

STUDIO RETROSPETTIVO SULLA PREVALENZA DI SWINE TORQUE TENO VIRUS GENOGRUPPI 1 E 2 E COINFEZIONE CON PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 IN SIERI DI SUINI ALLEVATI IN ITALIA (DAL 1990 AL 2009)

RETROSPECTIVE STUDY ON SWINE TORQUE TENO VIRUS GENOGROUPS 1 AND 2 AND PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 COINFECTION IN ITALIAN PIG SERA (FROM 1990 TO 2009)

BRESAOLA M.¹, LOMBARDO T.², VILLA R.², SOSSI E.², FERRARI M.²

¹*Scuola di Specializzazione in Patologia Suina, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma;* ²*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna*

Parole chiave: Swine Torque teno virus, Porcine circovirus type 2, studio retrospettivo, coinfezione.

Key words: Swine Torque teno virus, Porcine circovirus type 2, retrospective study, coinfection.

Riassunto. Il *Torque teno virus* (TTV) fu isolato per la prima volta nel 1997 in un paziente umano affetto da epatite. Successivamente seguirono isolamenti in diverse specie animali quali: suini, bovini, pecore, cani e gatti. Recenti studi suggeriscono che il swine TTV (swTTV) possa giocare un ruolo importante in alcune patologie del suino, in particolar modo per quanto concerne la post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In questo studio retrospettivo è stata determinata la prevalenza di swTTV, genogruppi 1 (swTTV1) e 2 (swTTV2), e *Porcine circovirus type 2* (PCV2) in sieri di suini italiani conservati dal 1990 al 2009. Il principale obiettivo è stato quello di valutare l'esistenza di un'associazione statisticamente significativa fra l'infezione da swTTV, genogruppi 1 e 2, e PCV2. Prendendo in considerazione l'intero periodo d'osservazione, 73 dei 95 campioni (76,84%) sono risultati positivi per almeno uno dei due genogruppi di swTTV, mentre 27 dei 95 campioni (28,42%) sono risultati positivi per entrambi i genogruppi. L'infezione da swTTV genogruppo 1 (54 di 95, 56,84%) si è dimostrata prevalente rispetto al genogruppo 2 (46 di 95, 48,42%). Inoltre, 41 dei 95 campioni (43,16%) sono risultati positivi per PCV2. Infine, 20 dei 95 campioni (21,05%) erano co-infetti da swTTV1 e PCV2, mentre 27 (28,42%) erano co-infetti da swTTV2 e PCV2. I risultati ottenuti evidenziano un'associazione statisticamente significativa fra l'infezione swTTV2 e PCV2.

Abstract. Torque teno virus (TTV) was first isolated from a human hepatitis patient in 1997. TTV was also identified in several animals, including pigs, cattle, sheep, cats and dogs. Recent studies suggest that swine TTV (swTTV) could play aetiological roles in pig diseases, in particular in post-weaning multisystemic wasting syndrome. In this retrospective study, we analysed the prevalence of swTTV, genogroups 1 (swTTV1) and 2 (swTTV2), and Porcine Circovirus type 2 (PCV2) in Italian pig sera between years 1990 and 2009. The main objective is to assess whether there was a statistically significant association between swTTV and PCV2 infection. Taking into account the whole study period, 73 out of 95 animals (76,84%) were infected with one or the other genogroup of swTTV, while 27 out of 95 pigs (28,42%) were co-infected with both genogroups. swTTV genogroup 1 (54 out of 95, 56,84%) was more prevalent than genogroup 2 (46 out of 95, 48,42%). Moreover, 41 out of 95 animals (43,16%) were infected with PCV2. Then, 20 out of 95 animals (21,05%)

were co-infected with swTTV1 and PCV2, while 27 out of 95 animals (28,42%) were co-infected with swTTV2 and PCV2. These results suggest that there is a statistically significant association between swTTV2 and PCV2 infection.

