

AISLAMIENTO DE CITOMEGALOVIRUS POR CULTIVO CONVENCIONAL Y CULTIVO RAPIDO

MONICA C. GALIANO, CRISTINA M. VIDELA, SILVIA SANCHEZ PUCH, GUADALUPE CARBALLAL

Laboratorio de Virología Clínica, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas Norberto Quirno (CEMIC), Buenos Aires

Resumen En pacientes inmunocomprometidos el diagnóstico de infección activa por *Citomegalovirus* (CMV) es imprescindible para el inicio, el monitoreo y la finalización de la terapia antiviral específica. Para ello, se requiere demostrar la presencia de replicación viral. El aislamiento en cultivo es uno de los métodos patrones. El objetivo de este trabajo fue comparar dos procedimientos de aislamiento: el cultivo convencional (CC) y el cultivo rápido en *shell vial* (SV). Entre 1991 y 1998, se estudiaron 584 muestras clínicas. En el 14.4% de las muestras se obtuvo aislamiento de CMV. De ellas, 11.8% fueron positivas por SV y 7.7% por CC. De 84 muestras positivas, en el 36% se observó concordancia entre ambos métodos; 46% fueron positivas sólo por SV; y 18% fueron positivas sólo por CC. El tiempo promedio de obtención de resultados por CC fue de 22.6 ± 2.3 días. De las 69 muestras positivas por SV, 43% fueron positivas ya a las 24 hs y el resto a las 48 hs. Estos resultados demuestran que el SV fue más sensible y más rápido que el CC. Aunque el CC es lento, su principal ventaja es la recuperación de la cepa viral para estudios fenotípicos de susceptibilidad antiviral así como para la caracterización de las cepas. Además, de no utilizarse el CC, se hubieran perdido el 18% de las muestras positivas. En conclusión, se sugiere el uso de ambos métodos simultáneamente para lograr un resultado rápido y una máxima sensibilidad.

Palabras clave: citomegalovirus, aislamiento, diagnóstico

Abstract *Cytomegalovirus isolation by conventional cell culture and shell vial assay.* In immunocompromised patients, diagnosis of *Cytomegalovirus* (CMV) active infection is of utmost importance for the initiation, monitoring and ending of antiviral therapy. Therefore, the presence of viral replication should be demonstrated. Isolation in tissue culture is one of the standard methods. The objective of the present paper was to compare two isolation procedures for CMV: conventional cell culture (CC) and rapid shell vial (SV) assay in human fibroblasts. A total of 584 clinical samples were studied between 1991 and 1998. CMV was isolated in 14.4% of the samples, 11.8% of which were positive by SV and 7.7% by CC. Out of 84 positive samples, concordance between both methods was observed in 36% of the cases. We found that 46% of the samples were positive only by SV, while 18% were positive only by CC. The average time required for obtaining the results by CC was 22.6 ± 2.3 days. Out of the 69 samples positive by SV, 43% were already positive after 24 hours and the rest after 48 hours. These results indicate that SV was more sensitive and rapid than CC. The main advantage of CC, despite its time-consuming process, is the ability to recover the viral strain for both antiviral susceptibility phenotypical tests and strain characterization. Furthermore, in this study, absence of CC would have resulted in the loss of 18% of the positive diagnoses. In conclusion, simultaneous use of both methods is suggested in order to obtain a rapid result and the highest sensitivity.

Key words: cytomegalovirus, isolation, diagnosis

El *Citomegalovirus* (CMV) produce en el ser humano una infección persistente que habitualmente es adecuadamente controlada por el sistema inmune. Por el contrario, en pacientes inmunocomprometidos (receptores de trasplantes de médula ósea, de órganos sólidos, pacientes con SIDA o bajo tratamiento inmunosupresor) el CMV es causa importante de morbilidad y mortalidad

a pesar de la existencia de antivirales específicos. Dado el alto costo y la toxicidad de los antivirales disponibles, éstos deben ser administrados solamente en presencia de un diagnóstico de certeza (*pre-emptive therapy*)¹.

