

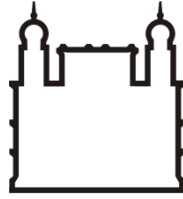
**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***TORQUE TENO VIRUS EM AMOSTRAS FEZES DE PACIENTES COM
GASTROENTERITE: PREVALÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO POR GENOGRUPOS
E CARGA VIRAL***

CARLOS AUGUSTO PINHO DO NASCIMENTO

RIO DE JANEIRO

MAIO DE 2011



**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

CARLOS AUGUSTO PINHO DO NASCIMENTO

***TORQUE TENO VIRUS* EM AMOSTRAS FEZES DE PACIENTES COM
GASTROENTERITE: PREVALÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO POR GENOGRUPOS
E CARGA VIRAL**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

ORIENTADOR: Dr. Christian Maurice Gabriel Niel

RIO DE JANEIRO

MAIO DE 2011

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

N244

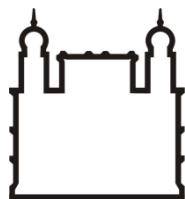
Nascimento, Carlos Augusto Pinho do.

Torque Teno Virus em amostras fezes de pacientes com gastroenterite : prevalência, distribuição por genogrupos e carga viral. / Carlos Augusto Pinho do Nascimento. – Rio de Janeiro, 2011. ix, 47 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011.
Bibliografia: f. 32-47

1. *Torque Teno Virus*. 2. *Anelloviridae*. 3. Coinfecção. 4. Suspensões fecais. 5. PCR. 6. Brasil. I. Título.

CDD 616.91



**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

CARLOS AUGUSTO PINHO DO NASCIMENTO

***TORQUE TENO VIRUS EM AMOSTRAS FEZES DE PACIENTES COM
GASTROENTERITE: PREVALÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO POR GENOGRUPOS
E CARGA VIRAL***

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

ORIENTADOR: Dr. Christian Maurice Gabriel Niel

BANCA EXAMINADORA

Dra. Vanessa Salete de Paula – Instituto Oswaldo Cruz

Dra. Marize Pereira Miagostovich – Instituto Oswaldo Cruz

Dra. Claudia Maria Dornelles da Silva – Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

Aprovada em: 26/05/2011

RIO DE JANEIRO

MAIO DE 2011

À minha família,

Pelo incentivo, apoio e carinho. Minha admiração e amor por vocês foi o que me motivou chegar até aqui. Sem dúvida vocês são a parcela mais importante dessa conquista. Agradeço todos os dias por ter vocês na minha vida. Obrigado por tudo. Somos loucos, mas nos amamos.

AGRADECIMENTOS

Ao pensar em Fiocruz, não me vem à cabeça apenas a pesquisa, mas sim, um período da minha vida. Além de todo o conhecimento que adquiri aqui, eu conquistei muitas outras coisas preciosas. Comecei uma vida profissional, aprendi o que é ciência, tive problemas e ótimos resultados. Sem dúvida, aprendi muito com isso tudo. Hoje, levo comigo não apenas o aprendizado, mas também um dos períodos mais importantes da minha vida, cheio de memórias que sempre me acompanharão. Isso se deve às pessoas que eu tive a oportunidade de conviver por esses anos. A todos que fizeram esse período inesquecível, muito obrigado.

Ao Dr. Christian Niel, meu orientador, primeiramente pela oportunidade de integrar a equipe do Laboratório de Virologia Molecular, pelo exemplo de ética e profissionalismo, pelo conhecimento que me foi transmitido e pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento desse projeto. Almejo um dia ser um profissional como o senhor;

Ao Dr. Leonardo Diniz, meu co-orientador, mais que isso, meu amigo, por me passar todos os conhecimentos necessários para realização de um trabalho de pesquisa, seja na bancada ou intelectualmente. Um trabalho sério e de qualidade pode ser feito com dedicação e a vida ser levada com bom humor. Agradeço principalmente pela grande amizade formada nesse período que, sem dúvida, é verdadeira. Valeu, CARA!

Ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite, pela colaboração concedendo as amostras para realização desse trabalho;

À Dra. Vanessa Salete de Paula pela revisão.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade de participação.

À Dra. Selma, por abrir o espaço no laboratório para esse trabalho e por todas as sugestões;

À minha família, mãe, pai, Renato e Charles, que sem ela, nada disso seria possível, por estar ao meu lado em todo e qualquer momento. Obrigado por tudo! Hoje eu sou um pouco de cada um de vocês.

À minha Priscila, pelo amor, apoio, companheirismo, amizade e acima de tudo pela paciência de ouvir as incertezas da minha carreira. Quero você sempre ao meu lado. Juntos, podemos conquistar tudo o que queremos. Vamos formar uma bela família. Amo você!

Ao amigo Chico, pela grande amizade, dentro e fora da Fiocruz, pelas cervejas e farras, por “trocar uma idéia” nos momentos difíceis. “Meu irmãoão, a melhor esfirra do mundo!”

À amiga Carol, por toda amizade, por aceitar minhas implicâncias, por todas as divergências de opinião, pelas caronas. Eu implico, mas é só porque eu gosto de você. Quando o carro quebrar pode chamar!

Às meninas do Laboratório de Virologia Molecular: Flavia, Nique, Babi, Nath, Kelly, Sylvie e Fabí pela amizade e por tornar os dias de trabalho muito agradáveis, obrigado pelo auxílio e apoio sempre;

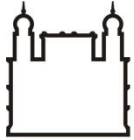
À equipe que está se formando no Laboratório de Virologia Molecular: Márcia Terezinha, Oscar, Rachel, Sérgio, Junior, Michele, Elza, Márcia Pimenta, Raphael e Marília. Agradeço a todos. Sejam muito bem vindos, desejo muito sucesso a vocês;

Ao CNPq e à FAPERJ, pelo apoio financeiro.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

“Que beleza é sentir a natureza
Ter certeza pra onde vai
E de onde vem
Que beleza é vir da pureza
E sem medo distinguir
O mal e o bem...”

(Tim Maia)



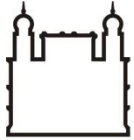
TORQUE TENO VIRUS EM AMOSTRAS FEZES DE PACIENTES COM GASTROENTERITE: PREVALÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO POR GENOGUPOS E CARGA VIRAL

RESUMO

O *Torque teno virus* (TTV) é um vírus de DNA do gênero *Alphatorquevirus* da família *Anelloviridae*. O TTV é altamente prevalente em populações de todo o mundo. Isolados foram classificados em cinco grupos filogenéticos (1-5) com grande distância genética entre eles. A presença do TTV já foi detectada nas fezes, porém, não se sabe se todos os cinco genogrupos do TTV são excretados nas fezes, e qual a distribuição do TTV entre os genogrupos. A fim de avaliar a presença, a diversidade genômica e a carga viral do TTV em fezes, 135 amostras de pacientes com gastroenterite foram analisadas. O DNA do TTV foi extraído de suspensão fecal e três diferentes métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR), dois qualitativos e um quantitativo, foram avaliados. Nas amostras de fezes estudadas, 123 (91,1%) foram positivas em pelo menos um dos três métodos. O DNA do TTV pertencente aos genogrupos de 1 a 5 foi detectado em 37 (27,4%), 27 (20,0%), 57 (42,2%), 29 (21,5%) e 33 (24,4%) amostras, respectivamente. Co-infecções com dois, três, quatro e cinco genogrupos do TTV foram encontradas em 23 (17,0%), 15 (11,1%), 7 (5,2%) e 7 (5,2%) amostras fecais, respectivamente. Assim, 52 (38,5%) amostras continham mais de um genogrupo de TTV. A carga viral variou de 2,6 a 6,5 log de genoma equivalentes por grama de fezes. No entanto, variações de carga viral foram observadas em função do genogrupo detectado e do número de genogrupos presentes simultaneamente. Os resultados encontrados são os primeiros a mostrar a alta prevalência e a diversidade de TTV nas fezes humanas.

Palavras-chave: TTV, *Anelloviridae*, Coinfecção, Suspensões fecais, PCR,

Brasil



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Master Dissertation

Carlos Augusto Pinho do Nascimento

PREVALENCE, GENOGROUPS DISTRIBUTION AND VIRAL LOAD OF *TORQUE TENO VIRUS* IN FECAL SAMPLES OF PATIENTS WITH GASTROENTERITIS

ABSTRACT

Torque teno virus (TTV) is a DNA virus of the genus *Alphatorquevirus* of the *Anelloviridae* family. The TTV is highly prevalent in populations from around the world. Isolates have been classified into at least five main phylogenetic groups (1-5) showing a large genetic distance between them. The presence of TTV has been detected in feces. However, are presently unknown whether all five TTV genogroups are excreted in feces and the genogroup distribution. To evaluate the presence and the genomic distribution of TTV DNA in feces, 135 samples of patients with gastroenteritis were analyzed. The DNA was extracted of fecal suspension and three different PCR methods, two qualitative and one quantitative, were used. One hundred and twenty three (91.1%) samples were positive with at least one method. The TTV DNA belonging to the genogroups 1 to 5 was detected in 37 (27.4%), 27 (20.0%), 57 (42.2%), 29 (21.5%) and 33 (24.4%) fecal samples, respectively. Coinfections with two, three, four and five TTV genogroups were found in 23 (17.0%), 15 (11.1%), 7 (5.2%) and 7 (5.2%) fecal samples, respectively. Thus, 52 (38.5%) samples contained more than one TTV genogroup. Viral loads ranged from 2.6 to 6.5 log genome equivalents per gram of feces. However, variations of viral load were noted depending on genogroup and number of coinfecting TTV genogroups. These results are the first to show high prevalence and the diversity of TTV isolates in human feces.

Key-words: *Anelloviridae*, Brazil, Coinfection, Fecal Suspension, PCR, TTV

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aa	Aminoácidos
AstV	Astrovirus
CAV	Chicken anaemia virus
Ct	Cycle Threshold
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
G1	Genogrupo 1
G2	Genogrupo 2
G3	Genogrupo 3
G4	Genogrupo 4
G5	Genogrupo 5
gEqs	Genoma equivalente
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
kb	Kilobase(s)
NAAT	Nucleic acid amplification test (teste de amplificação de ácidos nucleicos)
NCR	Região não-codificante (non coding region)
NoV	Norovirus
ORF	Fase aberta de leitura (open reading frame)
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCV	Porcine circo virus
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RV	rotavirus
Tris-HCL	Tris-hidroximetil amino-metano
TTMDV	Torque teno midi virus
TTMV	Torque teno mini virus
TTV	Torque teno virus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Dendrograma construído com base na análise filogenética das sequências nucleotídicas da fase aberta de leitura 1 dos três anelovírus humanos, <i>torque teno virus</i> (TTV), <i>torque teno mini vírus</i> (TTMV) e <i>torque teno midi vírus</i> (TTMDV)	3
Figura 1.2. Organização do genoma do <i>torque teno virus</i>	5
Figura 1.3. Localização das seis fases abertas de leitura do <i>torque teno virus</i> (TTV) no genoma do isolado HEL32..	6
Figura 1.4. Classificação de variantes do <i>torque teno virus</i> em cinco grupos genômicos distintos em uma análise filogenética realizada utilizando o genoma completo do vírus	8
Figura 1.5. Imagem obtida em microscopia eletrônica demonstrando as partículas virais do <i>torque teno virus</i> nas fezes.....	14
Figura 1.6. Rotas de transmissão de vírus entéricos no ambiente.....	15

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Histórico e Classificação	2
1.2. Estrutura e Genoma Viral.....	4
1.3. Variabilidade Genética	7
1.4. Detecção do TTV	9
1.4.1. Cultura de células	9
1.4.2. Modelos animais.....	10
1.4.3. Detecção de anticorpos	10
1.4.4. Microscopia eletrônica	10
1.4.5. Amplificação do DNA viral	11
1.5. Potencial Patogênico.....	12
1.6. Epidemiologia e Modos de Transmissão.....	12
1.7. TTV em Fezes.....	14
1.8. Gastroenterites.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo Geral	19
3.2. Objetivos Específicos	19
4. RESULTADOS	20
4.1. Artigo Publicado	20
5. DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÕES.....	30
7. PERSPECTIVAS	31
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e Classificação

O *Torque teno vírus* (TTV) foi descoberto em 1997 no Japão, no soro de um paciente com hepatite pós-transfusional de etiologia desconhecida, pela tecnologia de análise de diferença representacional (do inglês "*representational difference analysis*"). Neste estudo, foram utilizadas amostras coletadas antes e durante o aumento dos níveis de transaminases hepáticas do paciente. A análise de uma sequência nucleotídica com tamanho de 500 pares de bases (pb), não apresentou identidade com as sequências disponíveis nos bancos de dados, sugerindo a presença de um agente até então desconhecido (Nishizawa *et al.*, 1997).

A sigla TTV inicialmente foi atribuída às iniciais do nome do paciente em que o vírus foi descoberto. Mais tarde, TTV passou a representar a abreviatura de vírus transmitido por transfusão (do inglês "*transfusion transmitted virus*") (Nishizawa *et al.*, 1997). Posteriormente, percebeu-se que esta designação não contemplava as características epidemiológicas do vírus, uma vez que este pode ser transmitido através de outras vias como, por exemplo, a fecal-oral (Luo & Zhang, 2001). Dessa forma, a sigla foi mantida, mas passou a representar *torque teno virus* devido as suas características de genoma circular, fita-simples (do latim "*torques*" que significa colar e "*tenuis*" que significa fino) (Biagini, 2004).

Com a identificação do primeiro clone do TTV (TA278), imaginou-se que se tratava de um integrante da família *Parvoviridae* (caracterizada por integrar vírus de DNA fita-simples linear) por se tratar de um vírus de DNA fita simples (Okamoto *et al.*, 1998b). No entanto, após o sequenciamento completo e a consequente descoberta da natureza circular do genoma (Miyata *et al.*, 1999; Mushahwar *et al.*, 1999), o TTV passou a ser classificado como integrante da família *Circoviridae* (Takahashi *et al.*, 1998b) e foi considerado o primeiro vírus de DNA circular fita simples responsável pela infecção em humanos. Os vírus desta família eram conhecidos por infectar somente animais. Como exemplo, podemos citar o circovírus de porcos, PCV (do inglês "*porcine circovirus*") (Tischer *et al.*, 1982) e o vírus da anemia de galinhas, CAV (do inglês "*chicken anaemia virus*") (Noteborn *et al.*, 1991). As principais características encontradas no TTV e nos circovírus são: a presença de

apenas uma proteína estrutural, a natureza circular do seu genoma e a sobreposição de fases abertas de leitura (ORF do inglês open reading frame) (Meehan *et al.*, 1997).

Atualmente, o TTV é classificado como membro do gênero *Alphatorquevirus*, da família *Anelloviridae* (Carstens, 2010) na qual também se encontram dois vírus com organização genômica semelhante à do TTV, o *torque teno midivírus* (TTMDV) (Ninomiya *et al.*, 2007) e o *torque teno minivírus* (TTMV) (Takahashi *et al.*, 2000). A análise das sequências nucleotídicas da ORF 1 dos três vírus demonstra que eles formam grupos filogenéticos distintos (Figura 1.1).