INTRODUZIONE

Nel 1997, in un paziente giapponese affetto da epatite post-trasfusionale ad eziologia sconosciuta, fu isolato per la prima volta il “TT” virus (TTV) (Nishizawa et al. 1997).

Dal 1997 ad oggi si sono susseguiti numerosi isolamenti di TTV in pazienti affetti da gravi patologie, in particolare fibrosi polmonari idiopatiche e tumori primari in sede polmonare (Bando et al. 2008).

L'infezione da TTV non è limitata alla sola specie umana. Gli isolamenti virali condotti nell'ultimo decennio hanno evidenziato come molte altre specie risultino sensibili all'infezione da TTV: chimpanzee, macaco giapponese, tupaia (Okamoto et al. 2002). Negli animali domestici il virus è stato isolato nel cane, nel gatto (Okamoto et al. 2002), nel bovino (Brassard et al. 2009), nel suino e nel cinghiale (Martinez et al. 2006).

Nel suino, in particolare, sono stati identificati due genogruppi di swine TTV (swTTV) (Brassard et al. 2008). Campioni di siero positivi al genogruppo 1 sono stati individuati in vari Paesi del mondo (Canada, Cina, Corea, Spagna, Francia, Italia, Thailandia e USA) con un *range* di prevalenza compreso fra il 24% ed il 100% (Bigarre et al. 2005; McKeown et al. 2004; Martelli et al. 2006). Le conoscenze relative al genogruppo 2 sono limitate e ulteriori studi dovranno essere condotti al fine di accertarne la prevalenza.

TTV è un virus privo di “envelope” il cui patrimonio genetico è costituito da un singolo filamento circolare di DNA (Kekarainen, Segales 2009).

Attualmente il TTV appartiene alla famiglia *Circoviridae*, genere *Anellovirus*, tuttavia questa classificazione è ancora oggetto di dibattito nella comunità scientifica (Biagini 2009).

Nel suino il virus è stato isolato in campioni di siero, tamponi nasali e rettali. La trasmissione è dimostrata sia per via orizzontale (suino - suino) (Sibila et al. 2009b) che per via verticale (transplacentare/intrauterina e durante la lattazione) (Martinez-Guino, Kekarainen & Segales 2009; Pozzuto et al. 2009); l'infezione talvolta può diventare persistente (Sibila et al. 2009a).

Nei suini l'infezione da swTTV non rappresenta di per sé una causa sufficiente a determinare uno stato di malattia nei soggetti colpiti (Segales et al. 2009; Krakowka, Ellis 2008). Tuttavia, come dimostrato da più studi, è possibile attribuire un ruolo di agente co-infettivo del swTTV in corso di altre patologie (Ellis, Allan & Krakowka 2008; Kekarainen, Sibila & Segales 2006).

Nel 1990 venne isolato per la prima volta nel suino un nuovo *Porcine Circovirus* (PCV) (Allan, Ellis 2000), differente dal PCV noto all'epoca come contaminante delle colture cellulari PK-15 (Tischer et al. 1982). Il virus originale fu così chiamato *Porcine Circovirus 1* (PCV1) mentre il nuovo virus *Porcine Circovirus 2* (PCV2) (Allan et al. 1999).

PCV2 è un virus a DNA, il cui patrimonio genetico è costituito da un singolo filamento circolare contenente 1776-1678 nucleotidi (Hamel, Lin & Nayar 1998).

L'infezione da PCV2 nel suino è stata associata negli anni a diverse condizioni patologiche: alla postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), alla porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS), al porcine respiratory disease complex e a turbe riproduttive. Attualmente con la terminologia “porcine circovirus diseases”

(PCVD) sono indicate tutte le condizioni patologiche riferibili al PCV2 (Segales, Allan 2006).

