

## Genome Sequencing of Human Cytomegalovirus Strain LCW and Identification of Asia-specific Cluster

Ji Hye Kang, Jeong Hwa Yoon, Hye Rim Hwang and Chan Hee Lee\*

Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk, Korea

### Corresponding

Chan Hee Lee, Ph.D.

Department of Microbiology, Chungbuk National University, 1 Chungdae-Ro, Seowon-Gu, Cheongju, Chungbuk 28644, Korea.

Phone : +82-43-261-2304

Fax : +82-43-264-9600

E-mail : chlee@chungbuk.ac.kr

Received : October 30, 2018

Revised : November 12, 2018

Accepted : November 16, 2018

Human cytomegalovirus (HCMV) is a ubiquitous human pathogen and contains double stranded DNA genome with approximately 230 kbp. Molecular genomic studies of HCMV have been attempted in order to understand the pathogenesis and evolution of HCMV. However, studies on HCMV strains of Asian origin are limited. In this study, it was attempted to understand the genomics of HCMV isolated from Korea. Clinical strain LCW isolated from Korean patient was passaged in vitro cell culture, and subjected to next-generation sequencing. Complete genome sequence was obtained and compared with other HCMV strains. The LCW genome was found to contain 170 open reading frames (ORFs) and two ORF (RL5A and RL13) of the strain LCW were found to be truncated due to early stop codon. Phylogenetic analysis suggested that the strain LCW was closely related with Asian strains such as HCMV strains JHC and HAN. Common nucleotide sequences among the 3 Asian strains distinguishable from other strains were detected at 197 sites including 104 sites in ORFs.

**Key Words:** Human cytomegalovirus, Genome sequence, Asian cluster

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Copyright © 2018 Journal of Bacteriology and Virology

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

## INTRODUCTION

인간 거대세포바이러스(Human cytomegalovirus, HCMV)는 *Herpesviridae* family, *Betaherpesvirinae* subfamily의 *Cytomegalovirus* 속으로 분류되며, 인간 헤르페스 바이러스 중 가장 큰 게놈을 가진다. HCMV의 감염 유형은 일차 감염, 또는 무증상의 일차 감염 후 불현성 잠복 감염으로 존재하다가 간헐적으로 재활성되는 재발 감염, 또는 외부로부터 이형 HCMV의 감염에 의한 재감염 등으로 다양하며 (1), 그 임상증상도 환자의 연령과 면역 기능 상태에 따라 서로 다른 양상으로 나타난다 (2). 대부분의 경우 잠복성 감염을 하며 증상을 나타내지 않지만 선천적으로 감염된 신생아나 면역 기능이 저하된 환자에서 재활성도가 높게 나타나 뇌성마비나 청력감소, 위장질환 등 장애를 유발하고 심하게는 사망에까지 이르게 한다 (3~5). 미국에서 6세 이상의 58.9%, 80세 이상의 90.8%가 HCMV에 감염된 것으로 보고되고 있을 만큼 전 세계적으로 감염률이 높고 (6), 면역력이 약화된 사람에게 치명적인 질병을 유발할 수 있기 때문에 지난 수십 년간 HCMV에 대한 병리학 적 연구 및 백신개발에 대한 활발한 연구가 이어져오고 있다.

1904년 Jesionek와 Kiolemenoglou가 HCMV의 감염증인 세포비대성 봉입체병(cytomegalic inclusion disease)을 처음으로 보고한 이후 (7), 1956년 Smith가 바이러스 배양에 성공하였고 (8), 1957년 Craig 등에 의해 처음으로 생존해 있는 환자에게서 바이러스가 분리되었다 (9). 이후 HCMV에 대한 많은 연구가 진행되었고, 특히 AD169 주와 Towne 주는

인체 섬유아세포에서 순차적 계대를 통해 약독화된 백신 후보로 널리 연구되어 왔다 (10~13). 그럼에도 불구하고 아직까지 HCMV의 숙주 감염 및 잠복기작에 대해 알려진 바가 많이 없고, 효과적인 백신개발 또한 풀어야 할 과제로 남아있다 (14, 15).

