

Barbara Zawilińska<sup>1</sup>, Sława Szostek<sup>1</sup>, Jolanta Kopeć<sup>1</sup>, Małgorzata Koprynia<sup>1</sup>, Magdalena Kosz-Vnenchak<sup>1,2</sup>

## RÓŻNORODNOŚĆ GENOTYPOWA UL55 SZCZEPÓW WIRUSA CYTOMEGALII IZOLOWANYCH OD NOWORODKÓW I NIEMOWLĄT HOSPITALIZOWANYCH W POLSCE POŁUDNIOWEJ

### UL55 GENOTYPE DIVERSITY OF CYTOMEGALOVIRUS STRAINS ISOLATED FROM NEWBORNS AND INFANTS HOSPITALIZED IN SOUTHERN POLAND

<sup>1</sup> Zakład Wirusologii Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego  
Collegium Medicum w Krakowie

<sup>2</sup> Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

#### STRESZCZENIE

W badaniach nad zakażeniami cytomegalowirusem (HCMV) coraz częściej zwraca się uwagę na różnice w patogenności, tropizmie i wirulencji tego wirusa w zależności od jego genotypu.

Celem pracy była ocena występowania poszczególnych genotypów gB kodowanych w regionie UL55 genomu HCMV, w populacji noworodków i niemowląt z Polski południowej.

Analizę genotypową przeprowadzono w grupie 53 dzieci z potwierdzonym zakażeniem HCMV. Do genotypowania jak i oceny ilościowej HCMV wykorzystano metodę PCR w czasie rzeczywistym.

Badania potwierdziły obecność genotypów gB1, gB2, gB3 i gB4 w badanej grupie dzieci. Dominował genotyp gB1 (63,5%), który nieco częściej wykrywano u niemowląt niż u noworodków. Zakażenia mieszane, dwoma genotypami wykazano u 16 (31%) dzieci, przy czym głównie wykrywano je u dzieci starszych. Nie obserwowano znamienych statystycznie różnic w wirusowym „load” porównując grupę noworodków z niemowlętami oraz zakażenia pojedyncze z mieszanymi. Obserwowane w pracy różnice w proporcjonalnym występowaniu poszczególnych genotypów gB w dwóch grupach badanych dzieci mogą sugerować na istnienie różnych preferencji genotypowych w zakażeniach wrodzonych oraz nabytych HCMV.

#### ABSTRACT

Studies on cytomegalovirus (HCMV) infections more often draw attention to the differences in tropism, pathogenicity and virulence of the virus depending on its genotype.

The aim of this study was to assess the individual gB genotypes which are encoded in UL55 region of HCMV genome in a population of newborns and infants from Southern Poland.

Genotypic analysis was carried out on 53 children (16 newborns and 37 neonates) with confirmed HCMV infection. The children were tested several times. A total of 101 samples, mainly urine, less blood, swabs from the upper respiratory tract, in justified cases, the cerebrospinal fluid were used in our study. Both genotyping and quantitative assessment of HCMV were performed using real time-PCR (rt-PCR). For identification of four major gB genotypes in one reaction, a modification of multiplex rt-PCR was used.

Studies confirmed the presence of all major genotypes: gB1, gB2, gB3 and gB4 in the examined groups of children. Only in one case, the genotype could not be determined, perhaps it belonged to subtypes outside the detectable majority of gB genotypes. Genotype gB1 (63.5%) which was slightly more frequent in infants than in neonates, dominated in our studies. The other genotypes occurred at a rate: gB2 - 15.4%, gB3 - 21.2%, gB4 - 28.8%, respectively. Mixed infections, caused by two genotypes were found in 16 (31%) children, mainly in older infants. There were no statistically significant differences in viral load when comparing a group of newborns with infants and single vs. mixed infection, as well as individual genotypes.

