

ARTIGO ORIGINAL

COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUALITATIVO E ANTIGENEMIA PP65 PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR CITOMEGALOVÍRUS EM PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS*COMPARISON BETWEEN QUALITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION AND PP65 ANTIGENEMIA FOR THE DIAGNOSIS OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN IMMUNOSUPPRESSED PATIENTS*

Ricardo Obalski de Mello¹, Patrícia Borba Martiny², Juliana Belo Saturi², Fernanda de Paris³, Alice Beatriz Pinheiro Machado⁴, Martha Bergman Senger⁵, Maria Clara Medina Corrêa⁵, Luiz Carlos Werres Júnior⁵, Graziela Turra⁶, Carolina Fischinger Moura de Souza⁷

RESUMO

Introdução: A infecção por citomegalovírus (CMV) é freqüente e acomete com significativa morbimortalidade indivíduos imunossuprimidos, especialmente transplantados e pacientes HIV positivos com doença avançada. **Objetivo:** Este estudo visou a comparar o desempenho dos métodos reação em cadeia da polimerase qualitativo (PCR) e antigenemia pp65 para o diagnóstico de infecção por CMV em pacientes imunossuprimidos. **Métodos:** O estudo foi realizado em 216 amostras de sangue total coletadas de 85 pacientes, entre agosto de 2006 e janeiro de 2007, provenientes da internação ou ambulatório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). **Resultados:** Entre as 216 amostras analisadas, 35 amostras apresentaram resultados positivos e 181 amostras apresentaram resultados negativos em uma e/ou outra técnica. Destas 35 amostras positivas, 16 foram positivas em ambas as técnicas; 12 apresentaram-se positivas pela PCR e negativas pela antigenemia; e sete amostras apresentaram-se positivas pela antigenemia e negativas pela PCR. Considerando a antigenemia como padrão-ouro, a técnica de PCR mostrou sensibilidade de 69,6%, especificidade de 93,8%, valor preditivo positivo de 57,1% e valor preditivo negativo de 96,3%. O coeficiente de correlação kappa foi de 0,578. **Discussão:** Este resultado demonstra que a PCR qualitativa apresenta moderada sensibilidade e alta especificidade para o diagnóstico de infecção para CMV. Apesar de suas limitações, pode ser utilizada para exclusão do diagnóstico em pacientes com suspeita de infecção por CMV, por ser um método mais simples, de baixo custo e de fácil execução.

Unitermos: Citomegalovírus, antigenemia, reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

Introduction: Cytomegalovirus (CMV) infection is frequent and has significant morbidity and mortality in immunosuppressed individuals, especially in transplanted and HIV-positive patients with advanced disease. **Objective:** This study compared the performance of qualitative polymerase chain reaction (PCR) and pp65 antigenemia methods for the diagnosis of CMV infection in immunosuppressed patients. **Methods:** A total of 216 of peripheral blood samples were collected from 85 inpatients or outpatients, from August 2006 through January 2007 from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). **Results:** Of the 216 samples, 35 had positive results and 181 were negative with regard to one and/or another technique. Of the 35 positive samples, 16 were positive in both techniques; 12 were positive for PCR and negative for antigenemia, and seven samples were positive for antigenemia but negative for PCR. Considering antigenemia as the gold standard, the PCR technique showed sensitivity of 69.6%, specificity of 93.8%, positive predictive value of 57.1%, and negative predictive value of 96.3%. The kappa correlation coefficient was 0.578. **Discussion:** These results demonstrate that the qualitative PCR has moderate sensitivity and high specificity for the diagnosis of CMV infection. Despite its limitations, it can be used for diagnosis exclusion in patients under CMV infection suspicion because of its simplicity, low cost and of easy execution.

Keywords: Cytomegalovirus, antigenemia, polymerase chain reaction.