HCMV의 전체 염기서열 분석은 1990년 최초로 수행되었으며 (16), 이후 꾸준히 연구되었다. 근래에는 이를 바탕으로 HCMV의 감염과 약독화 기작을 밝히기 위해 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 분석이 활발하게 이루어지고 있다 (17~19). HCMV 임상분리주의 유전자 다양성에 의한 병원성과 효과적인 면역반응에 대해 아직 명확히 규명된 바가 없기 때문에 (20~22) 다양한 HCMV의 임상주에 대한 계능 분석이 요구되는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국내 조혈모세포 이식환자로부터 분리된 LCW 주를 배양하여 차세대 염기서열 분석 방식을 통해 계능을 분석하였고, 이는 유전자의 기능과 생물체의 진화에 대한 중요한 단서를 제공할 것이다.

## MATERIALS AND METHODS

### HCMV LCW 주의 분리 및 배양

본 연구에 사용된 LCW 주는 2003년 가톨릭대학교 병원에서 조혈모세포를 이식 받은 환자의 혈액에서 분리된 임상주 중 하나로, 그 중 JHC 주에 대한 서열 분석은 이미 보고한 바 있다 (23, 24). 환자의 혈액을 채취하여 분리한 바이러스를 인간 포피 섬유아세포(human foreskin fibroblast cell, HFF cell)에서 일차적으로 배양하였다. 획득한 바이러스의 계대배양은 HFF 세포에 10%의 소 태아 혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco, Waltham, MA, USA), 100 µg/ml 스트렙토마이신과 100 U/ml 페니실린을 첨가한 돌베코의 변형된 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온 배양기에서 수행하였다. 단층으로 자란 HFF 세포에 바이러스를 접종하고, 고르게 감염될 수 있도록 15분 간격으로 흔들어주며 1시간 동안 흡착시켰다. 흡착 후에는 인산-완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS)로 세척 후 2% FBS를 첨가한 DMEM을 넣어 80%의 세포가 세포 병변 효과(cytopathic effect, CPE)를 보일 때까지 배양하였다. CPE가 충분히 나타났으면 미리 배양한 HFF 세포에 동일한 방법으로 접종하여 6대까지 계대배양하여 분석에 사용하였다.

### 바이러스의 수확

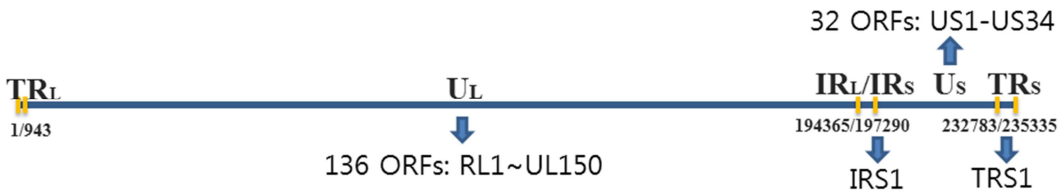
감염된 HFF 세포에서 CPE가 80% 이상으로 충분히 나타나면 cell scraper로 바닥에 붙어있는 세포까지 모두 떼어 3,000 rpm으로 5분간 실온에서 원심분리 하였다. 원심분리 후 바이러스를 포함하는 상층액은 따로 모아두고, 세포를 포함하는 pellet은 세포 안에 남아있는 바이러스까지 얻기 위해 -196°C 액체 질소에서 1분 동안 얼리고 37°C 항온수조에서 1분 동안 녹이는 과정을 3회 반복하였다. 그 후 3,000 rpm으로 5분간 실온에서 원심분리하여 파쇄된 cell의 구조물들을 제거한 상층액을 얻었다. 얻어낸 상층액과 이전 과정에서 모아둔 상층액을 혼합하여 0.45 µm 크기의 주사기 필터(Millex-HV syringe filter unit; Millipore, Bedford, MA, USA)로 여과하였다. 최종적으로 15,000 rpm에 1시간 30분 동안 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤, FBS가 첨가되지 않은 DMEM 200 µl를 넣고 재현탁하여 -70°C에 보관하였다.