The observed differences in the proportional occurrence of different gB genotypes in the two study groups of children may suggest various preferences of particular HCMV genotypes in congenital and acquired infections. Moreover, by monitoring of HCMV

**Słowa kluczowe:** cytomegalowirus, genotypy gB, zakażenia noworodków i niemowląt

## WSTĘP

Ludzki wirus cytomegalii (HCMV) klasyfikowany do rodziny *Herpesviridae*, podrodziny *Betaherpesvirinae* charakteryzuje się cechami typowymi dla tej podrodziny takimi jak: wysoka swoistość gatunkowa, długi czas cyklu replikacyjnego, późne pojawianie się zmian cytopatycznych po zakażeniu hodowli komórkowej. Genom HCMV o długości w zależności od szczepu od 220 - 240 tysięcy par zasad, zawiera ponad 200 otwartych ramek odczytu (ORF), przy czym poznano do tej pory funkcje tylko niektórych białek przez nie kodowanych (1). Są wśród nich białka bezpośrednio związane z replikacją, pełniące rolę regulatorową, jak i białka strukturalne, włączane do wirionów i tworzące nukleokapsyd, tegument lub osłonkę wirusa.

Analiza porównawcza DNA i białek wirusowych wykazała 95% homologię pomiędzy szczepami HCMV izolowanymi z przypadków klinicznych (2). Obserwowany polimorfizm dotyczy zarówno sekwencji kodujących jak i niekodujących, a zmienność nukleotydów jest rozproszona w całym genomie, przy czym w niektórych regionach występuje ona częściej.

Glikoproteiny osłonki wirionu, których różnorodność poznana dla HCMV przewyższa wszystkie inne występujące u herpeswirusów, ze względu na istotne funkcje w procesie zakażenia, rozprzestrzeniania się w organizmie i stymulacji odpowiedzi immunologicznej, podlegają stałej presji środowiska, a geny je kodujące wykazują często polimorfizm. Wśród glikoprotein HCMV, powiązanych ze sobą w większe kompleksy nazywane gC-I, gC-II i gC-III (od *glycoprotein complex*), najobfitsza jest glikoproteina B (gB), należąca do kompleksu gC-I. Jest ona integralnym składnikiem osłonki, niezbędnym w procesie przyłączenia wirusa do komórki, penetracji i fuzji z błoną komórkową, replikacji zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. Bierze udział w szerzeniu się zakażenia z komórki do komórki, jest eksponowana na powierzchni zakażonej komórki i jest głównym celem ataku odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Glikoproteina ta jest kodowana przez gen UL55 (2712 pz), tworzy ją 906 aminokwasów, jej względna masa molowa wynosi 160 000. W pozycji 460 jest cięta przez komórkowe endoproteazy na dwa fragmenty zwane: N lub gp116 (m.cz. 92000 – 116000) i C lub gp55 (m.cz. 52000 – 55000), połączone wiązaniem dwusiarczkowym, tworzącym kompleks gp116-gp55.

infection and determination the genotypes in consecutive samples, it could be identified infection acquired during hospitalization in three children.

**Key words:** cytomegalovirus, gB genotypes, newborns and infants infections

Miejsce cięcia, szczególnie region zawarty między kodonami 448-481, wykazuje największą zmienność genetyczną, co dało podstawy do podziału HCMV na genotypy. Ich rozróżnienie było możliwe po zastosowaniu endonukleaz restrykcyjnych *Hinf*-I (G↓ANTC) i *Rsa*-I (GT↓AC) do trawienia produktów amplifikacji tego regionu. Uzyskane różne wzory restrykcyjne pozwoliły na wyodrębnienie 4 genotypów HCMV: gB1, gB2, gB3 i gB4. Oprócz nich, dużo rzadziej można wykrywać dodatkowe 3 warianty wewnątrzgenotypowe (gB5, gB6 i gB7), które są wynikiem rekombinacji homologicznych (1).

