Sakamoto, M., Kitamura, T., Ito, M., Akahane, Y.** 2000. Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible transmission route and replication site of TT virus. *Journal of Medical Virology* **62**, 531-537.
33. **Desai, M., Pal, R., Deshmukh, R., Banker, D.** 2005. Replication of TT virus in hepatocyte and leucocyte cell lines. *Journal of Medical Virology* **77**, 136-143
34. **Deschler, B., Lubbert, M.** 2006. Acute Myeloid Leukemya: Epidemiology and etiology. *Cancer* **107**, 2099-107.
35. **Devalle, S., Niel, C.** 2004. Distribution of TT virus genomic groups 1-5 in brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV-1 infected patients. *Journal of Medical Virology* **72**, 133-173.

36. **Erker, J. C., Leary, T. P., Desai, S. M., Chalmers, M. L., Mushahwar, I. K.** 1999. Analyses of TT virus full-length genomic sequences. *Journal of General Virology* **80**, 1743-1750.
37. **Fields, N.** 1996. Virology, p 2950. In Fields N., Kinpe D. M., Howley P. M., Chanok M. R., Melnick J. L., Monath T. P., Roizman B., Straus S. E., Fields Virology 3rd d.-1996. *Lippincot -Raven, Philadelphia*.
38. **Fornai, C., Maggi, F., Vatteroni, M. L., Pistello, M., Bendinelli, M.** 2001. High prevalence of TT virus (TTV) and TTV-like mini virus in cervical swabs. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 2022-2024.
39. **Forns, X., Hegerich, P., Darnell, A., Emerson, S. U., Purcell, R. H., Bukh, J.** 1999. High prevalence of TT virus (TTV) infection in patients on maintenance hemodialysis: frequent mixed infections with different genotypes and lack of evidence of associated liver disease. *Journal of Medical Virology* **59**, 313-317.
40. **Gallian, P., Berland, Y., Olmer, M., Raccah, D., de Micco, P., Biagini, Simmons, S., Bouchouareb, D., Mourey, C., Roubicek, tounissi, M., Caantaloube, J. F., Dussol, B., de Lamballerie, X.** 1999. TT virus infection in French hemodialysis in patients: study of prevalence and risk factors. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 2538-2542.
41. **Gallian, P., Biagini, P., Zhong, S., Touinssi, M., Yeo, W., Cantaloube, J. F., Attoui, H., de Micco, P., Johnson, P. J., de Lamballerie, X.** 2000. TT virus: a study of molecular epidemiology and transmission of genotypes 1, 2 and 3. *Journal of Clinical Virology* **17**, 43-49.
42. **Gallian, P., Biagini, P., Attoui, H., Cantaloube, J. F., Dussol, B., Berland, Y., de Micco, P., de Lamballerie, X.** 2002. High genetic diversity revealed by the study of TLMV infection in French hemodialysis patients. *Journal of Medical Virology* **67**, 630-635.
43. **Garbuglia, A.,R., Iezzi, T., Capobianchi, M., R.** 2003 Detection of TT virus in lymph node biopsies of B-cell lymphoma and Hodgkin's disease, and its association with EBV infection. *Int J Immunopathol Pharmacol* **16**, 109-118.
44. **Gerner, P., Oettinger, R., Gerner, W., Falbrede, J., Wirth, S.** 2000. Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission. *Journal of Pediatric Infectious Diseases* **19**, 1074-1077.
45. **Griffiths, P.** 1999. Time to consider the concept of a commensal virus? *Reviews in Medical Virology* **9**, 73-74.
46. **Hallet, R. L., Clewley, J. P., Bobet, F., McKiernan, P. J., Teo, C. G.** 2000. Characterization of a highly divergent TT virus genome. *Journal of General Virology* **81**, 2273-2279.