### 전체 염기서열 결정

LCW 주의 전체 염기서열을 결정하기 위해서 GeneAll Exgene™ Cell SV mini kit (GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 제조사의 추천방법에 따라 DNA를 추출하였다. 추출한 바이러스 DNA는 천랩(Chunlab, Seoul, Korea)에 의뢰하여 차세대 시퀀싱을 진행하였다. TruSeq DNA Sample Preparation kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA)를 사용하여 제작한 DNA library를 Illumina MiSeq 방식으로 시퀀싱하였고, Illumina version 1.8을 사용하여 trimming된 read들을 제거하였다. 이렇게 얻은 read는 이전에 보고된 한국 임상분리주인 JHC 주(HQ380895.1)를 표준유전체로 하여 CLC Genomics Workbench (version 5.0)의 기본 파라미터 값에 따라 mapping 하였다. 그 결과 11개의 contig를 얻었고, contig 사이의 gap을 채우기 위해서 gap 지역의 앞뒤 contig 서열로부터 프라이머를 제작하였다. 제작한 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응 시퀀싱을 진행하여 염기서열을 해독하였고, 그 결과를 토대로 전체 염기서열을 완성하였다.

### ORF 정립 및 분석

LCW 주의 open reading frame (ORF)은 NCBI GenBank에 등록된 Merlin 주(NC\_006273.2)의 ORF 정보를 기준으로 local blast를 실행하여 위치를 찾았다. 그 후 CLC Sequence Viewer (version 7.0, <http://www.clcbio.com>)의 ORF find 기능과, GeneMarkS ([148](http://</a></p>
</div>
<div data-bbox=)



**Figure 1.** Genome map of the HCMV strain LCW. Nucleotide positions corresponding to the HCMV genome structure and the ORFs contained in each of the genome structure is indicated.

exon.gatech.edu/genemarks.cgi), NCBI의 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 프로그램으로 추가로 발견되는 ORF가 있는지 보았다. 최종적으로, BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.9.0, <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit>) 프로그램으로 실제 LCW 주의 ORF가 정확히 개시코돈으로 시작해서 종결코돈으로 끝나는지 확인하여 ORF 주소를 정립하였다.

## 계통분류학적 분석

2015년 1월 28일자를 기준으로 NCBI에 전체 서열이 등재되어 있는 HCMV 주 중에서 형질전환 바이러스 주를 제외한 41주의 HCMV와 본 연구에서 얻은 LCW 주 등 총 42개의 HCMV 주를 가지고 분석을 진행하였다(Table 1). HCMV의 계통분류학적 분석을 위해서 기준주로 널리 사용되고 있는 Merlin 주(NC\_006273.2)의 서열을 기준서열로 하여 ClustalW2 (version 2.1, <http://www.clustal.org/clustal2/>) 프로그램으로 정렬하였다. 계통분류학적 분석에는 염기서열 간의 유전적 거리 및 계통수를 구하기 위해서 Phylip package (version 3.69, <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>)를 이용하였다. 염기서열의 유전적 거리는 Kimura's 2-parameter model에 근거하여 구하였고, 계통수는 neighbor joining model로 작성하였다. 계통수의 신뢰성을 확보하기 위해서 bootstrap value를 1,000번 반복하는 조건으로 구하였고, 그림에 표기한 bootstrap value는 쉽게 볼 수 있도록 1/10로 환산한 값으로 나타내었다.

## RESULTS

### 국내 분리 임상주 LCW 주의 전체 염기서열 분석

Illumina MiSeq 시스템을 이용하여 LCW 주의 염기서열을 해독하였고, 동일한 국가인 한국에서 분리한 JHC 주를 참고 서열로 하여 총 11개의 contig를 얻을 수 있었다. Depth를 계산한 결과 LCW 주는 5,737X의 값을 가져 충분한 신뢰성을 확보하였다. 이후 contig 사이의 gap은 PCR sequencing을 이용하여 채워 넣어 최종적으로 235,335 bp의 전체 염기서열을 완성하였다.

