

## Sulla possibile patogenicità del virus trasmesso attraverso trasfusioni (TTV)

Anneo Violante, Raffaella A.M. Wetzl, Angelina Tedesco

Cattedra di Analisi Cliniche, Facoltà di Scienze M.F.N., Università di Roma "La Sapienza"

### ABSTRACT

#### About the possible pathogenicity of transfusion - transmitted virus (TTV)

Among viruses assumed to be responsible of hepatitis in humans, transfusion - transmitted virus (TTV) is the last isolated in order of time (Japan, 1997). Its genome is characterized by a circular single strand DNA without envelope and with an unknown symmetry capsid. Disagreements are the hypothesis on its effective pathogenic role, both about a possible hepatic damage and its neoplastic evolution. Although TTV main transmission way is the parenteral one, its recovery in faeces, semen and saliva specimens give rise to a possible direct way of infection. There are no methods to reveal anti - TTV antibodies at the moment, and the only possible technique available seems to be the Polymerase Chain Reaction (PCR).

### RIASSUNTO

Tra i virus ritenuti responsabili di epatite, l'ultimo isolato in ordine di tempo (1997, Giappone) è il TTV (virus trasmesso attraverso le trasfusioni). Il suo genoma è costituito da un singolo filamento di DNA circolare privo di envelope e con capsid a simmetria sconosciuta. Le ipotesi sulla sua effettiva patogenicità sono discordanti, sia per quanto riguarda il danno epatico che per la sua evoluzione in neoplasia. Sebbene la via parenterale sia la principale via di trasmissione, l'isolamento di TTV in campioni di feci, liquido seminale e saliva apre inquietanti prospettive sulla possibile trasmissione diretta del virus. La diagnostica di laboratorio al momento non dispone di metodiche per il rilevamento di anticorpi anti-TTV; la reazione polimerasica a catena (PCR), è l'unica tecnica disponibile.

### INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni, sono stati realizzati numerosi progressi nella conoscenza dei virus che provocano epatiti. I più noti sono i virus B, C e D trasmessi per via parenterale, ed i virus A ed E per via oro-fecale. (Tab.1) Tuttavia, nonostante i molti progressi nella eziopatogenesi di questi stati morbosi, sono segnalati ancora casi di epatiti da agenti patogeni ignoti. (1)

Recentemente grazie alle nuove tecniche di biologia molecolare, sono stati identificati due nuovi virus: l'HGV e il TTV. Nel 1995 è stato sequenziato il genoma del virus denominato GB virus C o virus dell'epatite G (GBV-C/HGV) individuato come potenziale agente responsabile di epatiti post-trasfusionali, post-trapianto, ad evoluzione cirrotica (in precedenza ritenuta criptogenica), e di epatiti acute.

L'ultimo virus isolato in ordine di tempo è il TTV (letteralmente "Virus Trasmesso attraverso le Trasfusioni"), scoperto in Giappone nel 1997 dal gruppo guidato da Makoto Mayumi nel siero di un paziente affetto da epatite post-trasfusionale di cui non si riusciva ad evidenziare la causa. (2)

Di questo stato morboso saranno prese in esame: le caratteristiche, la clinica, l'epidemiologia e i metodi di rilevamento del TT virus, pur considerando che le conoscenze fino ad oggi sono esigue e ancora oggetto di revisione.

### CARATTERISTICHE DEL VIRUS

Il TTV è un virus privo di envelope con capsid a simmetria sconosciuta (diametro 30-50 nm). Ha un genoma a DNA circolare a singolo filamento e a polarità negativa (3) costituito da 3852 nucleotidi. (Fig. 1)

Per tali caratteristiche è stato incluso da alcuni nella famiglia denominata Circoviridae (4); secondo altri ricercatori, apparterebbe alla nuova famiglia Circinoviridae (5-6).

Sul TTV -DNA sono presenti 2 moduli aperti di lettura (open reading frames, ORF).

