

Izabela Liweń^{1,3}, Danuta Januszkiewicz-Lewandowska^{1,2,3}, Jerzy Nowak¹

WŁAŚCIWOŚCI, WYSTĘPOWANIE I DROGI PRZENOSZENIA WIRUSA TT

¹	Zakład	Genetyki	Człowieka	PAN
²	Instytut	Pediatrici	Akademii	Medycznej
³	Zakład	Diagnostyki	Medycznej	w Poznaniu

Od momentu odkrycia wirusa TT próbowano odpowiedzieć na pytanie, jaka jest jego budowa, właściwości i jakimi drogami może przenosić się zakażenie. Ustalono, że TTV jest zbudowany z kolistej, pojedynczej nici DNA, spolaryzowanej ujemnie. Replikacja wirusa ma miejsce w komórkach szpiku kostnego i wątroby poprzez dwuniciową formę pośrednią. Szerzenie się infekcji jest możliwe drogą parenteralną, pokarmową, kropelkową i kontaktów seksualnych. Obecność wirusa stwierdzono również w organizmach zwierzęcych.

Słowa kluczowe: TTV, HBV, HCV, HIV, wirusowe zapalenie wątroby

Key words: TTV, HBV, HCV, HIV, viral hepatitis

WSTĘP

W 1997 roku japońscy naukowcy wyizolowali z surowicy krwi pacjenta z potransfuzyjnym zapaleniem wątroby typu nie A-G, fragment złożony z 500 nukleotydów wrażliwy na DNA-zę (1). Fragment ten okazał się być częścią wirusa DNA, którego nazwano od inicjałów pacjenta wirusem TT. Wirusa TT wykryto następnie u kolejnych pacjentów z potransfuzyjnym zapaleniem wątroby typu nie A-G. Występowanie korelacji wirerii TTV z podwyższoną aktywnością aminotransferaz skłoniło autorów do wyciągnięcia wniosku o roli wirusa TT w patogenezie potransfuzyjnego zapalenia wątroby o nieustalonej etiologii. Nazwę wirusa, pokrywającą się z inicjałami pacjenta, tłumaczyć można również jako - TTV - *transfusion - transmitted virus*.

Odkrycie japońskich naukowców zapoczątkowało dalsze badania ukierunkowane na określenie roli wirusa TT w zapaleniach wątroby o nieustalonej etiologii i wykazanie jego wpływu na przebieg przewlekłych chorób wątroby, wywołanych określonym czynnikiem sprawczym, jak również na ustalenie dróg szerzenia się zakażenia wirusem TT.

BUDOWA TTV

Nishizawa i współpr. - odkrywcy TTV - opisali go jako bezotoczkowego wirusa zbudowanego z pojedynczej nici DNA, o długości 3739 nukleotydów i liniowym genomie (1). Dalsze badania nie potwierdziły liniowego charakteru genomu, wykazały natomiast obecność dodatkowego fragmentu długości 114 nukleotydów, bogatego w guaninę i cytozynę (2,3,4). Następnie wykazano, że genom wirusa TT złożony jest z pojedynczej nici DNA spolaryzowanej ujemnie, o długości od 3537 do 3853 nukleotydów (w zależności od analizowanego genotypu) (5). DNA wirusowe przyjmuje formę kolistą. TTV nie posiada otoczki, rozmiary jego cząsteczki wynoszą od 30 nm do 50 nm, a gęstość w chlorku cezu waha się od 1,31 g/cm³ do 1,34 g/cm³.