El diagnóstico clínico de enfermedad por CMV es presuntivo. Para un diagnóstico de certeza es imprescindible realizar estudios virológicos ya que es necesario diferenciar entre infección activa (que puede o no conducir a enfermedad clínica) e infección latente asintomática.

Existe una amplia variedad de métodos para detectar la infección activa. El aislamiento en cultivo a partir de sangre permite demostrar replicación viral, lo cual

Recibido: 25-VII-2001

Aceptado: 18-X-2001

Dirección postal: Dra. Guadalupe Carballal, Laboratorio de Virología Clínica, CEMIC, Galván 4102, 1431 Buenos Aires, Argentina.
Fax: (54-11) 4546-8294 e-mail: gcarballal@cemic.edu.ar

permite definir infección activa *versus* latente. La elección de la muestra es crítica ya que si el aislamiento se realiza a partir de sangre o LCR su valor predictivo para diagnóstico de enfermedad es alto¹. Por el contrario, el aislamiento de orina o fauces puede ocurrir por eliminación asintomática².

Otros métodos directos para diagnóstico de infección activa son la detección de antígenos virales en leucocitos de sangre periférica (antigenemia pp65); la búsqueda de antígenos en biopsias o fluidos tisulares (antígeno p72); la amplificación de diferentes genes del CMV (MIE, gpB, LA, etc) por PCRs de diferente configuración y un método reciente para la detección de ARN mensajero de la proteína pp67 por NASBA (*nucleic acid sequence based amplification*)^{1,3}.

Los métodos indirectos o serológicos permiten diagnosticar infección reciente por demostración de Ig M específica o bien por seroconversión pero no son de utilidad en inmunocomprometidos. Además, en nuestro país la primoinfección suele ocurrir frecuentemente antes de la edad escolar y los anticuerpos duran de por vida⁴.

El aislamiento en cultivo es el método clásico para diagnóstico de infección activa. El primer procedimiento desarrollado fue el aislamiento por cultivo convencional (CC) en fibroblastos de origen humano crecidos en tubos. Es un método lento, ya que puede demorar hasta seis semanas en detectarse el efecto citopático (ECP). Este procedimiento fue posteriormente mejorado mediante el cultivo rápido en *shell vial* (SV) que consiste en la centrifugación de la muestra sobre monocapas de fibroblastos crecidas en cubreobjetos. Este método combina el aislamiento más la detección del antígeno temprano p72 por inmunofluorescencia a las 24 y 48 hs de cultivo, antes de la aparición del ECP. Esto representa una enorme ventaja para definir conductas terapéuticas, constituyendo el método de elección en muchos laboratorios que consideran al SV como más sensible que el CC^{5,6}.

El aislamiento de CMV, a pesar de requerir infraestructura para cultivos celulares, de su costo y complejidad y de la necesidad de un rápido transporte de la muestra para evitar la inactivación viral⁷, es un método imprescindible para la obtención de las cepas para caracterización en estudios epidemiológicos o para estudios fenotípicos de susceptibilidad antiviral. Fue considerado como el método patrón hasta la aparición de la determinación de antigenemia pp65 y de la detección del genoma por métodos moleculares. Estos últimos permiten obtener resultados positivos más rápidamente que el aislamiento por cultivo y presentan ventajas técnicas, por lo que se emplean actualmente en el diagnóstico en inmunocomprometidos junto con el aislamiento¹.

El objetivo de este trabajo fue comparar los resultados obtenidos en nuestro laboratorio en el aislamiento

de CMV por CC y SV para la detección de infección activa por CMV.

Materiales y métodos

Muestras: Entre agosto de 1991 y noviembre de 1998 se recibieron en el Laboratorio de Virología Clínica de CEMIC 772 muestras para aislamiento de CMV. Para este estudio se seleccionaron 584 muestras a las cuales se les realizó simultáneamente CC y SV. Se estudiaron muestras de sangre (n=402); orina (n=134); lavados bronqueoalveolares (BAL, n=18); biopsias de pulmón, hígado, colon, esófago, ganglios y médula ósea (n=19); líquidos de punción: LCR, amniótico, pericárdico, sinovial (n=11).