ORF 1 codifica per una proteina non strutturale di 770 aminoacidi, implicata nella replicazione virale. ORF 2 codifica per una proteina strutturale di 150 aminoacidi costituente il capsid. Si conoscono finora 16 genotipi di TTV che hanno una divergenza genetica maggiore del 30% nella sequenza nucleotidica ORF.

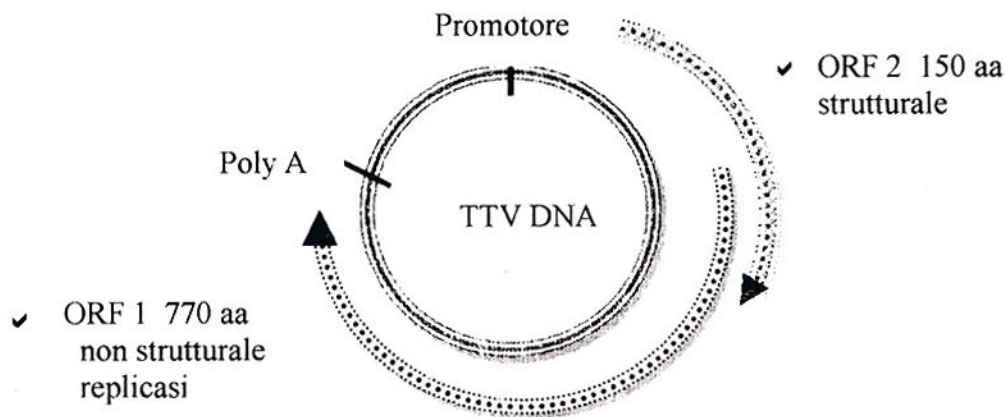
Un recente studio di Marsiglia (7) descrive la distribuzione dei tre maggiori genotipi di TTV nel mondo: genotipo 1, 2 e 3. In Asia prevale il genotipo 1; il genotipo 3 sarebbe assente in Africa.

Al momento attuale è stata dimostrata una larga diffusione dei diversi genotipi di TTV sia nella popolazione con epatiti di origine sconosciuta che in popolazione apparentemente sana. (8-9)

In USA, Francia, Giappone e Cina sono stati isolati, per ciascun paese, genotipi con una bassa divergenza

**Tabella 1**  
Confronto dei virus che provocano epatiti

Caratteristiche	A	B	D	C	E	G	TTvirus
Famiglia	Picornaviridae (RNA+)	Hepadnaviridae (DNA)	Arenaviridae (RNA-)	Flaviviridae (RNA+)	Non classificato (RNA+)	Flaviviridae (RNA+)	Circoviridae (DNA)
Patologia	Leggera	Moderata	Può essere severa in persone HBV +	Severa	Leggera	Molto leggera (può causare epatite?)	Può essere causa di epatite di eziologia sconosciuta?
Portatore	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI
Cronicità	-	+	+	+++	-	+	+
Trasmissione							
Oro-fecale	+	+/-	+/-	+/-	+	?	+
Sangue	-	+	+	+	-	+	+
Via sessuale	-	+	+	+	-	?	+
Tempo di incubazione (gg)	In media 20-30	In media 60-90	In media 60-90	In media 60-90	In media 20-30	?	?
Insorgenza	Improvvisa	Lenta insorgenza	Variabile	Lenta insorgenza	Lenta insorgenza	?	?
Età	Bambini, giovani, adulti	Tutti	Tutti	Tutti	Tutti	?	?
Effetto protettivo delle Ig sieriche	SI	SI	SI se bloccano l'HBV	?	NO	?	?
Indagine sierologica	SI	SI	SI	SI	SI	SI	?



**Figura 1**  
Il genoma del virus

genetica e questo suggerirebbe che il virus ha avuto nei paesi indicati una antica distribuzione e una evoluzione genetica lenta nelle popolazioni indigene.