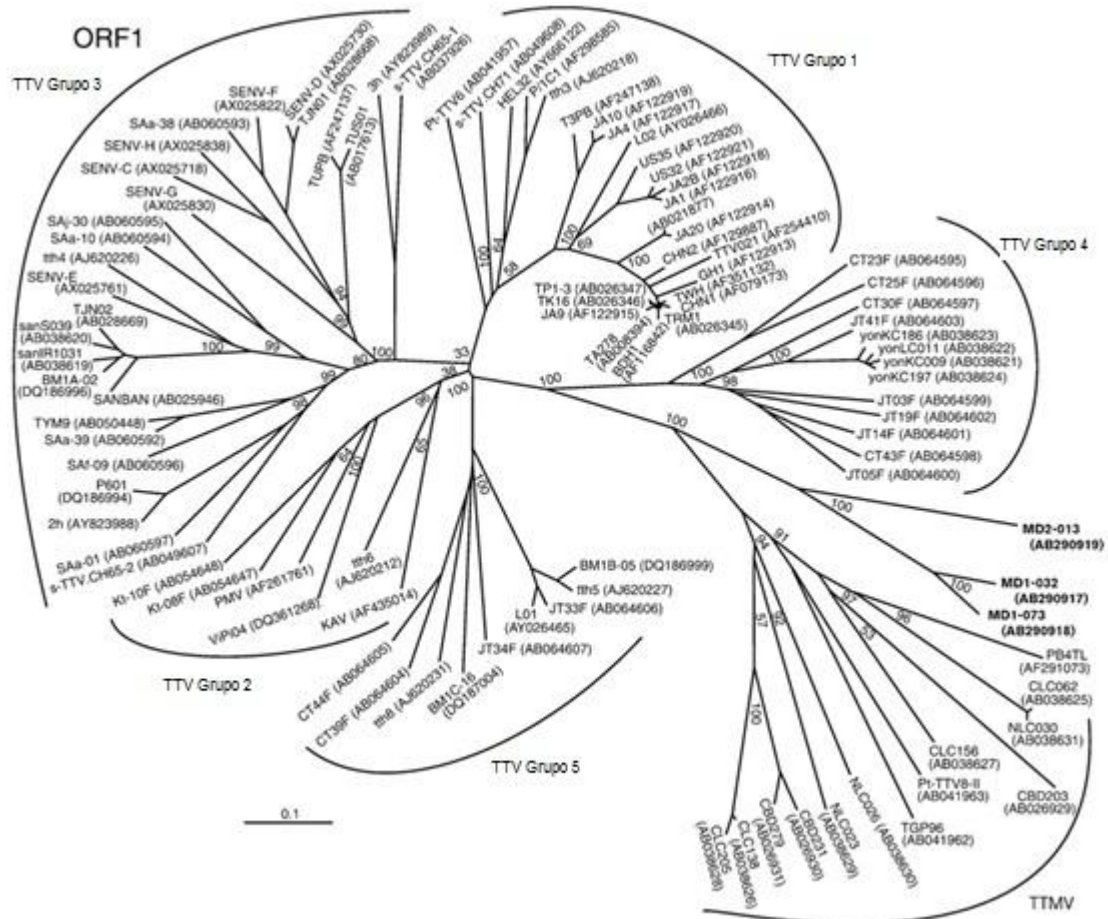


Figura 1.1.1. Dendrograma construído com base nas sequências nucleotídicas da fase aberta de leitura 1 dos três anelovírus humanos, *torque teno virus* (TTV), *torque teno minivírus* (TTMV) e *torque teno midivírus* (TTMDV) (isolados com nomes iniciados por MD em negrito). A barra de escala representa o número de substituição de nucleotídeos por posição. Adaptado de: Ninomiya *et al.*, 2007.

Outras espécies de TTV também estão classificadas nessa família, que infectam especificamente animais como cães (Okamoto *et al.*, 2002), gatos (Okamoto *et al.*, 2002; Biagini *et al.*, 2007) e porcos (Okamoto *et al.*, 2002; Niel *et al.*, 2005; Martelli *et al.*, 2006; Kekarainen *et al.*, 2007; Brassard *et al.*, 2008).

1.2. Estrutura e Genoma Viral

O TTV é um vírus não-envelopado, que apresenta uma partícula 30 a 50 nm de diâmetro. Como explicado no histórico e classificação, o TTV possui um genoma composto por uma fita simples de DNA circular, o qual é de polaridade negativa, com tamanho de aproximadamente 3.800 bases (Miyata *et al.*, 1999). O genoma do TTV é dividido em uma região codificante, com aproximadamente 2.600 nucleotídeos, e uma não-codificante (NCR), com cerca de 1.200 nucleotídeos. A região codificante apresenta pelo menos quatro ORFs sobrepostas (Miyata *et al.*, 1999) (Figura 1.2), formadas a partir de três RNAs mensageiros (RNAm) distintos. Alguns estudos já demonstraram a existência de outras duas ORFs, mas ainda são poucas as informações a respeito dessas (Qiu *et al.*, 2005). Já a segunda, a região não codificante, possui uma região promotora *TATA box* (Hallett *et al.*, 2000) e um segmento, com aproximadamente 110 nucleotídeos, rico em citosinas e guaninas (~90%), onde ocorre a formação de estruturas secundárias importantes para a replicação viral (Miyata *et al.*, 1999; Mushahwar *et al.*, 1999).

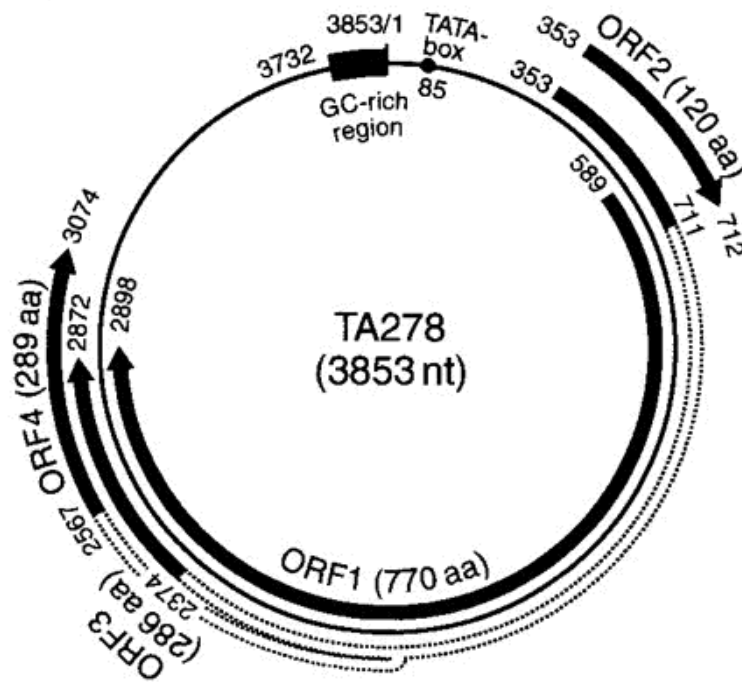


Figura 1.1.2. Organização do genoma do *torque teno virus* (Okamoto *et al.* 2001b)

Os três RNAm gerados pela região codificante possuem tamanhos de 2,8 kb, 1,2 kb e 1,0 kb e são formados por um processo conhecido como processamento alternativo do RNA (do inglês “*alternative splicing*”) a partir da região compreendida entre os nucleotídeos 109 e 3006 do isolado TYM9 (Okamoto *et al.*, 2000a). Um estudo utilizando o genótipo 6 do TTV (Kakkola *et al.*, 2002) sugere que esses três RNAm dão origem a seis fases ORFs que codificam proteínas hipotéticas de aproximadamente 736 aminoácidos (aa) [ORF1], 117 aa [ORF2], 281 aa [ORF2/2], 275 aa [ORF1/1], 195 aa [ORF2/3] e 142 aa [ORF1/3] (Qiu *et al.*, 2005) (Figura 1.3).

A partir do RNAm de 2,8 kb são traduzidas duas proteínas. Uma diretamente a partir da ORF 1, que codifica uma proteína estrutural, responsável pela formação do capsídeo viral (Hallett *et al.*, 2000), e outra a partir da ORF 2 que produz uma proteína que atua na defesa viral (Zheng *et al.*, 2007) contra o ataque do sistema imunológico do hospedeiro. Estas duas ORFs são oriundas da leitura do RNAm em duas fases diferentes, 1 e 2, respectivamente, e não sofrem processamento posterior. O RNAm de 1,2 kb codifica outras duas proteínas: (i) a ORF 2/2 a qual acredita-se que induza a apoptose celular (Kooistra *et al.*, 2004), essa é formada pela junção das extremidades amino e carboxi-terminais que se encontram na fase 2, e (ii) a ORF 1/1, formada pela junção das extremidades amino e carboxi-terminais

que se encontram na fase 1. As ORFs 2/3 e 1/2 têm sua origem a partir do RNAm de 1 kb. A proteína originada da ORF 2/3 é formada pela junção de uma porção amino-terminal traduzida de um segmento que se encontra na fase 2 e de uma região carboxi-terminal traduzida de um segmento oriundo da fase 3 (Kamahora *et al.*, 2000). Diferentemente, a ORF 1/2 codifica uma proteína formada pela junção de uma porção amino-terminal traduzida de um segmento da fase 1 e de uma região carboxi-terminal traduzida de um segmento da fase 2 (Figura 1.3). As funções das proteínas oriundas das ORFs 1/1, 2/3 e 1/2 ainda encontram-se sob estudo e as duas últimas não foram encontradas em todos os isolados do TTV (Qiu *et al.*, 2005).

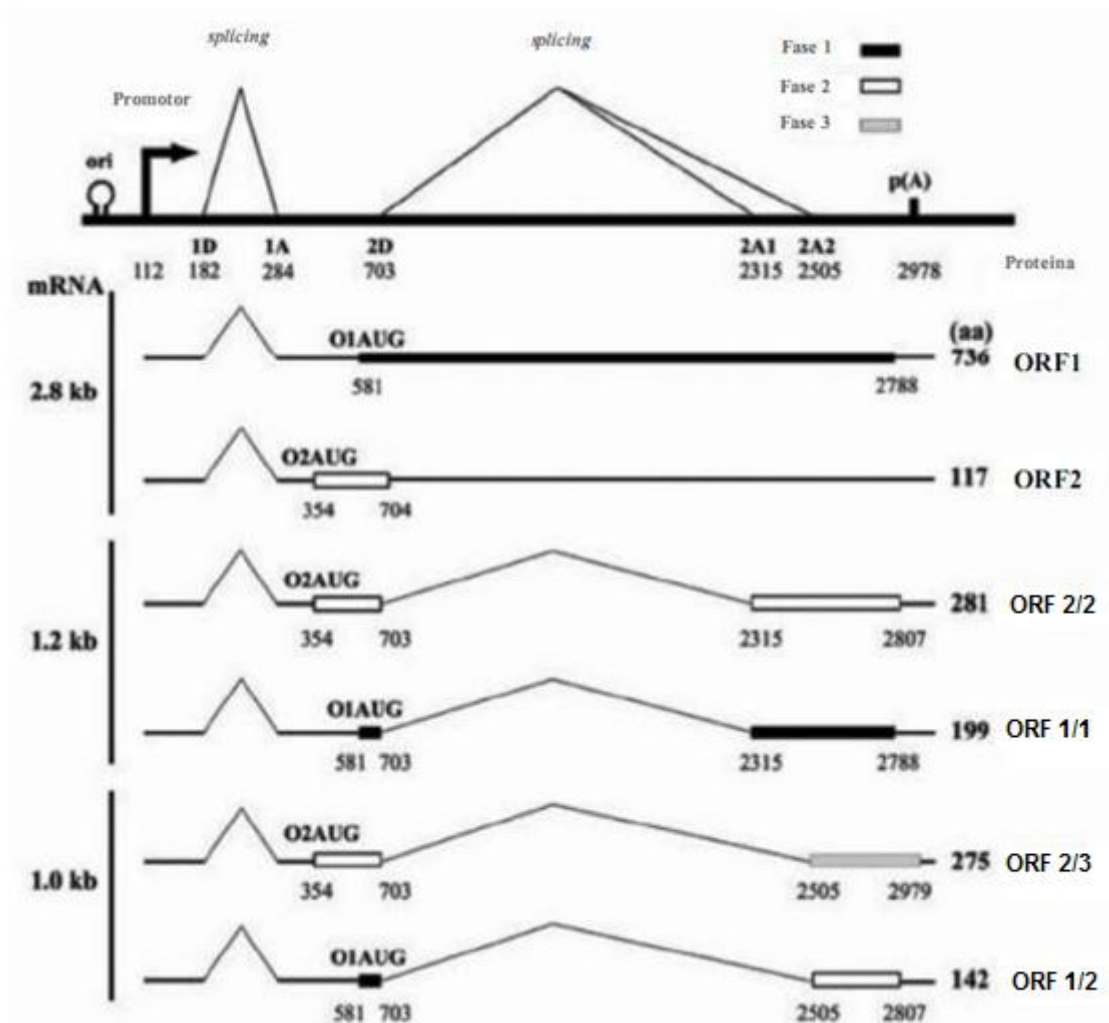


Figura 1.1.3. Localização das seis fases abertas de leitura do *Torque teno virus* no genoma do genótipo 6.

Adaptado de Qiu *et al.*, 2005.

1.3. Variabilidade Genética

O TTV possui grande variabilidade genética, apesar de ser um vírus de DNA (Tanaka *et al.*, 1998; Biagini *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 1999; Hallett *et al.*, 2000; Romeo *et al.*, 2000). A variabilidade genética não ocorre de forma homogênea em toda a extensão do genoma viral, sendo mais conservada a região não codificante (NCR), o que sugere a existência de uma função essencial na regulação da replicação viral. A variabilidade genética é mais elevada em algumas regiões específicas como, por exemplo, a denominada região de hipervariabilidade, localizada na região codificante, a qual tem aproximadamente 2/3 do genoma viral (Okamoto *et al.*, 1999a).

Análises filogenéticas do sequenciamento da ORF 1 do genoma viral revelaram que o TTV pode ser dividido em genótipos com até 30% de diferença nucleotídica entre eles (Okamoto *et al.*, 1999b), encontrados sem relação direta com a sua distribuição geográfica ou patogenia (Hohne *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1998; Viazov *et al.*, 1998; Biagini *et al.*, 1999; Mushahwar *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 1999b). O TTV possui mais de 30 genótipos descritos até o momento e, atualmente, estão classificados em cinco grandes grupos filogenéticos (Figura 1.4), conhecidos como genogrupos ou grupos genômicos, numerados de 1 a 5 (Peng *et al.*, 2002), cuja distância genética entre eles é superior a 60% (baseado na ORF1). A cepa TA278, o primeiro representante caracterizado (protótipo), foi identificado no Japão e classificado como representante do grupo genômico 1 (Okamoto *et al.*, 1998b); os isolados PMV (Hallett *et al.*, 2000) e KAV (Heller *et al.*, 2001) foram identificados na Europa e são classificados no genogrupo 2; o TUS01 foi isolado nos Estados Unidos e é o representante do genogrupo 3 (Okamoto *et al.*, 1999b). As cepas representantes do genogrupo 4 (Takahashi *et al.*, 2000) e do genogrupo 5 (Peng *et al.*, 2002) foram isoladas no Japão em soros de pacientes japoneses e chineses. No Brasil, em um estudo de prevalência realizado em doadores de sangue, indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) e do vírus da hepatite B, foram encontradas prevalências de 46%, 43%, 35%, 18% e 17% para os genogrupos 5, 3, 1, 2 e 4, respectivamente (Devalle & Niel, 2004).