47. **Handa, A., Dickstein, B., Young, N. S., Brown, K. E.** 2000. Prevalence of the newly described human circovirus, TTV, in United States blood donors. *Transfusion* **40**, 245-251.
48. **Hijikata, M., Takahashi, K., Mishiro, S.** 1999. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* **260**, 17-22.
49. **Inami, T., Konomi, N., Arakawa, Y., Abe, K.** 2000. High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 2407-2408.
50. **Irving, W. L., Ball, J. K., Berridge, S., Curran, R., Grabowska, A. M., Jameson, C. L., Neal, K. R., Ryder, S. D., Thomson, B. J.** 1999. TT virus infection in patients with hepatitis C: frequency, persistence, and sequence heterogeneity. *Journal of Infectious Diseases* **180**, 27-34.
51. **Itoh, Y., Takahashi, M., Ukita, M., Nishizawa, T., Okamoto, H.** 1999. Influence of primer on the detection of TT virus DNA by polymerase chain reaction. *Journal of Infectious Diseases* **180**, 1750-1751.
52. **Itoh, Y., Takahashi, M., Fukuda, M., Shibayama, T., Ishikawa, T., Tsuda, F., Tanaka, T., Nishizawa, T., Okamoto, H.** 2000. Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **279**, 718-724.
53. **Jelcic, I., Hotz-Wagenblatt A., Hunziker A., Zur Hausen H., de Villiers E. M.** 2004. Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. *Journal of Virology* **78**, 7498-7507.
54. **Jones, M. S., Kapoor, A., Lukashov, V. V., Simmonds, P., Hecht, F., Delwart, E.** 2005. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *Journal of Virology* **79**, 8230-8236.
55. **Kakkola, L., Hedman, K., Vanrobaeys, H., Hedman, L., Soderlund-Venermo, M.** 2002. Cloning and sequencing of TT virus genotype 6 and expression of antigenic open reading frame 2 proteins. *Journal of General Virology* **83**, 979-990.
56. **Kamada K., Kamahora T., Kabat P., Hino S.** 2004. Transcriptional regulation of TT virus: promoter and enhancer regions in the 1.2-kb noncoding region. *Virology* **10**, 341-348.
57. **Kamahora, T., Hino, S., Miyata, H.** 2000. Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells. *Journal of Virology* **74**, 9980-9986.
58. **Kanda, Y., Tanaka, Y., Kami, M., Saito, T., Asai, T., Izutsu, K., Yuji, K., Ogawa, S., Honda, H., Mitani, K., Chiba, S., Yazaki, Y., Hirai,**

- H. 1999. TT virus in bone marrow transplant recipients. *Blood* **93**, 2485-2490.
59. **Kao, J. H., Chen, W., Chen, P. J., Lai, M. Y., Chen, D. S.** 2000. TT virus infection in patients with chronic hepatitis B or C: influence on clinical, histological and virological features. *Journal of Medical Virology* **60**, 387-392.
60. **Kao, J. H., Chen, W., Chen, P. J., Lai, M. Y., Chen, D. S.** 2002. Prevalence and implication of a newly identified infectious agent (SEN virus) in Taiwan. *Journal of Infectious Diseases* **185**, 389-392.
61. **Kato, T., Mizokami, M., Mukaide, M., Orito, E., Ohno, T., Nakano, T., Tanaka, Y., Kato, H., Suguchi, F., Ueda, R., Hirashima, N., Shimamatsu, K., Kage, M., Kojiro, M.** 2000. Development of a TT virus DNA quantification system using real-time detection PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 94-98.
62. **Kawanaka, M., Niiyama, G., Mahmood, S., Ifukube, S., Yoshida, N., Onishi, H., Hanano, S., Ito, T., Yamada, G.** 2002. Effect of TT virus co-infection on interferon response in chronic hepatitis C patients. *Liver* **22**, 351-355.
63. **Kazi, A., Miyata, H., Kurokawa, K., Khan, M. A., Kamahora, T., Katamine, S., Hino, S.** 2000. High frequency of postnatal transmission of TT virus in infancy. *Archives of Virology* **145**, 535-540.
64. **Kikuchi, K., Miyakawa, H., Abe, K., Kako, M., Katayama, K., Fukushi, S., Mishiro, S.** 2000. Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient. *Journal of Medical Virology* **61**, 165-170.
65. **Kooistra, K., Zhang, Y. H., Henriquez, N. V., Weiss, B., Mumberg, D., Noterborn, M. H.** 2004. TT virus-derived apoptosis-inducing protein induces apoptosis preferentially in hepatocellular carcinoma-derived cells. *Journal of General Virology* **85**, 1445-1450.
66. **Krekulova, L., Rehak V., Killoran, P., Madrigal, N., Tiley, L. W.** 2001. Genotypic distribution of TT virus (TTV) in a Czech population: evidence for sexual transmission of the virus. *Journal of Clinical Virology* **23**, 31-41.
67. **Laddaga, M., Silvano, G., Conte, P. F.** 1995. Lezioni di oncologia clinica, Genova, I edizione *ECIG*, pp 140 . 164.
68. **Leary, T. P., Erker, J. C., Chalmers, M. L., Desai, S. M., Mushahwar, I. K.** 1999. Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *Journal of General Virology* **80**, 2115-2120.
69. **Lefrere, J. J., Roudot-Thoraval, F., Lefrere, F., Kahfer, A., Mariotti, M., Lerable, J., Thauvin, M., Lefevre, G., Rouger, P., Girot,**