W literaturze pojawiły się doniesienia o różnej patogenności, tropizmie i wirulencji HCMV, zależnej od genotypu. Potwierdzały to obserwacje kliniczne pacjentów w stanie immunosupresji, u których przebieg i ciężkość zakażenia HCMV próbowano łączyć z różnym genotypem gB (3, 4, 5). Związek taki wykazali także *Barbi* i wsp. (6) oraz *Yu* i wsp. (7) w przypadku zakażeń wrodzonych, w odniesieniu do objawów klinicznych i różnej zdolności transmisji wirusa z matki na płód. Dane publikowane na ten temat przez innych autorów nie są jednak tak jednoznaczne, a prezentowane wręcz przeciwne wyniki mogą wskazywać, że oddziaływanie pomiędzy wirusem a organizmem jest zapewne procesem wieloczynnikowym (8, 9).

W pracy podjęto próbę oceny występowania poszczególnych genotypów gB HCMV w populacji najmłodszych dzieci, u których zakażenie HCMV potwierdzono w pierwszym roku życia. Ponieważ zakażenie nabyte w tym okresie życia może być wynikiem zarówno zakażenia wrodzonego jak i nabytego, próbowano porównać ze sobą grupę noworodków i niemowląt.

## MATERIAŁ I METODY

Analizę genotypową przeprowadzono na szczepach HCMV wyizolowanych od 53 dzieci, hospitalizowanych w latach 2009 - 2011 w Klinice Neonatologii UJ CM lub Klinice Chorób Dzieci Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego. Dzieci były badane w związku z podejrzeniem klinicznym zakażenia HCMV. Charakterystykę pacjentów oraz rodzaj materiału klinicznego pozyskanego od badanych dzieci przedstawia tabela I.

Rozpoznanie zakażenia HCMV określano na podstawie dodatkowej izolacji wirusa z moczu lub wymazu z górnych dróg oddechowych (pobranego do 1 ml

Tabela I. Charakterystyka pacjentów i materiałów, w których określono genotypy gB HCMV

Table I. Characteristics of patients and materials in which gB genotypes of HCMV were determined

	NOWORODKI	NIEMOWLĘTA
liczba badanych dzieci	16	37
śr. wiek dzieci $\pm$ SD	10,2 $\pm$ 9,7 dni	5,6 $\pm$ 3,6 mies.
płeć męska/żeńska	8/8	21/16
śr. liczba materiałów $\pm$ SD przypadających na dziecko	2,9 $\pm$ 2,7	1,4 $\pm$ 0,6
rodzaj materiału (liczba badanych/dodatnich izolatów DNA)		
- mocz	33/26	43/40
- krew	11/7	7/7
- wymaz z górnych dróg oddechowych	1/1	3/3
- płyn mózgowo-rdzeniowy	3/1	0
śr. liczba kopii/ml ( $\log_{10}$ $\pm$ SD) w chwili rozpoznania zakażenia		
- mocz	6,16 $\pm$ 1,55	5,29 $\pm$ 1,63
- krew	4,25 $\pm$ 0,69	3,70 $\pm$ 0,60