Genom wirusa TT składa się z regionów kodujących i niekodujących. Regiony kodujące to sekwencje nukleotydowe wchodzące w skład trzech otwartych ramek odczytu ORF1, ORF2 i ORF3 (*open reading frames*) (5). ORF1 koduje białko, prawdopodobnie kapsydu, zbudowane z 765 - 770 aminokwasów. Białko to jest bogate w argininę w części N-końcowej. Podobną budowę ma białko kapsydu - VP1 (*viral protein* - białko wirusa) wirusa niedokrwistości kurcząt (CAV - *chicken anemia virus*) - kodowane przez jego najdłuższą ramkę odczytu (3). W obrębie białka Rep (*replication associated protein* - białko związane z replikacją) kodowanego przez geny zlokalizowane w ORF1 wirusa TT, odnaleziono dwie sekwencje odpowiedzialne za replikację wirusów z rodziny *Circoviridae*. Są to sekwencje: F-T-L i Y-X-X-K (F - fenyloalanina, T - treonina, L - leucyna, Y - tyrozyna, X - dowolny aminokwas, K - lizyna). W ORF1 wirusa TT występują trzy hyperzmiennne regiony - HVR1, HVR2 i HVR3 (*hypervariable region 1,2,3*) (6). Także CAV posiada podobny region hyperzmienny w obrębie sekwencji kodującej białko VP1. Duże zróżnicowanie sekwencji w obrębie regionów hyperzmiennych wykazano u szczepów wirusa TT wyizolowanych z surowicy krwi dwóch pacjentów z przewlekłym zakażeniem TTV (czas trwania infekcji wynosił kilka lat) (6). U trzech pacjentów z ostrym przebiegiem infekcji TTV (czas trwania zakażenia liczony w tygodniach) zróżnicowanie w regionach hyperzmiennych wykrywano rzadko lub wcale. Prawdopodobnie dzięki obecności białek kodowanych przez regiony hyperzmiennne, wirus TT może unikać odpowiedzi immunologicznej gospodarza, co sprawia, że infekcja przybiera wówczas charakter przewlekły. Najdłuższy poznany dotychczas okres zakażenia TTV wynosił 11 lat, jednak u tego pacjenta wirus mógł trwać dłużej, ponieważ stwierdzono ją już podczas pierwszego badania (7).

Analogiczna jest sytuacja w przypadku wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV - *hepatitis C virus* - wirus zapalenia wątroby typu C) (8). Białko otoczkowe E2 tego wirusa zawiera region hyperzmienny, obejmujący 25 aminokwasów w części N-końcowej. Duża zmienność tego regionu (10-krotnie większa niż dla całego genomu wirusa HCV) pozwala na unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza.

ORF2 i ORF3 wirusa TT kodują białka składające się odpowiednio z 149 - 151 i 57 aminokwasów (5). Funkcja tych białek pozostaje dotychczas nieustalona. Cechą charakterystyczną białka kodowanego przez ORF2 jest obecność konserwatywnego motywu W-X₇-H-X₃-C-X-C-X₅-H (W - tryptofan, H - histydyna, C - cysteina). Taki motyw (pozycja między 83 i 103 nukleotydem) posiada również białko kodowane przez ORF2 wirusa niedokrwistości kurcząt (CAV) (9).

W obrębie regionów niekodujących znajduje się wspomniany powyżej fragment bogaty w guaninę i cytozynę. Układ 36 nukleotydów tego fragmentu wykazuje podobieństwo w 80,6% do sekwencji genu CAV (lokalizacja pomiędzy 2237 a 2272 nukleotydem) (2). Przypuszcza się, że fragment ten może odgrywać znaczącą rolę w replikacji wirusa.

Analiza filogenetyczna pozwoliła na wyodrębnienie 16 genotypów wirusa TT. W obrębie poszczególnych genotypów różnice w sekwencjach wynoszą do 30% (10). Zróżnicowanie sekwencji opisywano zarówno w ORF1 jak i w ORF2. Występowanie genotypów 1 i 2 jest powszechne, stwierdza się je u wielu badanych osób niezależnie od położenia geograficznego. Inne genotypy zaobserwowano tylko na niektórych obszarach, np. genotyp 9 w Kenii a genotyp 7 w Japonii.

Pojawiły się też doniesienia, że dany genotyp wirusa TT może być charakterystyczny dla określonej patologii wątroby. Genotyp 1 obserwowano częściej w zapaleniu wątroby o nieustalonej etiologii i nadoстрыm zapaleniu wątroby o nieustalonej etiologii (11, 12). Inne badania nie potwierdziły jednak tej zależności. Hijikata i wspólr. nie wykazali częstszego występowania genotypu 1 wirusa TT w pierwotnym raku wątroby, przewlekłym zapaleniu wątroby czy w marskości wątroby o nieustalonej etiologii (13).

Kolejne prace pozwoliły na wyodrębnienie podtypów w obrębie danego genotypu wirusa TT (14, 15). Jak do tej pory, brak jest jednoznacznych danych na temat różnic w ich patogenności. Warunkowane jest to przede wszystkim zjawiskiem infekcji mieszanej - tj. zakażeniem tego samego pacjenta kilkoma genotypami i podtypami TTV. Zakażenia mieszane różnymi genotypami wirusa TT obserwowano u chorych na hemofilię, chorych z zapaleniem wątroby typu nie A-E, jak również u krwiodawców (3, 16).

