

## DIAGNÓSTICO DEL CITOMEGALOVIRUS EN LOS PACIENTES TRASPLANTADOS Y ENSAYOS DE SENSIBILIDAD ANTIVIRAL

Santiago Melón García y María de Oña Navarro

Sección de Virología, Servicio de Microbiología I, Hospital Central de Asturias

El citomegalovirus (CMV) es un virus muy ubicuo que pertenece a la familia *Betaherpesviridae*. La infección por el CMV ocurre, en la mayoría de los humanos, durante las dos primeras décadas de la vida. La defensa más importante del huésped frente al CMV es la inmunidad celular. Sin embargo, la inmunidad mediada por anticuerpos específicos también puede modificar la enfermedad causada por este virus. Después de la infección primaria, el CMV se mantiene latente por integración en el cromosoma de las células del huésped. Esta latencia, no del todo bien conocida, se puede alterar por factores que inician y regulan la transcripción del genoma vírico. En otras ocasiones, el virus puede permanecer en un estado de baja replicación viral, controlada por el sistema inmune del huésped.

Tras un trasplante de órganos, la disfunción del sistema inmune dará lugar a un aumento de los niveles de replicación viral, que posteriormente puede verse aumentada por una reactivación de la latencia. El impacto del CMV sobre el trasplante de órgano sólido y de médula ósea es tan grande que es considerado como la causa infecciosa más importante de morbilidad y mortalidad postrasplante. La infección por el CMV en el paciente trasplantado puede ser primaria si ocurre en un receptor seronegativo, sin contacto previo con el virus, o secundaria, si se produce en un receptor previamente seropositivo. Esta infección secundaria puede a su vez deberse a una reactivación del propio virus endógeno o puede ser producida por un virus exógeno, procedente fundamentalmente del injerto, en cuyo caso se hablaría de una reinfección.

Previa a la diseminación del virus a los distintos órganos (que el diagnóstico y manejo correcto del paciente puede en muchas ocasiones evitar), se produce el llamado síndrome por CMV, caracterizado por fiebre y leucopenia, y donde se puede detectar el virus en la sangre. La enfermedad por el CMV (ECMV) después del trasplante es el resultado de la invasión de uno o varios órganos. Dependiendo del órgano afectado se producirá neumonitis, enterocolitis, encefalitis, retinitis, etc. La enfermedad más grave ocurre en los receptores seronegativos que reciben un órgano de un donante seropositivo y en los receptores de médula ósea seropositivos.

Una peculiaridad del CMV es su relación con el rechazo del injerto, tanto en la forma aguda como crónica, aunque su papel inmunomodulador es controvertido. *In vitro* este virus induce, a través de la liberación de linfoquinas, como el factor de necrosis tumoral y el interferón, una alta expresión de antígenos de histocompatibilidad de la clase I y II. Dicha sobreexpresión se produce en las células vecinas a las infectadas por el CMV, dando como resultado el que los linfocitos T reconozcan a la célula trasplantada como foránea. Asimismo, existe una homología entre los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de la clase I y del CMV. Esto implica que el daño causado por la respuesta inmune frente al virus podría ir dirigido contra las células portadoras de antígenos mayores de histocompatibilidad.

Otro aspecto patogénico importante del CMV es su capacidad inmunodepresora. La infección por dicho virus produce un estado de inmunodepresión transitorio, con disminución general de todas las funciones asociadas a la inmunidad celular, lo que favorece la sobreinfección por patógenos oportunistas. También se ha demostrado que acelera la arteriosclerosis de la arteria coronaria injertada.

Existen varias estrategias para la prevención de la enfermedad por el CMV en los pacientes trasplantados:

- a) Profilaxis universal, esto es, el tratamiento de todos los receptores de órganos. Esta profilaxis se realiza actualmente con ganciclovir oral (dosis de 1 g/8h, ajustadas a la función renal) durante periodos de tiempo que varían desde 15 a 60 días, o incluso más, según los protocolos.
- b) Profilaxis a los receptores de riesgo (receptores seronegativos de un donante seropositivo). En los protocolos más utilizados, se administra ganciclovir endovenoso, a dosis de 5mg/kg/12h, durante 15 días, y a continuación ganciclovir oral hasta los dos o tres meses postrasplante. Se puede asociar o no a gammaglobulina específica anti-CMV.
- c) Tratamiento anticipado (*preemptive therapy*): profilaxis estándar con ganciclovir, en ausencia de enfermedad sintomática, guiada por un marcador de laboratorio (antigenemia, viremia) que se asocia con un riesgo elevado de desarrollar una complicación sintomática.