LCW 주의 전체 염기서열을 분석한 결과 HCMV가 가지는 전형적인 구조인 TR<sub>L</sub>, U<sub>L</sub>, IR<sub>L</sub>, IR<sub>S</sub>, U<sub>S</sub>, TR<sub>S</sub> 구조를 확인할 수 있었고, 정방향의 70개의 ORF와 역방향의 100개의 ORF를 가져 총 170개의 ORF가 존재하였다. U<sub>L</sub>의 양쪽 말단에 존재하는 반복구조인 TR<sub>L</sub>과 IR<sub>L</sub>에는 ORF가 존재하지 않았으며, 136개의 ORF가 U<sub>L</sub> 지역에, 32개의 ORF가 U<sub>S</sub> 지역에 존재하였다. 나머지 2개의 ORF는 각각 IR<sub>S</sub> 지역과 TR<sub>S</sub> 지역에 하나씩 위치하였다(Fig. 1). 170개의 ORF의 검증을 위해 ORF의 시작과 끝이 개시코돈과 종결코돈으로 이루어져 있는지 알아보았다. 그 결과 개시코돈으로는 ATG 코돈이 169개였고, 나머지 한 개의 개시코돈은 UL30A 지역에서 ACG 코돈이 사용되었다. 종결코돈으로는 TAA, TGA, TAG 세 종류가 모두 관찰되었는데 이 중 TGA가 제일 많이 분포하였다(data not shown).

LCW 주의 ORF 서열을 41주의 HCMV와 비교한 결과, ORF의 기능에 영향을 미칠 것으로 예상되는 중요한 변이를 두 개의 ORF 지역에서 관찰할 수 있었다. 첫 번째로 RL5A 지역에서는 T→A 치환 돌연변이로 TGA 종결코돈이 형성되었고(Fig. 2A), 두 번째로 RL13 지역에서는 C→T 치환 돌연변이로 TAA 종결코돈이 형성되어(Fig. 2B) 두 군데에서 조기 종결이 일어났다.

## 계통분류학적 분석

LCW 주를 포함한 HCMV 42주의 게놈 DNA 염기서열을 다중 정렬하고 이를 토대로 계통수를 그려 보았다(Fig. 3). 이 계통수를 살펴보면 42주의 HCMV는 크게 5개의 집단으로 나눌 수 있고, 특히 LCW 주는 JHC 주 및 HAN 주와 함께 다른 주들과는 구분되는 집단을



**Table 1.** Information of 42 HCMV strains analyzed in this study

No.	Strain	Accession number	Country	Collection date	Genome length (bp)
1	AD169-varUK	BK000394.5	USA	1956	230,290
2	AD169-varUC	FJ527563.1	USA	1956	231,781
3	Towne	FJ616285.1	USA	1970	235,147
4	HAN38	GQ396662.1	Germany	2007	236,112
5	HAN20	GQ396663.1	Germany	2007	235,728
6	HAN13	GQ221973.1	Germany	2007	236,219
7	3157	GQ221974.1	United Kingdom	2001	235,154
8	3301	GQ466044.1	United Kingdom	2001	235,703
9	JP	GQ221975.1	United Kingdom	2001	236,375
10	Toledo	GU937742.1	USA	1984	235,398
11	Merlin	NC_006273.2	United Kingdom	1999	235,646
12	U8	GU179288.1	Italy	2003	235,709
13	VR1814	GU179289.1	Italy	1996	235,233
14	U11	GU179290.1	Italy	2003	234,732
15	AF1	GU179291	Italy	2003	235,937
16	JHC	HQ380895.1	Korea	2003	235,476
17	TB40/E	KF297339.1	Germany	1999	237,683
18	TR	KF021605.1	USA	1996	235,681
19	6397	JX512197.1	United Kingdom	2001	235,870
20	Davis	JX512198.1	USA	1957	229,768
21	HAN1	JX512199.1	Germany	2007	235,006
22	HAN2	JX512200.1	Germany	2007	232,940
23	HAN3	JX512201.1	Germany	2007	235,703
24	HAN8	JX512202.1	Germany	2007	234,951
25	HAN12	JX512203.1	Germany	2007	236,006
26	HAN16	JX512204.1	Germany	2007	235,112
27	HAN19	JX512205.1	Germany	2007	235,810
28	HAN22	JX512206.1	Germany	2007	236,379
29	HAN28	JX512207.1	Germany	2007	236,017
30	HAN31	JX512208.1	Germany	2007	235,720
31	HAN	KJ426589.1	China	2007	236,144
32	BE/9/2010	KC519319.1	Belgium	2010	235,631
33	BE/10/2010	KC519320.1	Belgium	2010	235,215
34	BE/11/2010	KC519321.1	Belgium	2010	235,061