Po odkryciu wirusa TT powstał problem dotyczący jego przynależności do poznanych już rodzin wirusów. Kolisty genom, rozmiar wirionu i gęstość w chlorku cezu wykluczają przynależność TTV do rodziny *Parvoviridae*. Podobną jak TTV gęstość w chlorku cezu i kształt genu mają bezotoczkowe wirusy z rodziny *Circoviridae*, zakażające rośliny i kręgowce (ptaki, świnie). Jak wspomniano powyżej, znaleziono wiele podobieństw budowy wirusów CAV i TTV. Jednak TTV ma większe rozmiary genu i wirionu. Dlatego też zaproponowano przynależność wirusa TT do nowej rodziny - *Circinoviridae* (łac. *circino* - zaokrąglać) (3).

W 2000 roku japońscy naukowcy odkryli nowego wirusa, przypominającego TTV i CAV, którego nazwali *TTV-like mini virus* - TLMV (17). TLMV został w izolowany z krwi trzech z 10 krwiodawców z wirem TTV wynoszącą powyżej 10^5 kopii/ml.

TLMV, podobnie jak TTV, jest bezotoczkowym wirusem o kolistym genie zbudowanym z pojedynczej nici DNA spolaryzowanej ujemnie. Długość genu wirusa wynosi 2856-2897 nukleotydów (w zależności od analizowanego izolatu) (17). Gęstość w chlorku cezu jest podobna jak wirusa TT. Natomiast rozmiary cząsteczki TLMV są mniejsze i wynoszą poniżej 30 nm. Organizacja genu TLMV przypomina TTV i CAV. ORF1 wirusa TLMV koduje białko zbudowane z około 660 aminokwasów bogate w argininę, tryptofan i fenyloalaninę na N-końcu. ORF2 koduje proteinę zbudowaną z około 90 aminokwasów, z występującą również w genie TTV i CAV konserwatywną sekwencją W-X7-H-X3-C-X-C-X5-H. Sekwencje nukleotydowe zlokalizowane w ORF3 kodują białko złożone z około 130 aminokwasów. Do zakażenia

wirusem TLMV dochodzi drogą parenteralną. Stąd też propozycja utworzenia nowej rodziny wirusów - *Paracircoviridae*, do której należałyby wirusy TTV, CAV i TLMV.

REPLIKACJA WIRUSA TT

Najnowsze dane zdają się wskazywać na wątrobę i szpik kostny jako miejsce replikacji TTV (18, 19). Odnaleziono tam dwie formy wirusa - jednoniciową i dwuniciową. Forma dwuniciowa jest formą pośrednią w procesie replikacji.

Postuluje się, że replikacja TTV może być podobna do replikacji wirusów z rodziny *Parvoviridae* (2). Wirusy AAV (*adeno-associated viruses* - wirusy adenosatelitarne) pochodzące z tej rodziny replikują w komórkach gospodarza dopiero po nadkażeniu innym wirusem (adenowirusem lub wirusem herpes), dostarczającym enzymy niezbędne do replikacji. Możliwe, że podobny mechanizm replikacji występuje u TTV.

WYKRYWANIE SEKWENCJI WIRUSA TT U CZŁOWIEKA

Zakażenie wirusem TT u człowieka można wykryć metodą PCR (*polymerase chain reaction* - reakcja łańcuchowa polimerazy), metodą hybrydyzacji *in situ* bądź wykazując swoiste przeciwciała anti-TTV.

Wirusa TT wykryto po raz pierwszy w surowicy krwi chorego z potransfuzyjnym zapaleniem wątroby (1). Wkrótce potem podjęto próby jego izolacji z innych wydzielin i wydalın ustrojowych. Okamoto i współpr. przebadali 5 pacjentów z HCC (*hepatocellular carcinoma* - pierwotny rak wątroby) zakażonych wirusem B lub C zapalenia wątroby (HBV - *hepatitis B virus*) (21). U wszystkich tych chorych stwierdzono TTV DNA w surowicy krwi. U trzech z nich wykryto TTV DNA w kale. Sekwencje TTV izolowane z kału i surowicy danego pacjenta były identyczne.