- R. 1999. Natural history of the TT virus infection through follow-up of TTV DNA-positive multiple-transfused patients. *Blood* **95**, 347-351.
70. **Leppik, L., Gunst, K., Lehtinen, M.** 2007. In vivo and in vitro intragenomic rearrangement of TT viruses. *Journal Virology* **8**, 9346-9356.
71. **Lin, C. L., Kyono, W., Tongson, J., Chua, P. K., Easa, D., Yanagihara, R., Nerurkar, V. R.** 2000. Fecal excretion of a novel human circovirus, TT virus, in healthy children. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **7**, 960-963.
72. **Liu, C. J., Kao, J. H., Chen, W., Tsai, R. J., Chen, P. J., Lai, M. Y., Chen, D. S.** 2000. Interspousal transmission of TT virus: low efficiency and lack of apparent risk factors. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **15**, 1287-1291.
73. **Lopez, M.** 2005. *Oncologia medica pratica*, Roma, II edizione, *Società Editrice Universo*.
74. **Lopez-Alcorocho, J. M., Mariscal, L. F., de Lucas, S., Rodriguez-Inigo, E., Casqueiro, M., Castillo, I., Bartolome, J., Herrero, M., Manzano, M. L., Pardo, M., Careno, V.** 2000. Presence of TTV DNA in serum, liver, and peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis. *Journal of Viral Hepatitis* **7**, 440-447.
75. **Luo, K., Liang, W., He, H., Yang, S., Wang, Y., Xiao, H., Liu, D., Zhang, L.** 2000. Experimental infection of nonenveloped DNA virus (TTV) in Rhesus monkey. *Journal of Medical Virology* **61**, 159-164.
76. **Maggi, F., Fornai, C., Morrica, A., Casula, F., Vatteroni, M. L., Marchi, S., Ciccorossi, P., Riente, L., Pistello, M., Bendinelli, M.** 1999. High prevalence of TT virus viremia in Italian patients, regardless of age, clinical diagnosis, and previous interferon treatment. *Journal of infectious diseases* **180**, 838-842.
77. **Maggi, F., Fornai, C., Vatteroni, M. L., Siciliano, G., Menichetti, F., Tascini, C., Specter, S., Pistello, M., Bendinelli, M.** 2001a. Low prevalence of TT virus in the cerebrospinal fluid of viremic patients with central nervous system disorders. *Journal of Medical Virology* **65**, 418-422.
78. **Maggi, F., Fornai, C., Zaccaro, L., Morrica, A., Vatteroni, M. L., Isola, P., Marchi, S., Ricchiuti, A., Pistello, M., Bendinelli, M.** 2001b. TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *Journal of Medical Virology* **64**, 190-194.
79. **Maggi, F., Pistello, M., Vatteroni, M. L., Presciuttini, S., Marchi, S., Isola, P., Fornai, C., Fagnani, S., Andreoli, E., Antonelli, G., Bendinelli, M.** 2001c. Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with alpha interferon for concomitant hepatitis C virus infection. *Journal of Virology* **75**, 11999-12004

80. **Maggi, F., Pifferi, Fornai, C., M., Andreoli, E., Tempestini, E., Vatteroni, M. L., Presciuttini, S., Marchi, S., Pietrobelli, S., Boner, A., Pistello, M., G., Bendinelli, M.** 2003. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory disease: relations to viremia and disease severity. *Journal of Virology* **77**, 2418-2425.
81. **Maggi, F., Andreoli, E., Lanini, L., Fornai, C., Vatteroni, M.L., Pistello, M., Bendinelli, M.** 2005. Relationships between total plasma load of torquetenovirus (TTV) and TTV genogroups carried. *J Clin Microbiol* **43**, 4807-4810.
82. **Manni, F., Rotola, A., Caselli, E., Bertorelle, G., Luca, D. D.** 2002. Detecting recombination in TT virus: a phylogenetic approach. *Journal of Molecular Evolution* **55**, 563-572.
83. **Mariscal, L. F., Lopez-Alcorocho, J. M., Rodriguez-Inigo, E., Ortiz-Movilla, N., De Luca, S., Bartolome, J., Carreno, V.** 2002. TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virology* **301**, 121-129.
84. **Martinez, N. M., Garcia, F., Garcia, F., Alvarez, M., Bernal, M. C., Piedrola, G., Hernandez, J., Maroto, M. C.** 2000. TT virus DNA in serum, peripheral blood mononuclear cells and semen of patients infected by HIV. *AIDS* **14**, 1464-1466.
85. **Matsubara, H., Michitaka, K., Horiike, N., Kihana, T., Yano, M., Mori, T., Onji, M.** 2001. Existence of TT virus DNA and TTV-like mini virus DNA in infant cord blood: mother-to-neonatal transmission. *Hepatology Research* **21**, 280-287.
86. **Matsubara, H., Michitaka, K., Horiike, N., Yano, M., Fazle Akbar, S.M., Torisu, M., Onji, M.** 2000. Existence of TT virus DNA in extracellular body fluids from normal healthy Japanese subjects. *Intervirology* **43**, 16-19.
87. **Matsumoto, A., Yeo, A. E. T., Shih, J. W. K., Tanaka, E., Kiyosawa, K., Alter, H. J.** 1999. Transfusion-associated TT virus infection and its relationship to liver disease. *Hepatology* **30**, 283-288.
88. **Mikuni, M., Moriyama, M., Tanaka, N., Abe, K., Arakawa, Y.** 2002. SEN virus infection does not affect the progression of non-A to -E liver disease. *Journal of Medical Virology* **67**, 624-629.
89. **Miyata, H., Tsunoda, H., Kazi, A., Yamada, A., Khan, M. A., Murakami, J., Kamahora, T., Shiraki, K., Hino, S.** 1999. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *Journal of Virology* **73**, 3582-3586.
90. **Moen, E. M., Sleboda, J., Grinde, B.** 2002. Real-time PCR methods for independent quantitation of TTV and TLMV, *Journal of Virological Methods* **104**, 59-67.