Uma vez que a variabilidade genética do TTV é muito elevada, novos genótipos e até genogrupos ainda podem ser desconhecidos. Novas técnicas cada vez mais

sensíveis e capazes de detectar um maior número de isolados vêm sendo utilizadas. Contudo, essas metodologias são baseadas na detecção de sequências nucleotídicas do vírus previamente conhecidas, dificultando a detecção de genomas virais de variantes do TTV ainda desconhecidos. Além disso, ainda não há um método universal para detecção desse vírus, permitindo a detecção de diferentes prevalências seja constantemente relatada (Ninomiya *et al.*, 2008).

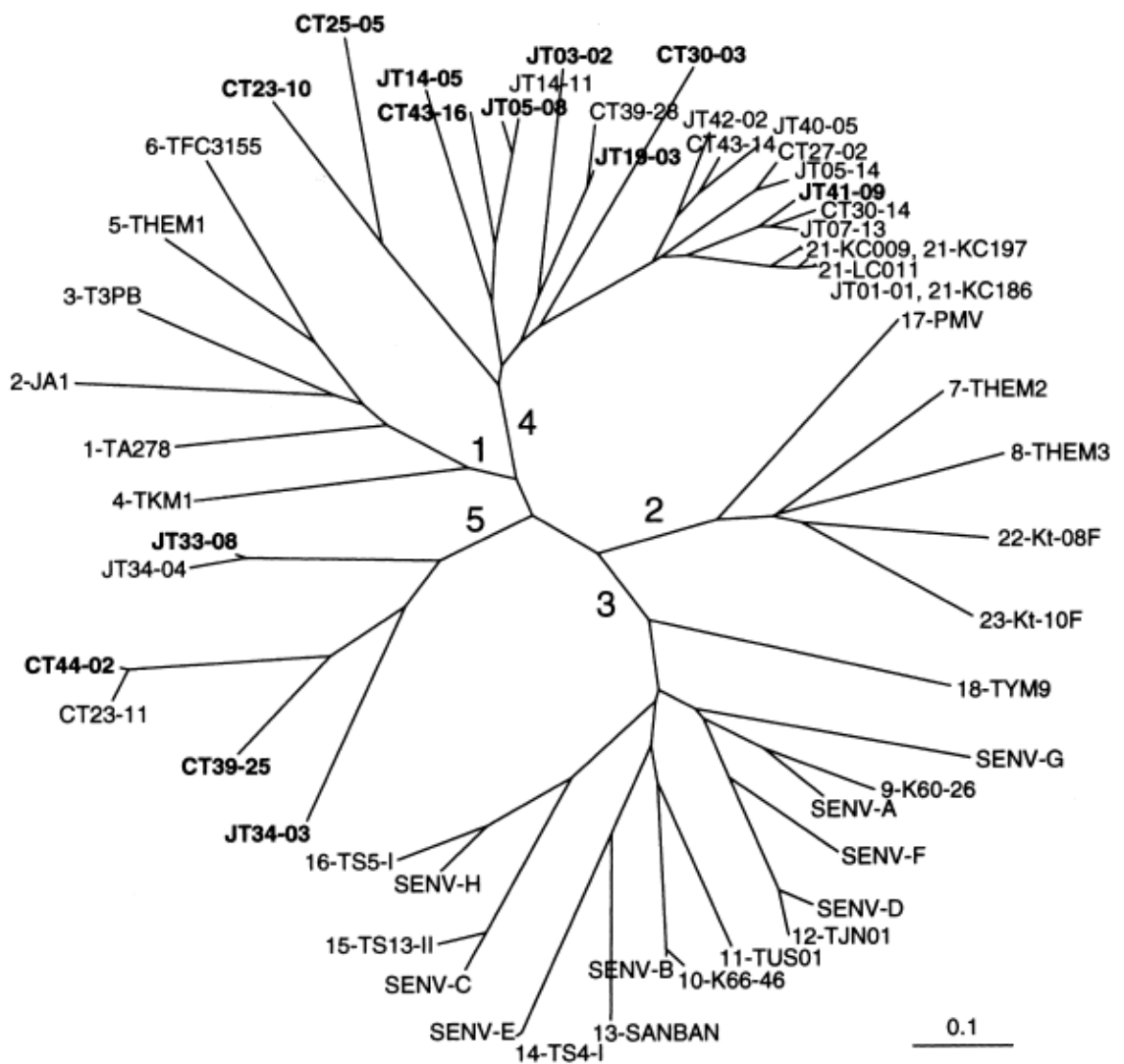


Figura 1.1.4. Classificação de variantes do TTV em cinco grupos genômicos distintos em uma análise filogenética utilizando o genoma completo do vírus
Fonte: Peng *et al.*, 2002.

A presença dos cinco grupos genômicos do TTV tem sido relatada em diferentes populações estudadas, seja em pacientes acometidos por alguma patologia ou, até mesmo, em indivíduos saudáveis. O genogrupo 3 é comumente

descrito como o com maior número de isolados e os genogrupos 2 e 4 os menos prevalentes (Hallett *et al.*, 2000; Maggi *et al.*, 2003; Devalle & Niel, 2004; Biagini *et al.*, 2006). A detecção de isolados de TTV de diferentes genogrupos (coinfecção) já foi diversas vezes reportada no soro de um mesmo paciente (Ball *et al.*, 1999; Forns *et al.*, 1999; Niel *et al.*, 2000; Devalle & Niel, 2004; Devalle *et al.*, 2009).

Diversos autores já discutiram a possível existência de propriedades biológicas distintas entre isolados do TTV, principalmente entre genótipos e genogrupos. Essas características particulares seriam responsáveis pelo desencadeamento de determinadas patologias (Hallett *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 2000b; Maggi *et al.*, 2006). Alguns estudos detectaram diferentes combinações de genótipos do TTV em tecidos distintos, o que sugere a existência de tropismo por órgãos específicos. De fato, caso os diferentes genogrupos ou genótipos do TTV possuam tropismo celular, as partículas virais poderiam vir a ser liberadas por diferentes vias de transmissão (Deng *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 2000b; Maggi *et al.*, 2003).

Contudo, apesar da suspeita de haver diferença nas vias de eliminação dos genogrupos do TTV, até hoje não se sabe a respeito da distribuição desses nas fezes, que seria uma das vias mais importantes de disseminação desse vírus.

1.4. Detecção do TTV

1.4.1. Cultura de células

Até a presente data, não há registro sobre o cultivo celular bem-sucedido de TTV *in vitro*. Contudo, o uso de vetores de expressão já foi utilizado para obtenção de mRNAs e proteínas que deram origem a dados de altíssima relevância a cerca dos estudos do TTV (Qiu *et al.*, 2005; Kakkola *et al.*, 2008). Vários tipos de células eucarióticas já foram transfectadas com sucesso, dentre elas, células de rim de macaco COS-1, células embrionárias de rim humano 293, linhagens celulares de linfoma (Raji, L428, BJAB), linhagens celulares de leucemia (Jurkat, HSB2), de hepatocarcinoma (HepG2, Hep3B, HUH-7, Chang), de osteosarcoma (Saos-2, U2OS), de carcinoma pulmonar humano (H1299) (Kamahora *et al.*, 2000; Asabe *et al.*, 2001; Kooistra *et al.*, 2004; Desai *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2005; Leppik *et al.*, 2007).

1.4.2. Modelos animais

Estudos de infecção experimental de TTV humano em primatas (macaco *Rhesus*) já foram descritos, elucidando algumas hipóteses, como as vias de transmissão do TTV, até então sem comprovação (Mushahwar *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2000; Tawara *et al.*, 2000). Tanto na inoculação oral como na parenteral, foi observado que o TTV é capaz de estabelecer infecção e ser excretado nas fezes alguns dias após a infecção. Os animais infectados desenvolvem uma infecção aparentemente assintomática. A infecção experimental em macacos *Rhesus* infectados experimentalmente progrediu de maneira semelhante à infecção em humanos, permanecendo infectados, ou seja, o DNA do vírus pode ser detectado por pelo menos 6 meses (tempo em que os experimentos duraram) sem sintomas e alterações hepáticas. Vale ressaltar que estes resultados refletem características referentes ao genótipo 1 e inúmeros grupos filogenéticos foram descobertos posteriormente. Estudos de inoculação de TTVs pertencentes a diversos grupos filogenéticos são necessários visando explorar as diferenças existentes entre os isolados virais (Luo *et al.*, 2000).

1.4.3. Detecção de anticorpos

Devido a sua alta variabilidade genética, é difícil a seleção de um único antígeno para a detecção de anticorpos contra o TTV. Para detectar a presença de TTV a partir de anticorpos específicos, seria necessário que os anticorpos reconhecessem as proteínas estruturais do capsídeo viral, uma vez que essas estariam expostas na superfície da partícula viral. Porém, a proteína expressa pela ORF1, que é a candidata mais provável à função de proteína estrutural do capsídeo, é também a proteína mais variável. Alguns trabalhos já realizaram a detecção “*in house*” de anticorpos para o TTV (Ott *et al.*, 2000; Kakkola *et al.*, 2002), porém até o momento não existe um “kit” comercial para a detecção de antígenos ou anticorpos contra o TTV.

1.4.4. Microscopia eletrônica

O registro por microscopia eletrônica de algumas partículas com o tamanho semelhante ao do TTV (30-50 nm de diâmetro) foi descrito em amostras de soro e

suspensões fecais positivas para o DNA do TTV (Figura 1.5). Contudo, por não ser possível o isolamento do vírus por falta de um cultivo celular, a visualização do TTV por microscopia eletrônica ainda é um método incipiente (Itoh *et al.*, 2000).

1.4.5. Amplificação do DNA viral

Assim como em sua descoberta, o modo mais usual de detecção e investigação do TTV é baseado em técnicas de NAAT (teste de amplificação de ácidos nucleicos do inglês nucleic acid amplification test) (Takahashi *et al.*, 1998a; Okamoto *et al.*, 1999b; Devalle & Niel, 2004; Diniz-Mendes *et al.*, 2008). Contudo, a alta variabilidade genética do TTV dificulta a obtenção de resultados fidedignos a cerca da prevalência viral. A escolha da região do genoma a ser amplificada é de suma importância. Oligonucleotídeos iniciadores direcionados a regiões variáveis são incapazes de se hibridar eficientemente aos inúmeros isolados de TTV, levando a uma subestimação da prevalência viral. Por outro lado, oligonucleotídeos iniciadores direcionados as regiões conservadas permitem uma maior detecção, mas, em função da conservação da NCR, não é possível a classificação desses isolados (Devalle & Niel, 2004). Ainda assim, PCR é o teste padrão para a detecção deste vírus. Dessa maneira, as características epidemiológicas e clínicas do TTV são estudadas como um todo, sem levar em conta os diferentes grupos filogenéticos, ou levando em conta apenas um ou outro grupo isoladamente, o que muitas vezes induz o pesquisador a conclusões errôneas. Vários autores apontaram a discrepância de resultados obtidos com diferentes sistemas de PCR (Takahashi *et al.*, 1998b; Desai *et al.*, 1999; Irving *et al.*, 1999; Leary *et al.*, 1999; Niel *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 1999a; Biagini *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2001).

Como exemplo de resultado que leva a conclusões equivocadas, em um estudo realizado em pacientes com problemas hepáticos e indivíduos saudáveis foi relatada a prevalência do TTV em 47% dos pacientes com hepatite fulminante, 46% dos portadores de doenças crônicas de fígado e em 12% dos doadores de sangue. Esses resultados induzem a interpretação de que a presença do TTV tinha correlação com o aparecimento de doenças hepáticas (Okamoto *et al.*, 1998b). Posteriormente, um estudo realizado em amostras de doadores de sangue japoneses detectou diferentes prevalências de TTV, utilizando os diferentes pares de

oligonucleotídeos NG061/NG063 e T801/T935. As prevalências encontradas foram de 23% e 92%, respectivamente, mostrando que os oligonucleotídeos utilizados interferem diretamente nos resultados obtidos (Takahashi *et al.*, 1998b).

Conforme novas técnicas de PCR mais sensíveis e capazes de detectar um maior número de isolados vão sendo descritas e novos tipos de TTV descobertos, as prevalências estarão em constante mudança. Os impactos causados pela presença do TTV na população humana e a predominância de cada grupo filogenético ainda devem ser elucidados, ainda que esteja claro que o TTV é extremamente abundante na população geral (>80%) (Prescott & Simmonds, 1998; Niel *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2001; Devalle & Niel, 2004).

1.5. Potencial Patogênico

Alguns estudos levantaram associações estatísticas entre a presença do vírus e certas patologias, tais como disfunções hematológicas (Miyamoto *et al.*, 2000; Tokita *et al.*, 2001; 2002), doenças respiratórias (Deng *et al.*, 2000; Bando *et al.*, 2001; Maggi *et al.*, 2003; Maggi *et al.*, 2004; Pifferi *et al.*, 2005; Pifferi *et al.*, 2006), câncer de pulmão (Bando *et al.*, 2008), comprometimento dos rins (Yokoyama *et al.*, 2002), pior prognóstico em pacientes com câncer de laringe (Szladek *et al.*, 2005), desordens linfo-proliferativos (Cacoub *et al.*, 2003; Garbuglia *et al.*, 2003), menor sobrevivência de pacientes com HIV-1 quando presentes em altas concentrações (Christensen *et al.*, 2000), e doenças auto-imunes (Gergely *et al.*, 2005a; Gergely *et al.*, 2005b; Sospedra *et al.*, 2005; Maggi *et al.*, 2007; Blazsek *et al.*, 2008). Nesses tipos de estudos, as possíveis correlações são difíceis de ser comprovadas, uma vez que os resultados observados podem ser devidos às causas ou consequências das patologias estudadas. Dessa forma, apesar de diversas moléstias terem sido associadas ao TTV, o seu potencial patogênico ainda é desconhecido (Okamoto, 2009).

1.6. Epidemiologia e Modos de Transmissão

O TTV está disseminado mundialmente na população (Prescott & Simmonds, 1998; Viazov *et al.*, 1998; Okamoto *et al.*, 1999b) e sua prevalência aumenta

conforme a faixa etária (Hsieh *et al.*, 1999; Saback *et al.*, 1999; Umemura *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2001). Diversos estudos epidemiológicos demonstraram a distribuição global do TTV (África, Américas, Ásia, Europa e Oceania), tanto em populações rurais, quanto em urbanas (Prescott & Simmonds, 1998).

A avaliação sobre a incidência do TTV pode variar dependendo do método de PCR utilizado (Niel *et al.*, 2005; Biagini *et al.*, 2007). Diferentes prevalências já foram detectadas também em indivíduos saudáveis. Em estudos realizados no Brasil entre doadores de sangue foram detectadas prevalências de 62 a 80% no Brasil (Niel *et al.*, 1999; Devalle & Niel, 2004), 51,6 a 82,7% na Turquia (Erensoy *et al.*, 2002; Yazici *et al.*, 2002), 90% na Noruega (Huang *et al.*, 2001) e 53,3% na China (Zhong *et al.*, 2001).