La profilaxis ha disminuido la incidencia de ECMV durante el periodo temprano postrasplante, pero ésta todavía se produce tras finalizar la profilaxis en los receptores de un órgano sólido que desarrollan rechazo y entre los receptores de médula que presentan la enfermedad del injerto contra huésped. Por otra parte, la prevención de la enfermedad por CMV y la mejora en el manejo de la misma se debe también al avance en el diagnóstico virológico. En este sentido ha sido esencial el desarrollo y el uso generalizado de métodos sensibles y específicos.

## **TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO**

El estudio virológico tiene como objetivos: a) conocer el estado inmune frente al CMV del donante y receptor, previo al trasplante, para valorar el riesgo de infección o de ECMV, b) diagnosticar precozmente la infección o la ECMV, c) guiar el inicio del tratamiento específico, d) monitorizar la respuesta a dicho tratamiento, y e) detectar la aparición de cepas resistentes.

### **Métodos serológicos**

La respuesta humoral a la infección por CMV se manifiesta por la producción de anticuerpos específicos de la clase IgG e IgM. Los anticuerpos de la clase IgM se producen entre las 2-4 semanas después de la infección primaria y los anticuerpos IgG se producen inmediatamente después de la aparición de los primeros. Ambos tipos se pueden detectar por una variedad de métodos, siendo los más usados los inmunoenzimáticos (EIA).

En el trasplante, la serología frente al CMV no está indicada, salvo excepciones, para el diagnóstico, ya que la infección por CMV tiene una prevalencia muy elevada y la mayoría de los adultos son seropositivos. Por otra parte, el tiempo que tardan en aparecer los anticuerpos IgM en la primoinfección, la persistencia de estos anticuerpos en algunos individuos sanos y la incapacidad de algunos receptores (sobre todo los de médula) para producirlos, disminuyen significativamente la utilidad clínica de la serología en el diagnóstico de la ECMV. Sin embargo, la detección de anticuerpos es fundamental para conocer el estado serológico del donante y del receptor y, por lo tanto, el riesgo postrasplante de reactivación y de enfermedad. Así, existe riesgo aumentado de ECMV en los receptores seronegativos que reciben un órgano de un donante seropositivo (D+/R-), y en los receptores de médula seropositivos.

Otra situación en la que la serología puede tener una cierta utilidad la encontramos en el trasplante infantil, ya que en los niños es más probable la seronegatividad frente al CMV y, en consecuencia, la aparición de un cuadro clínico sintomático tras la infección primaria, del mismo modo que ocurre con aquellos pacientes D+/R-. Esto es importante ya que, en estos pacientes, la demostración de una seroconversión a CMV asintomática al final de la profilaxis antiviral indica que es necesario prolongar ésta para prevenir una enfermedad tardía.

## **Métodos directos**

Las pruebas diagnósticas que se utilizan en el manejo de la infección por el CMV postrasplante se basan, principalmente, en el aislamiento o en la detección del virus o partículas virales en la sangre. La detección del CMV en los órganos diana se realiza cuando hay una sospecha clínica de enfermedad focal. Dependiendo del órgano afectado, las muestras clínicas incluirán tejidos (pulmón, hígado, intestino, riñón o cerebro) y líquidos orgánicos (lavados broncoalveolares, líquido cefalorraquídeo, etc.). La detección del CMV en orina (viruria) se relaciona generalmente con una infección asintomática, aunque puede ser la primera evidencia de la replicación del virus en los pacientes D+/R-. Es de gran utilidad para aislar cepas de CMV y para realizar estudios fenotípicos de sensibilidad, ya que en estos pacientes es frecuente su excreción por orina. En resumen, el mejor marcador de replicación activa viral es la detección del virus o de sus componentes (genoma o antígenos) en la sangre o en los órganos diana.