91. **Moriyama, M., Matsumura, H., Shimizu, T., Shioda, A., Kaneko, M., Miyazawa, K., Miyata, H., Tanaka, N., Uchida, T., Arakawa, Y.** 2001. Histopathologic impact of TT virus infection on the liver of type C chronic hepatitis and liver cirrhosis in Japan. *Journal of Medical Virology* **64**, 74-81.
92. **Muljono, D. H., Nishizawa, T., Tsuda, F., Takahashi, M., Okamoto, H.** 2001. Molecular epidemiology of TT virus (TTV) and characterization of two novel TTV genotypes in Indonesia. *Archives of Virology* **146**, 1249-1266.
93. **Mushahwar, I. K., Erker, J. C., Muerhoff, A. S., Leary, T. P., Simons, J. N., Birkenmeyer, L. G., Chalmers, M. L., Pilot-Matias, T. J., Desai, S. M.** 1999. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **96**, 3177-3182.
94. **Mushahwar, I. K.** 2000. Recently discovered blood-borne viruses: are they hepatitis viruses or merely endosymbionts? *Journal of Medical Virology* **62**, 399-404.
95. **Nakagawa, N., Ikoma, J., Ishihara, T., Yasui-Kawamura, N., Fujita, N., Iwasa, M., Kaito, M., Watanabe, S., Adachi, Y.** 2000. Biliary excretion of TT virus (TTV). *Journal of Medical Virology* **61**, 462-467.
96. **Naoumov, N. V.** 2000. TT virus-highly prevalent, but still in search of a disease. *Journal of Hepatology* **33**, 157-159.
97. **Neumann, A. U., Lam, N. P., Dahari, H., Gretch, D. R., Wiley, T. E., Layden, T. J., Perelsen, A. S.** 1998. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* **282**, 103-107.
98. **Niel, C., Saback, F. L., Lampe, E.** 2000. Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 1926-1930.
99. **Niel, C., Lampe, E.** 2001. High detection rates of TTV-like mini virus sequences in sera from Brazilian blood donors. *Journal of Medical Virology* **65**, 199-205.
100. **Ninomiya, M., Nishizawa, T., Takahashi, M.** 2007a Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb. *Journal Gen Virol* **57**, 259-263.
101. **Ninomiya, M., Takahashi, M., Shimosegawa, T., Okamoto, H.** 2007b Analysis of the entire genomes of fifteen torque teno midi virus variants classifiable into a third group of genus Anellovirus. *Arch Virol* **152** **11**, 1961-1975.
102. **Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M.** 1997. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of

unknown etiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **241**, 92-97.

103. **Nishizawa, T., Okamoto, H., Tsuda, F., Aikawa, T., Sugai, Y., Konishi, K., Akahane, Y., Ukita, M., Tanaka, T., Miyakawa, Y., Mayumi, M.** 1999. Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *Journal of Virology* **73**, 9604-9608.

104. **Ohto, H., Ujiie, N., Takeuchi, C., Sato, A., Hayashi, A., Ishiko, H., Nishizawa, T., Okamoto, H.** 2002. TT virus infection during childhood. *Transfusion* **42**, 892-898.

105. **Okamoto, H., Nishizawa, T., Kato, N., Ukita, M., Ikeda, H., Iizuka, Y., Miyakawa, Y., Mayumi, M.** 1998. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology Research* **10**, 1-16.

106. **Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, M., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y., Mayumi, M.** 1999. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* **259**, 428-438.

107. **Okamoto, H., Fukuda, M., Tawara, A., Nishizawa, T., Itoh, Y., Hayasaka, I., Tsuda, F., Tanaka, T., Miyakawa, Y., Mayumi, M.** 2000a. Species-specific TT viruses and cross-species infection in nonhuman primates. *Journal of Virology* **74**, 1132-1139.