**CLINICA**

Non ci sono prove certe di un effetto patogeno diretto del virus TT nelle epatopatie croniche o in quelle fulminanti, così come non si ha la sicurezza che sia in ogni caso patogeno. (1-2)

Tuttavia, è ritenuto ormai certo che il virus possa causare infezioni transitorie ed a volte anche persistenti (10).

Da un recente studio condotto da Okamoto (11) e coll. si è dimostrata la presenza nelle cellule epatiche di pazienti TTV positivi, di forme replicative del DNA virale (doppia elica) oltre a quelle a singola elica negativa già rilevate nel siero (ciò dimostrato mediante l'uso della PCR).

Lo stesso gruppo di studio ha dimostrato che esistono altre sedi di replicazione virale oltre al fegato.

Dallo studio differenziale del DNA delle cellule del sangue periferico e del midollo osseo si è visto che le forme replicative del virus si ritrovano in quest'ultimo ma non nel sangue periferico. (12)

A tal riguardo, un recentissimo studio ipotizza che i genotipi 3 e 4 del TTV abbiano un particolare tropismo per le cellule emopoietiche e che le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) costituiscano un serbatoio del virus; un altro studio evidenzia che il TTV può replicarsi soprattutto nel midollo osseo e che l'infezione da virus possa causare anemia aplastica.(13-14)

Nella maggior parte dei portatori TTV positivi non si sono riscontrate evidenti modificazioni biochimiche a livello epatico. Tuttavia, in uno studio francese si è osservato un aumento dei livelli sierici di alanina aminotransferasi nei pazienti TTV positivi (HCV negativi), anche se tale picco risultava essere transiente e poco elevato. (10)

Uno studio americano (15) ha preso in esame un gruppo di soggetti con valori di ALT elevati e assenza di marcatori sierologici per epatite A, B e C. Solo in 5 pazienti dei 99 esaminati è stata constatata la presenza del DNA di TTV.

Mediante la tecnica dell'ibridazione in situ, alcuni studi sostengono che non esiste nessuna correlazione statisticamente significativa tra il DNA del TTV negli epatociti e il l'eventuale danno cellulare. (16-17) Con la medesima tecnica si è esclusa la presenza del virus in campioni biotici di milza, rene, stomaco e intestino. (18)

Per quanto riguarda il carcinoma epatocellulare, sebbene TTV sia stato riscontrato in presenza di virus generalmente correlati a stati neoplastici (HBV, herpesvirus, Parvovirus B19 e Adenovirus), non ci sono prove per sostenere che esso sia responsabile dell'induzione o dell'accelerazione del processo epatocarcinogeno nell'uomo. (19-20)

Pertanto essendo ancora incerta la patogenicità del virus TT, è troppo presto per stabilire schemi di presidi terapeutici. (21) Tuttavia, in uno studio condotto in Giappone su due casi di infezione quadruple (HCV, HIV, HGV, TTV), l'interferone risultava avere un effetto a lungo termine solo sul TTV. (22)

**TRASMISSIONE DEL VIRUS**

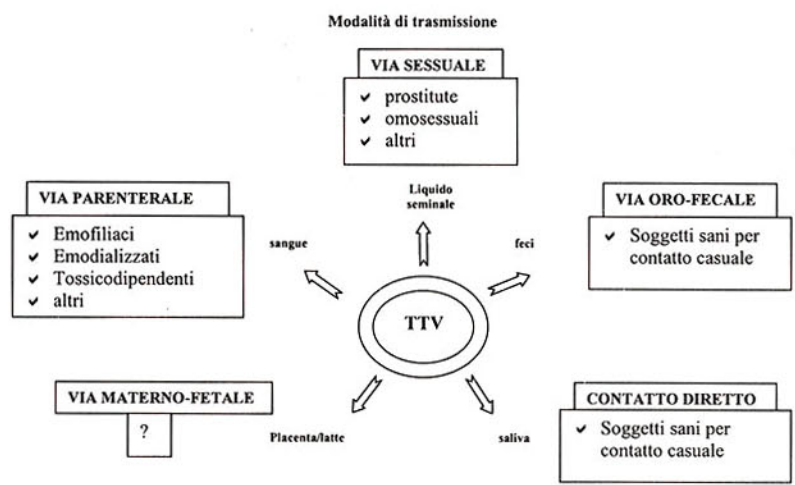
Si era ipotizzato che la principale via di trasmissione del TT virus potesse essere quella parenterale, identificando in tal modo la popolazione a maggior rischio tra gli emotrasfusi, emodializzati e tossicodipendenti. (23-24-25)