**Table 1.** Information of 42 HCMV strains analyzed in this study (Continued)

No.	Strain	Accession number	Country	Collection date	Genome length (bp)
35	BE/21/2010	KC519322.1	Belgium	2010	235,722
36	BE/27/2010	KC519323.1	Belgium	2010	234,810
37	UKNEQAS1	KJ361971.1	United Kingdom	2012	235,190
38	PAV16	KJ872539.1	Italy	2009	236,240
39	PAV18	KJ872540.1	Italy	2008	234,739
40	PAV20	KJ872541.1	Italy	2013	236,293
41	PAV21	KJ872542.1	Italy	2013	235,901
42	LCW	not assigned	Korea	2003	235,335

**Table 2.** Mutations leading to single nucleotide polymorphism specific for the HCMV strains of Asian origin

	Location	Mutation				Sum
		Ts	Tv	In	Del	
ORF	Syn	64	9			73
	NonSyn	23	6			29
				1	1	2
NCR		40	42	9	2	93
Sum		125	57	10	3	197

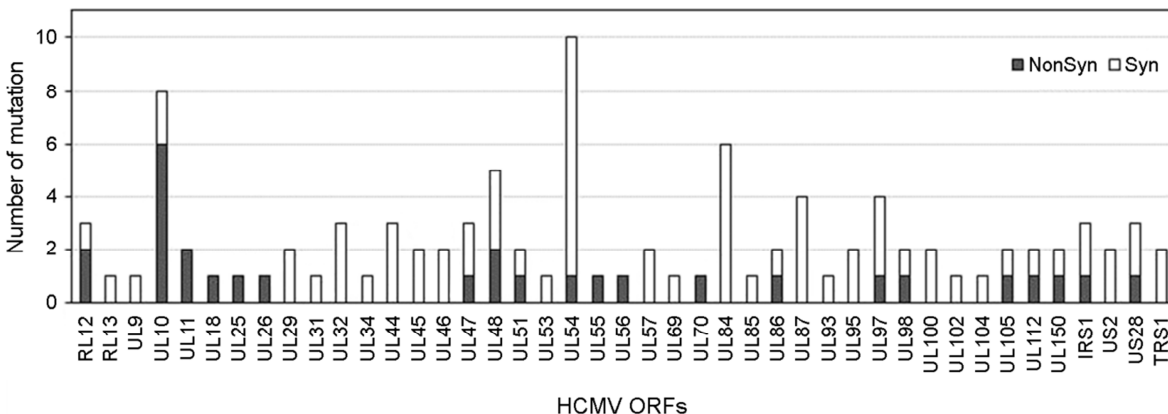
ORF: Open reading frame; NCR: Non-coding region; NonSyn: Non-synonymous mutation; NS: Nonsense mutation; TS: Transition; Tv: Transversion; In: Insertion; Del: Deletion