108. **Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Takahashi, M., Kishimoto, J., Sai, T., Sugai, Y.** 2000b. TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **279**, 700-707.

109. **Okamoto, H., Takahashi, M., Kato, N., Fukuda, M., Tawara, A., Fukuda, S., Tanaka, T., Miyakawa, Y., Mayumi, M.** 2000c. Sequestration of TT virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Virology* **74**, 10236-10239.

110. **Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Sugai, Y., Sai, T., Tanaka, T., Tsuda, F.** 2000d. Replicative forms of TT virus DNA in bone marrow cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **279**, 700-707.

111. **Okamoto, H., Ukita, M., Nishizawa, T., Kishimoto, J., Hoshi, Y., Mizuo, H., Tanaka, T., Miyakawa, Y., Mayumi, M.** 2000e. Circular double-stranded forms of TT virus DNA in the liver. *Journal of Virology* **74**, 5161-5167.

112. **Okamoto, H., Mayumi, M.** 2001. TT virus: virological and genomic characteristics and disease associations. *Journal of Gastroenterology* **36**, 519-529.

113. **Okamoto, H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Asabe, S., Tsuda, F., Yoshikawa, A.** 2001. Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. *Virology* **288**, 358-368.
114. **Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Fukai, K., Muramatsu, U., Naito, Y., Yoshikawa, A.** 2002. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *Journal of General Virology* **83**, 1291-1297.
115. **Okamura, A., Yoshioka, M., Kikuta, H., Kubota, M., Ma, X., Hayashi, A. Ishiko, H., Kobayashi, K.** 2000. Detection of TT virus sequences in children with liver disease of unknown etiology. *Journal of Medical Virology* **62**, 104-108.
116. **Ott, C., Duret, L., Chemical, I., Trepo, C., Mandrad, B., Komurian-Pradel, F.** 2000. Use of a TT virus ORF1 recombinant protein to detect anti-TT virus antibodies in human sera. *Journal of General Virology* **81**, 2949-2958.
117. **Peng, Y. H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Ishikawa, T., Yoshikawa, A., Okamoto, H.** 2002. Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Archives of Virology* **147**, 21-41.
118. **Peters, M. A., Jackson, D. C., Crabb, B. S., Browning, G. F.** 2002. Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 39566-39573.
119. **Pifferi, M., Maggi, F., Andreoli, E.** 2005. Associations between nasal torquetenovirus load and spirometric indices in children with asthma. *Journal of Infectious Disease* **192**, 1141-1148.
120. **Pifferi, M., Maggi, F., Caramella, D.** 2006 High torquetenovirus loads are correlated with bronchiectasis and peripheral airflow limitation in children. *Pediatr Infect Dis J* **25**, 804-808.
121. **Pirovano, S., Bellinzoni, M., Ballerini, C., Cariani, E., Duse, M., Albertini, A., Imberti, L.** 2002a. Transmission of SEN virus from mothers to their babies. *Journal of Medical Virology* **66**, 421-427.
122. **Pirovano, S., Bellinzoni, M., Matteelli, A., Ballerini, C., Albertini, A., Imberti, L.** 2002b. High prevalence of a variant of SENV in intravenous drug user HIV-infected patients. *Journal of Medical Virology* **68**, 18-23.
123. **Pistello, M., Morrica, A., Maggi, F., Vatteroni, M. L., Freer, G., Fornai, C., Casula, F., Marchi, S., Ciccorossi, P., Rovero, P., Bendinelli, M.** 2001. TT virus levels in the plasma of infected individuals with different hepatic and extrahepatic pathologies. *Journal of Medical Virology* **63**, 189-195.