Infatti, sin dal 1998, Simmonds e coll. (2) rilevarono che esisteva un'alta prevalenza di TTV+ fra i pazienti emofiliaci che avevano ricevuto da più tempo emoderivati non trattati con anti-virali; in questa categoria di individui, inoltre, il virus si riscontrava nel 20% dei casi di epatiti fulminanti.

L'Istituto Superiore di Sanità nel 1999 ha ricercato il DNA di TTV in alcuni lotti di emoderivati e in pools plasmatici provenienti da quattro differenti regioni. Tutte le immunoglobuline e le albumine sieriche sono risultate TTV negative. L'80% dei campioni contenenti il Fattore VIII concentrato e il 40% delle immunoglobuline intramuscolari sono risultate TTV positivi, così come il 70% dei pools plasmatici. Tale studio ha confermato l'ampia diffusione del virus e che non sempre viene eliminato con i trattamenti anti-virali a cui vengono sottoposti usualmente gli emoderivati.(26)

Sin dal 1998 si osservò che il virus TT era rilevabile anche in persone sane e non entrate in contatto con derivati ematici, il che fece ritenere possibile anche una trasmissione non parenterale del virus. A conferma di tale assunto, studi condotti soprattutto da gruppi di ricercatori giapponesi su soggetti emodializzati o con epatiti fulminanti o affetti da epatiti B e C, misero in evidenza che la presenza del TT virus in questi Pz era sovrapponibile a quella riscontrata nei gruppi di controllo. (21-27-28-29-30)

Nel 1998, in ricerche sulle possibili vie di trasmissioni del virus eseguite in GB su persone considerate ad alto rischio, (31-32) la frequenza della viremia non risultò significativamente differente da quella riscontrata nei controlli a basso rischio. Inoltre, poiché la presenza virale - che aumentava considerevolmente con l'età dei soggetti studiati - coincideva con la diffusione della infezione da HAV, fu avanzata l'ipotesi che, tra le altre, fosse possibile la trasmissione del virus anche per via oro-fecale.



In due recenti studi (su campioni di sieropositivi per TTV) si è avuto la conferma (mediante l'uso della PCR) che il virus è presente anche nelle feci, liquido seminale e saliva. (33-7). In particolare il titolo virale nella saliva è risultato 100-1000 volte più alto rispetto a quello ritrovato nel siero degli stessi Pz. Questa constatazione apre prospettive inquietanti sulla possibile trasmissione diretta del virus.

I dati circa la trasmissione materno-fetale sono ancora discordanti: alcuni la ritengono possibile (34-35), altri improbabile a causa dell'alta percentuale di neonati di madri TTV negative, che sviluppano l'infezione dai tre mesi in poi (7).

A conferma di ciò un recente studio condotto in Giappone (36), basato sull'esame di 100 cordoni ombelicali di bambini nati da madri TTV positive e negative, ha osservato che il 99% dei neonati era TTV negativi.

#### METODI DI RILEVAMENTO DEL VIRUS

Al momento attuale, gli unici metodi di rilevamento del virus TT nel siero e in altri campioni biologici sono rappresentati da tecniche di biologia molecolare.

Sono stati utilizzati, a scopo di ricerca, l'ibridazione in situ, la reazione polimerasica a catena (PCR) e (nello studio delle coinfezioni virali) l'analisi di motilità degli eteroduplex (HMA). Per eseguire queste metodiche sono state selezionate sequenze altamente conservate del genoma virale. Mediante lo studio della divergenza genetica, nell'ambito di queste sequenze, è stato possibile identificare i diversi genotipi virali.