Uma vez que o TTV foi descoberto no soro de um paciente com hepatite pós-tranfusional de etiologia desconhecida, foi sugerido que este vírus seria transmitido somente por via parenteral (Nishizawa *et al.*, 1997). Devido à alta prevalência do TTV em doadores de sangue saudáveis e sem prévia exposição a produtos sanguíneos, supôs-se que haveria a participação de outras vias, além da via parenteral, na disseminação do TTV (Abe *et al.*, 1999; Niel *et al.*, 1999; Saback *et al.*, 1999; Deng *et al.*, 2000; Matsubara *et al.*, 2000; Puig-Basagoiti *et al.*, 2000; Luo & Zhang, 2001). De fato, DNA de TTV foi detectado em cordões umbilicais, em leite materno (Gerner *et al.*, 2000; Matsubara *et al.*, 2001) e em fluido amniótico (Matsubara *et al.*, 2001) sugerindo a possibilidade de transmissão vertical. A transmissão perinatal foi comprovada por análise filogenética onde sequências idênticas foram observadas no soro de mães e filhos infectados (Gerner *et al.*, 2000; Bagaglio *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2002). O TTV foi detectado em saliva e espécimes clínicos do trato respiratório de crianças (Ishikawa *et al.*, 1999; Gallian *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 2001; Maggi *et al.*, 2003), sugerindo que esta seja mais uma forma de transmissão possível.

Em uma análise feita em amostras de soro de doadores de sangue e dos pacientes que receberam transfusões sanguíneas provenientes desses pacientes, 100% das amostras foram positivas para o TTV, 66,7% para o TTMDV e 62,5% para o TTMV. Ao se realizar a análise filogenética dos vírus presentes nessas amostras, diferentes sequências virais foram encontradas. Em nenhuma das amostras dos pacientes que receberam as doações pode-se detectar sequências virais

semelhantes às observadas nos doadores de sangue, o que poderia estar relacionado com a alta variabilidade de possíveis coinfeções (Bernardin *et al.*, 2010).

Além do soro, a presença do TTV também foi observada em amostras de sêmen (Inami *et al.*, 2000) e líquido cervical (Calcaterra *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2010). Por outro lado, a frequência das infecções em indivíduos pertencentes a grupos de alto risco para doenças sexualmente transmissíveis não apresentou variação significativa, o que sugere que a transmissão sexual não apresenta papel de alta relevância na disseminação do TTV (Huang *et al.*, 2000; Krekulova *et al.*, 2001).

Como uma das principais vias de disseminação, o TTV foi demonstrado ser excretado via bile (Ukita *et al.*, 1999) nas fezes (Okamoto *et al.*, 1998a; Ross *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Matsubara *et al.*, 2000; Braham *et al.*, 2009). A rota de transmissão fecal-oral foi reforçada por infecção experimental do vírus em macacos *Rhesus*. Tanto após inoculação oral ou parenteral foi possível realizar a detecção do DNA do TTV nas fezes dos animais inoculados (Luo *et al.*, 2000; Luo & Zhang, 2001).

1.7. TTV em Fezes

No estudo onde foi realizada a primeira detecção do TTV em fezes, a partir de alguns experimentos, foi relatado que as partículas de TTV possuem a densidade de 1,35 g/cm³ em CsCl (Okamoto *et al.*, 1998a). Mais tarde, partículas íntegras de 30-50 nm foram visualizadas no soro e nas fezes através de microscopia eletrônica, sugerindo que fossem partículas virais do TTV presentes nas fezes (Itoh *et al.*, 2000) (Figura 1.5).

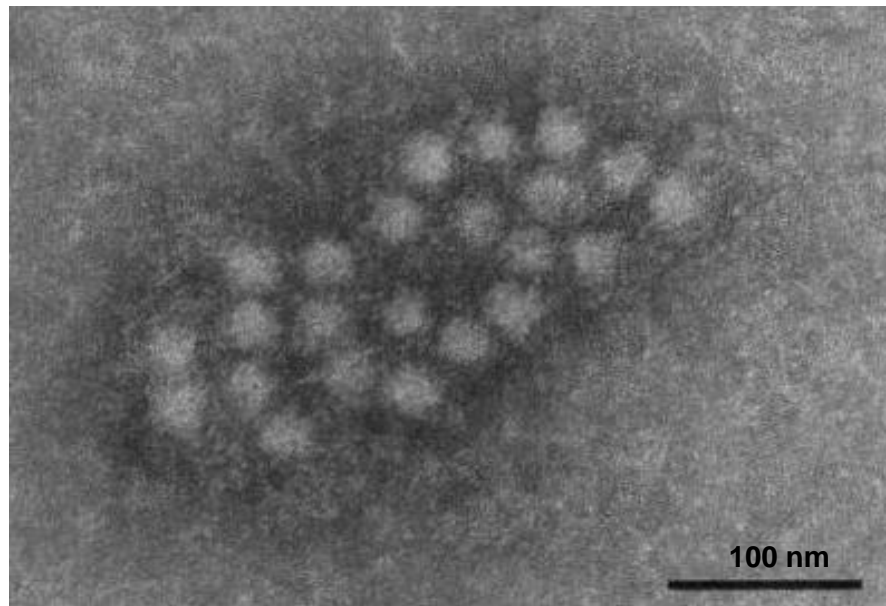


Figura 1.1.5. Imagem de microscopia eletrônica demonstrando a presença de partículas virais do *torque teno virus* nas fezes.
Fonte: Itoh *et al.*, 2000

O processo de disseminação do TTV pela rota fecal-oral inicia-se pela liberação de excretas de um indivíduo, podendo haver a disseminação direta por falta de hábitos de higiene adequados ou pela destinação das fezes a um sistema de esgoto ou até mesmo a aterros de resíduos sólidos. Principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, o esgoto pode não sofrer tratamento, ou seja, pode ser despejado *in natura* em rios e lagos ou, até mesmo, em aterros sanitários, culminando na contaminação dos ambientes aquáticos (Figura 1.6). Sendo assim, a presença do TTV tem sido descrita em amostras de esgoto (Vaidya *et al.*, 2002; Haramoto *et al.*, 2005b; Carducci *et al.*, 2006; Carducci *et al.*, 2008) e em ambientes aquáticos, sendo detectada em amostras de água de rio (Haramoto *et al.*, 2005a; Verani *et al.*, 2006; Diniz-Mendes *et al.*, 2008).

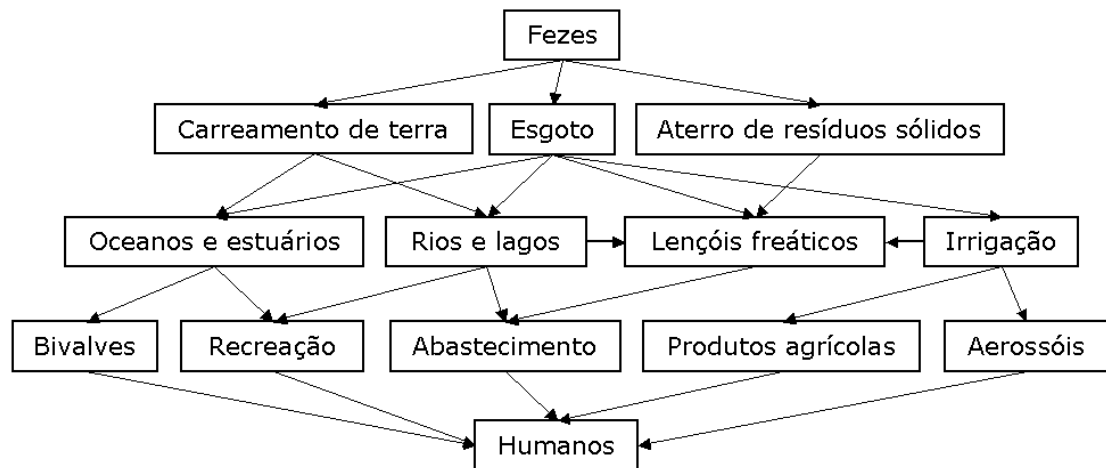


Figura 1.1.6. Rotas de transmissão de vírus entéricos no ambiente.
Adaptado de: Metcalf *et al.*, 1995

Uma das principais vias de transmissão de vírus entéricos, como os vírus causadores de gastroenterite, ocorre através da utilização da água contaminada por resíduos biológicos. Com o crescimento populacional e a falta de saneamento, os casos de doenças transmitidas pela água são cada vez maiores. O principal fator de contaminação é o despejo de esgoto sem tratamento diretamente em corpos d'água. Todavia, os marcadores de qualidade de água atuais não são efetivos para avaliar a ocorrência de vírus em corpos hídricos. Estudos comparativos entre a detecção de marcadores bacteriológicos e de alguns vírus entéricos (Enterovirus, Adenovirus, Rotavirus (RV), Astrovirus (AstV), Norovirus (NoV) e vírus da hepatite A) (Schvoerer *et al.*, 2000) não encontraram correlação entre estes agentes nas amostras de água examinadas: água de esgotos, rios, córregos, poços e torneiras.

Devido à alta prevalência, distribuição global e a não associação com surtos, o TTV pode ser considerado uma potencial fonte de informação sobre a presença de vírus humanos na água. Sendo assim, a detecção do TTV em amostras ambientais pode representar uma importante ferramenta para o monitoramento virológico de qualidade da água (Diniz-Mendes *et al.*, 2008). Por outro lado, a variabilidade genética, a qual muitas vezes interfere nos métodos de detecção do TTV, deve ser muito bem estudada, principalmente em amostras fecais, as quais são a fonte de contaminação dessas águas. Além disso, é fundamental que se conheça a prevalência e a carga viral do TTV nas fezes.

1.8. Gastroenterites

As gastroenterites são uma das principais patologias, dentre as que são transmitidas pela via fecal-oral e, conseqüentemente, por água contaminada por fezes humanas. A gastroenterite aguda ganha destaque por ser uma das principais causas de enfermidades que acometem crianças menores de cinco anos no mundo. Atualmente, estima-se que 1,6 – 2,5 milhões dessas crianças morrem por ano (Kosek *et al.*, 2003). As gastroenterites podem ser ocasionadas por diferentes agentes etiológicos, são eles: bactérias, parasitas e vírus.

Dentre os agentes virais causadores de gastroenterite, o principal deles é o *rotavirus* (RV), sendo o agente causador de aproximadamente 40% dos casos de diarreia aguda em crianças. Por ano, cerca de 527.000 crianças morrem em decorrência de infecções pelo RV, a maioria delas com menos de dois anos de idade (Parashar *et al.*, 2003). Os (*norovirus* NoVs) são a segunda maior causa de morte por diarreia não bacteriana em todo mundo, ficando apenas atrás apenas dos RV. Além de ser o principal agente etiológico de gastroenterite em adultos, a incidência em crianças de 0-5 anos de idade é de cerca de 12% dos casos registrados de diarreia aguda (Maunula & Von Bonsdorff, 2005; Fankhauser *et al.*, 1998). Nos Estados Unidos, cerca de 23.000 hospitalizações ocorrem em decorrência da infecção por NoV por ano (Patel *et al.*, 2008). A terceira maior causa de gastroenterites virais ocorre em decorrência a infecção pelo *astrovirus* (AstV), estando esse vírus também relacionado a muitos casos de hospitalizações e mortes (Guix *et al.*, 2005).

Sendo a gastroenterite viral uma doença de altíssima relevância para a saúde pública, é fundamental que se conheça melhor sobre a presença do TTV nos pacientes acometidos por essa patogenia e se avalie os métodos de detecção desses vírus nas fezes. Uma vez elucidadas as informações sobre a excreção fecal do TTV, poderá ser investigada a existência de correlações, no ambiente, entre a presença do TTV e de vírus sabidamente patogênicos, por exemplo, os vírus causadores de gastroenterite como os RVs, NoVs e AstVs, auxiliando no manejo da contaminação ambiental para controle epidemiológico dessas doenças.

2. JUSTIFICATIVA

Detectado pela primeira vez no soro, o TTV também já foi encontrado em diversos tipos de materiais biológicos como sêmen, líquido cervical, lágrima, leite materno, bile e fezes (Okamoto *et al.*, 1998a; Deng *et al.*, 2000; Gerner *et al.*, 2000; Inami *et al.*, 2000; Matsubara *et al.*, 2000; Calcaterra *et al.*, 2001). A presença de populações de diferentes tipos de TTV, infectando simultaneamente o soro de um mesmo paciente, já foi diversas vezes documentada (Ball *et al.*, 1999; Forns *et al.*, 1999; Niel *et al.*, 2000; Devalle & Niel, 2004; Devalle *et al.*, 2009). Alguns estudos indicaram que combinações distintas de grupos de TTV estão presentes em diferentes órgãos, sugerindo que alguns genótipos/genogrupos podem apresentar tropismo por determinados tecidos (Deng *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 2000b; Okamoto *et al.*, 2001; Maggi *et al.*, 2003). Contudo, ainda não se sabe se todos os cinco genogrupos do TTV são excretados nas fezes, tampouco a frequência desses eventos.

Estudos recentes mostraram a presença do TTV em corpos hídricos e, conseqüentemente, seu potencial como marcador de qualidade de água. Entretanto, estudos em amostras de fezes, buscando informações a respeito da eficiência dos métodos de detecção, prevalência, carga viral, diversidade e distribuição dos genogrupos ainda não foram realizados. A determinação destes parâmetros do TTV em fezes de pacientes com gastroenterite poderá ser fundamental, não apenas para o melhor conhecimento sobre o TTV nas fezes, mas como para futuramente a associação com amostras ambientais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar a prevalência, a diversidade dos grupos genômicos e a carga viral do TTV em amostras de fezes humanas provenientes de pacientes com gastroenterite aguda.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a eficácia de três protocolos de amplificação de ácidos nucléicos para a determinação da prevalência do TTV em fezes humanas;
- Avaliar a prevalência dos grupos genômicos do TTV nas fezes;
- Determinar a carga viral do TTV nas fezes;
- Detectar a presença de co-infecções com diferentes grupos genômicos de TTV;
- Correlacionar a presença do TTV com os vírus causadores de gastroenterites (RV, NoV e AstV).

4. MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS

4.1. Artigo Publicado

Pinho-Nascimento CA, Leite JPG, Niel C, Diniz-Mendes L,. *Torque Teno Virus in Fecal Samples of Patients With Gastroenteritis: Prevalence, Genogroups Distribution, and Viral Load.* **J Med Virol**, 2011; 83:1107-11.