Obecność sekwencji wirusa TT wykazano także w żółci 5 pacjentów z wiremią TTV, hospitalizowanych z powodu cholestazy (22). Ilość kopii wirusa w żółci była wyższa niż w surowicy u danego pacjenta i wahała się od 10^1 do 10^4 kopii/ml w surowicy i od 10^2 do 10^5 kopii/ml w żółci. Do badania ilościowego wiremii TTV stosowano metodę rozcieńczenia (*limiting dilution analysis*) badanego materiału. Analiza filogenetyczna ujawniła obecność takich samych genotypów TTV w surowicy i żółci badanych pacjentów.

TTV DNA wyizolowano również ze śliny, łez i nasienia zdrowych osób z wiremią TTV (23, 24, 25). W przypadkach braku wiremii TTV we krwi obwodowej, w płynach ustrojowych nie wykrywano materiału genetycznego wirusa. Inni autorzy wykazali obecność TTV DNA w moczu 20 z 36 pacjentów z wiremią TTV w surowicy, poddanych immunosupresji po transplantacji serca (26).

TTV DNA wykryto także w kobiecym mleku (34). Sekwencje wirusa stwierdzono w mleku 17 z 22 kobiet z wiremią TTV w surowicy. U dzieci wszystkich matek TTV DNA-dodatnich również obserwowano wiremię TTV. Wyjątek stanowiło jedno dziecko, u którego nie wykryto wirusa TT, pomimo że w surowicy jak i w mleku matki stwierdzano obecność sekwencji TTV.

TTV DNA wykazano również w tkance wątrobowej (27). Okamoto i współpr. przebadali surowicę i tkankę wątrobową 6 pacjentów z zapaleniem wątroby o nieustalonej etiologii, spośród których u 5 wykryto TTV DNA w surowicy. U pacjenta bez wiremii TTV nie stwierdzono także sekwencji wirusa w wątrobie. W pozostałych przypadkach

wykazana w tkance wątrobowej liczba kopii wirusa była równa lub 10-100 razy większa aniżeli w surowicy krwi badanych chorych (27).

Obecność TTV stwierdzano również w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (28,29) i komórkach szpiku kostnego (18). DNA wirusa wykazano też w biopsjach sutka, mózgu, raka nerki i gruczolaka prostaty. Badania tkanek osób zmarłych z powodu zapalenia wątroby, marskości lub raka wątroby wykazały obecność TTV DNA nie tylko w wątrobie, ale i w nerkach, śledzionie, żołądku i jelitach (30).

Sekwencje wirusa TT wykrywano również metodą hybrydyzacji *in situ*. Posługując się tą metodą potwierdzono obecność TTV DNA w komórkach wątroby 17 pacjentów, u których wcześniej techniką PCR wykazano obecność TTV DNA w krwi i tkance wątrobowej (20). Materiał do badań pobrano od chorych z wzv B (wirusowe zapalenie wątroby typu B), wzv C (wirusowe zapalenie wątroby typu C), z hemosyderozą, stłuszczeniem wątroby, zapaleniem wątroby o nieustalonej etiologii i z zanikiem wewnątrzwątrobowych dróg żółciowych. Grupę kontrolną stanowiło zaledwie dwóch pacjentów, od których zdrową tkankę wątrobową pobrano w trakcie cholecystektomii. U wszystkich zbadanych pacjentów metodą hybrydyzacji wykrywano materiał genetyczny wirusa zarówno w jądrze jak i w cytoplazmie hepatocytów.

Nie wykazano różnic ilości hepatocytów zawierających TTV DNA w przebiegu stłuszczenia i zapalenia wątroby czy hemosyderozy. Liczba hepatocytów z wykrywanym TTV DNA metodą hybrydyzacji wahała się od 2,1% do 30% u wszystkich wyżej wymienionych badanych. Metodą PCR stwierdzono również zmienną liczbę kopii wirusa TT w tkance wątrobowej tych pacjentów. W grupie chorych zakażonych TTV, ale bez koinfekcji HBV czy HCV, istniała wprost proporcjonalna zależność pomiędzy liczbą zakażonych hepatocytów a aktywnością aminotransferazy alaninowej. Co więcej, miano wirusa TT w tkance wątrobowej tych pacjentów również korelowało z aktywnością aminotransferazy alaninowej. Pomimo, iż hepatocyty zawierające TTV DNA nie wykazywały żadnych morfologicznych zmian zależność ta może sugerować udział TTV w patogenezie chorób wątroby.