124. **Pollicino, T., Raffa, G., Squadrito, G., Costantino, L., Cacciola, I., Brancatelli, S., Alafaci, C., Florio, M. G., Raimondo, G.** 2002. TT virus has ubiquitous diffusion in human body tissues: analyses of paired serum and tissue samples. *Journal of Viral Hepatitis* **10**, 95-102.
125. **Poovorawan Y, Tangkijvanich P, Theamboonlers A.** 2001. Transfusion transmissible virus TTV and its putative role in the etiology of liver disease. *Hepatogastroenterology* **48**, 256-260.
126. **Prescott, L. E., Simmonds, P.** 1998. Global distribution of transfusion-transmitted virus. *New England Journal of Medicine* **339**, 776-777.
127. **Primi, D., Fiordalisi, G., Mantero, J. L., Mattioli, S., Sottini, A., Bonelli, F., Vaglini, L., Olivero, P., Dal Corso, A., Monelli, M.** 2000. Identification of SENV genotypes. International patent number WO0028039 (<http://ep.es-pacenet.com/>).
128. **Raimondi, R.** 2010. Hematology Meeting Reports, vol **2**, n. 6. *Ferrata Storti Foundation*.
129. **Rodriguez-Inigo, E., Casqueiro, M., Bartolome, J., Ortiz-Movilla, N., Lopez-Alcorocho, J. M., Herrero, M., Manzarbeitia, F., Oliva, H., Carreno, V.** 2000. Detection of TT virus DNA in liver biopsies by in situ hybridization. *American Journal of Pathology* **156**, 1227-1234.
130. **Romagnani, S., Emmi, L., Almerigogna, F.** 2000. Malattie del sistema immunitario seconda edizione, *Milano, McGraw-Hill*.
131. **Saback, F. L., Gomes, S. A., Niel, C.** 2002. High frequency of mixed TT virus infections in healthy adults and children detected by a simplified heteroduplex mobility assay. *Journal of Virological Methods* **101**, 117-125.
132. **Schroter, M., Polywka, S., Zollner, B., Schafer, P., Laufs, R., Feucht, H. H.** 2000. Detection of TT virus DNA and GB virus type C/hepatitis G virus RNA in serum and breast milk: determination of mother-to-child transmission. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 745-747.
133. **Shang, D., Lin, Y. H., Rigopoulou, I., Chen, B., Alexander, G. J. M., Allain, J. P.** 2000. Detection of TT virus DNA in patients with liver disease and recipients of liver transplant. *Journal of Medical Virology* **61**, 455-461.
134. **Shibata, M., Morizane, T., Baba, T., Inoue, K., Sekiyama, K., Yoshiba, M., Mitamura, K.** 2000. TT virus infection in patients with fulminant hepatic failure. *American Journal of Gastroenterology* **95**, 3602-3606.
135. **Shibata, M., Wang, R. Y., Yoshiba, M., Shin, J. W., Alter, H. J., Mitamura, K.** 2001. The presence of a newly identified infectious agent (SEN virus) in patients with liver diseases and in blood donors in Japan. *Journal of Infectious Diseases* **184**, 400-404.

136. **Shibayama, T., Masuda, G., Ajisawa, A., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tsuda, F., Okamoto, H.** 2001. Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and CD4 cell count in patients infected with HIV. *AIDS* **20**, 536-545.
137. **Silvestrini, R.** 2005. Trapianto di cellule staminali emopoietiche e terapie cellulari innovative. *Basi scientifiche per linee guida*, ISS.
138. **Simmonds, P.** 2002. TT virus infection: a novel virus-host relationship. *Journal of Medical Microbiology* **51**, 455-458.
139. **Sirohi, B., Powles, R.** 2004. Multiple mieloma. *The Lancet* **363**, 875-887.
140. **Stark, K., Poggensee, G., Hohne, M., Bienzle, U., Kiwelu, I., Schreier, E.** 2000. Seroepidemiology of TT virus, GBV-C/HGV, and hepatitis viruses B, C, and E among women in a rural area of Tanzania. *Journal of Medical Virology* **62**, 524-530.
141. **Suzuki, C., Ishii, M., Niitsuma, H., Cervantes, J. G., Hong, S., Ojima, T., Kikuchi, K., Kobayashi, T., Ueno, Y., Kobayashi, K., Shimosegawa, T., Toyota, T.** 2000. Genoepidemiology of TT virus infection in hepatitis B virus carriers with high sensitivity PCR. *Hepatology Research* **17**, 12-18.
142. **Suzuki, F., Chayama, K., Tsubota, A., Akuta, N., Someya, T., Kobayashi, M., Suzuki, Y., Saitoh, S., Arase, Y., Ikeda, K., Kumada, H.** 2001. Pathogenic significance and organic virus levels in patients infected with TT virus. *Intervirology* **44**, 291-297.
143. **Suzuki, T., Suzuki, R., Li, J., Hijikata, M., Matsuda, M., Li, T. C., Matsuura, Y., Mishiro, S., Miyamura, T.** 2004. Identification of Basal Promoter and Enhancer elements in a untranslated region of the TT virus genome. *Journal of Virology* **78**, 10820-10824.
144. **Szladesk, G., Juhasz, A., Asztalos, L., Szoke, K., Murvai, M., Szarka, K., Veress, G., Gergely, L., Konya, J.** 2003. Persisting TT virus (TTV) genogroup 1 variants in renal transplant recipients. *Archives of Virology* **148**, 841-851.
145. **Tajiri, H., Tanaka, T., Sawada, A., Etani, Y., Kozaiwa, K., Mushiake, S., Mishiro, S.** 2001. Three cases with TT virus infection and idiopathic neonatal hepatitis. *Intervirology* **44**, 364-369.
146. **Takahashi, K., Hijikata, M., Samokhvalov, E. I., Mishiro, S.** 2000a. Full or near full length nucleotide sequences of TT virus variants (types SANBAN and YONBAN) and the TT virus-like mini virus. *Intervirology* **43**, 119-123.
147. **Takahashi, K., Iwasa, Y., Hijikata, M., Mishiro, S.** 2000b. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Archives of Virology* **145**, 979-993.