### 아시아 분리주 특이 SNP 분석

앞서 HCMV의 계통분류학적 분석 결과 아시아 분리주들은 상대적으로 가까운 유전적 거리를 가지는 것을 관찰하였고, 이에 ORF 내에서 아시아 분리주만 가지는 특이적인 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP) 부위가 있는지 알아보았다. 아시아 분리주들만 가지는 공통적인 SNP는 모두 197개로, 그 중 104개는 ORF 내에서, 93개는 NCR 지역에서 관찰되었다(Table 2). ORF 내의 104개 SNP 가운데 73개는 동의적 변이에 의한 것이고, 29개는 비동의적 변이에 의한 것이었다. 동의적 변이 73개 중에서 64개가 transition (Ts), 나머지 9개가 transversion (Tv)에 의한 것이었고, 비동의적 변이 29개 중에서 23개가 Ts, 6개가 Tv이었다. 이는 ORF 내에서 관찰된 104개의 SNP의 생성에 Ts/Tv의 비율은 5.8로 매우 높았다. 반면 NCR에서는 Ts/Tv가 거의 1로 상대적으로 Tv의 역할이 큰 것을 알 수 있다. 이와 같은 SNP들이 어떠한 ORF에서 존재하고 있는지 살펴본 결과 총 43개의 ORF에서 SNP가 관찰되었다(Fig. 4). 가장 많은 SNP를 보인 ORF는 UL54로 10개의 SNP가 관찰되었는데, 그 중 9개가 동의적 변이여서 아미노산 수준에서는 큰 차이를 보이지 않았다. UL10에서 8개로 두 번째로 많은 변이를 보였고, 이 중 6개가 비동의적 변이로 아미노산 수준에서도 6개의 변이를 보였다.

### DISCUSSION

HCMV는 전 세계적으로 감염률이 높고, 선천적으로 감염된 신생아나 면역력이 약화된 사람에게 치명적이기 때문에 세계적으로 많은 연구가 진행되어 왔다. HCMV 임상분리주의 유전적 다양성에 대한 많은 연구가 있었음에도 불구하고 (20~22), 그러한 유전적 다양성에 의한 병원성과 면역과정에 대한 자세한 메커니즘에 대해서는 아직 명확히 규명된 바가 없었다. 더욱이 대부분의 HCMV 분리주는 미국이



**Figure 4.** Distribution of the mutations found specifically in Asian strains of HCMV. Numbers of synonymous (□) and nonsynonymous (■) mutations are shown.

나 유럽 등지에서 이루어졌고, 대한민국이 포함된 아시아 지역에서 분리된 HCMV 주는 본 연구실에서 이전에 보고한 바 있는 JHC 주와 (24)와 중국에서 분리한 HAN 주 등 2개에 불과하다. 이에 따라 본 연구에서는 국내 환자에서 분리한 LCW 주의 전체 염기서열을 결정하고 그 유전적 특성을 분석하고자 하였다.

LCW 주의 전체 염기서열을 분석한 결과 RL5A 유전자와 RL13 유전자에서 조기 종결이 일어나는 것을 알 수 있었다. RL5A의 경우 HAN13 주와 JP 주에서, 그리고 RL13의 경우 AD169 varUK 주나 AD169 varUC 주, TOWNE 주, TOLEDO 주, JHC 주 등 다른 fibroblast cell에서 계대가 이루어진 바이러스 주에서도 동일하게 결실로 인한 frame shift 현상이나 조기 종결이 보고된 바가 있었다 (24). 이 두 유전자는 모두 매우 변이가 많다고 알려진 RL11 gene family에 속하며, class I membrane glycoprotein을 암호화하고 있는 것으로 밝혀져 있지만 (16, 25), HCMV의 감염 시 자세한 역할에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다 (26). 그렇지만 선행연구 논문 중에서 fibroblast cell에서의 계대가 RL13 유전자와 UL128 locus (UL128, UL130, UL131A)에 영향을 미쳐 빠르게 변이가 선택되고, 그에 따라 바이러스의 tropism과 병원성이 바뀔 수 있다는 보고가 있었다 (27). 이 보고가 있기 전까지는 세포 적응에 의한 변이는 높은 계대의 바이러스 주에 한정적인 것으로 추측되지만, 4~5 계대와 같이 낮은 계대에서도 변이가 일어날 수 있다는 해당 참고 문헌을 통해 LCW 주 역시 6계대로 낮은 계대이지만 섬유아세포에서의 배양을 통해 변이가 일어난 것으로 추측할 수 있었다.