Precedenti studi hanno dimostrato l'elevata prevalenza di swTTV nella popolazione suina (McKeown et al. 2004; Martelli et al. 2006; Kekarainen, Lopez-Soria & Segales 2007; Ellis, Allan & Krakowka 2008; Brassard et al. 2008). Poiché il solo agente infettivo si è dimostrato insufficiente a determinare un quadro patologico nell'ospite, al swTTV è stato attribuito un ruolo di co-fattore in patologie conclamate. In particolare è stata messa in evidenza da più Autori come la prevalenza di swTTV aumenti in allevamenti in cui è manifesta la PMWS (Kekarainen, Sibila & Segales 2006; Taira et al. 2009).

Scopo del presente studio è quello di verificare, mediante un'indagine retrospettiva (1990-2009), se anche nella popolazione suina italiana esiste una correlazione statisticamente significativa fra l'infezione con swTTV e PCV2. Oltre all'obiettivo precedentemente indicato verranno valutati altri aspetti quali il decorso della prevalenza di swTTV genotipo 1 e 2 e PCV2 negli anni in esame, la diversa associazione fra swTTV1/PCV2 e swTTV2/PCV2.

MATERIALI E METODI

Campioni

Per lo studio retrospettivo (1990-2009), volto ad accertare la prevalenza di swTTV e la coinfezione con PCV2, sono stati esaminati sieri di suino conservati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZLER). Nel complesso sono stati utilizzati 95 sieri cercando, per quanto possibile, di sottoporre ad esame 10 campioni per biennio. Trattasi di sieri di animali provenienti da allevamenti del nord Italia e conservati ad una temperatura di -20°C. Nessun'altra informazione aggiuntiva è disponibile relativamente ai campioni esaminati.

L'estrazione del DNA dai sieri è stata effettuata con l'ausilio del kit commerciale QIAamp DNA Mini Kiy.

La PCR per swTTV è stata eseguita utilizzando due coppie di primer distinte per swTTV1 (5'-CGGGTTCAGGAGGCTCAAT-3'Primer forward) (5'-GCCATTCGGAAGTGCACCTTACT-3' Primer reverse)

e swTTV-2 (5'-TCATGACAGGGTTCACCGGA-3'Primer forward) (5'-CGTCTGCGCACTTACTTATATACTCTA -3' Primer reverse).

Per la PCR si sono utilizzati i seguenti reagenti Qiagen: Buffer II 10X, MgCl₂ 25 mM, dNTPs 2.5 mM each, Primer F 10 μM, Primer R 10 μM, Taq polimerasi.

Il Ciclo di PCR, effettuato su un termociclatore Gene Amp PCR system 2400 (Applied Biosystems), prevede le seguenti fasi: denaturazione iniziale 94°C per 5 minuti, denaturazione 94°C per 15", annealing 54°C per 20", estensione 72°C per 30" (50 cicli) ed estensione finale 72°C per 5 minuti.

La rivelazione delle bande è avvenuta tramite l'utilizzo del transilluminatore Chemi doc (Biorad). La dimensione delle bande che testimoniano l'avvenuta amplificazione varia a seconda del genogruppo investigato: 300 bp per swTTV1 e 252 bp per swTTV2

Ricerca DNA di PCV2

La presenza di genoma virale riferibile a PCV2 è stata evidenziata mediante una reazione PCR- RT TaqMan, che prevede l'utilizzo di una sonda FAM (6-carboxy-fluorescein) in

grado di legarsi in maniera specifica ad una sequenza oligonucleotidica compresa fra i due primer forward e reverse (5'-TAGGTGAGGGCTGTGGCCTTT-3' Primer forward)

(5'-ATGGCATCTTCAACACCCGCC-3' Primer reverse)

(5'-FAM-ATCTCATCATGTCCACCGCCCAGGA-BHQ1-3' Sonda)

Per la PCR si sono utilizzati i seguenti reagenti Qiagen: Quanti Tect Virus Master Mix, Primer F 5 μ M Primer R 5 μ M Sonda 2.5 μ M

Il Ciclo di PCR-RT prevede le seguenti fasi: denaturazione 95°C per 5 minuti, denaturazione 95°C per 15", annealing/estensione/lettura emissione 60°C per 45" (50 cicli)

L'esecuzione della PCR-RT permette di consultare l'esito direttamente sul computer. Per l'interpretazione dei risultati viene valutato il valore del Ct associato ad ogni campione. Sono identificati come positivi al PCV2 campioni che presentano un $CT \leq 39$ e negativi i campioni con un $Ct > 39.7$

Analisi statistica

Per l'analisi statistica delle prevalenze di coinfezione fra swTTV e PCV2 è stato utilizzato il Fisher's exact test, con significatività fissata a $p < 0.05$. GraphPrism5® è il software utilizzato per l'elaborazione statistica dei dati.