148. **Takahashi, M., Asabe, S., Gotanda, Y., Kishimoto, J., Tsuda, F., Okamoto, H.** 2002. TT virus is distributed in various leukocyte subpopulation at distinct levels, with the highest viral load in granulocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **290**, 242-248.
149. **Takayama, S., Yamazaki, S., Matsuo, S., Sugii, S.** 1999. Multiple infection of TT virus (TTV) with different genotypes in Japanese hemophiliacs, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **256**, 208-211.
150. **Tanaka, Y., Mizokami, M., Orito, E., Ohno, T., Nakano, T., Kato, T., Iida, S., Ueda, R.** 2000a. Lack of integrated TT virus (TTV) genomes into cellular DNA in infected human hematopoietic cells. *Leukemia and Lymphoma* **38**, 411-417.
151. **Tanaka, Y., Orito, E., Ohno, T., Nakano, T., Hayashi, K., Kato, T., Mukaide, M., Iida, S., Mizokami, M.** 2000b. Identification of a novel 23 kDa protein encoded by putative open reading frame 2 of TT virus (TTV) genotype 1 different from the other genotypes. *Archives of Virology* **145**, 1385-1398.
152. **Tanaka, Y., Primi, D., Wang, R. Y. H., Umemura, T., Yeo, A. E. T., Mizokami, M., Alter, H., J., Shih, J. W. K.** 2001. Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and its relationship to the TT virus family. *Journal of Infectious Diseases* **183**, 359-367.
153. **Tawara, A., Akahane, Y., Takahashi, M., Nishizawa, T., Ishikawa, T., Okamoto, H.** 2000. Transmission of human TT virus of genotype 1a to chimpanzees with fecal supernatant or serum from patients with acute TTV infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **278**, 470-476.
154. **Todd, D., McNulty M.S., Adair B. M., Allan G. M.** 2001. Animal Circoviruses. *Advances in virus research* **57**, 1-70.
155. **Tokita, H., Murai, S., Kamitsukasa, H., Yagura, M., Harada, H., Hebisawa, A. Takahashi, M., Okamoto, H.** 2001a. Influence of TT virus on the histopathological features of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology Research* **19**, 197-211.
156. **Tokita, H., Murai, S., Kamitsukasa, H., Yagura, M., Harada, H., Tawara, A. Takahashi, M., Okamoto, H.** 2001b. Influence of TT virus on the clinical course of alcoholic liver disease. *Hepatology Research* **19**, 180-193.
157. **Tokita, H., Murai, S., Kamitsukasa, H., Yagura, M., Harada, H., Takahashi, M., Okamoto, H.** 2001c. Influence of TT virus infection on the thrombocytopenia of patients with chronic liver disease. *Hepatology Research* **20**, 288-300.
158. **Tokita, H., Murai, S., Kamitsukasa, H., Yagura, M., Harada, H., Takahashi, M., Okamoto, H.** 2002. High TT virus load as an

independent factor associated with the occurrence of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Journal of Medical Virology* **667**, 501-509.

159. **Touinssi, M., Gallian, P., Biagini, P., Attoui, H., Vialettes, B., Berland, Y., Tamalet, C., Dhiver, C., Ravaux, I., de Micco, P., de Lamballerie, X.** 2001. TT virus infection: prevalence of elevated viraemia and arguments for the immune control of viral load. *Journal of Clinical Virology* **21**, 135-141.

160. **Tsuda, F., Okamoto, H., Ukita, M., Tanaka, T., Akahane, Y., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M.** 1999. Determination of antibodies to TT virus (TTV) and application to blood donors and patients with post-transfusion non-A to G hepatitis in Japan. *Journal of Virological Methods* **77**, 199-206.

161. **Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T., Akahane, Y., Konishi, K., Yoshizawa, H., Okamoto, H.** 2001. IgM-class antibodies to TT virus (TTV) in patients with acute TTV infection. *Hepatology Research* **19**, 1-11.

162. **Tuveri, R., Jaffredo, F., Lunel, F., Nalpas, B., Pol, S., Feray, C., Marcellin, P., Thibault, V., Delagneau, J. F., Opolon, P., Scarpa, B., Brechot, C., Thiers, V.** 2000. Impact of TT virus infection in acute and chronic, viral- and non viral-related liver diseases. *Journal of Hepatology* **33**, 121-127.

163. **Ukita, M., Okamoto, H., Kato, N., Miyakawa, Y., Mayumi, M.** 1999. Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associate with acute and chronic non-A-G hepatitis. *Journal of Infectious Diseases* **179**, 1245-1248.