Las muestras provenían de 212 pacientes con diversas patologías: Transplante (Tx) renal: n= 129; HIV(+): n=13; Tx reno-pancreático: n=1; Tx de médula ósea: n=2; pacientes oncohematológicos: n=10; neonatos, embarazadas con sospecha de primoinfección: n=5; otras patologías: enfermedades autoinmunes, neutropenia, síndrome febril prolongado: n=8; sin datos: n=44.

Metodología según el tipo de muestra

Sangre: Se diluyeron 4 ml de sangre (con EDTA K3) con 1 ml de dextrán 5% en solución salina tamponada (PBS). Luego de mezclar e incubar a 37°C 15 min, el sobrenadante se centrifugó a 1000 rpm 10 min, el sedimento se resuspendió en 1.5 ml de cloruro de amonio al 0.8% para lisar los glóbulos rojos remanentes y se añadió 1.5 ml de PBS. Los leucocitos se lavaron 2 veces con 2 ml de Hanks más 2% de suero fetal bovino (Hanks 2% SFB), se centrifugaron y resuspendieron en 2 ml de Medio Mínimo Esencial Eagle con 5% de SFB (EMEM, 5% SFB) y se inocularon 0.2 ml en tubos y en SV por duplicado.

Orina: A 10 ml de orina recientemente emitida se agregaron antibióticos (200–500 µl de Penicilina 1000000 U + estreptomina 1%) y se centrifugó a 3000 rpm a 4°C 30 min. Se desechó el sobrenadante dejando 1 ml de sedimento y orina y se añadieron 2 ml de Hanks 2% SFB con antibióticos. Se ajustó el pH a 7.0-7.4 con CO₂HNa 7.5% y se inocularon 0.2 ml en tubos y SV, por duplicado.

BAL y líquidos de punción: Se diluyeron 1:2 con Hanks 2% SFB y se inocularon 0.3 ml por duplicado.

Biopsias: Se disgregaron en mortero estéril con 2 ml de Hanks 2% SFB. Luego de centrifugar a 1000 rpm 10 min se inocularon 0.3 ml del sobrenadante en tubos y SV por duplicado.

Cultivo convencional (CC): Se realizó en cultivo primario de fibroblastos de prepucio humano, obtenidos en nuestro laboratorio. Los inóculos se incubaron 1 h para la adsorción viral y, luego de 2 lavados con 1 ml de Hanks 2% SFB, se incubaron con 1 ml de EMEM 5% SFB a 37°C durante 30 días, efectuándose cambio de medio cada 72 hs. Los cultivos se consideraron positivos cuando uno o ambos tubos mostraron evidencia de ECP característico, que fue confirmado por inmunofluorescencia indirecta (IFI) con un anticuerpo monoclonal (MAB810, Chemicon, USA) contra el antígeno inmediato temprano p72, seguido por un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (F-2012 *Anti-mouse IgG*, Sigma Inmuno Chemicals). La lectura se realizó con un microscopio de epifluorescencia C. Zeiss a 250x.

Cultivo rápido en "Shell vial" (SV): Las muestras inoculadas sobre fibroblastos crecidos en cubreobjetos se centrifugaron a 2200 rpm 60 min a 25°C. Luego de dos lavados con Hanks 2% SFB, se incubaron con EMEM 5% SFB a 37 °C durante 24 y 48 hs. Se fijaron los cubreobjetos con acetona fría durante 10 min y se tiñeron para IFI, como se des-

cribió previamente. Los SV se consideraron positivos cuando se detectaron núcleos fluorescentes positivos a las 24 o a las 48 hs.

Análisis Estadístico: Se utilizó el test de Chi-cuadrado (χ^2) para la comparación de las distintas frecuencias de aislamiento.