RISULTATI

Prevalenza di swTTV

Dei 95 campioni esaminati 54 sono risultati positivi per swTTV1 (56,84% swTTV1+) e 46 positivi per swTTV2 (48,42% swTTV2+). I sieri positivi a swTTV1 o swTTV2 erano 73 (76,84% swTTV+), mentre i negativi ad entrambi i genotipi 22 (23,16% swTTV-). Infine, sono risultati positivi per **entrambi** i genotipi di swTTV 27 campioni (28,42% swTTV1/2+) (tabella numero 1).

Tab.1. Prevalenza swTTV genogruppi 1 e 2

Tab.1. swTTV genogroups 1 and 2 prevalence

Anno	n° camp	swTTV+	swTTV1/2+	swTTV1+	swTTV2+	swTTV-
1990	10	4	1	3	2	6
1992	10	8	1	1	8	2
1996	5	1	0	0	1	4
1998	10	10	7	10	7	0
2000	10	10	5	8	7	0
2002	10	6	0	6	0	4
2006	10	6	0	5	1	4
2007	10	8	3	5	6	2
2008	10	10	7	8	9	0
2009	10	10	3	8	5	0
tot	95	73	27	54	46	22
%	100,00	76,84	28,42	56,84	48,42	23,16

Prevalenza di PCV2

Sono risultati positivi e negativi per PCV2 rispettivamente 41 (43,16% PCV2+) e 54 (56,84% PCV2-) campioni (tabella numero 2).

Tab.2. prevalenza PCV2

Tab.2. PCV2 prevalence

Anno	n° camp	PCV2+	PCV2-
1990	10	0	10
1992	10	8	2
1996	5	1	4
1998	10	1	9
2000	10	5	5
2002	10	1	9
2006	10	1	9
2007	10	7	3
2008	10	9	1
2009	10	8	2
tot	95	41	54
%	100,00	43,16	56,84

Coinfezione di swine Torque Teno virus genogruppi 1 e 2 / Porcine Circovirus type 2

Dei 95 campioni esaminati sono risultati coinfezati da swTTV e PCV2 38 sieri (40,00% swTTV+/PCV2+). I rimanenti 57 sieri (60%) erano così suddivisi: 35 swTTV positivi e PCV2 negativi (36,84% swTTV+/PCV2-), 3 swTTV negativi e PCV2 positivi (3,16% swTTV-/PCV2+) e 19 swTTV negativi e PCV2 negativi (20% swTTV-/PCV2-) (tabella numero 3) .

Coinfezione di swine Torque Teno virus genogruppo 1 / Porcine Circovirus type 2

Dei 95 campioni esaminati sono risultati coinfezati da swTTV1 e PCV2 20 sieri (21,05% swTTV1+/PCV2+). I rimanenti 75 sieri (78,95%) erano così suddivisi: 34 swTTV1 positivi e PCV2 negativi (35,79% swTTV1+/PCV2-), 21 swTTV1 negativi e PCV2 positivi (22,11% swTTV1-/PCV2+) e 20 swTTV1 negativi e PCV2 negativi (21,05% swTTV1-/PCV2-) (tabella numero 3) .