En la detección del CMV en sangre se define la viremia como el aislamiento del CMV por cultivo convencional o rápido (método *shell-vial*). La antigenemia se refiere a la detección de un antígeno del CMV, habitualmente la proteína pp65, en los leucocitos de sangre periférica. Cuando lo que pretendemos detectar es el DNA del virus, hablamos de DNAemia, mientras que RNAemia indica la detección de RNAm víricos en la muestra de sangre periférica.

### ***Cultivo viral***

El aislamiento del CMV en cultivo ha sido tradicionalmente el método estándar para el diagnóstico de la infección por este virus. Sin embargo, presenta una serie de problemas (falta de sensibilidad, demora en obtener resultados, etc.) que le hacen poco útil desde el punto de vista clínico. El cultivo rápido en *shell-vial*, introducido en 1985, supuso un gran avance, ya que acortó considerablemente el tiempo de diagnóstico a las 16-24 h de inocular la muestra. Aunque la detección del virus por aislamiento en leucocitos de sangre periférica tiene una elevada correlación con las manifestaciones clínicas, no se considera útil en la monitorización temprana postrasplante para la instauración de terapia anticipada, por su baja sensibilidad, ya que no detecta niveles bajos de replicación viral. Tampoco es de utilidad en los pacientes con trasplante de médula neutropénicos, en el periodo temprano postrasplante. Ya se ha mencionado que, aunque la correlación de la viruria con la sintomatología es baja, la aplicación del cultivo celular en muestras de orina permite la obtención de cepas virales para realizar estudios de sensibilidad fenotípica.

### ***Antigenemia***

El primer ensayo que consiguió detectar de forma precoz la infección activa por CMV en el periodo temprano postrasplante fue la antigenemia. Esta técnica se basa en la detección del antígeno pp65 en los leucocitos de sangre periférica por inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra dicha proteína. Es una técnica cuantitativa y los resultados se expresan como el número de leucocitos que expresan el antígeno respecto a un número determinado de leucocitos que se colocan en el portaobjetos en el que se realiza la prueba.

El principio en que se basa la utilidad clínica de esta prueba consiste en la existencia de correlación directa entre el número de células infectadas (expresan el antígeno) y la presencia de ECMV. La antigenemia también se utiliza como guía para el tratamiento anticipado, sugiriéndose los límites de 10 células pp65+/200000 leucocitos en los trasplantados de órgano sólido, y de 2 células pp65+/200000 en los de médula ósea. Sin embargo, estas cifras de referencia pueden variar según cada laboratorio, puesto que la limitación mayor de la antigenemia es su falta de estandarización inter-laboratorio. Además, requiere de un observador experimentado para su correcta interpretación y un procesamiento inmediato después de su obtención. Por último, en los pacientes neutropénicos (trasplantados de médula), su aplicación es difícil por la leucopenia que suele acompañar a estos pacientes. A pesar de estas limitaciones bien conocidas, la antigenemia debe ser considerada como un avance significativo en el seguimiento de los pacientes trasplantados, ya que se trata de una técnica muy fácil de protocolizar, se puede realizar de forma individual y su coste económico es bajo.

### ***Métodos de detección genómica***

Las técnicas de biología molecular, y en concreto la amplificación genómica (PCR), están siendo cada vez más utilizadas en los laboratorios de virología. También se pueden utilizar métodos de hibridación directa. Así, la prueba de captura del híbrido (Digene® Hybrid Capture CMV DNA, Digene Corporation, EEUU), es un método de hibridación cualitativo de amplificación de la señal. El ensayo detecta DNA del CMV utilizando una sonda de RNA y anticuerpos frente a los híbridos RNA-DNA formados, que se revelan con un sistema de detección conjugado-substrato quimioluminiscente. La sensibilidad y especificidad de la prueba son similares a la antigenemia, pero se trata de un método cualitativo, por lo que el significado clínico de un resultado positivo no está claro, y su utilidad en la predicción de la ECMV es baja.

En cuanto a los métodos de amplificación, existen protocolos desarrollados en cada laboratorio y también métodos comerciales. En ambos casos, se aplican tanto a muestras de plasma o de leucocitos principalmente. Existe una amplia variedad de métodos de desarrollo propio que difieren en el fragmento diana, en los cebadores utilizados, en las mezclas de reacción e, incluso, en los protocolos de amplificación (PCR simple, PCR doble en un solo tubo o en en dos tubos). De ahí que su estandarización inter-centros se haga difícil. Habitualmente, son técnicas cualitativas aunque, en algún caso, se han desarrollado variantes cuantitativas por comparación con una curva patrón o por competición con un estándar interno. Estos métodos suelen detectar genoma viral 1 ó 2 semanas antes que la antigenemia.