Resultados

Frecuencia de detección de CMV

De las 584 muestras estudiadas, se obtuvo aislamiento de CMV en 84 (14.4%). De ellas, 69 (11.8%) fueron positivas por SV y 45 (7.7%) lo fueron por CC. La mayor frecuencia de aislamiento en SV fue estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) (Tabla 1).

Las mayores frecuencias de aislamiento se observaron en BAL (33.3%), orina (28.4%) y sangre (9.4%). En la mayoría de las muestras la detección de CMV por SV fue mayor que mediante CC. Se observaron diferencias significativas para sangre ($p < 0.0001$) y orina ($p < 0.0001$). Los líquidos de punción fueron negativos por ambos métodos.

Tiempo de espera de resultados

De las 69 muestras positivas por el método de SV, 30 muestras (43%) fueron positivas ya a las 24 hs y el resto a las 48 hs (Figura 1). Por el contrario, el tiempo medio de positividad para el CC fue de 22.6 ± 2.31 días, con un rango de 4 - 35 días.

Distribución de resultados positivos según el método de aislamiento

Del total de muestras positivas por alguno de los dos métodos ($n = 84$), 30 muestras fueron positivas por CC

y SV (concordancia: 36%). Sin embargo, se detectaron 15 muestras por CC (18%) que fueron negativas por SV. El método de SV detectó 39 muestras positivas sobre 84 (46%) que fueron negativas para el CC (Figura 2).

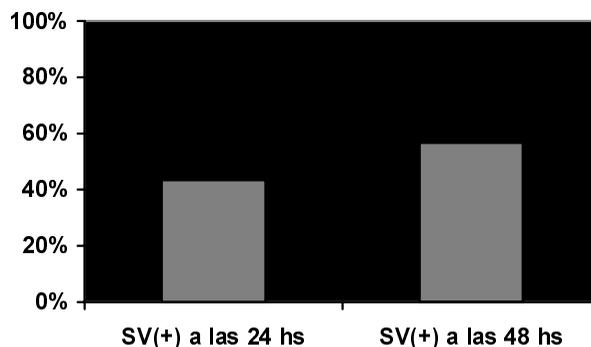


Fig. 1.- Tiempo de espera para la obtención de resultados en el aislamiento de CMV por método rápido (SV). Total de muestras positivas por este método: $n = 69$

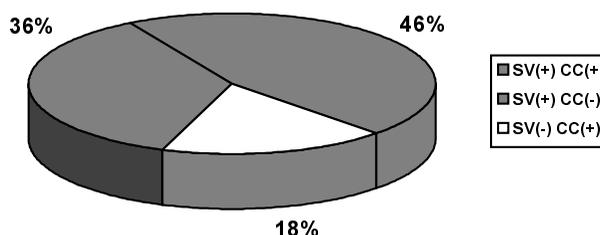


Fig. 2.- Aislamiento de CMV : Distribución de resultados positivos por cultivo convencional (CC) y rápido (SV). Total muestras positivas: 84

TABLA 1.- Detección de CMV por aislamiento en cultivo rápido (SV) y cultivo convencional (CC) en diferentes muestras clínicas

Metodo	Cultivo rapido (SV)		Cultivo convencional (CC)		Total de aislamientos (SV y/o CC)	
	+ / total	%	+ / total	%	+ / total	%
Sangre	30 / 402	7.4*	21 / 402	5.2	38 / 402	9.4
Orina	33 / 134	24.6**	20 / 134	14.9	38 / 134	28.4
BAL	5 / 18	27.7	2 / 18	11.1	6 / 18	33.3
Biopsia	1 / 19	5.2	2 / 19	10.5	2 / 19	10.5
Líqu. Punción	0 / 11	0.0	0 / 11	0.0	0 / 11	0.0
Total	69 / 584	11.8*	45 / 584	7.7	84 / 584	14.4

* Aislamiento de sangre en SV vs CC $\chi^2 = 95.10$ $p < 0.0001$
 ** Aislamiento de orina en SV vs CC $\chi^2 = 50.30$ $p < 0.0001$
 + Total de aislamientos en SV vs CC $\chi^2 = 145.30$ $p < 0.0001$