Coinfezione di swine Torque Teno virus genogruppo 2 / Porcine Circovirus type 2

Dei 95 campioni esaminati sono risultati coinfezati da swTTV2 e PCV2 27 sieri (28,42% swTTV2+/PCV2+). I rimanenti 68 sieri (71,58%) erano così suddivisi: 19 swTTV2 positivi e PCV2 negativi (20,00% swTTV2+/PCV2-), 14 swTTV2 negativi e PCV2 positivi (14,74% swTTV1-/PCV2+) e 35 swTTV2 negativi e PCV2 negativi (36,84% swTTV2-/PCV2-) (tabella numero 3).

Tab.3. coinfezione swTTV/PCV2**Tab.3. swTTV/PCV2 coinfection**

Anno	n° camp	swTTV+/PCV2+	swTTV1+/PCV2+	swTTV2+/PCV2+
1990	10	0	0	0
1992	10	7	1	7
1996	5	1	0	0
1998	10	1	1	0
2000	10	5	4	3
2002	10	0	0	0
2006	10	1	0	1
2007	10	6	3	4
2008	10	9	6	8
2009	10	8	5	4
Tot	95	38	20	27
%	100,00	40,00	21,05	28,42

DISCUSSIONE

I dati emersi in questo studio retrospettivo indicano che l'infezione da swTTV nei suini allevati in Italia fosse già presente dal 1990, ovvero nove anni prima dell'isolamento del TTV nei suini (Leary et al. 1999). Dei 95 campioni esaminati il 77% è risultato positivo a swTTV.

I precedenti lavori condotti in altri Paesi hanno dimostrato come la prevalenza di swTTV sia alquanto variabile: dal 24% al 100% (McKeown et al. 2004; Martelli et al. 2006; Bigarre et al. 2005; Kekarainen, Sibila & Segales 2006).

Anche per quanto riguarda l'infezione da PCV2, appare chiaro come questa sia particolarmente diffusa, indipendentemente dal manifestarsi o meno della PMWS. Nello studio condotto ritroviamo sieri positivi a PCV2 (43%) a partire dal 1992, ma dalla letteratura presente in merito è logico ritenere che la sua circolazione, anche in Italia, sia antecedente a questa data. E' infatti dimostrata la presenza di PCV2 a partire dal 1962 in Europa (Jacobsen et al. 2009), dal 1973 in America (Ramirez-Mendoza et al. 2007) e dal 1989 in Asia (Mori et al. 2000). Considerando la prevalenza dei due genogruppi di swTTV è emerso che il genogruppo 1 (57%) è più diffuso del genogruppo 2 (42%) e che il 28% dei campioni è positivo ad entrambi i genogruppi.

Esaminando i casi di coinfezione swTTV/PCV2 il 40% dei campioni risulta essere positivo per entrambi gli agenti virali; il dato più interessante è che il 93% dei campioni PCV2 positivi è contemporaneamente positivo per swTTV. Alla luce dei dati ottenuti, è dunque possibile sostenere che esiste un'associazione statisticamente significativa fra l'infezione da PCV2 e da swTTV ($p < 0.05$).

Nel caso di swTTV1 risultano coinfezioni con PCV2 il 21% dei 95 campioni, mentre solamente il 49% di quelli PCV2 positivi. Non è dunque possibile stabilire un'associazione statisticamente significativa fra l'infezione da PCV2 e swTTV1 ($p < 0.05$).

Per swTTV2 risultano coinfezioni con PCV2 il 28% dei 95 campioni, cioè il 66% dei campioni

PCV2 positivi. E' dunque possibile stabilire un'associazione statisticamente significativa fra l'infezione da PCV2 e swTTV2 ($p < 0.05$) (tabella numero 4).

Tab.4. Positività per swTTV in campioni PCV2+

Tab.4. Positivity for swTTV in PCV2+ sample

%	swTTV+	swTT1+	swTTV2+
campioni PCV2+	93,00	49,00	66,00

CONCLUSIONI

Dallo studio retrospettivo condotto appare evidente come il swTTV, genogruppi 1 e 2, sia presente nella popolazione suina Italiana dal 1990.