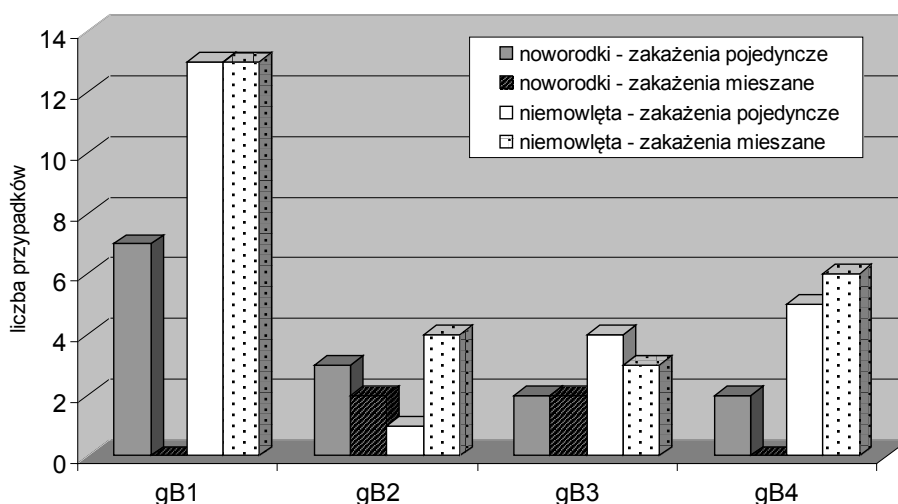
podłoża transportowego) w hodowli komórek MRC-5 metodą „shell vial” (10). Równolegle dla tych materiałów oraz próbek krwi i płynów mózgowo-rdzeniowych przeprowadzono reakcję nested PCR według procedury wcześniej opisanej przez autorów tego doniesienia (11). W izolowanym z materiału klinicznego DNA HCMV oznaczano liczbę kopii wirusa/ml próbki stosując test PCR w czasie rzeczywistym (rt-PCR) i odczynnik firmy Nanogen Advanced Diagnostics. Reakcję przeprowadzono w aparacie Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System według zaleceń producenta.

Do określenia genotypu gB zastosowano także reakcję rt-PCR, w której amplifikowano w zależności od genotypu fragmenty długości 72-79 pz UL55. Stosowano 4 pary starterów swoistych dla poszczególnych genotypów oraz sondy TaqMan znakowane barwnikami FAM i VIC, odpowiednio dla gB1, gB3 oraz gB2 i gB4. Sekwencje starterów i sond zaczerpnięto z pracy Pang i wsp. (12). Amplifikację przeprowadzono w jednej reakcji, w dwóch oddzielnych probówkach (osobno dla gB1 i gB3 oraz gB2 i gB4) w objętości 20  $\mu$ l, stosując 10  $\mu$ l TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 400 nM starterów i 200 nM odpowiadających im sond oraz 4  $\mu$ l izolatu DNA ze szczepem klinicznym HCMV. Profil temperaturowy reakcji był następujący: 95°C przez 20 s., a następnie 40 cykli w temperaturze 95°C przez 3 s. i 60°C przez 30 s. Do każdej reakcji dołączano seryjnie rozcieńczane DNA uzyskane ze szczepów prototypowych HCMV Towne (ATCC nr kat. VR-977) i AD-169 (ATCC nr kat. VR-538) w celu wykreślenia krzywych kalibracyjnych. Woda stanowiła kontrolę ujemną amplifikacji.

Do oceny uzyskanych wyników zastosowano analizę statystyczną  $\chi^2$  oraz nieparametryczne testy U Manna-Whitneya, Kołmogorowa-Smirnowa i Waldy-Wolfowitza (pakiet STATISTICA 9).

## WYNIKI

W badanej grupie 53 dzieci zakażonych HCMV, tylko dla jednego dziecka nie udało się określić genotypu gB. Dzieci ze względu na wiek, w którym rozpoznano po raz pierwszy zakażenie HCMV podzielono na grupę



Ryc. 1. Występowanie czterech głównych genotypów gB (UL55) HCMV u noworodków (n=16) i niemowląt (n=36) z uwzględnieniem zakażeń wywołanych pojedynczymi i mieszanymi genotypami. Dzieci były hospitalizowane w latach 2009 – 2011 w Klinice Neonatologii UJ CM lub Klinice Chorób Dzieci Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego

Fig. 1. Occurrence of four major genotypes of gB (UL55) HCMV in neonates (n = 16) and infants (n = 36) in relation to single and mixed genotypes infections. Children were hospitalized in the years 2009 – 2011 in the Clinic of Neonatology or the Clinic of Pediatrics, University Hospital

noworodków (n=16) i niemowląt (n=37). Badania były wykonywane kilkakrotnie, w różnych odstępach czasu, u noworodków maksymalnie do 6 miesiąca życia. Ilościową ocenę zakażenia (tzw. *load*) wyrażoną w postaci  $\log_{10}$  liczby kopii HCMV/ml próbki ograniczono tylko do materiałów, w których po raz pierwszy wykryto jego obecność, z uwagi na spadek liczby kopii w materiałach uzyskanych w kolejnych tygodniach od dzieci leczonych lekami przeciwwirusowymi. Średnia wartość „*load*” wykrywanego w moczu i krwi (tab. I) nie różniła się statystycznie w grupie noworodków i niemowląt (odpowiednio dla moczu  $p = 0,08$  i krwi  $p = 0,12$ ; test U Manna-Whitneya). Występowanie poszczególnych genotypów wśród badanych przedstawiało się następująco: gB1 u 33 (63,5%), gB2 u 8 (15,4%), gB3 u 11 (21,2%) i gB4 u 15 (28,8%) dzieci zakażonych HCMV. U 14 noworodków (87,5%) i 23 niemowląt (63,9%) potwierdzono obecność jednego genotypu. Zakażenia mieszane, spowodowane dwoma różnymi genotypami wykryto u 16 (tj. 30,77%) dzieci, przy czym głównie u dzieci starszych (14 niemowląt, w tym u 8 powyżej 5 mies. życia). Na rycinie 1 przedstawiono dystrybucję poszczególnych genotypów w zakażeniach pojedynczych i mieszanych w grupie noworodków i niemowląt. Genotyp gB1 występował nieznacznie częściej u niemowląt niż u noworodków (Pearson  $\chi^2 = 3,8726$ ;  $p = 0,049$ ), dla pozostałych genotypów obserwowane różnice nie były znamienne statystycznie. Przeprowadzona statystycznie ocena uwzględniająca w obu grupach proporcjonalne występowanie poszczególnych genotypów HCMV u noworodków i niemowląt wykazała znamienne różnice (test serii Walda-Wolfowitza,  $p = 0,0002$ ). Nie obserwowano natomiast istotnych statystycznie różnic w wirusowym „*load*” w przypadku zakażeń pojedynczych i mieszanych. Średnie miano HCMV (wyrażone w postaci  $\log_{10}$ ) w badanych próbkach moczu wynosiło odpowiednio  $5,62 \pm 1,57$  w zakażeniach pojedynczych i  $5,32 \pm 1,88$  w przypadkach z zakażeniami mieszanymi ( $p = 0,62$ ; test U Manna-Whitneya). Nie obserwowano także różnic w mianie wirusa w zależności od zakażającego genotypu.

Dzięki monitorowaniu zakażenia HCMV i oznaczeniach genotypów gB w kolejnych próbkach, u jednego niemowlęcia rozpoznano nadkażenie odmiennym genotypem w drugim miesiącu życia, co wiązało się ze wzrostem ponad 100-krotnym liczby kopii wirusa w moczu. U dwójki innych dzieci hospitalizowanych z powodu skrajnego wcześniactwa, u których w okresie noworodkowym nie potwierdzono zakażenia HCMV, wykryto jego obecność w 6 i 7 tygodniu życia.

## DYSKUSJA

W pracy wykorzystano materiał kliniczny pochodzący od dzieci z objawami klinicznymi mogącymi

sugerować zakażenie HCMV. Po wyizolowaniu z tego materiału genomowego DNA i potwierdzeniu obecności wirusa w reakcji nested PCR, oceniono ilościowo wirusowe „*load*” oraz podjęto próbę identyfikacji genotypu gB wirusa. Zastosowano metodę rt-PCR, która umożliwiła dzięki amplifikacji krótkich i zbliżonych pod względem wielkości odcinków wirusowego DNA, równoczesne wykrycie w jednym badaniu, w reakcji typu „multiplex” czterech głównych genotypów gB. Tylko u jednego dziecka nie udało się określić genotypu gB. Być może należał on do wariantu wewnątrzgenotypowego, spoza regionu rozpoznawanego przez zastosowane w pracy startery.