L'ibridazione in situ, che consente di effettuare una valutazione citologica e di rilevare la presenza del DNA virale, utilizza come sonda genetica parti della sequenza ORF2 e come sistema di rilevazione utilizza la digossigenina. (18)

Per la reazione polimerasica a catena (PCR) sono utilizzati primers altamente specifici che delimitano parti delle sequenze 5' UTR, ORF 1 e ORF 2. (37)

La coinfezione virale di diversi ceppi di TTV o di TTV associati ad altri virus (38) è stata studiata mediante una metodica che utilizza, in una stessa reazione polimerasica a catena, due coppie di primers, ciascuna di esse specifica per i diversi ceppi dello stesso virus o per due virus di specie diverse.

Il prodotto dell'amplificazione, contenente potenzialmente entrambi gli amplificati virali, è poi sottoposto a denaturazione; le singole eliche di DNA sono in seguito portate a una temperatura tale per cui si formano, oltre alle doppie eliche originarie, degli ibridi costituiti dal DNA di entrambi i ceppi virali o di virus differenti.

La presenza degli ibridi viene evidenziata mediante elettroforesi su gel poliacrilamide.

Per la diagnostica di laboratorio, non esistono attualmente metodiche per il rilevamento di anticorpi anti-TTV, ma si trovano in commercio kit per il rilevamento del DNA virale nei campioni biologici mediante la reazione polimerasica a catena.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Soto Jr. "The hepatitis viruses: from A to TT" *Rev Med Chil* 1999; 127(10):1161-3.
2. Glaxo Wellcome "Notizie e attualità - Un nuovo virus in agguato negli emoderivati" *Lancet*, 1998; 352: 164, 191-5, 195-7.
3. Pinho JRR, Takahashi DA e coll. "Transfusion-transmitted virus (TTV) in Brasil. Preliminary report 2000
4. Barin F. "The virus isolated from patient TT (TTV): still an orphan 2 years after its discovery" *Transfus Clin Biol* 2000; 7(1): 79-83.
5. Springfield C e coll. "TT virus as a human pathogen: significance and problems" *Virus Genes* 2000; 20(1): 35-45.
6. Andrew LM e coll. "TT virus: will Work for food?" *The American Journal of Gastroenterology* Editorial Dec 1999; 94(12): 3398-401.
7. Gallian P e coll. " TT virus: a study of molecular epidemiology and transmission of genotypes 1, 2 and 3" *J Clin Virol* 2000; 17(1): 43-9.
8. Tanaka Y e coll. " Identification of a novel 23kDa protein encoded by putative open reading frame 2 of TT virus (TTV) genotype 1 different from the other genotypes" *Arch Virol* 2000; 145(7): 1385-98.
9. Hijikata M e coll. " Genotypes of TT virus (TTV) compared between liver disease patients and healthy individuals using a new PCR system capable of differentiating 1a and 1b types from others" *Arch Virol* 1999; 144(12): 2345-54.
10. Lefrere JJ e coll. " Natural history of the TT virus infection through follow-up of TTV DNA-positive multiple-transfused patients" *Blood* 2000; 95(1): 347-51.
11. Okamoto H e coll. " Circular double-stranded forms of TT virus DNA in the liver" *J Virol* 2000; 74(11): 5161-7.
12. Okamoto H e coll. " Replicative forms of TT virus DNA in bone marrow cells" *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270(2): 657-62.
13. Okamoto H e coll. " Sequestration of TT virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear cells" *J Virol* 2000; 74(21): 10236-9.
14. Kikuchi K e coll. " Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patients" *J Med Virol* 2000; 61(1): 165-70.
15. Cleavinger PJ e coll. " Prevalence of TT virus infection in blood donors with elevated ALT in the absence of known hepatitis markers" *Am J Gastroenterol* 2000; 95(3): 772-6.
16. Rodriguez-Inigo E e coll. " Detection of TT virus DNA in liver biopsies by in situ hybridization" *Am J Pathol* 2000; 156(4): 1227-34.
17. Jiang XJ e coll. " Intrahepatic transfusion-transmitted virus detected by in situ hybridization in patients with liver diseases" *J Viral Hepat* 2000; 7(4): 292-6.
18. Fan L e coll. " Detection of transfusion transmitted virus in hepatic and extra hepatic tissues using in situ hybridisation" *Chung Hua Kan Tsang Ping Tsa Chih* 2000; 8(3): 147-9.
19. Pineau P e coll. " Effect of TT virus infection on hepatocellular carcinoma developments: results of a Euro-Asian survey" *J Infect Dis* 2000; 181(3): 1138-42.
20. Tangkijvanich P e coll. " Hepatitis viruses and chronic liver disease" *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1999; 30(3): 489-95.
21. Mizokami M e coll. " TT virus infection in patients with chronic hepatitis C virus infection-effect of primers, prevalence, and clinical significance. Hepatitis Interventional Therapy Group" *J Hepatol* 2000; 32(2): 339-43.
22. Toyoda H e coll. " Interferon treatment of two patients with quadruple infection with hepatitis C virus (HCV), human