Sin embargo, los métodos de amplificación cualitativos tienen una utilidad reducida, dado su bajo valor predictivo para la ECMV, ya que la PCR suele ser positiva en los casos de infección activa que no se acompañan de manifestaciones clínicas, lo que es una situación muy frecuente en los trasplantados de órgano sólido y, en menor medida, en los de médula ósea. Por ello, actualmente, se dispone de dos técnicas automatizadas y cuantitativas de PCR: el Cobas® Amplicor CMV Monitor y el sistema Light Cycler®, ambos de la firma comercial Roche. El Cobas® Amplicor CMV Monitor detecta DNA de CMV plasmático (aunque se puede realizar también a partir de leucocitos) mediante amplificación de un fragmento de 365 pb del gen de la polimerasa UL54. Según algunos estudios preliminares, una carga viral plasmática de 1000-5000 copias/ml en receptores de órgano sólido y de 400 copias/ml en receptores de médula predice la ECMV, si el paciente no ha sido tratado previamente. No obstante, se necesitan mas estudios para validar estos límites.

El sistema Light Cycler® es una PCR a tiempo real cuyos resultados se pueden obtener en 30-40 minutos. Este sistema ofrece la automatización de la PCR con un control

preciso de la temperatura de reacción y una monitorización continua de la amplificación mediante un fluorímetro. Los estudios realizados hasta el momento encuentran una buena correlación entre ambas técnicas. La ventaja del sistema Lyght Cycler® es que se pueden procesar más muestras y se obtienen los resultados en menos tiempo; por otra parte, este sistema es abierto, lo que permite optimizar la cuantificación genómica con distintos cebadores. La desventaja de ambas técnicas es su alto coste económico.

La técnica NucliSens® (bioMérieux) es un ensayo de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (NASBA) que detecta el RNAm del CMV que codifica la proteína pp67, cuya presencia indica una replicación viral activa. La experiencia con esta técnica sugiere que es menos sensible que la detección de DNA y que la antigenemia, por lo que, según algunos autores, podría distinguir entre enfermedad e infección asintomática de forma más efectiva que los anteriores. Pero su baja sensibilidad descrita, limita su uso en el seguimiento postrasplante.

La clave para evaluar la utilidad de los ensayos moleculares en la detección de la ECMV es la correlación clínica con los resultados de laboratorio. Las técnicas cuantitativas (tanto PCR como antigenemia) superan en utilidad a las técnicas cualitativas y sirven como guía en la instauración del tratamiento anticipado, pero hay que tener en cuenta que el CMV es un virus que esta asociado a las células, por lo que la detección de antígeno y, sobre todo, de DNA viral en las células de la sangre puede ser muy sensible y por tanto es necesario definir con exactitud los valores límite predictivos de la enfermedad. Por otra parte, la PCR en plasma se correlaciona mejor con la ECMV pero es menos sensible que los métodos anteriores. Por último, en cuanto a la monitorización de la ECMV, las técnicas de PCR cuantitativas superan en sensibilidad a la antigenemia, ya que pueden predecir más rápidamente las recaídas.

## **ENSAYOS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIVÍRICOS**

Actualmente, las tres drogas que se utilizan en la prevención y tratamiento de la ECMV son el ganciclovir (GCV) y su éster, el valganciclovir, en fase III de ensayos clínicos), foscarnet y cidofovir. El éster de valina del GCV, o valganciclovir, se encuentra en la fase III de ensayos clínicos. El GCV es una prodroga que, en las células infectadas, se fosforila a ganciclovir 5-monofosfato mediante una timidina-kinasa codificada por gen UL97 del virus; a partir de aquí, es fosforilado por kinasas celulares del huésped a las formas di y trifosfato. Esta última es la que inhibe la DNA polimerasa viral, por competición con la deoxiguanosina trifosfato, parando la replicación viral. El foscarnet es un análogo de pirofosfato que inhibe directamente la DNA polimerasa viral. El cidofovir es un análogo de nucleótido que se fosforila mediante las enzimas celulares del huésped. Estos dos últimos compuestos, a diferencia del GCV, no requieren para su activación la timidin-kinasa codificada por el virus.