Infekcję TTV potwierdzano także badając występowanie swoistych przeciwciał anty-TTV. Autorzy japońscy, którzy posługiwali się metodą immunoprecypitacji, wykryli przeciwciała anty-TTV u jednego z 6 badanych (17%) zdrowych krwiodawców z wiremiami TTV (31). Natomiast wśród 38 krwiodawców, u których nie wykazano sekwencji TTV w surowicy, przeciwciała anty-TTV obecne były u 11 badanych (29%). U dwóch pacjentów z potransfuzyjnym zapaleniem wątroby typu nie A-G stwierdzono swoiste przeciwciała anty-TTV dopiero po samoistnej eliminacji TTV DNA z krwi. Z kolei, amerykańscy badacze wprowadzili produkt ORF1 do *Escherichia coli*, gdzie ulegał ekspresji (32). Powstałe białko fuzyjne używali jako antygen do wykrywania swoistych przeciwciał przeciwko wirusowi TT w surowicy zdrowych dawców. Stwierdzono je u 32 spośród 38 TTV DNA-pozytywnych krwiodawców (84%) i u 6 z 38 krwiodawców bez wiremii TTV (16%). Dane te potwierdzają fakt wytwarzania swoistych przeciwciał anty-TTV oraz wskazują na możliwość eliminacji wirusa u części zakażonych osób.

WYSTĘPOWANIE SEKWENCJI WIRUSA TT U ZWIERZĄT

Obecność sekwencji wirusa TT wykazano nie tylko u ludzi. Powiodła się próba zakażenia wirusem zwierząt doświadczalnych - szympanśów i rebusów, u których izo-

lowano następnie TTV DNA z surowicy, żółci, kału i tkanki wątrobowej (23, 3). Pomimo obecności sekwencji wirusa TT, nie zaobserwowano u badanych zwierząt żadnych biochemicznych i histopatologicznych wykładników zapalenia wątroby. W innym badaniu stwierdzono występowanie TTV DNA w surowicy badanych szympanów, przy czym analiza filogenetyczna wykazała, że były to genotypy wirusa, których nie znaleziono w surowicy ludzkiej (34). Jednakże kolejne badania na większej liczbie zwierząt tego gatunku (104 przypadki) wykazały obecność - w surowicy jednego ze zwierząt - genotypu wirusa odpowiadającego ludzkiemu genotypowi Ia (35).

Badania surowicy zwierząt domowych (świń, krów, kurcząt i owiec) z użyciem starterów komplementarnych do sekwencji regionów niekodujących wirusa TT, pozwoliły stwierdzić wiramię TTV u wszystkich badanych gatunków (odpowiednio u 20%, 25%, 19% i 30%) (36). Dodatkowo wykazano bardzo duże, bo aż w granicach od 79% do 99,2%, podobieństwo sekwencji TTV izolowanych od ludzi i od zwierząt.

Wykazanie obecności wirusa TT u zwierząt wskazywać może na istnienie także innych źródeł, jak i dróg szerzenia się infekcji TTV.

DROGI PRZENOSZENIA WIRUSA TT

Początkowo uważano, że wirus TT przenoszony jest drogą parenteralną - poprzez krew i preparaty krwiopochodne. Zwracano uwagę na częste występowanie infekcji TTV u chorych z dużym ryzykiem zakażeń wirusowych drogą parenteralną, np. hemodializowanych czy pacjentów z zaburzeniami odporności.

Wykazanie obecności TTV DNA w kale, żółci, ślinie, moczu, nasieniu i łzach wskazuje na możliwość szerzenia się infekcji drogą pokarmową, kropelkową i kontaktów seksualnych.

Brak otoczki białkowej wirusa TT, podobnie jak u wirusów zapalenia wątroby typu A i E (HAV - *hepatitis A virus* - wirus zapalenia wątroby typu A, HEV - *hepatitis E virus* - wirus zapalenia wątroby typu E), umożliwia transmisję zakażenia drogą pokarmową (22).