Torque Teno Virus in Fecal Samples of Patients With Gastroenteritis: Prevalence, Genogroups Distribution, and Viral Load

Carlos Augusto Pinho-Nascimento,¹ José Paulo Gagliardi Leite,² Christian Niel,^{1*} and Leonardo Diniz-Mendes¹

¹Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

Torque teno virus (TTV, genus Alphatorquevirus, family Anelloviridae) is a DNA virus, highly prevalent in populations from around the world. TTV isolates have been classified into five main phylogenetic groups (1–5) showing a large genetic distance between them. The presence of TTV has been detected in feces. However, whether all five TTV genogroups are excreted in feces and the frequency of these events are presently unknown. The presence of TTV DNA was assessed in feces from 135 Brazilian (0–90 years old) patients with gastroenteritis by using three PCR methods, including real-time PCR. One hundred twenty one (91.1%) samples were positive with at least one method. Using a genogroup-specific assay, it was shown that all genogroups were present. Thirty-seven (27.4%), 27 (20.0%), 57 (42.2%), 29 (21.5%), and 33 (24.4%) fecal samples contained TTV isolates belonging to genogroups 1–5, respectively. Coinfections with two, three, four, and five TTV genogroups were found in 23 (17.0%), 15 (11.1%), 7 (5.2%), and 7 (5.2%) fecal samples, respectively. Thus, 52 (38.5%) samples contained more than one TTV genogroup. Viral loads ranged from 2.6 to 6.5 log genome equivalents per gram of feces. However, only moderate variations of viral load were noted depending on genogroup and number of coinfecting TTV genogroups. These results show a high prevalence and a diversity of TTV isolates in feces. **J. Med. Virol.** 83:1107–1111, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: *Anelloviridae*; Brazil; coinfection; feces; PCR; TTV

INTRODUCTION

Torque teno virus (TTV), first identified in the serum of a patient with hepatitis of unknown etiology [Nishizawa et al., 1997], has been recently classified into

the genus Alphatorquevirus, family Anelloviridae (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>). Anelloviruses are small DNA viruses with circular, single-stranded genomes (3.8–3.9 kb for TTV). As no cell culture system has been developed for these viruses, the conventional method to recognize TTV infection is PCR amplification of viral DNA extracted from serum samples. Sensitive PCR assays directed to the noncoding region (NCR) of the genome were developed that allowed to establish that TTV is a ubiquitous virus, infecting chronically >80% of the general population throughout the world.

Despite being a DNA virus, TTV shows an extensive genetic variability. The numerous TTV species and genotypes described at the moment have been classified into five phylogenetic groups (genogroups 1–5), with complete nucleotide sequence divergence of > 40% between them [Peng et al., 2002]. Frequent coinfection of single individuals with TTV isolates belonging to different genotypes and/or genogroups has been reported [Ball et al., 1999; Fornis et al., 1999; Okamoto et al., 1999; Takayama et al., 1999; Niel et al., 2000; Sugiyama et al., 2001; Peng et al., 2002; Saback et al., 2002]. PCR assays able to detect separately each of the five TTV genogroups have been developed [Devalle and Niel, 2004; Biagini et al., 2006], and the prevalence and distribution of TTV genogroups 1–5 in sera of Brazilian individuals has thus been determined [Devalle and Niel, 2004].

Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil); Grant sponsor: Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

*Correspondence to: Christian Niel, PhD, Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: niel@ioc.fiocruz.br

Accepted 23 November 2010

DOI 10.1002/jmv.22024

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Liver, respiratory and other diseases have been associated with TTV infection [Okamoto, 2009]. However, the pathogenic potential of the virus, if exists, remains unclear. TTV has been detected in serum, saliva, breast milk, tears, semen and cervical smears, and has been shown to be secreted via bile [Okamoto et al., 1998; Ukita et al., 1999] into feces [Ross et al., 1999; Lin et al., 2000; Matsubara et al., 2000; Braham et al., 2009], where the virus was visualized by electron microscopy [Itoh et al., 2000]. As a consequence of TTV excretion, the virus has been reported in sewage [Vaidya et al., 2002; Haramoto et al., 2005b; Carducci et al., 2006, 2008] and even in rivers [Haramoto et al., 2005a; Carducci et al., 2006; Diniz-Mendes et al., 2008]. Whether all five TTV genogroups are excreted in feces and the frequency of these events are presently unknown. The aim of this study was to determine the prevalence, genomic distribution and load of TTV in the feces of 135 Brazilian patients, including children and adults, with gastroenteritis caused by different pathogenic agents.

METHODS

Fecal Samples

One hundred thirty-five stool diarrhea samples were collected from November 2006 to February 2007 in five different Brazilian states (Bahía, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro and Rio Grande do Sul) from 0 to 90 years old patients who presented gastroenteritis symptoms. The presence of rotaviruses, caliciviruses and astroviruses in all samples was investigated in the Laboratory of Comparative and Environmental Virology at Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. Seven, 40, and 13 samples contained rotaviruses, caliciviruses, and astroviruses, respectively.

Nucleic Acids Extraction

Extraction of viral nucleic acids was performed on the basis of a previous method [Boom et al., 1990], with modifications. Fecal specimens (100 mg) were suspended by agitation with a vortex mixer in 1 ml of Tris–Ca²⁺ buffer (10 mM, pH 7.2), centrifuged at 3,000g for 10 min at 4°C, and the supernatant was recovered and stored at –20°C. Viral nucleic acids (DNA and RNA) were extracted from 100 µl of fecal suspension by using the method of adsorption to glass powder followed by elution in 50 µl of TE buffer (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8).

Conventional PCR Amplification Methods

All 135 fecal samples were tested for the presence of TTV DNA by two different conventional PCR methods. The first one was a single-round assay [Takahashi et al., 1998] directed to the most conserved segment of the NCR of the TTV genome, which generates an amplicon of 199 bp. That assay was able to detect TTV samples belonging to all five genomic groups, with a sensitivity of about 3×10^3 molecules per assay.

The second PCR method was a set of five different nested assays, with a common first round that amplified a long genome segment covering the entire coding region (about 3,200 bp). The second round of amplification was able to discriminate TTV genogroups through five separate reactions performed with a unique sense primer (located in the NCR) and five different genogroup-specific antisense primers designed in the coding region [Devalle and Niel, 2004]. In that assay, the size of the amplicons (111–885 bp) allowed the determination of the genogroup. Sensitivity was about 10^2 molecules for genogroup 3 and between 10^3 and 10^4 for the others. PCR products were resolved by 2% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light.

Calculation of Viral Load

TTV loads in feces were determined by TaqMan real-time PCR amplification method. The quantitative assays were carried out using 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers and probe, designed in the relatively well conserved NCR of the TTV genome, have been described previously [Diniz-Mendes et al., 2008]. A modified pCR4-TOPO plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA), carrying a 79-bp target fragment of the NCR of the TTV genome [Diniz-Mendes et al., 2008], was used for standard curve setting. A strong linear relationship was observed between the amount of input plasmid DNA and the Ct values over seven log dilutions of the standard curve. Regression analysis of the Ct values generated by the log dilution series produced correlation coefficient values of 0.99. The slope of the regression curves indicated an increase of 3.37 cycles per log increase of DNA. Amplification efficiency (E), calculated from the regression analysis with the formula $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$, was 98.03%. Sensitivity of the real-time PCR assay was 4 genome equivalents (gEq) per reaction tube, corresponding to approximately 400 gEqs/g of feces.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using Fisher's exact test. All comparisons were made at a significance level of 0.05 and a 95% confidence interval. The calculations were performed using InStat software (ver. 3.0; GraphPad, San Diego, CA).

RESULTS

Prevalence of TTV Genogroups in Feces

Table I shows the prevalence of each TTV genogroup among the 135 fecal samples under study, estimated by using a set of five genogroup-specific PCR assays. All five genogroups were detected in feces at frequencies varying from 20% (genogroup 2) to 42.2% (genogroup 3). Globally, that set of PCR assays revealed the presence of at least one TTV genogroup in 81/135 (60.0%) samples of feces. By comparison, the NCR PCR amplification assay was able to detect TTV in 75/135 (55.6%) samples.

TABLE I. Prevalence of the Five TTV Genogroups in 135 Fecal Samples

PCR assay	Method reference	No. of positive samples (%)
Genogroup 1-specific	Devalle and Niel [2004]	37 (27.4)
Genogroup 2-specific	Devalle and Niel [2004]	27 (20.0)
Genogroup 3-specific	Devalle and Niel [2004]	57 (42.2)
Genogroup 4-specific	Devalle and Niel [2004]	29 (21.5)
Genogroup 5-specific	Devalle and Niel [2004]	33 (24.4)
Any genogroup	Devalle and Niel [2004]	81 (60.0)
NCR	Takahashi et al. [1998]	75 (55.6)
Any method	—	106 (78.5)

Twenty-five (18.5%) samples were negative with the genogroup-discriminating method but positive with the NCR PCR assay, while the inverse was true for 31 (22.9%) samples. As a whole, 106 (78.5%) of the samples tested positive by at least one assay (Table I).

Mixed Infections

Since high frequencies of mixed infections with different TTV genogroups have been described previously by analyzing serum samples, it was interesting to seek the presence of such associations in fecal specimens. Simultaneous presence of two, three, four, and five TTV genogroups was found in 23 (17.0%), 15 (11.1%), 7 (5.2%), and 7 (5.2%) fecal samples, respectively (Table II). At all, 52 (38.5%) samples contained more than one TTV genogroup. A correlation was observed between NCR PCR positivity and number of TTV genogroups. Among the 75 NCR PCR positive samples, 37 (49.3%) contained at least two TTV samples belonging to different genogroups, although this was the case for only 15/60 (25%) NCR PCR negative samples ($P < 0.01$). All five TTV genogroups were detected in seven (9.3%) NCR PCR positive samples, but in none of the NCR PCR negative samples. As a result, the mean number of TTV genogroups (1.65) detected in the NCR PCR positive samples was significantly higher than that (0.98) detected in the negative samples ($P < 0.01$).

TABLE II. Simultaneous Presence of Two or More TTV Genogroups and Correlation With Non-Coding Region PCR Positivity

Number of genogroups	Number of samples		
	Total	NCR PCR positive	NCR PCR negative
None	54	25	29
One	29	13	16
Two	23	18	5
Three	15	8	7
Four	7	4	3
Five	7	7	0
Total	135	75	60

Viral Load

All 135 fecal samples were then tested by real-time PCR. One hundred twenty (88.9%) were positive. This number reached 123 (91.1%) when considering the three (two conventional and one real-time) PCR methods used in this study. One hundred percent of the samples coinfecting with three to five genogroups and 96–97% of the samples containing one or two genogroups were positive by real-time PCR (Table III). Even among the 54 samples for which the genogroup-discriminating PCR method did not detect any TTV, 41 (76%) tested positive by real-time PCR. Viral load comparison between samples coinfecting with two to five TTV genogroups and the other ones (either containing one genogroup or positive by real-time PCR only) showed that the first group (multi-infected samples) had a moderately higher mean viral load, with a log difference of 0.5 (4.34 vs. 3.84), corresponding to a threefold ratio.

By analyzing all the 31 possible combinations of single and mixed infections, it was found that eight of them, that is, G2 alone, G1 + G2, G4 + G5, G1 + G2 + G5, G1 + G3 + G4, G1 + G4 + G5, G2 + G4 + G5, and G1 + G2 + G4 + G5 were not represented. By dividing the 31 combinations into five categories (one, two, three, four, and five genogroups simultaneous detected), it appeared that genogroup G3 was always represented in the combination found most frequently (G3 alone, 10 patients; G1 + G3, nine patients; G1 + G3 + G5, five patients; G1 + G2 + G3 + G4, three patients; G1 + G2 + G3 + G4 + G5, seven patients). Furthermore the highest viral loads were found in a sample containing G1 + G3 (log gEq/g of feces = 6.5), followed by two samples containing G1 + G3 + G5 and G1 + G2 + G3 + G5, respectively (log = 6.2). Two samples (G5 alone and G1 + G3), although positive with the genogroup-discriminating method, remained negative by real-time PCR (log < 2.6).

Pairwise Combinations of Genogroups

Table IV shows the pairwise combinations of TTV genogroups among the 52 fecal samples that contained at least two TTV genogroups, ordered by frequency.

TABLE III. Number of TTV Genogroups Simultaneously Present in Feces and Correlation With Real-Time PCR Positivity and Mean Viral Load

Number of genogroups	Number of samples		
	Total	Real-time PCR positive (%)	Mean viral load ^a
None	54	41 (76)	3.9
One	29	28 (97)	3.8
Two	23	22 (96)	4.5
Three	15	15 (100)	4.2
Four	7	7 (100)	4.1
Five	7	7 (100)	4.4
Total	135	120 (89)	4.1

^alog gEq/1g of feces.

TABLE IV. Frequencies of Pairwise Combinations of TTV Genogroups Among the 52 Samples With Mixed Infection

Combination	Number of samples	%	Mean viral load ^a
G1 + G3	27	51.9	4.3
G2 + G3	23	44.2	4.4
G3 + G5	23	44.2	4.3
G3 + G4	21	40.3	4.1
G2 + G4	16	30.7	4.0
G1 + G5	15	28.8	4.3
G1 + G2	14	26.9	4.4
G2 + G5	14	26.9	4.5
G1 + G4	13	25.0	4.0
G4 + G5	12	23.1	4.3

^alog gEq/g of feces.

All possible combinations were represented. The associations G1 + G3 (51.9%) and G4 + G5 (23.2%) were the most, and the least frequent, respectively. Mean viral loads showed only little variations from a pairwise combination to another, since all of them were comprised between $10^{4.0}$ and $10^{4.5}$ gEq/g of feces.

DISCUSSION

The presence of human TTV has been reported not only in serum, but also in other biological fluids such as saliva, nasal secretions, breast milk, tears, semen, and cervical smears. The first report of TTV DNA in feces was in 1998 when fecal samples from three adult patients with hepatocellular carcinoma were found positive by PCR [Okamoto et al., 1998]. The presence of TTV DNA was then reported in feces from patients with acute cholestasis [Ukita et al., 1999], expecting for allogeneic bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation [Ross et al., 1999] and with gastroenteritis [Braham et al., 2009], as well as in healthy adults and children [Ross et al., 1999; Lin et al., 2000; Matsubara et al., 2000]. Due to very high genomic variability, TTV prevalence has been re-evaluated continuously, in direct correlation with the design and optimization of DNA amplification methods [Biagini et al., 2006]. Until now, no “universal” method, able to amplify DNA from all human TTV samples, has been described. In this study, three PCR methods, including two conventional and one real time assays, were used to investigate the presence of TTV DNA in fecal samples from 135 Brazilian patients with gastroenteritis aged 0–90 years. At all, 123 (91.1%) samples were positive by at least one method. Such very high prevalence was similar to that observed in serum samples of healthy populations from around the world. These data, if confirmed by further studies, would show that fecal samples are biological specimens as adequate as serum for detection of TTV infection and to calculate its prevalence in the population.

Human TTV isolates have been classified into five major phylogenetic groups, separated by a large genetic distance (< 60% nucleotide sequence identity) [Peng et al., 2002]. Even if the phylogenetic description of

TTV members is no longer restricted to five main phylogenetic groups, the approach described here may be considered as robust and informative. Genogroup 3 is that containing the highest number of TTV isolates described until now. Genogroups 2 and 4 are less prevalent than the others [Hallet et al., 2000; Maggi et al., 2003; Devalle and Niel, 2004; Biagini et al., 2006]. However, which TTV genogroups/genotypes are excreted in feces is presently unknown. There are many examples of viral infections (papillomaviruses, adenoviruses, enteroviruses, etc.) that have different pathological consequences depending on the genotype of the virus involved. In this case, modes of elimination may vary from an isolate to another. It was therefore of interest to determine whether all five TTV genogroups were excreted in feces. This study showed that this was the case in the group of gastroenteritis patients where prevalences varied from 20.0% for genogroup 2, the least prevalent, to 42.2% for genogroup 3, the most commonly found. There is no available information indicating that the fact that the patients had gastroenteritis has affected the rate of TTV detection, or whether the presence of other viruses, namely rotaviruses, caliciviruses and astroviruses, may interfere with TTV.