Rev HCPA 2008;28(1):16-20

O citomegalovírus (CMV) pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae* (1), sendo o maior membro da família, medindo de 150 a 200 nm de diâmetro (2). Seu genoma é composto por DNA linear de fita dupla, presente em um capsídeo icosaédrico, de aproximadamente 100 nm de diâmetro e recoberto por uma estrutura protéica, denominada matriz (2,3). No envelope, o CMV possui, pelo menos, oito glicoproteí-

nas, nas quais se destacam as glicoproteínas B e glicoproteínas H (3,4).

A primoinfecção pelo CMV em pacientes imunocompetentes geralmente é assintomática ou caracterizada por um quadro semelhante à mononucleose infecciosa, apresentando eventualmente uma discreta hepatomegalia. Sintomas mais severos, como corioretinite, pneumonite, púrpura trombocitopênica, erupção maculopapular ou hemorrágica e anemia hemolítica, podem ocorrer de

1 Farmacêutico-bioquímico, Laboratório Cedoclin, Canoas, RS. Especialista em Análises Clínicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, em parceria com o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS.

2 Farmacêutica-bioquímica. Aluna, graduação da Pontifícia Universidade Católica (PUCRS), Porto Alegre, RS.

3 Farmacêutica-bioquímica Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica do HCPA. Mestre em Ciências Biológicas, área de Bioquímica, UFRGS.

4 Farmacêutica-bioquímica, Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica do HCPA. Mestre em Ciências Médicas, UFRGS.

5 Farmacêutica-bioquímica, Unidade de Bioquímica e Imunoensaios, Serviço de Patologia Clínica, HCPA. Graduada, UFRGS.

6 Farmacêutica-bioquímica. Aluna, Curso de especialização em Análises Clínicas, UFRGS em parceria com o HCPA.

7 Médica geneticista, Serviço de Patologia Clínica do HCPA. Doutorado em Ciências Biológicas, área de Biologia Molecular, UFRGS.

Correspondência: Ricardo Obalski de Mello, Rua Gonçalves Dias, 201/202. CEP: 92010-050, Canoas, RS, Brasil.

E-mail: rmellofar@hotmail.com

acordo com a característica imunológica do paciente (5,6). O CMV já foi encontrado na saliva, urina, sangue, secreções respiratórias, secreções do cervix uterino, sêmen, leite materno, medula óssea, rins e outros órgãos. Desse modo, a disseminação do vírus pode ocorrer de várias formas (7).

Segundo Mercatelli (8), o CMV é considerado um dos principais causadores de doenças no homem, acometendo cerca de 85% da população. O risco de infecção por este agente começa na vida intra-uterina ou no período perinatal, podendo ocorrer também na infância ou na idade adulta como infecção adquirida, principalmente em pacientes imunocomprometidos (2,9). Estudos soropidemiológicos demonstram que existe uma nítida relação entre a prevalência de anticorpos em uma determinada população adulta e seu nível socioeconômico, variando de 40 a 60% em populações de alto nível e de 80 a 100% em populações de baixa renda (10,11).

Com o advento das terapias imunossupressoras e a grande expansão das técnicas de transplante, bem como a introdução de novos quimioterápicos para o tratamento de neoplasias, o CMV passou a ser o agente causal de “doenças graves”, sendo importante fator de morbimortalidade em pacientes imunossuprimidos (3,9). O CMV também é um dos agentes oportunistas mais comuns em pacientes com infecção avançada pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). O desenvolvimento da doença por CMV nesta população ocorre concomitante ao aumento do estágio de imunossupressão, manifestado pelo decréscimo da contagem de células T CD4⁺ e presença de viremia por CMV (12).

Nos indivíduos transplantados de órgãos sólidos e de medula óssea, evidências de replicação viral e sintomas clínicos sugestivos de citomegalovirose costumam ocorrer de 1 a 6 meses pós-transplante (4). Admite-se que cerca de 70 a 90% dos receptores de transplante renal irão apresentar, em algum momento do pós-operatório, infecção pelo CMV (9).