Rozważano także możliwość wertykalnego przenoszenia wirusa (37, 38, 39). Dzieci matek TTV DNA-dodatnich były zakażone w 42,9% (9/21) do 68% (26/38). Jednakże obecność TTV DNA w krwi pępowinowej potwierdzono zaledwie w 1% przypadków (99/100) (40). Wiremia TTV stwierdzana była także u dzieci matek nie zakażonych tym wirusem. Wykazano ją aż w 43%, u 13 spośród 30 badanych dzieci. Sekwencje TTV pojawiały się w surowicy wszystkich badanych dzieci po upływie trzech do 14 miesięcy od urodzenia. Kolejni autorzy stwierdzili zwiększone ryzyko zakażenia wirusem TT u dzieci karmionych piersią przez matki TTV DNA-dodatnie (38). Inni badacze nie potwierdzili tej hipotezy (41).

Przedstawione powyżej dane wskazują raczej na transmisję horyzontalną aniżeli wertykalną wirusa TT. Wydają się to również potwierdzać badania homologii DNA TTV w trzech rodzinach zakażonych tym wirusem. Podobieństwo sekwencji wirusa u zakażonych matek i dzieci wynosiło od 62% do 100%, a u zakażonego rodzeństwa od 92,3% do 100% (40).

Z uwagi na duże rozprzestrzenienie wirusa TT zarówno u ludzi jak i u zwierząt, jego zmienność genetyczną oraz możliwość szerzenia się zakażenia wieloma drogami, określenie patogenności wirusa TT pozostaje istotnym problemem.

Izabela Liwen^{1,3}, Danuta Januszkiewicz-Lewandowska^{1,2,3}, Jerzy Nowak¹

TT VIRUS - CHARACTERISTICS, INCIDENCE AND ROUTES OF INFECTION TRANSMISSION

SUMMARY

Recent discovery of a novel DNA virus from the serum of a Japanese patient (T.T.) has prompted further studies directed on possible role of TT virus in the development of cryptogenic hepatitis. The TT is an unenveloped and circular DNA virus. TTV possesses single stranded DNA genome and comprises 3537 to 3853 nucleotides. TTV is similar to the Circoviridae and possesses three open reading frames. Phylogenetic analysis revealed up to 30% nucleotide sequence divergence in the 16 virus genotypes. TTV infection can be detected by polymerase chain reactions, in situ hybridization and by specific antibodies to TTV. TTV DNA has been identified in the serum of patients with cryptogenic hepatitis, hepatitis B and C, hepatocellular carcinoma as well as in healthy individuals. TTV has been found also in the peripheral blood leukocytes, bone marrow cells, liver biopses as well as in feces and breast milk. Some animals including cattle, sheep, pigs and chicken appeared to have TTV viremia. Recent detection of TTV in nonblood products, such as saliva and feces suggest in addition to parenteral also nonparenteral routes of TTV transmissions including sexual and fecal-oral.

PIŚMIENICTWO

1. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, i in. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:92-7.
2. Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, i in. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J Virol* 1999;73:3582-6.
3. Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, i in. Molecular and biophysical characterization of TT virus: Evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;96:3177-82.
4. Okamoto H, Kato N, Iizuka H, i in. Distinct genotypes of a nonenveloped DNA virus associated with posttransfusion non-A to G hepatitis (TT virus) in plasma and peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* 1999;57:252-8.
5. Erker JC, Leary TP, Desai SM, i in. Analyses of TT virus full-length genomic sequences. *J Virol* 1999;80:1743-50.
6. Nishizawa T, Okamoto H, Tsuda F, i in. Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic 11V infection. *J Virol* 1999;73:9604-8.
7. Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Lefrere F, i in. Natural history of the TT virus infection through follow-up of TTV DNA-positive multiple-transfused patients. *Blood* 2000;95:347-51.
8. Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, i in. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology Res* 1998;10:1-16.
9. Hijikata M, Takahashi K, Mishiro S. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* 1999;260:17-22.
10. Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M, i in. Entire nucleotide sequence of a TT virus isolate from the United States (TUS01): comparison with reported isolates and phylogenetic analysis. *Virology* 1999;259:437-48.