El GCV se usa como droga de elección, tanto en la profilaxis como en el tratamiento de la ECMV en los pacientes trasplantados. Su uso prolongado favorece la aparición de cepas resistentes, lo cual puede tener repercusiones clínicas. Por lo tanto, es conveniente disponer de ensayos de sensibilidad del CMV al ganciclovir. Hay dos tipos de ensayos que determinan la sensibilidad o resistencia del CMV a las drogas utilizadas: los métodos fenotípicos y los genotípicos.

### **Métodos fenotípicos**

Los métodos fenotípicos miden la concentración de la droga que inhiben el 50% del crecimiento viral. Al método clásico y estándar de reducción de placas, le siguieron ensayos más rápidos, como el que utiliza directamente muestras de orina o, incluso, leucocitos, siempre que se detecten al menos 300 células productoras de antígeno en un cultivo rápido o *shell-vial*. A las 16 h de la recepción de la muestra se inocula en varios *shell-vial* con

distintas concentraciones de droga. Después de cuatro días de incubación se tiñen los viales con anticuerpos monoclonales frente a un antígeno tardío, se cuenta el número de células en cada una de las concentraciones de la droga y se calcula la ID<sub>50</sub> del antiviral mediante una recta de regresión. La limitación de este método es la elevada dosis infectante (el número de células productoras de antígeno) requeridas para realizarlo.

Una variación de este método sería partir de un cultivo con al menos 30 focos de efecto citopático. Se inoculan tubos con concentraciones decrecientes con GCV y tras 7 días de incubación, se transfieren las monocapas celulares a los correspondientes *shell-vial*. A las 17 h se revelan los cultivos rápidos con antígeno temprano. Aunque el método es más lento que el anterior, permite trabajar con aislados clínicos y leer la inmunofluorescencia de los *shell-vial* con antígeno temprano, más fácil de interpretar que el tardío. Otros métodos alternativos a la reducción de placas son los métodos que miden la inhibición de la síntesis proteica (por IF o por EIA), o la inhibición de la síntesis del DNA viral detectada por hibridación. Requieren el aislamiento previo del virus y la obtención de suficiente cantidad de virus mediante pases, que no deben de ser mas de 2-3 para no cambiar la población viral que tiene el paciente.

Los inconvenientes de los métodos fenotípicos son: a) la necesidad de aislar la cepa viral, b) tener que alcanzar la suficiente dosis infecciosa requerida (100-200 TCDI<sub>50</sub>) para realizar el ensayo, c) su falta de estandarización, con la consiguiente variabilidad de los resultados, y d) el tiempo requerido para realizarlo. Las muestras de mayor rendimiento para conseguir aislar el virus son la orina en el trasplante de órgano sólido y la muestras faríngeas en el trasplante de médula ósea.

### **Métodos genotípicos**

El conocimiento de las mutaciones específicas en los genes UL54 y UL97, asociados a la resistencia a las drogas utilizadas, y los problemas inherentes a los métodos fenotípicos, ha hecho que se desarrollen métodos moleculares para la detección de mutantes de CMV resistentes a los fármacos utilizados. El gen UL97 codifica la timidinkinasa necesaria para la fosforilación inicial del GCV, por lo que las mutaciones en este gen tiene como consecuencia una inadecuada fosforilación intracelular de la droga, dando lugar a la aparición de resistencia. Estas mutaciones afectan a los codones 460 (V460, I460), 520 (Q520) y de los 591 a 607. Las mutaciones en este gen no confieren resistencia al foscarnet ni al cidofovir, ya que estos compuestos no requieren de esta enzima. Por el contrario, las mutaciones en el gen UL54, que codifica para la DNA polimerasa viral, pueden originar, aunque no siempre, resistencia a las tres drogas. Así, las mutaciones en los codones 375-540 confieren resistencia cruzada al GCV y al cidofovir, mutaciones en los codones 756-809 al GCV y foscarnet, y las de los codones 981-987 a las tres drogas antivirales. La mayoría de las mutaciones en el gen UL54 se acompañan de mutaciones en el gen UL97. Las cepas con mutaciones en los dos genes parecen ser altamente resistentes al GCV y poseen resistencia cruzada al cidofovir y foscarnet.