Inconvenientes encontrados en el aislamiento en CC

De las 772 muestras recibidas para aislamiento de CMV, 584 se procesaron por los dos métodos de cultivo. De las restantes muestras que se procesaron por ambos métodos, en 165 (21%) no se obtuvieron resultados en el CC por problemas técnicos tales como contaminación (n=65, 8.4%) o desprendimiento del cultivo luego de varias semanas de incubación (n=100, 12.9%). En 23 muestras sólo se realizó CC.

Discusión

La frecuencia de aislamiento de CMV obtenida en este trabajo (14.4%, Tabla 1) coincide con la observada en laboratorios del hemisferio norte^{6, 8, 9} para muestras y poblaciones similares. No están disponibles publicaciones al respecto en nuestro medio. Sin embargo, de haberse contado con muestras más homogéneas, por ej. sangre de pacientes sintomáticos luego del trasplante, probablemente la frecuencia de aislamiento hubiese sido mayor.

De las 84 muestras positivas para CMV por alguno de los dos métodos, 46% se detectaron sólo por SV. Existió concordancia entre el SV y CC en el 36% de los casos.

Estos resultados demuestran la mayor sensibilidad del SV. Sin embargo, de no haberse utilizado el CC, se hubiese perdido el diagnóstico en el 18% de los casos positivos (Figura 2). Probablemente, estas muestras tuvieran un bajo inóculo viral que sólo fue demostrado luego de un largo período de incubación en CC.

Esto coincide con la bibliografía internacional^{5-8, 10}. Algunos factores pueden modificar la sensibilidad del cultivo en SV, tales como número de SV utilizados, número de leucocitos inoculados, edad de las células a inocular y tiempo de incubación^{8, 10}.

Una ventaja adicional del SV es la rapidez en la obtención de los resultados. En nuestro laboratorio, usualmente se inoculan dos SV, se tiñe uno a las 24 hs y otro a las 48 hs. En este estudio, el 43% de los resultados positivos por SV se obtuvieron ya a las 24 hs y el resto a las 48 hs. Esto permite al médico contar con un dato relevante para modificar la conducta terapéutica en un período de tiempo clínicamente útil.

Por el contrario, el tiempo medio para la obtención de un resultado positivo en el aislamiento por CC fue de 22.6 ± 2.3 días. Además del largo período de incubación, el CC presenta otras desventajas técnicas, tales como riesgo de contaminación y desprendimiento de las células.

En los últimos años se ha registrado un notable avance en el desarrollo y optimización de nuevas técnicas para el diagnóstico y el seguimiento de la infección activa por CMV. Pero, a pesar de ello, todavía se considera al cultivo como *gold standard*, por las siguientes razo-

nes: a) el aislamiento continúa siendo una evidencia directa de que el virus se está replicando. La detección de viremia es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad; b) el CC permite recuperar la cepa para ulteriores estudios de caracterización fenotípica y estudios de sensibilidad a antivirales; c) A pesar de la elevada sensibilidad de los métodos moleculares, éstos aún no están debidamente estandarizados como para ser considerados como un nuevo *gold standard*.

Además de los métodos clásicos de aislamiento, en nuestro laboratorio se han incorporado nuevas técnicas, como la antigenemia pp65, PCR para CMV en leucocitos, plasma, LCR y otras muestras y detección del ARN mensajero de la proteína pp67 por NASBA. Estos procedimientos han demostrado ampliamente su utilidad para el diagnóstico y seguimiento de las infecciones activas causadas por este virus¹¹.