Detection in serum of TTV mixed populations containing isolates from more than one genogroup has been reported in several studies [Ball et al., 1999; Forns et al., 1999; Niel et al., 2000; Devalle and Niel, 2004; Devalle et al., 2009]. Furthermore, data have shown that individuals can harbor different mixtures of TTV genotypes in different organs suggestive of preferential tropism of certain TTV strains for specific tissues [Deng et al., 2000; Okamoto et al., 2000, 2001; Maggi et al., 2003]. This study showed that simultaneous excretion of TTVs from different genogroups is a common event, at least in patients with gastroenteritis. Due to age composition of the group under study, no conclusion could be drawn with respect to a possible correlation between age of the patients and number of coinfecting TTV genogroups. All ten possible pairwise combinations of TTV genogroups (G1 + G2, G1 + G3, etc.) were represented, showing the absence of antagonism between genogroups. The most frequent genogroups association was G1 + G3, found in 27 samples. Interestingly, a previous study has mentioned the possible existence of some kind of infection facilitation between genogroups 1 and 3 by revealing that subjects coinfecting with these genogroups tended to have higher-than-expected viral loads [Maggi et al., 2005]. However, such phenomenon was not observed in the present study based on 135 fecal samples, in which viral load did not show significant variations depending on TTV genogroup(s).

Three main epidemiological features of TTV infection have been established previously, based on detection of TTV DNA in serum, (i) extremely high prevalence in healthy individuals, (ii) chronicity of infection, and (iii) high prevalence of each of the five phylogenetic groups. In this study, those three characteristics were also observed by analyzing fecal samples. Although

paired serum and fecal samples were not analyzed, data from this study tended to demonstrate a high correlation between presence of TTV in serum and feces. This reinforces considerably the hypothesis formulated previously that TTV is secreted into feces in a transmissible form and would spread by fecal-oral route for deep and wide penetration into general population [Ukita et al., 1999].

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Ludmila Bergsten-Torralla, Alexandre Fialho and Juliana Andrade for technical assistance. The authors also thank the Public Health Secretaries of Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro and Rio Grande do Sul States for providing fecal samples.

REFERENCES

- Ball JK, Curran R, Berridge S, Grabowska AM, Jameson CL, Thomson BJ, Irving WL, Sharp PM. 1999. TT virus sequence heterogeneity in vivo: Evidence for co-infection with multiple genetic types. *J Gen Virol* 80:1759–1768.
- Biagini P, Gallian P, Cantaloube JF, Attoui H, de Micco P, de Lamballerie X. 2006. Distribution and genetic analysis of TTV and TTMV major phylogenetic groups in French blood donors. *J Med Virol* 78:298–304.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:495–503.
- Braham S, Iturriza-Gómara M, Gray J. 2009. Detection of TT virus by single-primer sequence-independent amplification in multiple samples collected from an outbreak. *Arch Virol* 154:981–985.
- Carducci A, Verani M, Battistini R, Pizzi F, Rovini E, Andreoli E, Casini B. 2006. Epidemiological surveillance of human enteric viruses by monitoring of different environmental matrices. *Water Sci Technol* 54:239–244.
- Carducci A, Morici P, Pizzi F, Battistini R, Rovini E, Verani M. 2008. Study of the viral removal efficiency in a urban wastewater treatment plant. *Water Sci Technol* 58:893–897.
- Deng X, Terunuma H, 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. *J Med Virol* 62:531–537.
- Devalle S, Niel C. 2004. Distribution of TT virus genomic groups 1–5 in Brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV-1-infected patients. *J Med Virol* 72:166–173.
- Devalle S, Rua F, Morgado MG, Niel C. 2009. Variations in the frequencies of torque teno virus subpopulations during HAART treatment in HIV-1-coinfected patients. *Arch Virol* 154:1285–1291.
- Diniz-Mendes L, Paula VS, Luz SL, Niel C. 2008. High prevalence of human Torque teno virus in streams crossing the city of Manaus, Brazilian Amazon. *J Appl Microbiol* 105:51–58.
- Forns X, Hegerich P, Darnell A, Emerson SU, Purcell RH, 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. *J Med Virol* 59:313–317.
- Hallett RL, Clewley JP, Bobet F, McKiernan PJ, Teo CG. 2000. Characterization of a highly divergent TT virus genome. *J Gen Virol* 81:2273–2279.
- Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Ohgaki S. 2005a. Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan. *Appl Environ Microbiol* 71:2403–2411.
- Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Yamashita H, Nakajima E, Ohgaki S. 2005b. One-year monthly monitoring of Torque teno virus (TTV) in wastewater treatment plants in Japan. *Water Res* 39:2008–2013.
- 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. *Biochem Biophys Res Commun* 279:718–724.
- Lin CL, Kyono W, Tongson J, Chua PK, Easa D, Yanagihara R, Nerurkar VR. 2000. Fecal excretion of a novel human circovirus, TT virus, in healthy children. *Clin Diagn Lab Immunol* 7:960–963.
- Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, Presciuttini S, Marchi S, Pietrobelli A, Boner A, Pistello M, Bendinelli M. 2003. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: Relations to viremia and disease severity. *J Virol* 77:2418–2425.
- Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Fornai C, Vatteroni M, Pistello M, Presciuttini S, Bendinelli M. 2005. Relationships between total plasma load of torquetenovirus (TTV) and TTV genogroups carried. *J Clin Microbiol* 43:4807–4810.
- Matsubara H, Michitaka K, Horiike N, Yano M, Akbar SM, Torisu M, Onji M. 2000. Existence of TT virus DNA in extracellular body fluids from normal healthy Japanese subjects. *Intervirology* 43:16–19.
- Niel C, Saback FL, Lampe E. 2000. Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults. *J Clin Microbiol* 38:1926–1930.
- 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. *Biochem Biophys Res Commun* 241:92–97.
- Okamoto H. 2009. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 331:1–20.
- Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. 1998. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol* 56:128–132.
- Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, 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* 259:428–436.
- Okamoto H, Takahashi M, Kato N, Fukuda M, Tawara A, Fukuda S, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. 2000. Sequstration of TT virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 74:10236–10239.
- 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.
- Peng YH, 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. *Arch Virol* 147:21–41.
- Ross RS, Viazov S, Runde V, Schaefer UW, Roggendorf M. 1999. Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. *J Clin Virol* 13:181–184.
- Saback FL, Gomes SA, Niel C. 2002. High frequency of mixed TT virus infections in healthy adults and children detected by a simplified heteroduplex mobility assay. *J Virol Methods* 101:117–125.
- Sugiyama K, Goto K, Ando T, Mizutani F, Terabe K, Yokoyama T. 2001. Highly diverse TTV population in infants and their mothers. *Virus Res* 73:183–188.
- Takahashi K, Hoshino H, Ohta Y, Yoshida N, Mishiro S. 1998. Very high prevalence of TT virus (TTV) infection in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers. *Hepatal Res* 12:233–239.
- Takayama S, Yamazaki S, Matsuo S, Sugii S. 1999. Multiple infection of TT virus (TTV) with different genotypes in Japanese hemophiliacs. *Biochem Biophys Res Commun* 256:208–211.
- Ukita M, Okamoto H, Kato N, Miyakawa Y, Mayumi M. 1999. Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A-G hepatitis. *J Infect Dis* 179:1245–1248.
- Vaidya SR, Chitambar SD, Arankalle VA. 2002. Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. *J Hepatal* 37:131–136.

5. DISCUSSÃO

A presença do TTV humano tem sido descrita não somente no soro, mas também em outros fluidos biológicos como saliva, secreções nasais, leite materno, sêmen e fluido cervical (Gerner *et al.*, 2000; Inami *et al.*, 2000; Matsubara *et al.*, 2000; Calcaterra *et al.*, 2001). O TTV foi descrito pela primeira vez nas fezes em amostras de três pacientes adultos com carcinoma hepatocelular (Okamoto *et al.*, 1998a). A presença do DNA do TTV foi detectada na bile e nas fezes de paciente com colestase aguda, sugerindo que a excreção do TTV nas fezes ocorresse via bile (Ukita *et al.*, 1999). O TTV também foi detectado em fezes de pacientes aguardando transplante de medula (Ross *et al.*, 1999), com gastroenterite (Braham *et al.*, 2009) e em indivíduos adultos e crianças saudáveis (Ross *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Matsubara *et al.*, 2000). Entretanto, os estudos publicados até o momento, não apresentaram amplos resultados sobre a prevalência, carga viral, ou distribuição grupo genômica do TTV nas fezes.

Devido à alta variabilidade genômica, a prevalência do TTV está diretamente correlacionada com as sequências dos oligonucleotídeos escolhidos e a otimização dos métodos de amplificação de DNA (Biagini *et al.*, 2006). Em um estudo realizado em fezes de 67 crianças saudáveis, dois diferentes pares de oligonucleotídeos foram utilizados para avaliar a prevalência do TTV (Lin *et al.*, 2000). Utilizando os oligonucleotídeos NG061 e NG063 (Okamoto *et al.*, 1999b) foi relatada a prevalência de 10,4%. A prevalência de detecção do TTV nas fezes subiu para 19,4% utilizando os oligonucleotídeos T801 e T935 (método NCR PCR) (Takahashi *et al.*, 1998a). Quando combinados os resultados encontrados nos dois métodos de detecção a prevalência total encontrada foi de 22,4% (Lin *et al.*, 2000), mostrando uma discrepância entre os resultados encontrados.

Uma vez que, variações entre as metodologias de detecção por PCR são comumente encontradas, neste estudo, três diferentes métodos, incluindo dois convencionais e um em tempo-real, foram usados para investigar a presença do DNA do TTV em amostras de fezes de 135 pacientes brasileiros (0-90 anos de idade) com gastroenterite. Os resultados obtidos demonstraram diferenças significativas entre os métodos utilizados. O DNA do TTV foi detectado em 81

amostras (60%) quando utilizado o sistema grupo específico, ou seja, pelo menos um grupo genômico foi detectado. Já com o método de NCR PCR esse número foi de 75 amostras (55,6%). Entre as 81 amostras positivas pelo sistema grupo-específico, 25 foram consideradas negativas utilizando o sistema NCR PCR, que atualmente é adotado como o mais eficiente. Por outro lado, se o estudo fosse realizado apenas com os iniciadores grupo-específicos, 31 dos 75 indivíduos dados como positivos pelo sistema NCR PCR seriam considerados negativos. Quando combinados os resultados, o DNA do TTV pode ser detectado em 106 amostras, havendo um aumento de 23% na detecção do TTV.

O sistema de PCR quantitativo (Diniz-Mendes *et al.*, 2008) mostrou ser o mais eficiente para detecção do TTV. A análise realizada pelo método de PCR em tempo-real pode detectar o DNA do TTV em 120 (88,9%) amostras com carga viral variando $10^{2,7}$ a $10^{6,5}$ gEq/g de fezes. Ao todo, 123 (91,1%) amostras foram positivas por pelo menos um dos métodos utilizados. Esta prevalência extremamente alta é similar à observada em diversos locais do mundo em amostras de soro de populações saudáveis (Vasilyev *et al.*, 2009) e é a maior encontrada em fezes até o momento (Ross *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Matsubara *et al.*, 2000; Braham *et al.*, 2009). Essas informações indicam que a detecção do TTV nas fezes, assim como nas amostras de soro, pode ser útil para se detectar a infecção por TTV e avaliar a prevalência em determinadas populações. Entretanto, estudos comparativos entre a detecção do TTV em fezes e soro serão necessários para que se determine se há correlação entre a detecção dos mesmos grupos genômicos do TTV em fezes e soro de um mesmo paciente.

Os resultados encontrados pelas diferentes metodologias de PCR aplicadas no presente trabalho apresentaram correlação direta com o número de genogrupos, ou seja, quanto maior a quantidade de genogrupos detectados, maior o número de amostras positivas detectadas pelo NCR PCR e PCR em tempo-real. Quanto à distribuição grupo genômica, antes deste trabalho, ainda não se sabia quais os genótipos/genogrupos do TTV eram excretados nas fezes. Na literatura atual, o genogrupo 3 é o que contém o maior número de isolados descritos até agora e que os genogrupos 2 e 4 são menos prevalentes do que os demais (Hallett *et al.*, 2000; Maggi *et al.*, 2003; Devalle & Niel, 2004; Biagini *et al.*, 2006). Alguns trabalhos propõem que o desenvolvimento de patogenias pode estar relacionado a diferentes

tipos de TTV, e que alguns genótipos, ou genogrupos, possam ter propriedades biológicas distintas (Hallett *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 2000b; Maggi *et al.*, 2006). Nesse caso, as formas de eliminação poderiam variar de um genogrupo para o outro. A detecção em soro de populações mistas de TTV contendo isolados de mais de um genogrupo já foi demonstrada por diversos autores (Ball *et al.*, 1999; Forns *et al.*, 1999; Niel *et al.*, 2000; Devalle & Niel, 2004; Devalle *et al.*, 2009). Além disso, estudos anteriores mostraram que indivíduos podem portar diferentes combinações de genótipos do TTV em diferentes órgãos, sugerindo uma relação entre os tipos do TTV e tecidos específicos (Deng *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 2000b; Maggi *et al.*, 2003).

O presente estudo pode mostrar que, nos pacientes com gastroenterite, todos os genogrupos conhecidos do TTV estão presentes nas fezes. As prevalências variaram de 20% para o genogrupo 2, o menos prevalente, até 42,2% para o genogrupo 3, o mais encontrado. Distribuição esta, semelhante à descrita no soro de doadores de sangue, de pacientes com hepatite B e de portadores de HIV no Brasil, o qual caracterizou os genogrupos 3 e 5 com alta prevalência e os genogrupos 2 e 4 com as menores prevalências (Devalle & Niel, 2004). Anteriormente, já havia sido demonstrado que o genogrupo 2 apresentava baixa incidência na Inglaterra (Hallett *et al.*, 2000). Na Itália, antes da caracterização do genogrupo 5, foram detectados apenas os genogrupos 1, 3 e 4 em soro e secreções nasais de crianças com doenças respiratórias agudas (Maggi *et al.*, 2003). O fato do grupo genômico 2 não ter sido detectado reforça a idéia de uma menor prevalência desse genogrupo.

Ademais, esse trabalho mostrou que a excreção simultânea de diferentes genogrupos do TTV é um evento comum, ao menos em pacientes com gastroenterite. Todas as possíveis combinações de pareamento entre os genogrupos do TTV (G1 + G2, G1 + G3, etc.) foram encontradas, demonstrando uma ausência de antagonismo entre os genogrupos. A mais frequente associação entre os genogrupos foi G1 + G3, encontrada em 27 amostras. É interessante ressaltar que, um estudo anterior mencionou uma possível existência de sinergia entre os genogrupos 1 e 3, mostrando que os indivíduos coinfectados com estes dois genogrupos tendem a ter uma carga viral maior do que a esperada (Maggi *et al.*, 2005). No entanto, este fenômeno não foi observado nas 135 amostras de fezes analisadas no nosso trabalho, onde a carga viral ($10^{4.0}$ a $10^{4.5}$ gEq/g de fezes) não

mostrou variação significativa dependendo dos genogrupos do TTV e suas associações.