L'elevata omologia fra le regioni sequenziate nel presente lavoro e quelle disponibili in banca dati, indica la scarsa variabilità del virus, sia nel tempo che nello "spazio". Questo fatto si ritiene legato alla scarsa pressione immunitaria a cui è sottoposto il virus e conferma quanto precedentemente riscontrato da altri autori.

I dati rilevati evidenziano che **esiste un'associazione statisticamente significativa fra l'infezione da PCV2 e swTTV genogruppo 2.**

Alla luce del possibile ruolo patogenetico del swTTV (peraltro molto simile a quello del PCV2) e della sua notevole diffusione nella popolazione suina, si ritiene che l'aspetto coinfezioso dei due agenti virali meriti ulteriori approfondimenti.

BIBLIOGRAFIA

- ALLAN G., MC NEILLY F., MEEHAN B., KENNEDY S., MACKIE D., ELLIS J., CLARK E., ESPUNA E., SAUBI N. & RIERA P. (1999) Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Veterinary Microbiology* 66, 115-123
- BANDO M., TAKAHASHI M., OHNO S., HOSONO T., HIRONAKA M., OKAMOTO H. & SUGIYAMA Y. (2008) Torque teno virus DNA titre elevated in idiopathic pulmonary fibrosis with primary lung cancer. *Respirology (Carlton, Vic.)* 13, 263-269
- BIAGINI P. (2009) Classification of TTV and related viruses (anelloviruses). *Current Topics in Microbiology and Immunology* 331, 21-33
- BIAGINI P., GALLIAN P., ATTOUI H., TOUINSSI M., CANTALOUBE J., DE MICCO P. & DE LAMBALLERIE X. (2001) Genetic analysis of full-length genomes and subgenomic sequences of TT virus-like mini virus human isolates. *The Journal of General Virology* 82, 379-383
- BIGARRE L., BEVEN V., DE BOISSESON C., GRASLAND B., ROSE N., BIAGINI P. & JESTIN A. (2005) Pig anelloviruses are highly prevalent in swine herds in France. *Journal of General Virology* 86, 631
- BRASSARD J., GAGNE M. J., HOUDE A., POITRAS E. & WARD P. (2009) Development of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of porcine and bovine torque teno virus. *Journal of Applied Microbiology*

- BRASSARD J., GAGNE M. J., LAMOUREUX L., INGLIS G. D., LEBLANC D. & HOUDE A. (2008) Molecular detection of bovine and porcine torque teno virus in plasma and feces. *Veterinary Microbiology* 126, 271-276
- ELLIS J. A., ALLAN G. & KRAKOWKA S. (2008) Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *American Journal of Veterinary Research* 69, 1608-1614
- HAMELA L., LIN L. L. & NAYAR G. P. S. (1998) Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology* 72, 5262
- JACOBSEN B., KRUEGER L., SEELIGER F., BRUEGMANN M., SEGALES J. & BAUMGAERTNER W. (2009) Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in northern germany. *Veterinary Microbiology* 138, 27-33
- KEKARAINEN T., LOPEZ-SORIA S. & SEGALES J. (2007) Detection of swine torque teno virus genogroups 1 and 2 in boar sera and semen. *Theriogenology* 68, 966-971
- KEKARAINEN T. & SEGALES J. (2009) Torque teno virus infection in the pig and its potential role as a model of human infection. *Veterinary Journal (London, England : 1997)* 180, 163-168
- KEKARAINEN T., SIBILA M. & SEGALES J. (2006) Prevalence of swine torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in spain. *The Journal of General Virology* 87, 833-837
- KRAKOWKA S. & ELLIS J. A. (2008) Evaluation of the effects of porcine genogroup 1 torque teno virus in gnotobiotic swine. *American Journal of Veterinary Research* 69, 1623-1629
- LEARY T. P., ERKER J. C., CHALMERS M. L., DESAI S. M. & MUSHAHWAR I. K. (1999) Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *Journal of General Virology* 80, 2115
- MARTELLI F., CAPRIOLI A., DI BARTOLO I., CIBIN V., PEZZOTTI G., RUGGERI F. M. & OSTANELLO F. (2006) Detection of swine torque teno virus in italian pig herds. *Journal of Veterinary Medicine, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 53, 234-238
- MARTINEZ L., KEKARAINEN T., SIBILA M., RUIZ-FONS F., VIDAL D., GORTAZAR C. & SEGALES J. (2006) Torque teno virus (TTV) is highly prevalent in the european wild boar (*sus scrofa*). *Veterinary Microbiology* 118, 223-229
- MARTINEZ-GUINO L., KEKARAINEN T. & SEGALES J. (2009) Evidence of torque teno virus (TTV) vertical transmission in swine. *Theriogenology* 71, 1390-1395
- MCKEOWN N. E., FENAUX M., HALBUR P. G. & MENG X. J. (2004) Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. *Veterinary Microbiology* 104, 113-117
- MORI M., SATO K., AKACHI S., ASAHI S., TANIGUCHI S. & NARITA M. (2000) Retrospective study of porcine circovirus 2 infection in japan: Seven cases in 1989. *Veterinary Pathology Online* 37, 667
- NISHIZAWA T., OKAMOTO H., KONISHI K., YOSHIZAWA H., MIYAKAWA Y. & MAYUMI M. (1997) A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochemical*