A altíssima prevalência das infecções por esse vírus, em nosso meio, dificulta a interpretação de testes que detectam a presença de CMV em materiais clínicos. Isto se deve, também, ao fato de o vírus permanecer em estado de latência, nem sempre sendo possível implicar o vírus detectado como o agente etiológico da doença presente. Assim, é importante o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico em que ocorra a detecção de citomegalovirose como doença ou a presença de infecção ativa pelo CMV com replicação viral, sendo um fator indicativo de risco iminente para desenvolvimento de manifestação clínica (3).

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo CMV pode ser feito por diferentes métodos, que incluem exame direto de amostras (por microscopia eletrônica, demonstração de células com corpúsculos de inclusão característicos e detecção de antígenos ou DNA viral), isolamento viral em culturas celulares e vários testes sorológicos. Contudo, devido à importância de se diferenciar uma infecção primária de uma reinfecção ou reativação pelo CMV em pacientes transplantados, técnicas sorológicas de medidas de IgG ou IgM, nestes casos, não são úteis na prática, pois dificilmente diferenciam infecção primária ou tardia. Portanto, recomenda-se a

utilização de técnicas rápidas, sensíveis e específicas para o diagnóstico. Dentre as técnicas, encontra-se a pesquisa direta de antígenos do CMV em neutrófilos circulantes (antigenemia) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (9).

A antigenemia foi o primeiro método laboratorial utilizado rotineiramente a oferecer parâmetro quantitativo, por determinar proporção do antígeno pp65 no núcleo de neutrófilos infectados no sangue de pacientes. Esta técnica exige processamento de material fresco e, quando realizada por imunofluorescência, produz resultados dependentes de uma interpretação subjetiva (3).

Nos últimos anos, a PCR vem sendo amplamente utilizada na detecção genômica de CMV, possuindo sensibilidade superior à do isolamento viral em cultura celular e da antigenemia. A metodologia do PCR pode fornecer resultados qualitativos ou quantitativos, apresentando vantagens como maior flexibilidade com os materiais em teste, permitindo armazená-los a - 20 °C até o processamento, e a possibilidade de repetir os testes em caso de resultados duvidosos, devido à utilização de pequenos volumes do material clínico. Atualmente, a metodologia mais recomendada para o diagnóstico é a PCR quantitativa, porém não disponível em nosso meio (3,13).

Apesar de alguns estudos demonstrarem resultados comparativos entre diversas técnicas de diagnóstico de infecção aguda por CMV, a literatura ainda é escassa na definição e conclusão sobre a melhor metodologia diagnóstica em pacientes imunossuprimidos. Considerando essas dificuldades e o fato de o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) ser um local de referência para transplantes e acompanhamento de pacientes imunossuprimidos, este estudo visa comparar o desempenho do método “PCR qualitativo” e o “teste de antigenemia pp65” para o melhor diagnóstico de infecção por CMV em pacientes imunossuprimidos.

MÉTODOS

O estudo foi realizado em 216 amostras de sangue total (EDTA), coletadas entre agosto de 2006 e janeiro de 2007 de 85 pacientes imunossuprimidos, provenientes da internação ou ambulatório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Todas as amostras enviadas à Unidade de Bioquímica e Imunoensaios do HCPA para pesquisa assistencial de CMV foram submetidas à técnica de antigenemia por imunofluorescência indireta (Brite™ Turbo), realizando-se em paralelo a reação em cadeia pela polimerase qualitativa (PCR *nested*) na Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular. As amostras com material insuficiente para a realização da técnica de PCR foram excluídas do estudo.

Para a realização da antigenemia, foi feita a separação de uma fração de células pelo emprego de dextran (fração enriquecida de polimorfonucleares). Posteriormente, nesta fração foram empregados anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno viral pp65 (proteína da matriz do CMV). A detecção ocorreu por imunofluorescência indireta com presença do antígeno pp65 no núcleo dos neutrófilos que os fagocitaram, fazendo a

leitura quantitativa em 2×10^5 células. Consideram-se como resultados positivos valores ≥ 4 células fluorescentes, segundo recomendações do *Kit* (Brite™ Turbo) (14).