Quando avaliada a presença dos vírus causadores de gastroenterite em pacientes portadores de TTV, em 6 indivíduos foi detectada a presença de Rotavirus (RV) (4%), em 9 indivíduos a presença de Astrovirus (AstV) (10%) e em 38 indivíduos a presença de Norovirus (NoV) (30%). Ao se analisar o inverso, a prevalência do TTV nos pacientes infectados pelos vírus causadores de gastroenterite, os resultados mostraram alta prevalência do TTV nos pacientes infectados por esses vírus. Em 95% dos indivíduos positivos para NoV, em 69,2% dos que apresentaram AstV e 85% dos pacientes com RV o TTV também estava presente. Apesar da alta prevalência do TTV nos pacientes infectados por vírus da gastroenterite, apenas o resultado encontrado nos pacientes infectados por AstV e TTV foi considerado significativo ($p < 0,05$). Além disso, houve correlação entre a presença dos sintomas clínicos de gastroenterite e a taxa de detecção de TTV.

As três principais características epidemiológicas da infecção do TTV em soro são: alta prevalência em indivíduos saudáveis (Niel *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2001; Devalle & Niel, 2004), presença dos cinco grupos filogenéticos e coinfeção de genogrupos em um mesmo paciente (Peng *et al.*, 2002; Devalle & Niel, 2004; Devalle *et al.*, 2009). Nesse estudo, as três características da infecção do TTV em soro de indivíduos saudáveis também foram observadas nas amostras de fezes de pacientes com gastroenterite. Apesar de amostras de soro e fezes pareadas não terem sido comparadas, os resultados encontrados mostraram que as amostras de fezes também podem ser utilizadas para a caracterização molecular do TTV. Os resultados reforçam a hipótese previamente formulada que o TTV é excretado pelas fezes e pode se disseminar pela rota fecal-oral na população em geral (Ukita *et al.*, 1999).

6. CONCLUSÕES

- Diferenças significativas entre os métodos de detecção do TTV por PCR foi observada (55,6% - NCR PCR, 60% - Grupo específico e 88,9% - PCR em tempo-real), mostrando que a detecção por PCR em tempo-real foi o mais eficiente para detecção do TTV em fezes.
- Uma alta prevalência do TTV (91,1%) foi observada em fezes de pacientes com gastroenterite quando combinados os três métodos de detecção;
- O sistema de PCR em tempo-real detectou o DNA do TTV em 88,9% das amostras com carga viral variando $10^{2,7}$ a $10^{6,5}$, resultado semelhante ao encontrado em soro de pacientes saudáveis estudado por outros autores.
- Todos os genogrupos conhecidos do TTV estavam presentes nas fezes de pacientes com gastroenterite, sendo o grupo 3 o mais prevalente, seguido pelos genogrupos 1, 5, 4 e 2.
- As cargas virais encontradas nas amostras de fezes foram aproximadamente 0,5 log maior (4,34 – 3,84) no grupo de pacientes que tinham coinfeção de genogrupos do que nos pacientes mono infectados.
- A coinfeção entre os genogrupos 1 e 3 nas fezes foi a mais encontrada entre as amostras estudadas, corroborando resultados descritos previamente em amostras de soro.
- Quando analisada a correlação entre o TTV e os vírus causadores de gastroenterite, apenas a correlação entre AstV e o TTV foi estatisticamente significativa.

7. PERSPECTIVAS

- Correlacionar a detecção e os genótipos do TTV nas fezes com amostras ambientais
- Caracterizar a presença do TTV em amostras pareadas de fezes e soro de indivíduos saudáveis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe K, Inami T, Asano K, Miyoshi C, Masaki N, Hayashi S, *et al.* *TT virus infection is widespread in the general populations from different geographic regions.* **J Clin Microbiol**, 1999; 37(8): 2703-05.
- Asabe S, Nishizawa T, Iwanari H and Okamoto H. *Phosphorylation of serine-rich protein encoded by open reading frame 3 of the TT virus genome.* **Biochem Biophys Res Commun**, 2001; 286(2): 298-304.
- Bagaglio S, Sitia G, Prati D, Cella D, Hasson H, Novati R, *et al.* *Mother-to-child transmission of TT virus: sequence analysis of non-coding region of TT virus in infected mother-infant pairs.* **Arch Virol**, 2002; 147(4): 803-12.
- Ball JK, Curran R, Berridge S, Grabowska AM, Jameson CL, Thomson BJ, *et al.* *TT virus sequence heterogeneity in vivo: evidence for co-infection with multiple genetic types.* **J Gen Virol**, 1999; 80 (7): 1759-68.
- Bando M, Ohno S, Oshikawa K, Takahashi M, Okamoto H and Sugiyama Y. *Infection of TT virus in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.* **Respir Med**, 2001; 95(12): 935-42.
- Bando M, Takahashi M, Ohno S, Hosono T, Hironaka M, Okamoto H, *et al.* *Torque teno virus DNA titre elevated in idiopathic pulmonary fibrosis with primary lung cancer.* **Respirology**, 2008; 13(2): 263-69.
- Bernardin F, Operskalski E, Busch M and Delwart E. *Transfusion transmission of highly prevalent commensal human viruses.* **Transfusion**, 2010; 50(11): 2474-83.
- Biagini P. *Human circoviruses.* **Vet Microbiol**, 2004; 98(2): 95-101.
- Biagini P, Gallian P, Attoui H, Cantaloube JF, de Micco P and de Lamballerie X. *Determination and phylogenetic analysis of partial sequences from TT virus isolates.* **J Gen Virol**, 1999; 80 (2): 419-24.

- Biagini P, Gallian P, Cantaloube JF, Attoui H, de Micco P and de Lamballerie X. *Distribution and genetic analysis of TTV and TTMV major phylogenetic groups in French blood donors. J Med Virol*, 2006; 78(2): 298-304.
- Biagini P, Gallian P, Touinssi M, Cantaloube JF, Zapitelli JP, de Lamballerie X, *et al.* *High prevalence of TT virus infection in French blood donors revealed by the use of three PCR systems. Transfusion*, 2000; 40(5): 590-05.
- Biagini P, Uch R, Belhouchet M, Attoui H, Cantaloube JF, Brisbarre N, *et al.* *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*, 2007; 88(10): 2696-701.
- Blazsek A, Sillo P, Ishii N, Gergely P, Jr., Poor G, Preisz K, *et al.* *Searching for foreign antigens as possible triggering factors of autoimmunity: Torque Teno virus DNA prevalence is elevated in sera of patients with bullous pemphigoid. Exp Dermatol*, 2008; 17(5): 446-54.
- Braham S, Iturriza-Gomara M and Gray J. *Detection of TT virus by single-primer sequence-independent amplification in multiple samples collected from an outbreak of gastroenteritis. Arch Virol*, 2009; 154(6): 981-85.
- Brassard J, Gagne MJ, Lamoureux L, Inglis GD, Leblanc D and Houde A. *Molecular detection of bovine and porcine Torque teno virus in plasma and feces. Vet Microbiol*, 2008; 126(1): 271-76.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. *Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol*, 1990; 28: 495-503.
- Cacoub P, Rosenthal E, Gerolami V, Hausfater P, Ghillani P, Sterkers Y, *et al.* *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. Clin Microbiol Infect, 2003; 9(1): 39-44.

Calcaterra S, Zaniratti MS, Serraino D, Peroni M, Abbate I, Cappiello G, *et al. Cervicovaginal shedding of TT virus in HIV-infected women. J Hum Virol*, 2001; 4(6): 343-45.

Carducci A, Morici P, Pizzi F, Battistini R, Rovini E and Verani M. *Study of the viral removal efficiency in a urban wastewater treatment plant. Water Sci Technol*, 2008; 58(4): 893-97.

Carducci A, Verani M, Battistini R, Pizzi F, Rovini E, Andreoli E, *et al. Epidemiological surveillance of human enteric viruses by monitoring of different environmental matrices. Water Sci Technol*, 2006; 54(3): 239-44.

Carstens EB. *Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). Arch Virol*, 2010; 155: 133-46.

Chan PK, Chik KW, Li CK, Tang NL, Ming MS, Cheung JL, *et al. Prevalence and genotype distribution of TT virus in various specimen types from thalassaemic patients. J Viral Hepat*, 2001; 8(4): 304-09.

Christensen JK, Eugen-Olsen J, M SL, Ullum H, Gjedde SB, Pedersen BK, *et al. Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency virus. J Infect Dis*, 2000; 181(5): 1796-99.

Deng X, Terunuma H, Handema R, Sakamoto M, Kitamura T, Ito M, *et al. 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. J Med Virol*, 2000; 62(4): 531-37.

Desai M, Pal R, Deshmukh R and Banker D. *Replication of TT virus in hepatocyte and leucocyte cell lines. J Med Virol*, 2005; 77(1): 136-43.

- Desai SM, Muerhoff AS, Leary TP, Erker JC, Simons JN, Chalmers ML, *et al.* *Prevalence of TT virus infection in US blood donors and populations at risk for acquiring parenterally transmitted viruses.* **J Infect Dis**, 1999; 179(5): 1242-44.
- Devalle S and Niel C. *Distribution of TT virus genomic groups 1-5 in Brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV-1-infected patients.* **J Med Virol**, 2004; 72(1): 166-73.
- Devalle S, Rua F, Morgado MG and Niel C. *Variations in the frequencies of torque teno virus subpopulations during HAART treatment in HIV-1-coinfected patients.* **Arch Virol**, 2009; 154(8): 1285-91.
- Diniz-Mendes L, Paula VS, Luz SL and Niel C. *High prevalence of human Torque teno virus in streams crossing the city of Manaus, Brazilian Amazon.* **J Appl Microbiol**, 2008; 105(1): 51-58.
- Erensoy S, Sayiner AA, Turkoglu S, Canatan D, Akarca US, Sertoz R, *et al.* *TT virus infection and genotype distribution in blood donors and a group of patients from Turkey.* **Infection**, 2002; 30(5): 299-302.
- Erker JC, Leary TP, Desai SM, Chalmers ML and Mushahwar IK. *Analyses of TT virus full-length genomic sequences.* **J Gen Virol**, 1999; 80 (7):1743-50.
- Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T and Glass RI. *Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States.* **J Infect Dis**, 1998; 178(6): 1571-78.
- Forns X, Hegerich P, Darnell A, Emerson SU, Purcell RH and Bukh J. *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.* **J Med Virol**, 1999; 59(3): 313-17.

- Gallian P, Biagini P, Zhong S, Touinssi M, Yeo W, Cantaloube JF, *et al.* *TT virus: a study of molecular epidemiology and transmission of genotypes 1, 2 and 3.* **J Clin Virol**, 2000; 17(1): 43-49.
- Garbuglia AR, Iezzi T, Capobianchi MR, Pignoloni P, Pulsoni A, Sourdis J, *et al.* *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**, 2003; 16(2): 109-18.
- Gergely P, Jr., Blazsek A, Danko K, Ponyi A and Poor G. *Detection of TT virus in patients with idiopathic inflammatory myopathies.* **Ann N Y Acad Sci**, 2005a; 1050: 304-13.
- Gergely P, Jr., Pullmann R, Stancato C, Otvos L, Jr., Koncz A, Blazsek A, *et al.* *Increased prevalence of transfusion-transmitted virus and cross-reactivity with immunodominant epitopes of the HRES-1/p28 endogenous retroviral autoantigen in patients with systemic lupus erythematosus.* **Clin Immunol**, 2005b; 116(2): 124-34.
- Gerner P, Oettinger R, Gerner W, Falbrede J and Wirth S. *Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission.* **Pediatr Infect Dis J**, 2000; 19(11): 1074-77.
- Guix S, Bosch A and Pinto RM. *Human astrovirus diagnosis and typing: current and future prospects.* **Lett Appl Microbiol**, 2005; 41(2): 103-05.
- Hallett RL, Clewley JP, Bobet F, McKiernan PJ and Teo CG. *Characterization of a highly divergent TT virus genome.* **J Gen Virol**, 2000; 81(9): 2273-79.
- Haramoto E, Katayama H, Oguma K and Ohgaki S. *Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan.* **Appl Environ Microbiol**, 2005a; 71(5): 2403-11.

- Haramoto E, Katayama H, Oguma K, Yamashita H, Nakajima E and Ohgaki S. *One-year monthly monitoring of Torque teno virus (TTV) in wastewater treatment plants in Japan.* **Water Res**, 2005b; 39(10): 2008-13.
- Heller F, Zchoval R, Koelzer A, Nitschko H and Froesner GG. *Isolate KAV: a new genotype of the TT-virus family.* **Biochem Biophys Res Commun**, 2001; 289(5): 937-41.
- Hohne M, Berg T, Muller AR and Schreier E. *Detection of sequences of TT virus, a novel DNA virus, in German patients.* **J Gen Virol**, 1998; 79 (11): 2761-64.
- Hsieh SY, Wu YH, Ho YP, Tsao KC, Yeh CT and Liaw YF. *High prevalence of TT virus infection in healthy children and adults and in patients with liver disease in Taiwan.* **J Clin Microbiol**, 1999; 37(6): 1829-31.
- Huang LY, Oystein Jonassen T, Hungnes O and Grinde B. *High prevalence of TT virus-related DNA (90%) and diverse viral genotypes in Norwegian blood donors.* **J Med Virol**, 2001; 64(3): 381-86.
- Huang YH, Wu JC, Lin CC, Sheng WY, Lee PC, Wang YJ, *et al.* *Prevalence and risk factor analysis of TTV infection in prostitutes.* **J Med Virol**, 2000; 60(4): 393-95.
- Inami T, Konomi N, Arakawa Y and Abe K. *High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen.* **J Clin Microbiol**, 2000; 38(6): 2407-08.
- Irving WL, Ball JK, Berridge S, Curran R, Grabowska AM, Jameson CL, *et al.* *TT virus infection in patients with hepatitis C: frequency, persistence, and sequence heterogeneity.* **J Infect Dis**, 1999; 180(1): 27-34.
- Ishikawa T, Hamano Y and Okamoto H. *Frequent detection of TT virus in throat swabs of pediatric patients.* **Infection**, 1999; 27(4-5): 298.

- Itoh Y, Takahashi M, Fukuda M, Shibayama T, Ishikawa T, Tsuda F, *et al.* *Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans.* **Biochem Biophys Res Commun**, 2000; 279(2): 718-24.
- Kakkola L, Bonden H, Hedman L, Kivi N, Moisala S, Julin J, *et al.* *Expression of all six human Torque teno virus (TTV) proteins in bacteria and in insect cells, and analysis of their IgG responses.* **Virology**, 2008; 382(2): 182-89.
- Kakkola L, Hedman K, Vanrobaeys H, Hedman L and Soderlund-Venermo M. *Cloning and sequencing of TT virus genotype 6 and expression of antigenic open reading frame 2 proteins.* **J Gen Virol**, 2002; 83(5): 979-90.
- Kamahora T, Hino S and Miyata H. *Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells.* **J Virol**, 2000; 74(21): 9980-86.
- Kekarainen T, Lopez-Soria S and Segales J. *Detection of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in boar sera and semen.* **Theriogenology**, 2007; 68(7): 966-71.
- Kooistra K, Zhang YH, Henriquez NV, Weiss B, Mumberg D and Noteborn MH. *TT virus-derived apoptosis-inducing protein induces apoptosis preferentially in hepatocellular carcinoma-derived cells.* **J Gen Virol**, 2004; 85(6): 1445-50.
- Kosek M, Bern C and Guerrant RL. *The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000.* **Bull World Health Organ**, 2003; 81(3): 197-204.
- Krekulova L, Rehak V, Killoran P, Madrigal N and Riley LW. *Genotypic distribution of TT virus (TTV) in a Czech population: evidence for sexual transmission of the virus.* **J Clin Virol**, 2001; 23(1): 31-41.

- Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Desai SM and Mushahwar IK. *Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals.* **J Gen Virol**, 1999; 80 (8):2115-20.
- Leppik L, Gunst K, Lehtinen M, Dillner J, Streker K and de Villiers EM. *In vivo and in vitro intragenomic rearrangement of TT viruses.* **J Virol**, 2007; 81(17): 9346-56.
- Lin CL, Kyono W, Tongson J, Chua PK, Easa D, Yanagihara R, *et al.* *Fecal excretion of a novel human circovirus, TT virus, in healthy children.* **Clin Diagn Lab Immunol**, 2000; 7(6): 960-63.
- Lin HH, Kao JH, Lee PI and Chen DS. *Early acquisition of TT virus in infants: possible minor role of maternal transmission.* **J Med Virol**, 2002; 66(2): 285-90.
- Luo K, Liang W, He H, Yang S, Wang Y, Xiao H, *et al.* *Experimental infection of nonenveloped DNA virus (TTV) in rhesus monkey.* **J Med Virol**, 2000; 61(1): 159-64.
- Luo K and Zhang L. *Enteric transmission of transfusion-transmitted virus.* **Chin Med J (Engl)**, 2001; 114(11): 1201-04.
- Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Fornai C, Vatteroni M, Pistello M, *et al.* *Relationships between total plasma load of torquetenovirus (TTV) and TTV genogroups carried.* **J Clin Microbiol**, 2005; 43(9): 4807-10.
- Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Meschi S, Rocchi J, Fornai C, *et al.* *Rapid increase in total torquetenovirus (TTV) plasma viremia load reveals an apparently transient superinfection by a TTV of a novel group 2 genotype.* **J Clin Microbiol**, 2006; 44(7): 2571-74.
- Maggi F, Andreoli E, Riente L, Meschi S, Rocchi J, Delle Sedie A, *et al.* *Torquetenovirus in patients with arthritis.* **Rheumatology (Oxford)**, 2007; 46(5): 885-86.

Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, *et al.* *TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity.* **J Virol**, 2003; 77(4): 2418-25.

Maggi F, Pifferi M, Tempestini E, Lanini L, De Marco E, Fornai C, *et al.* *Correlation between Torque tenovirus infection and serum levels of eosinophil cationic protein in children hospitalized for acute respiratory diseases.* **J Infect Dis**, 2004; 190(5): 971-74.

Martelli F, Caprioli A, Di Bartolo I, Cibir V, Pezzotti G, Ruggeri FM, *et al.* *Detection of swine torque teno virus in Italian pig herds.* **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**, 2006; 53(5): 234-38.

Matsubara H, Michitaka K, Horiike N, Kihana T, Yano M, Mori T, *et al.* *Existence of TT virus DNA and TTV-like mini virus DNA in infant cord blood: mother-to-neonatal transmission.* **Hepatol Res**, 2001; 21(3): 280-87.

Matsubara H, Michitaka K, Horiike N, Yano M, Akbar SM, Torisu M, *et al.* *Existence of TT virus DNA in extracellular body fluids from normal healthy Japanese subjects.* **Intervirology**, 2000; 43(1): 16-19.

Maunula L and Von Bonsdorff CH. *Norovirus genotypes causing gastroenteritis outbreaks in Finland 1998-2002.* **J Clin Virol**, 2005; 34(3): 186-94.

Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK. *Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology--a trip of over 50 years.* **Annu Rev Microbiol**. 1995; 49: 461-87.

Meehan BM, Creelan JL, McNulty MS and Todd D. *Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses.* **J Gen Virol**, 1997; 78(1): 221-27.

Miyamoto M, Takahashi H, Sakata I and Adachi Y. *Hepatitis-associated aplastic anemia and transfusion-transmitted virus infection.* **Intern Med**, 2000; 39(12): 1068-70.

- Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, Yamada A, Khan MA, Murakami J, *et al.* *Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus.* **J Virol**, 1999; 73(5): 3582-86.
- Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, Leary TP, Simons JN, Birkenmeyer LG, *et al.* *Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans.* **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1999; 96(6): 3177-82.
- Niel C, de Oliveira JM, Ross RS, Gomes SA, Roggendorf M and Viazov S. *High prevalence of TT virus infection in Brazilian blood donors.* **J Med Virol**, 1999; 57(3): 259-63.
- Niel C, Diniz-Mendes L and Devalle S. *Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup.* **J Gen Virol**, 2005; 86(5): 1343-47.
- Niel C, Saback FL and Lampe E. *Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults.* **J Clin Microbiol**, 2000; 38(5): 1926-30.
- Ninomiya M, Nishizawa T, Takahashi M, Lorenzo FR, Shimosegawa T and Okamoto H. *Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb.* **J Gen Virol**, 2007; 88(7): 1939-44.
- Ninomiya M, Takahashi M, Nishizawa T, Shimosegawa T and Okamoto H. *Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy.* **J Clin Microbiol**, 2008; 46(2): 507-14
- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y and Mayumi M. *A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology.* **Biochem Biophys Res Commun**, 1997; 241(1): 92-97.

- Noteborn MH, de Boer GF, van Roozelaar DJ, Karreman C, Kranenburg O, Vos JG, *et al.* Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. **J Virol**, 1991; 65(6): 3131-39.
- Okamoto H. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. **Curr Top Microbiol Immunol**, 2009; 331:1-20.
- Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, *et al.* Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. **J Med Virol**, 1998a; 56(2): 128-32.
- Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, Ukita M, Ikeda H, Iizuka H, *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology **Hepatol Res**, 1998b; 10:1-16.
- Okamoto H, Nishizawa T, Takahashi M, Asabe S, Tsuda F and Yoshikawa A. Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. **Virology**, 2001; 288(2): 358-68.
- Okamoto H, Nishizawa T, Tawara A, Takahashi M, Kishimoto J, Sai T, *et al.* TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. **Biochem Biophys Res Commun**, 2000a; 279(2): 700-07.
- Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M, Takahashi M, Fukuda M, Iizuka H, *et al.* The entire nucleotide sequence of a TT virus isolate from the United States (TUS01): comparison with reported isolates and phylogenetic analysis. **Virology**, 1999a; 259(2): 437-48.
- Okamoto H, Takahashi M, Kato N, Fukuda M, Tawara A, Fukuda S, *et al.* Sequestration of TT virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear cells. **J Virol**, 2000b; 74(21): 10236-39.

- Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Tawara A, Fukai K, Muramatsu U, *et al.* *Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia.* **J Gen Virol**, 2002; 83(6): 1291-97.
- Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, *et al.* *Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions.* **Virology**, 1999b; 259(2): 428-36.
- Ott C, Duret L, Chemin I, Treppe C, Mandrand B and Komurian-Pradel F. *Use of a TT virus ORF1 recombinant protein to detect anti-TT virus antibodies in human sera.* **J Gen Virol**, 2000; 81(12): 2949-58.
- Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA and Glass RI. *Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children.* **Emerg Infect Dis**, 2003; 9(5): 565-72.
- Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinje J and Parashar UD. *Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis.* **Emerg Infect Dis**, 2008; 14(8): 1224-31.
- Peng YH, Nishizawa T, Takahashi M, Ishikawa T, Yoshikawa A and Okamoto H. *Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants.* **Arch Virol**, 2002; 147(1): 21-41.
- Pifferi M, Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Marco ED, Fornai C, *et al.* *Associations between nasal torquetenovirus load and spirometric indices in children with asthma.* **J Infect Dis**, 2005; 192(7): 1141-48.
- Pifferi M, Maggi F, Caramella D, De Marco E, Andreoli E, Meschi S, *et al.* *High torquetenovirus loads are correlated with bronchiectasis and peripheral airflow limitation in children.* **Pediatr Infect Dis J**, 2006; 25(9): 804-08.

- Prescott LE and Simmonds P. *Global distribution of transfusion-transmitted virus.* **N Engl J Med**, 1998; 339(11): 776-77.
- Puig-Basagoiti F, Cabana M, Guilera M, Gimenez-Barcons M, Sirera G, Tural C, *et al.* *Prevalence and route of transmission of infection with a novel DNA virus (TTV), hepatitis C virus, and hepatitis G virus in patients infected with HIV.* **J Acquir Immune Defic Syndr**, 2000; 23(1): 89-94.
- Qiu J, Kakkola L, Cheng F, Ye C, Soderlund-Venermo M, Hedman K, *et al.* *Human circovirus TT virus genotype 6 expresses six proteins following transfection of a full-length clone.* **J Virol**, 2005; 79(10): 6505-10.
- Romeo R, Hegerich P, Emerson SU, Colombo M, Purcell RH and Bukh J. *High prevalence of TT virus (TTV) in naive chimpanzees and in hepatitis C virus-infected humans: frequent mixed infections and identification of new TTV genotypes in chimpanzees.* **J Gen Virol**, 2000; 81(4): 1001-07.
- Ross RS, Viazov S, Runde V, Schaefer UW and Roggendorf M. *Detection of TT virus DNA in specimens other than blood.* **J Clin Virol**, 1999; 13(3): 181-84.
- Saback FL, Gomes SA, de Paula VS, da Silva RR, Lewis-Ximenez LL and Niel C. *Age-specific prevalence and transmission of TT virus.* **J Med Virol**, 1999; 59(3): 318-22.
- Schvoerer E, Bonnet F, Dubois V, Cazaux G, Serceau R, Fleury HJ, Lafon ME. *PCR detection of human enteric viruses in bathing areas, waste waters and human stools in Southwestern France.* **Res Microbiol**, 2000; 151(8): 693-01.
- Sospedra M, Zhao Y, zur Hausen H, Muraro PA, Hamashin C, de Villiers EM, *et al.* *Recognition of conserved amino acid motifs of common viruses and its role in autoimmunity.* **PLoS Pathog**, 2005; 1(4): 41.

- Sugiyama K, Goto K, Ando T, Mizutani F, Terabe K, Yokoyama T. *Highly diverse TTV population in infants and their mothers.* **Virus Res.** 2001 73: 183 – 88.
- Szladek G, Juhasz A, Kardos G, Szoke K, Major T, Sziklai I, *et al.* *High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma.* **J Clin Pathol**, 2005; 58(4): 402-05.
- Takahashi K, Hoshino H, Ohta Y, Yoshida N and Mishiro S. *Very high prevalence of TT virus (TTV) infection in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers.* **Hepatol Res** 1998a; 12: 233-39.
- Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M and Mishiro S. *Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus.* **Arch Virol**, 2000; 145(5): 979-93.
- Takahashi K, Ohta Y and Mishiro S. *Partial 2.4-kb sequences of TT virus (TTV) genome from eight Japanese isolates: diagnostic and phylogenetic implications.* **Hepatol Res**, 1998b; 12: 111-20.
- Takayama S, Yamazaki S, Matsuo S and Sugii S. *Multiple infection of TT virus (TTV) with different genotypes in Japanese hemophiliacs.* **Biochem Biophys Res Commun**, 1999; 256(1): 208-11.
- Tanaka H, Okamoto H, Luengrojanakul P, Chainuvati T, Tsuda F, Tanaka T, *et al.* *Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A to G hepatitis in hepatitis patients and healthy blood donors in Thailand.* **J Med Virol**, 1998; 56(3): 234-38.
- Tawara A, Akahane Y, Takahashi M, Nishizawa T, Ishikawa T and Okamoto H. *Transmission of human TT virus of genotype 1a to chimpanzees with fecal supernatant or serum from patients with acute TTV infection.* **Biochem Biophys Res Commun**, 2000; 278(2): 470-76.

- Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W and Koch MA. *A very small porcine virus with circular single-stranded DNA*. **Nature**, 1982; 295(5844): 64-66.
- Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Takahashi M, *et al*. *Influence of TT virus infection on the thrombocytopenia of patients with chronic liver disease*. **Hepatol Res**, 2001; 20(3): 288-300.
- Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Takahashi M, *et al*. *TT virus of certain genotypes may reduce the platelet count in patients who achieve a sustained virologic response to interferon treatment for chronic hepatitis C*. **Hepatol Res**, 2002; 23(2): 105-14.
- Ukita M, Okamoto H, Kato N, Miyakawa Y and Mayumi M. *Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A-G hepatitis*. **J Infect Dis**, 1999; 179(5): 1245-48.
- Umemura T, Alter HJ, Tanaka E, Yeo AE, Shih JW, Orii K, *et al*. *Association between SEN virus infection and hepatitis C in Japan*. **J Infect Dis**, 2001; 184(10): 1246-51.
- Vaidya SR, Chitambar SD and Arankalle VA. *Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area*. **J Hepatol**, 2002; 37(1): 131-36.
- Vasconcelos HC, Menezes ME and Niel C. *TT virus infection in children and adults who visited a general hospital in the south of Brazil for routine procedure*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2001; 96(4): 519-22.
- Vasilyev EV, Trofimov DY, Tonevitsky AG, Ilinsky VV, Korostin DO and Rebrikov DV. *Torque Teno Virus (TTV) distribution in healthy Russian population*. **Virology**, 2009; 6(134): 1-4.
- Verani M, Casini B, Battistini R, Pizzi F, Rovini E and Carducci A. *One-year monthly monitoring of Torque teno virus (TTV) in river water in Italy*. **Water Sci Technol**, 2006; 54(3): 191-95.

- Viazov S, Ross RS, Niel C, de Oliveira JM, Varenholz C, Da Villa G, *et al.* *Sequence variability in the putative coding region of TT virus: evidence for two rather than several major types.* **J Gen Virol**, 1998; 79 (12): 3085-89.
- Yazici M, Comert MR, Mas R, Guney C, Cinar E and Kocar IH. *Transfusion-transmitted virus prevalence in subjects at high risk of sexually transmitted infection in Turkey.* **Clin Microbiol Infect**, 2002; 8(6): 363-67.
- Yokoyama H, Yasuda J, Okamoto H and Iwakura Y. *Pathological changes of renal epithelial cells in mice transgenic for the TT virus ORF1 gene.* **J Gen Virol**, 2002; 83(1): 141-50.
- Zheng H, Ye L, Fang X, Li B, Wang Y, Xiang X, *et al.* *Torque teno virus (SANBAN isolate) ORF2 protein suppresses NF-kappaB pathways via interaction with IkkappaB kinases.* **J Virol**, 2007; 81(21): 11917-24.
- Zheng MY, Lin Y, Li DJ, Ruan HB, Chen Y and Wu TT. *[TTV and HPV co-infection in cervical smears of patients with cervical lesions in littoral of Zhejiang province].* **Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi**, 2010; 24(2): 110-12.
- Zhong S, Yeo W, Lin CK, Lin XR, Tang MW and Johnson PJ. *Quantitative and genotypic analysis of TT virus infection in Chinese blood donors.* **Transfusion**, 2001; 41(8): 1001-07.