Badania potwierdziły obecność czterech genotypów gB w badanej populacji dzieci. Dominującym pod względem częstości okazał się genotyp gB1 (63,5%), następnie gB4 (28,8%). Przegląd piśmiennictwa dotyczący tego tematu wskazuje na wyraźne odmienne rozprzestrzenienie szczepów HCMV w różnych krajach i regionach świata. *Lukácsi* i wsp. badając szczepy izolowane z przypadków wrodzonej cytomegalii występujące na Węgrzech wykazali obecność jedynie genotypu gB1 (13). Natomiast prace pochodzące z Japonii, Indii czy z Chin zwracają uwagę na brak występowania tam genotypów gB2 i/lub gB4 (7, 14, 15). We wszystkich jednak pracach znamienne było to, że genotypem dominującym wykrywanym w zakażeniach wrodzonych jest gB1. Zastanawiające jest także to, że wśród badanych polskich dzieci wykrywano wysoką częstość genotypu gB4, której nie opisywali w takim nasileniu inni autorzy, także w krajach europejskich (6, 9). W badaniach *Bale* i wsp., a dotyczących genotypowania szczepów HCMV izolowanych z 53 przypadków zakażeń wrodzonych ze stanów Iowa i Teras, obecność gB4 potwierdzono poprzez analizę restrykcyjną produktów PCR tylko w 4% badanych szczepów (8).

Zastosowana w pracy metoda rt-PCR umożliwiła wykrycie przypadków zakażeń mieszanych, wywołanych przez dwa genotypy równocześnie. Zakażenia tego typu rozpoznano u 31% badanych dzieci, przy czym znamienne częściej wykrywano je u niemowląt niż u noworodków. Obserwowane różnice statystyczne w proporcjonalności występowania poszczególnych genotypów gB w obu grupach badanych dzieci mogą wskazywać na różne preferencje genotypowe w zakażeniach wrodzonych i nabytych w okresie postnatalnym. Badania potwierdziły, że do zakażeń nabytych dochodzi w warunkach polskich bardzo wcześnie, w pierwszych tygodniach życia, nawet w czasie pobytu dziecka w oddziale noworodkowym. Jednak, wykryte u dwójki dzieci w 1. i 2. tygodniu życia zakażenia mieszanimi genotypami wskazują na możliwość takiej transmisji także przez łożysko i zwracają uwagę na ryzyko reinfekcji kobiet w okresie ciąży. Na wysoką częstość wtórnych, wieloszczepowych zakażeń wśród seropozytywnych

kobiet zwracali już uwagę Novak i wsp. (16). Porównania ilościowe przeprowadzone w badaniach własnych pomiędzy szczepami HCMV należącymi do różnych genotypów nie wykazały znamiennych różnic. Dla oceny ewentualnie różnej wirulencji poszczególnych genotypów konieczna jest dalsza analiza i ocena kliniczna dzieci, także w ich późniejszym rozwoju. Należy podkreślić, że do monitorowania skutków zakażenia i oceny czasu utrzymywania się aktywnej replikacji HCMV wystarczą badania próbek moczu, materiału który można łatwo pozyskać od małych dzieci i w którym liczba kopii wirusa przewyższa wartości wykrywane w krwi obwodowej.