Em paralelo, as amostras testadas pela PCR foram submetidas à separação de leucócitos por gradiente de densidade. Estas células foram suspensas em água estéril para a realização da mesma. Para a determinação molecular, foi utilizada uma técnica *in house* de PCR *nested*. Esta técnica utiliza duas etapas consecutivas de amplificação, sendo que o produto da primeira reação (347 pb) servirá como alvo para a segunda (297 pb), ou seja, nesta técnica os iniciadores (*primers*) da segunda amplificação estão localizados internamente aos iniciadores da primeira amplificação. Tanto os *primers* externos (5' TG AGG AAT GTC AGC TTC 3' e 5' TC ATG AGG TCG TCC AGA 3') como os internos (5' CCA GCC TCA AGA TCT TCA T 3' e 5' TCG TCC AGA CCC TTG AGG TA 3') utilizados amplificam fragmentos do gene da glicoproteína B presente no DNA do CMV (15).

Cada reação de PCR na primeira etapa continha 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 67 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C), 1,5 mM MgCl_2 , 0,01% (w/v) de Tween-20, 200 mM dNTP, 100 mM de "primers" externos na concentração de 0,1 μM , 1,25 U de DNA polimerase (*super-therm*) em um volume de 47 μL . Acrescentou-se 3 μL de amostra clínica (solução de leucócitos periféricos), totalizando um volume final de 50 μL . A amplificação foi executada em termociclador Techne®. A reação iniciou com uma desnaturação de 1 minuto e 40 segundos a 94 °C, seguida de 33 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos de anelamento a 50 °C e 30 segundos de polimerização a 72 °C.

Na segunda reação de amplificação, utilizou-se uma mistura idêntica à primeira, porém substituiu-se o *primer* externo por um interno e adicionou-se 2 μL do "amplicon" obtido na primeira reação, totalizando um volume de 24 μL . A reação iniciou com uma desnaturação de 45 segundos a 94 °C, seguido de 33 ciclos de 20 segundos a 94 °C, 20 segundos de anelamento a 55 °C e 30 segundos de polimerização a 72 °C.

Os produtos finais destas reações foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de brometo de etídio. Para a visualização das bandas, foi utilizado um transluminador com ultravioleta. Todos os experimentos foram feitos com controles negativos (água MiliQ® autoclavada) e positivos (ácido nucleico total e purificado do CMV - Virión®). Os resultados são expressos qualitativamente como negativos, positivo-fracos e positivos.

Análise estatística

A correlação entre as duas técnicas foi determinada pelo coeficiente kappa. Considerando a antigenemia como padrão-ouro, foi calculada a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) da PCR qualitativa nas amostras estudadas.

RESULTADOS

Entre os 85 pacientes estudados, 38 pacientes apresentaram duas ou mais solicitações para a realização de antigenemia e 47 pacientes foram submetidos a apenas uma coleta, totalizando 216 amostras estudadas. Destes 85 pacientes, 41 eram provenientes de transplantes renais, 24 receptores de medula óssea, 10 faziam uso crônico de medicamentos imunossupressores, oito de transplantes hepáticos e dois eram pacientes portadores de HIV em fase avançada (Tabela 1).

Tabela 1 - Perfil dos 85 pacientes imunossuprimidos atendidos no HCPA

	1 amostra	2 a 10 amostras	Mais de 10 amostras
TMO	5	15	4
T. RENAL	26	15	---
T. HEP.	5	3	---
HIV +	2	---	---
IS	9	1	---

HIV + = positivo para o vírus da imunodeficiência humana; TMO = transplantado de medula óssea; T. RENAL = transplantado renal; T. HEP. = transplantado hepático. IS = pacientes decorrentes do uso crônico de medicamentos imunossupressores.