또한 이번 연구에서는 42종 HCMV의 전체 염기서열에 대한 분석을 진행하였고, LCW 주를 포함한 아시아 분리주 3종이 비교적 가까운 유전적 거리를 가지는 것을 볼 수 있었다. 이러한 아시아 분리주의 지리적 계통군 형성은 선행연구 논문에서도 찾아 볼 수 있었고 (28), 그에 따라 본 연구에서는 더욱 심층적으로 들어가 아시아 분리주에서 특이적으로 보이는 SNP를 찾고자 하였다. 그 결과 197군데에서 아시아 분리주만이 가지는 SNP를 발견하였고, 그 중 104군데가 ORF 지역이었다. ORF 중에서 가장 많은 비동의적 변이를 보인 UL10의 경우 많이 밝혀진 바가 없고 바이러스 복제 시에 필수적이지 않은 유전자로 알려져 있었지만 (29), 해당 유전자의 경우 많은 HCMV 주에서 보존적이고 이것은 숙주환경에서 바이러스의 생존에 있어서 결정적인 역할을 할 것이라는 보고가 있었다 (30). 해당 선행연구의 내용은 UL10 유전자가 암호화하는 pUL10 단백질이 섬유아세포나 상피세포 등의 세포의 종류에 상관없이 다양한 세포의 표면을 쫓아 세포의 receptor 및 백혈구와 같은 면역시스템과 상호작용에 관여한다는 것이었지만 이러한 UL10의 기능과 아시아주 특이 변이가 연관이 있을지는 단정 지을 수 없었다. 향후 대한민국과 중국뿐 아니라 일본 또는 기타 아시아 지역에서 더 많은 HCMV 주가 분리되고 그 게놈 서열이 알려지게 되면 아시아 특이주의 특성이 보다 명확하게 규명되고, 이는 아시아인에 적합한 HCMV 백신이나 치료제 개발에 도움이 될 것이다.

## ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported in part by a grant from Green Cross Company.

## REFERENCES

- 1) Sinclair J, Reeves M. The intimate relationship between human cytomegalovirus and the dendritic cell lineage. *Front Microbiol* 2014;5:389.
- 2) Weller TH. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. *N Engl J Med* 1971;285:203-14.
- 3) Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* 2003;98:269-97.
- 4) Hassan J, Connell J. Translational Mini-Review Series on Infectious Disease: Congenital cytomegalovirus infection: 50 years on. *Clin Exp Immunol* 2007;149:205-10.
- 5) Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest* 2011;121:1673-80.
- 6) Staras SA, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis* 2006;43:1143-51.
- 7) Jesionek A, Kiolemenoglou B. Ueber einen befund von protozoenartigen gebilden in den organen eines hereditar-luetis-chen foetus. *Muenchner Med Wochenschr* 1904;51:1905-7.
- 8) Smith MG. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956;92:424-30.
- 9) Craig JM, Macauley JC, Weller TH, Wirth P. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957;94:4-12.
- 10) Elek SD, Stern H. Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet* 1974;1:1-5.
- 11) Plotkin SA, Furukawa T, Zygraich, Huygelen C. Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infect Immun* 1975;12:521-7.
- 12) Just M, Buergin-Wolff A, Emoedi G, Hernandez R. Immunisation trials with live attenuated cytomegalovirus TOWNE 125. *Infection* 1975;3:111-4.
- 13) Brayman KL, Dafoe DC, Smythe WR, Barker CF, Perloff LJ, Naji A, *et al*. Prophylaxis of serious cytomegalovirus infection in renal transplant candidates using live human cytomegalovirus vaccine. Interim results of a randomized controlled trial. *Arch Surg* 1988;123:1502-8.
- 14) Khanna R, Diamond DJ. Human cytomegalovirus vaccine: time to look for alternative options. *Trends Mol Med* 2006;12:26-33.
- 15) Krause PR, Bialek SR, Boppana SB, Griffiths PD, Laughlin CA, Ljungman P, *et al*. Priorities for CMV vaccine development. *Vaccine* 2013;32:4-10.
- 16) Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, *et al*. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990;154:125-69.