- immunodeficiency virus (HIV), hepatitis G virus (HGV), and TT virus (TTV)" *Liver* 1999; 19(5): 438-43.
23. Parquet MC e coll. " Prevalence and clinical characteristics of TT virus (TTV) in patients with sporadic acute hepatitis of unknown etiology " *J Hepatol* 1999; 31(6): 985-9.
  24. Barril G e coll. " Prevalence of TT virus in serum and peripheral mononuclear cells from a CAPD population" *Perit Dial Int* 2000; 20(1): 65-8.
  25. Maggi F e coll. " High prevalence of TT virus viremia in Italian patients, regardless of age clinical diagnosis, and previous interferon treatment" *J Infect Dis* 1999; 180(3): 838-42.
  26. Pisani G e coll. " Prevalence of TT virus in plasma pools and blood products" *Br J Haematol* 1999; 106(2): 431-5.
  27. Tanaka M e coll. " Prevalence of TT virus in patients with fulminant hepatic failure in Japan" *J Gastroenterol* 1999; 34(5): 589-93.
  28. Kao JH e coll. " TT virus infection in patients with chronic hepatitis B or C: influence on clinical, histological and virological features" *J Med Virol* 2000; 60(4): 387-92.
  29. Chan YJ e coll. " TT virus infection among hemodialysis patients at a medical center in Taiwan" *Chung Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien I Hsueh Tsa Chih* 2000; 33(1): 14-8.
  30. Utsunomiya S e coll. " TT virus infection in hemodialysis patients" *Am J Gastroenterol* 1999; 94(12): 3567-70.
  31. MacDonald DM e coll. " Infrequent detection of TT virus infection in intravenous drug users, prostitutes, and homosexual men" *The J of Infect Diseases* 1999; 179: 686-9.
  32. Saback FL e coll. " Age-specific prevalence and transmission of TT virus" *J Med Virol* 1999; 59(3): 318-22.
  33. Inami T e coll. " High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen" *J Clin Microbiol* 2000; 38(6): 2407-8.
  34. Tada K e coll. " Confirmation of mother-to-child transmission of TT virus" *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19(3): 255-6.
  35. Goto K e coll. " Detection rates of TT virus DNA in serum of umbilical cord blood, breast milk and saliva" *Tohoku J Exp Med* 2000; 191(4): 203-7.
  36. Kazi A e coll. " High frequency of postnatal transmission of TT virus in infancy" *Arch Virol* 2000; 154(3): 535-40.
  37. Biagini P e coll. " High prevalence of TT virus infection in French blood donors revealed by the use of three PCR systems" *Transfusion* 2000; 40(5): 590-5.
  38. White PA e coll. " Mixed viral infection identified using heteroduplex mobility analysis (HMA)" *Virology* 2000; 271(2): 382-9.