- and Biophysical Research Communications 241, 92-97
- OKAMOTO H., NISHIZAWA T., TAWARA A., PENG Y., TAKAHASHI M., KISHIMOTO J., TANAKA T., MIYAKAWA Y. & MAYUMI M. (2000) Species-specific TT viruses in humans and nonhuman primates and their phylogenetic relatedness. *Virology* 277, 368-378
 - OKAMOTO H., TAKAHASHI M., NISHIZAWA T., TAWARA A., FUKAI K., MURAMATSU U., NAITO Y. & YOSHIKAWA A. (2002) Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaias. *The Journal of General Virology* 83, 1291-1297
 - OKAMOTO H., TAKAHASHI M., NISHIZAWA T., TAWARA A., FUKAI K., MURAMATSU U., NAITO Y. & YOSHIKAWA A. (2002) Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaias. *The Journal of General Virology* 83, 1291-1297
 - POZZUTO T., MUELLER B., MEEHAN B., RINGLER S. S., MCINTOSH K. A., ELLIS J. A., MANKERTZ A. & KRAKOWKA S. (2009) In utero transmission of porcine torque teno viruses. *Veterinary Microbiology* 137, 375-379
 - RAMIREZ-MENDOZA H., MARTINEZ C., MERCADO C., CASTILLO-JUAREZ H., HERNANDEZ J. & SEGALES J. (2007) Porcine circovirus type 2 antibody detection in backyard pigs from Mexico city. *Research in Veterinary Science* 83, 130-132
 - SEGALES J. & ALLAN G. (2006) Disease of swine, 9th
 - SEGALES J., MARTINEZ-GUINO L., CORTEY M., NAVARRO N., HUERTA E., SIBILA M., PUJOLS J. & KEKARAINEN T. (2009) Retrospective study on swine torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. *Veterinary Microbiology* 134, 199-207
 - SIBILA M., MARTINEZ-GUINO L., HUERTA E., LLORENS A., MORA M., GRAU-ROMA L., KEKARAINEN T. & SEGALES J. (2009) Swine torque teno virus (TTV) infection and excretion dynamics in conventional pig farms. *Veterinary Microbiology* 139, 213-218
 - SIBILA M., MARTINEZ-GUINO L., HUERTA E., MORA M., GRAU-ROMA L., KEKARAINEN T. & SEGALES J. (2009) Torque teno virus (TTV) infection in sows and suckling piglets. *Veterinary Microbiology* 137, 354-358
 - TAKAHASHI K., IWASA Y., HIJIKATA M. & MISHIRO S. (2000) Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Archives of Virology* 145, 979-993
 - TISCHER I., GELDERBLUM H., VETTERMANN W. & KOCH M. (1982) A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295, 64-66