La antigenemia pp65 es la técnica más rápida para la detección de infección activa por CMV y es más sensible que el aislamiento para detectar CMV en sangre^{9, 12-14}. Tiene la ventaja de ser cuantitativa y útil para el diagnóstico precoz de infecciones asintomáticas, reactivaciones con baja carga viral de CMV y respuesta al tratamiento antiviral. Su mayor desventaja es la degradación del antígeno pp65, que puede disminuir hasta 62% en 24 hs, lo que afecta seriamente la cuantificación en muestras con bajos niveles de antigenemia. Para evitarlo es fundamental el rápido procesamiento de la muestra dentro de las 6 hs siguientes a su recolección.

La búsqueda de antígenos de CMV en BAL, orina y biopsias de diversos tejidos es un método rápido, aunque de baja sensibilidad⁹.

La detección del ADN de CMV se realiza por PCR cualitativa en leucocitos y plasma para la detección de viremia. Su principal utilidad es que puede detectar con la mayor precocidad la presencia de CMV luego de un trasplante de órganos sólidos o de médula ósea¹². Por otra parte, una PCR en sangre con resultado negativo tiene un alto valor predictivo negativo para enfermedad sistémica por CMV¹⁵. La PCR en leucocitos es más apropiada en situaciones donde la carga viral es baja (por ej. durante la terapia antiviral), mientras que la PCR en plasma es más útil en pacientes leucopénicos^{16, 17}. Las PCRs cuantitativas (carga viral para CMV) muestran correlación estadística entre altos niveles de viremia por CMV y enfermedad¹⁸⁻²⁰, aunque se está tratando de determinar cuáles son los valores de *cut off* significativos o predictivos de enfermedad²¹⁻²³.

Una variante de estos métodos es el NASBA, donde la detección de ARN mensajero es una forma efectiva de comprobar la replicación viral. Algunos trabajos demuestran que su sensibilidad es comparable a la de la antigenemia pp65, presenta adecuada correlación con el desarrollo posterior de enfermedad por CMV y es un método estandarizado²⁴.

La elección de una determinada prueba dependerá de la información que el médico quiera obtener, ya sea establecer el diagnóstico de infección activa o enfermedad por CMV, o bien evaluar la efectividad del tratamiento antiviral. El estado patológico del paciente influirá en la elección de la muestra utilizada y en la determinación a solicitar (por ej. para determinación de viremia, estarán indicados PCR o NASBA para pp67 en el caso de pacientes neutropénicos severos, en los cuales la antigenemia pp65 pierde sensibilidad).

En la necesidad de disminuir costos, nos hemos planteado la posibilidad de utilizar solamente un método de aislamiento, ya sea SV o bien CC. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que, a pesar de la mayor sensibilidad del SV, la combinación de ambas técnicas sería más efectiva para detectar CMV con la mayor sensibilidad y rapidez.

Además, se destaca que el aislamiento en CC presenta un aspecto único ya que permite conservar las cepas virales para posteriores pruebas de susceptibilidad fenotípica a antivirales o para caracterización de las mismas con fines epidemiológicos.

Agradecimientos: Los autores agradecen la colaboración de la Lic. Beatriz Ebekian, Sra. Carmen Ricarte y Srta. Cristina Juárez por su excelente apoyo técnico. Este trabajo fue financiado por la Universidad de Buenos Aires (UBA), subsidio N° TM06 y por la Fundación A. J. Roemmers. Se agradece el apoyo brindado por la Fundación René Barón.