### WNIOSKI

1. Zastosowana metoda genotypowania potwierdziła polimorfizm szczepów HCMV zakażających noworodki i niemowlęta.
2. Wykryto obecność wszystkich głównych genotypów gB w populacji dzieci z Polski południowej, przy czym dominował genotyp gB1.
3. Potwierdzono częste zakażenia mieszane wywołane różnymi szczepami HCMV, które mogą być wynikiem zarówno wertykalnej transmisji wirusa jak również zakażeń nabytych w okresie niemowlęcym.
5. Goossens VJ, Wolffs PF, van Loo IH, i in. CMV DNA levels and CMV gB subtypes in ART-naïve HAART-treated patients: a 2-year follow-up study in the Netherlands. *AIDS* 2009; 23: 1425-1429.
6. Barbi M, Binda S, Caroppo S, i in. CMV gB genotypes and outcome of vertical transmission: study on dried blood spots of congenitally infected babies. *J Clin Virol* 2001; 21: 75-79.
7. Yu ZS, Zou CC, Zheng JY, i in. Cytomegalovirus gB genotype and clinical features in Chinese infants with congenital infections. *Intervirology* 2006; 49: 281-285.
8. Bale JF, Murph JR, Demmler GJ, i in. Intrauterine cytomegalovirus infection and glycoprotein B genotypes. *J Infect Dis* 2000; 182: 933-6.
9. Picone O, Costa JM, Leruez-Ville M, i in. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B genotype and CMV DNA load in the amniotic fluid of infected fetuses. *Prenat Diagn* 2004; 24: 1001-6.
10. Zawilińska B, Kruszewska M, Stopyrowa J, i in. Cytomegalia wrodzona i nabyta niemowląt potwierdzona badaniami wirusologicznymi. *Przeegl Lek*; 1995; 52: 354-7.
11. Piątkowska-Jakubas B, Zawilińska B, Kopeć J, i in. Monitorowanie infekcji CMV metodą oceny antygenemii pp65 i DNA przy pomocy jakościowego PCR u chorych poddanych allogenicznej transplantacji komórek hematopoetycznych - doświadczenia własne. *Acta Haematol Pol* 2003; 34: 339-346.
12. Pang X, Humar A, Preiksaitis JK: Concurrent genotyping and quantitation of cytomegalovirus gB genotypes in solid-organ-transplant recipients by use of a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 4004-10.
13. Lukácsi A, Taródi B, Endreffy E, i in. Human cytomegalovirus gB genotype 1 is dominant in congenital infections in South Hungary. *J Med Virol*. 2001; 65: 537-42.
14. Yan H, Koyano S, Inami Y, i in. Genetic variations in the gB, UL144 band UL149 genes of human cytomegalovirus strains collected from congenitally and postnatally infected Japanese children. *Arch Virol* 2008; 153: 667-674.
15. Mewara A, Mishra B, Ratho RK, i in. Cytomegalovirus glycoprotein B gene polymorphism and its association with clinical presentations in infants. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009; 40: 759-64.
16. Novak Z, Ross SA, Patro RK, i in. Cytomegalovirus strain diversity in seropositive women. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 882-6.

### PODZIĘKOWANIA

Praca powstała dzięki wsparciu udzielonemu przez Islandię, Lichtenstein i Norwegię poprzez dofinansowanie ze środków Mechanizmu Finansowego Europejskiego Obszaru Gospodarczego oraz środków budżetu państwa na naukę – projekt nr PL0270 pt. „Zakażenia prenatalne i perinatalne ludzkim wirusem cytomegalii”.

### PIŚMIENNICTWO

1. Pignatelli S, Dal Monte P, Rossini G, i in. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Rev Med Virol* 2004; 14: 383-410.
2. Chandler SH, McDougall JK. Comparison of restriction site polymorphisms among clinical isolates and laboratory strains of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 1986; 67: 2179-2192.
3. Coaquette A, Bourgeois A, Dirand C, i in. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 155-161.
4. Görzer I, Kerschner H, Jaksch P, i in. Virus load dynamics of individual CMV-genotypes in lung transplant recipients with mixed-genotype infections. *J Med Virol* 2008; 80: 1405-1414.

Otrzymano: 20.04.2011 r.

Zaakceptowano do druku: 22.06.2011 r.

#### Adres do korespondencji:

Barbara Zawilińska  
Zakład Wirusologii Katedry Mikrobiologii UJ CM,  
ul. Czysa 18, 31-121 Kraków  
tel. 12 634 54 00  
e-mail: mbzawili@cm-uj.krakow.pl