El mejor método para detectar estas mutaciones es la amplificación de los fragmentos implicados en las resistencias, seguida de una secuenciación de éstos y de la comparación con una secuencia de las cepas salvajes. La amplificación de estos genes por PCR a tiempo real podría servir para detectar nucleótidos relacionados con la resistencia a los fármacos mediante sondas específicas, aunque no permite conocer los cambios puntuales. Podría servir como un método de cribado antes de la secuenciación. De todas formas, estos métodos necesitan optimización y validación clínica, ya que hay mutaciones en estos genes que no se correlacionan con la resistencia fenotípica.

### **BIBLIOGRAFIA**

- AMORIM ML, CABEDA JM, SECA R, MENDES AC, CASTRO AP, AMORIM JM. CMV infection of liver transplant recipients: comparison of antigenemia and molecular biology assays. *BioMed Central Infect Dis* 2001; 1:2. En: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/1/2>.
- CALIENDO AM, ST GEORGE K, ALLEGA J, BULLOTTA AC, GILBANE L, RINALDO CR. Distinguishing cytomegalovirus (CMV) infection and disease with CMV nucleic acid assays. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40:1581-1586.
- CALIENDO AM, ST GEORGE K, KAO SY *et al.* Comparison of quantitative cytomegalovirus (CMV) PCR in plasma and CMV antigenemia assay: clinical utility of the prototype AMPLICOR test in transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000; 38(6): 2122-2127.
- DE OÑA M, MELÓN S, MENDÉZ S *et al.* Cytomegalovirus susceptibility assay to ganciclovir in renal transplant and renal transplant recipients. *Transplant Internat* 2002; 15(11):570-573.
- ERICE A. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:286-297.
- FLEXMAN J, KAY I, FONTE R, HERRMANN R, GABBAY E, PALLADINO S. Differences between the quantitative antigenemia assay and the Cobas Amplicor Monitor quantitative PCR assay for detecting CMV viraemia in bone marrow and solid organ transplant patients. *J Med Virol* 2001; 64:275-282.
- HEBART H, WUCHTER P, LOEFFLER J *et al.* Evaluation of the Murex CMV DNA Hybrid Capture assay (version 2.0) for early diagnosis of cytomegalovirus infection in recipients of an allogeneic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28:213-218.
- KELLY J, HURLEY D, RAGHU G. Comparison of the efficacy and cost effectiveness of preemptive therapy as directed by CMV antigenemia and prophylaxis with ganciclovir in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:355-359.
- LJUNGMAN P, GRIFFITHS P, PAYA C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34:1094-1097.
- PIIPARINEN H, HOCKERSTEDT K, GRONHAGEN-RISKA C, LAPPALAINEN M, SUNI J, LAUTENSCHLAGER I. Comparison of plasma polymerase chain reaction and pp65-antigenemia assay in the quantification of cytomegalovirus in liver and kidney transplant patients. *J Clin Virol* 2001; 22:111-116.
- RAZONABLE RR, BROWN RA, ESPY MJ *et al.* Comparative quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA in solid organ transplant recipients with CMV infection by using two high-throughput automated systems. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4472-4476.
- RAZONABLE RR, PAYA CV, SMITH TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2002; 40:746-752.
- SCHAFFER P, TENSCHERT W, SCHROTER M, GUTENSOHN K, LAUFS R. False-positive results of plasma PCR for cytomegalovirus DNA due to delayed sample preparation. *J Clin Microbiol* 2000; 38:3249-3253.

- SCHULENBURG A, WATKINS-RIEDEL T, GREINIX HT *et al.* CMV monitoring after peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation by pp65 antigen and quantitative PCR. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28:765-768.
- SOLANO C, MUNOZ I, GUTIERREZ 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; 39:3938-3941.
- VAN DER BIJ W, SPEICH R. Management of cytomegalovirus infection and disease after solid-organ transplantation. *Clin Infect Dis* 2001; 33(Supl 1):S32-S37.
- VON MULLER L, HAMPL W, HINZ J *et al.* High variability between results of different in-house tests for cytomegalovirus(CMV) monitoring and a standardized quantitative plasma CMV PCR assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2285-2287.