Bibliografía

- Storch, Gregory A. Viral infections in immunocompromised patients. En: *Essentials of Diagnostic Virology*. Storch, Gregory, editor. 1ª edición. New York: Churchill Livingstone 2000, p. 203-32.
- Meyers J, Ljungman P, Fisher L. Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: importance of cytomegalovirus viremia. *J Infect Dis* 1990; 162: 373-80.
- Ehrnst A. The clinical relevance of different laboratory test in CMV diagnosis. *Scand J Infect Dis* 1996; 100 (Suppl): 64-72.
- Damilano G, Juárez C, Carballal G, Arana R. Prevalence of anti-cytomegalovirus antibodies in a children population of Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)* 1992; 52: 116-8.
- Forbes B, Bartholoma N. Detection of cytomegalovirus in clinical specimens using shell vial centrifugation and conventional cell culture. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1988; 10: 121-4.
- Paya CV, Wold AD, Smith TF. Detection of cytomegalovirus infections in specimens other than urine by the shell vial assay and conventional tube cell culture. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 755-7.
- Roberts TC, Buller RS, Gaudreault-Keener M et al. Effects of storage temperature and time on qualitative and quantitative detection of cytomegalovirus in blood specimens by shell vial culture and PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2224-8.
- Arens M, Owen J, Hagerty CM, Reed CA, Storch GA. Optimizing recovery of cytomegalovirus in the shell vial culture procedure. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1991; 14: 125-30.
- Brumback BG, Bolejack SN, Morris MV, Mohla C, Shutzbank TE. Comparison of culture and the antigenemia assay for detection of cytomegalovirus in blood specimens submitted to a reference laboratory. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1819-21.
- Buller R, Gaudreault-Keener M, Rossiter-Fornoff J, Storch G. Direct quantitative comparison of shell vial and conventional culture for detection of CMV viremia. *Clin Diagn Virol* 1995; 3: 317-22.
- Vanpoucke H, Van Vlem B, Vanholder R, Van Renterghem L. Significance of qualitative polymerase chain reaction combined with quantitation of viral load in the diagnosis and follow-up of cytomegalovirus infection after solid-organ transplantation. *Intervirology* 1999; 42: 398-404.
- Gerna G, Zipeto D, Parea M et al. Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia, and DNAemia. *J Infect Dis* 1991; 164: 488-98.
- Boeckh M, Bowden RA, Goodrich JM, Pettinger M, Meyers JD. Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1992; 80: 1358-64.
- St. George K, Rinaldo Ch. Comparison of Cytomegalovirus antigenemia and culture assays in patients on and off antiviral therapy. *J Med Virol* 1999; 59: 91-7.
- Schmidt CA, Oettle H, Wilborn F et al. Demonstration of cytomegalovirus after bone marrow transplantation by polymerase chain reaction, virus culture and antigen detection in buffy coat leukocytes. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13:71-5.
- Boeckh M, Boivin G. Quantitation of Cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11:533-54.
- Boivin G, Handfield J, Toma E, Murray G, Lalonde R, Bergeron MG. Comparative evaluation of the cytomegalovirus DNA load in polymorphonuclear leukocytes and plasma of human immunodeficiency virus-infected subjects. *J Infect Dis* 1998; 177: 355-60.
- Imbert-Marcille BM, Cantarovich D, Ferre-Aubineau V, Richet B, Solillou JP, Billaudel S. Usefulness of DNA viral load quantification for cytomegalovirus disease monitoring in renal and pancreas/renal transplant recipients. *Transplantation* 1997; 63: 1476-81.
- Macartney M, Gane EJ, Portmann B, Williams R. Comparison of a new quantitative cytomegalovirus DNA assay with other detection methods. *Transplantation* 1997; 63: 1803-7.
- Cope AV, Sabin C, Burroughs A, Rolles K, Griffiths PD, Emery VC. Interrelationships among quantity of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in blood, donor-recipient serostatus, and administration of methylprednisolone as risk factors for HCMV disease following liver transplantation. *J Infect Dis* 1997; 176:1484-90.
- Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 2000; 355: 2032-6.
- Ferreira-Gonzalez A, Fisher RA, Weymouth LA et al. Clinical utility of a quantitative polymerase chain reaction for diagnosis of cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients. *Transplantation* 1999; 68: 991-6.
- Tanaka N, Kimura H, Iida K et al. Quantitative analysis of cytomegalovirus load using a real-time PCR assay. *J Med Virol* 2000; 60: 455-62.
- Carballal G, Videla C, Juárez C, Sánchez Puch S, Lahan G, Brunet R. Diagnosis of Cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients by qualitative antigenemia and pp67 mRNA. Abstract N° T15, XVI Annual Clinical Virology Symposium; Pan American Society for Clinical Virology, April 30, 2000, Clearwater FL, USA.