Dentre as 216 amostras analisadas, 35 amostras (16,2%) apresentaram resultados positivos e 181 amostras (83,8%) apresentaram resultados negativos nas duas técnicas. Destas 35 amostras positivas, 16 foram tanto positivas para a PCR como para a antigenemia; 12 apresentaram-se positivas para PCR e negativas para antigenemia (totalizando 28 amostras positivas para PCR); sete apresentaram-se positivas para a antigenemia e negativas para PCR (totalizando 23 amostras positivas para antigenemia).

O coeficiente de correlação kappa demonstrou uma concordância de 0,578.

Pelo fato de a antigenemia ser uma técnica quantitativa, esta foi considerada padrão-ouro para a validação das metodologias analisadas, demonstrando que a PCR para CMV apresentou sensibilidade de 69,6%, especificidade de 93,8%, VPP de 57,1% e VPN de 96,3% (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação da antigenemia e PCR no monitoramento da viremia de CMV para os pacientes imunossuprimidos, atendidos no HCPA.

	Antigenemia		Total
	Positivo	Negativo	
PCR			
Positivo	16	12	28
Negativo	7	181	188
Total	23	193	216

DISCUSSÃO

A infecção por CMV é uma patologia grave e afeta com elevada frequência pacientes imunossuprimidos. Em nossa amostra, encontramos um índice de positividade de 16,2% quando testadas ambas as metodologias. Os pacientes submetidos a transplante renal foram os mais investigados, seguidos pelos pacientes transplantados de medula óssea. A literatura é incerta quanto ao número de repetibilidade e coletas por paciente e por tipo de transplante (3,4,9). Em nosso estudo, identificamos uma maior taxa de repetibilidade nos pacientes com transplante de medula óssea. Certamente há uma forte correlação com a gravidade da doença, protocolo de avaliação clínica e terapia empregada.

Comparando as duas técnicas realizadas, observou-se que o coeficiente de correlação kappa demonstrou uma correlação moderada (16). Porém, estudos de Storch et al. (17) e Solano et al. (18) sugerem que o diagnóstico através da técnica de PCR apresenta uma positividade com 1 semana de antecedência, em média, em relação à antigenemia. Este dado reforça a possibilidade de que, dependendo do período em que se realiza este exame, podemos encontrar discrepância entre a positividade das técnicas. A literatura afirma que a viremia ocorre antes do surgimento dos sintomas e correlaciona-se com o desenvolvimento posterior da doença e a gravidade desta (19-21).

No presente estudo, a técnica de PCR demonstrou que, apesar da moderada sensibilidade, a especificidade foi elevada, o que reforça a utilização deste método para exclusão do diagnóstico em pacientes imunossuprimidos com suspeita de infecção por CMV. Esta correlação nos níveis de sensibilidade da PCR em relação à antigenemia também pode ser observada nos trabalhos de Hiyoshi et al. (22) e Solano et al. (18).

Considerando o baixo custo, simplicidade da técnica e rapidez, a PCR pode ser utilizada para diagnóstico, e a antigenemia no monitoramento da eficácia terapêutica, como já descrito por Marin et al. (3).