- 17) Dargan DJ, Douglas E, Cunningham C, Jamieson F, Stanton RJ, Baluchova K, *et al.* Sequential mutations associated with adaptation of human cytomegalovirus to growth in cell culture. *J Gen Virol* 2010;91:1535-46.
- 18) Renzette N, Gibson L, Bhattacharjee B, Fisher D, Schleiss MR, Jensen JD, *et al.* Rapid intrahost evolution of human cytomegalovirus is shaped by demography and positive selection. *PLoS Genet* 2013;9:e1003735.
- 19) Fernández-Ruiz M, Corrales I, Arias M, Campistol JM, Giménez E, Crespo J, *et al.* Association between individual and combined SNPs in genes related to innate immunity and incidence of CMV infection in seropositive kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2015;15:1323-35.
- 20) Murphy E, Yu D, Grimwood J, Schmutz J, Dickson M, Jarvis MA, *et al.* Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14976-81.
- 21) Novak Z, Ross SA, Patro RK, Pati SK, Kumbala RA, Brice S, *et al.* Cytomegalovirus strain diversity in seropositive women. *J Clin Microbiol* 2008;46:882-6.
- 22) Renzette N, Pokalyuk C, Gibson L, Bhattacharjee B, Schleiss MR, Hamprecht K, *et al.* Limits and patterns of cytomegalovirus genomic diversity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:E4120-8.
- 23) Lee GC, Lee DG, Choi SM, Yoo JH, Park SH, Choi JH, *et al.* Use of Time-Saving Flow Cytometry for Rapid Determination of Resistance of Human Cytomegalovirus to Ganciclovir. *J Clin Microbiol* 2005;43:5003-8.
- 24) Jung GS, Kim YY, Kim JI, Ji GY, Jeon JS, Yoon HW, *et al.* Full genome sequencing and analysis of human cytomegalovirus strain JHC isolated from a Korean patient. *Virus Res* 2011;156:113-20.
- 25) Davison AJ, Akter P, Cunningham C, Dolan A, Addison C, Dargan DJ, *et al.* Homology between the human cytomegalovirus RL11 gene family and human adenovirus E3 genes. *J Gen Virol* 2003;84:657-63.
- 26) Cunningham C, Gatherer D, Hilfrich B, Baluchova K, Dargan DJ, Thomson M, *et al.* Sequences of complete human cytomegalovirus genomes from infected cell cultures and clinical specimens. *J Gen Virol* 2010;91:605-15.
- 27) Wilkinson GW, Davison AJ, Tomasec P, Fielding CA, Aichele R, Murrell I, *et al.* Human cytomegalovirus: taking the strain. *Med Microbiol Immunol* 2015;204:273-84.
- 28) Sijmons S, Thys K, Mbong Ngwese M, Van Damme E, Dvorak J, Van Loock M, *et al.* High-throughput analysis of human cytomegalovirus genome diversity highlights the widespread occurrence of gene-disrupting mutations and pervasive recombination. *J Virol* 2015;89:7673-95.
- 29) Dunn W, Chou C, Li H, Hai R, Patterson D, Stolc V, *et al.* Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14223-8.
- 30) Bruno L, Cortese M, Monda G, Gentile M, Caló S, Schiavetti F, *et al.* Human cytomegalovirus pUL10 interacts with leukocytes and impair TCR mediated T-cell activation. *Immunol Cell Biol* 2016;94:849-60.