11. He C, Nomura F, Yukimasa N, i in. Transfusion-transmitted virus infection in China: prevalence in blood donors and in patients with liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:899-903.
12. Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M, i in. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* 1999;259:428-36.
13. Hijikata M, Iwata K, Ohta Y, i in. Genotypes of TT virus (TTV) compared between disease patients and healthy individuals using a new PCR system capable of differentiating 1a and 1b types from others. *Arch Virol* 1999;144:2345-54.
14. Naoumov NV, Petrova EP, Thomas MG, i in. Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet* 1998;352:195-7.
15. Simmonds P, Davidson F, Lycett C, i in. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* 1998;352:191-5.
16. Ukita M, Okamoto H, Nishizawa T, i in. The entire nucleotide sequences of two distinct TT virus (TTV) isolates (TJN01 and TJN02) remotely related to the original TTV isolates. *Arch Virol* 2000;145:1543-59.
17. Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M, i in. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol* 2000;145:973-9.
18. Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, i in. Replicative forms of TT virus in bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;270:657-62.
19. Okamoto H, Ukita M, Nishizawa T, i in. Circular double-stranded forms of TT virus DNA in the liver. *J Virol* 2000;74:5161-7.
20. Rodriguez-Inigo E., Casqueiro M, Bartolome J, i in. Detection of TT virus DNA in liver biopsies by in situ hybridization. *Am J Pathol* 2000;156:1227-34.
21. Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, i in. Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol* 1998;156:128-32.
22. Ukita M, Okamoto H, Kato N, i in. Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A-G hepatitis. *J Infect Dis* 1999;179:1245-8.
23. Gallian P, Biagini P, Zhong S, i in. TT virus: a study of molecular epidemiology and transmission of genotypes 1, 2 and 3. *J Clin Virol* 2000;17:43-9.
24. Matsubara H, Miehitaka K, Horiike N, i in. Existence of TT virus DNA in extracellular body fluids from normal healthy Japanese subjects. *Intervirology* 2000;43:16-9.
25. Ross RS, Viazov S, Runde V, i in. Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. *J Clin Virol* 1999;13:181-4.
26. Wolff C, Diekmann A, Boomgaarden M, i in. Viremia and excretion of TT virus in immunosuppressed heart transplant recipients and in immunocompetent individuals. *Transplantation* 2000;69:351-6.
27. Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M. A novel unenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic non-A to G hepatitis. *Intervirology* 1999;42:196-204.
28. Kanda Y, Tanaka Y, Kami M, i in. TT virus in bone marrow transplant recipients. *Blood* 1999;93:2485-90.
29. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, i in. Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human carrier: comparison with reported isolates for conserved and divergent regions. *J Gen Virol* 1991;72:2697-704.
30. Fan L, Zhao X, Zhang D, i in. Detection of transfusion transmitted virus in hepatic and extra hepatic tissues using in situ hybridization. *Chung Hua Kan Tsang Ping Tsa Chih* 2000;8:147-9.

31. Tsuda F, Okamoto H, Ukita M, i in. Determination of antibodies to TT virus (TTV) and application to blood donors and patients with post-transfusion non-A to G hepatitis in Japan. *J Virol Methods* 2000;77:199-206.
32. Handa H, Dickstein B, Young NS, i in. Prevalence of the newly described human circovirus, TTV, in United States blood donors. *Transfusion* 2000;40:145-51.
33. Lou K, Liang W, He H, i in. Experimental infection of nonenveloped DNA virus (TTV) in rhesus monkey. *J Med Virol* 2000;61:159-64.
34. Cong ME, Nichols B, Dou XG, i in. Related TT viruses in chimpanzees. *Virology* 2000;274:343-55.
35. Okamoto H, Fukuda M, Tawara A, i in. Species-specific TT viruses and cross- species infection in nonhuman primates. *J Virol* 2000;74:1132-9.
36. Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, i in. Improved detection system for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animal. *J Gen Virol* 1999;80:2115-120.
37. Davidson F, MacDonald D, Mokili JLK, i in. Early acquisition of TT virus (TTV) in an area endemic for TTV infection. *J Infect Dis* 1999;179:1070-76.
38. Inaba N, Oshima K, Okajima Y, i in. TTV materno-infantile infection - a study on the TTV frequency in Japanese pregnant women and the natural history of TTV mother-to- infant infection. *Nippon Rinsho* 1999;57:1406-9.
39. Sugiyama K, Goto K, Ando T, i in. Route of TT virus infection in children. *J Med Virol* 1999;59:204-7.
40. Kazi A, Miyata H, Kurokawa K, i in. frequency of postnatal transmission of TT virus in infancy. *Arch Virol* 2000;145:535-40.
41. Schroter M, Polywka S, Zollner B, i in. Detection of TT virus DNA and GB virus type C/hepatitis G virus RNA in serum and breast milk: determination of mother-to-child transmission. *J Clin Microbiol* 2000;38:745-7.

Adres autorów:

Jerzy Nowak

Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk

ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

e-mail : nowakjs@man.poznan.pl