164. **Ukita, M., Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Takahashi, M., Iizuka, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M.** 2000. The entire nucleotide sequences of two distinct TT virus (TTV) isolates (TJN01 and TJN02) remotely related to the original TTV isolates. *Archives of Virology* **145**, 1543-1559.

165. **Umemura, T., Alter, H. J., Tanaka, E., Yeo, A. E. T., Shih, J. W. K., Orii, K., Matsumoto, A., Yoshizawa, K., Kiyosawa, K.** 2001a. Association between SEN virus infection and hepatitis C in Japan. *Journal of Infectious Diseases* **184**, 1246-1251.

166. **Umemura, T., Tanaka, Y., Kiyosawa, K., Alter, H. J., Shih, J. W. K.** 2001b. Observation of positive selection within hypervariable regions of a newly identified DNA virus (SEN virus). *FEBS Letters* **25640**, 1-4.

167. **Umemura, T., Alter, H. J., Tanaka, E., Orii, K., Yeo, A. E., Shih, J. W., Matsumoto, A., Yoshizawa, K., Kiyosawa, K.** 2002. SEN virus: response to interferon alpha and influence on the severity and treatment response of coexistent hepatitis C. *Hepatology* **35**, 953-959.

168. **Vasconcelos, H. C. F., Cataldo, M., Niel, C.** 2002. Mixed infections of adults and children with multiple TTV-like mini virus isolates. *Journal of Medical Virology* **68**, 291-298.

169. **Viazov, S., Rossi, R. S., Niel, C., de Oliveira, J. M., Varenholz, C., Da Villa, G., Roggendorf, M.** 1998. Sequenze variabilità in the putative coding region of TT virus: evidence for two rather than several major types. *Journal of General Virology* **79**, 3085-3089.
170. **Watanabe, H., Saito, T., Kawamata, O., Shao, L., Aoki, M., Terui, Y., Mitsuhashi, H., Matsuo, T., Takeda, Y., Saito, K., Togashi, H., Shinzawa, H., Takahashi, T.** 2000. Clinical implications of TT virus superinfection in patient with chronic hepatitis C. *American Journal of Gastroenterology* **95**, 1776-1780.
171. **White, P. A., Li, Z., Zhai, X., Marinos, G., Rawlinson, W. D.** 2000. Mixed viral infection identified using heteroduplex mobility analysis (HMA). *Virology* **271**, 382-389.
172. **Wilson, L. E., Umemura, T., Astemborski, J., Ray, S. C., Alter, H. J., Strathdee, S. A., Vlahov, D., Thomas, D. L.** 2001. Dynamics of SEN virus infection among injection drug users. *Journal of Infectious Diseases* **184**, 1315-1319.
173. **Wong, S. G., Primi, D., Kojima, H., Sottini, A., Giulivi, A., Zhang, M., Uhanova, J., Minuk, G. Y.** 2002. Insights into SEN virus prevalence, transmission, and treatment in community-based persons and patients with liver disease referred to a liver disease unit. *Clinical Infectious Diseases* **35**, 789-795.
174. **Worobey, M.** 2000. Extensive homologous recombination among widely divergent TT viruses. *Journal of Virology* **74**, 7666-7670.
175. **Yokoyama, H., Yasuda, J., Okamoto, H., Iwakura, Y.** 2002. Pathological changes of renal epithelial cells in mice transgenic for the TT virus ORF1 gene. *Journal of General Virology* **83**, 141-150.
176. **Yoshida, H., Kato, N., Shiratori, Y., Shao, R., Wang, Y., Shiina, S., Omata, M.** 2002. Weak association between SEN virus viremia and liver disease. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 3140-3145.
177. **Yu, Q., Shiramizu, B., Nerurkar, VR., Hu, N., Shikuma, CM., Melish, ME., Cascio, K., Imrie, A., Lu, Y., Yanagihara, R.** 2002. TT virus: preferential distribution in CD19+ peripheral blood mononuclear cells and lack of viral integration. *Journal of Medical Virology* **66**, 276-284.
178. **Yuki, N., Kato, M., Masuzawa, M., Ishida, H., Inoue, T., Tabata, T., Matsushita, Y., Kishimoto, H., Sasaki, Y., Hayashi, N., Hori, M.** 1999. Clinical implications of coinfection with a novel DNA virus (TTV) in hepatitis C virus carriers on maintenance hemodialysis. *Journal of Medical Virology* **59**, 431-436.
179. **Zein, N. N., Arslan, M, Li, H.** 1999. Clinical significance of TT virus infection in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* **94**, 3020-3027.

180. **Zhong, S., Yeo, W., Tang, M., Liu, C., Lin, X., Ho, W.M., Hui, P., Johnson, P.J.** 2002. Frequent detection of the replicative form of TT virus DNA in peripheral blood mononuclear cells and bone marrow cells in cancer