É de conhecimento que a literatura tem sugerido a PCR, em tempo real, para melhor conclusão do diagnóstico de infecção por CMV em pacientes imunossuprimidos, por ser um método capaz de quantificar o genoma viral (23). Porém, na ausência desta metodologia em nosso meio, acreditamos que ambos os métodos utilizados têm sido úteis para o diagnóstico, apesar de apresentarem limitações técnicas, levando a uma dificuldade de interpretação. Este trabalho demonstrou que a PCR qualitativa parece ser uma técnica confiável para o diagnóstico, e a antigenemia para o monitoramento terapêutico dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- Johnson G, Nelson S, Petric M, Tellier R. Comprehensive PCR-based assay for detection and species identification of human herpesviruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38(9):3274-9.
- Yamamoto AY, Aquino VH, Figueiredo LT, Mussi-Pinhata MM. Diagnóstico de infecção congênita e perinatal por citomegalovírus utilizando a reação em cadeia da polimerase. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998;31(1):19-26.
- Marin LJ, Marin LJ, Cunha AA, Aquino VH, Figueiredo LTM. Desenvolvimento de uma metodologia de PCR semi-quantitativa utilizando plasmídeo clonado com parte do gene Gb de citomegalovírus. *Medicina.* 2002;35:85-94.
- Wilson WR; Sande MA. Doenças infecciosas: diagnóstico e tratamento. Porto Alegre: Artmed; 2001.
- Veronesi R, Focaccia R, Dietze R, Ruiz Castaneda M, Rosa CAS, Louzada AP. Doenças infecciosas e parasitárias. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1991.
- Henry JB. Diagnóstico clínico & tratamento: por métodos laboratoriais. 18 ed. São Paulo: Manole; 1995.
- Pannuti CS. Infecção por citomegalovírus. *Pediatria.* 1984;6:144-53.
- Mercatelli C, et al. Citomegalovírus. Laes e Haes. 1998;17:62-4.
- Ferreira AW; Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
- Pannuti CS. Infecção congênita pelo citomegalovírus. Estudo em dois hospitais públicos no município de São Paulo [tese]. São Paulo: USP; 1983.
- Oliveira AM, Leite AD, Silva VEA, Zago SCS, Carneiro LEP, Moliterno RA. Pesquisa de anticorpos IgG e IgM para citomegalovírus em parturientes e recém-natos do município de Presidente Prudente e região, Estado de São Paulo. *Acta Scientiarum.* 2002;24(3):737-41.
- Terra APS, Vergara MLS, Gomes RAS, Pereira CLL, Simpson AJG, Caballero OL. Monitoramento de pacientes com AIDS para o desenvolvimento de doenças por citomegalovírus (CMV) usando-se PCR multiplex. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000;33(6):583-9.
- Cunningham R, Harris A, Frankton A, Irving W. Detection of cytomegalovirus using PCR in serum from renal transplant recipients. *J Clin Pathol.* 1995;48(6):575-7.
- CMV Brite™ Turbo Kit. Rapid CMV pp65 antigenemia for the detection of active CMV infection. IQ Products.
- Read SJ, Jeffery KJ, Bangham CR. Aseptic meningitis and encephalitis: the role of PCR in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol.* 1997;35(3):691-6.
- Altman DG. Practical statistics for medical research. London: Chapman & Hall; 1991.
- Storch GA, Buller RS, Bailey TC, et al. Comparison of PCR and pp65 antigenemia assay with quantitative shell vial culture for detection of cytomegalovirus in blood leukocytes from solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 1994;32(4):997-1003.
- Solano C, Muñoz I, Gutiérrez A, et al. Qualitative plasma PCR assay (AMPLICOR CMV Test) versus pp65 antigenemia assay for monitoring cytomegalovirus viremia and guiding preemptive ganciclovir therapy in allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol.* 2001;39(11):3938-41.
- Hibberd PL, Rubin RH. Prevention of cytomegalovirus infection in the pediatric renal transplant recipient. *Pediatr Nephrol.* 1991;5(1):112-7.
- Iragorri S, Pillay D, Scrine M, Trompeter RS, Rees L, Griffiths PD. Prospective cytomegalovirus surveillance in paediatric renal transplants patients. *Pediatr Nephrol.* 1993;7(1):55-60.

21. Peiris JS, Taylor CE, Main J, Graham K, Madeley CR. Diagnosis of cytomegalovirus (CMV) disease in renal allograft recipients: the role of semiquantitative polymerase reaction (PCR). *Nephrol Dial Transplant*. 1995;10(7):1198-205.
22. Hiyoshi MS, Tagawa S, Takubo T, et al. Evaluation of the Amplicor CMV test for direct detection of cytomegalovirus in plasma specimens. *J Clin Microbiol*. 1997;35(10):2692-4.
23. Leruez-Ville M, Ouachée M, Delarue R, et al. Monitoring cytomegalovirus infection in adult and pediatric bone marrow transplant recipients by a real-time PCR assay performed with blood plasma. *J Clin Microbiol*. 2003;41(5):2040-6.