

Monitoramento de pacientes com AIDS para o desenvolvimento de doença por citomegalovirus (CMV) usando-se PCR multiplex

Monitoring AIDS patients for the development of cytomegalovirus (CMV) disease using multiplex PCR

Ana Paula Sarreta Terra¹, Mario León Silva-Vergara², Roseli Aparecida S. Gomes³,
Carla Lisandra L. Pereira⁴, Andrew J.G. Simpson⁵ e Otávia Luísa Caballero⁴

Resumo O citomegalovirus é um patógeno importante em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). A carga viral do CMV parece ser preditora da sintomatologia das infecções citomegálicas em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Um protocolo de PCR multiplex que fornece informações de quantificação de DNA amplificando somente um ou dois genes alvo do CMV foi utilizado neste trabalho. Amostras mensais de sangue foram coletadas de 270 pacientes com AIDS. Vinte pacientes tiveram positividade para dois alvos por 3 ou mais consecutivas e apresentaram doença por CMV no decorrer do estudo. Os pacientes que não apresentaram positividade ou alternância de amostras positivas somente para um gene viral não desenvolveram doença ligada ao CMV. Os resultados sugerem que a PCR multiplex é um protocolo útil para a identificação dos pacientes com alta carga viral e maior risco de desenvolvimento de doença por CMV.

Palavras-chaves: Doença por citomegalovirus. PCR multiplex. HIV. AIDS.

Abstract The human cytomegalovirus is an important pathogen in patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV). The CMV viral load seems to be predictor of the development of the CMV disease in these patients. We used a multiplex PCR protocol that also provides quantitative information in those samples from which a single band is amplified and contains fewer viral genomes than those from which both targets are amplified. Monthly blood samples were collected from 270 AIDS patients. From twenty patients, two CMV targets were amplified three or more consecutive times and these patients developed CMV related disease during the study. In contrast, patients who did not result positive for both viral targets, for three or more consecutive times, or who had alternating positive and negative samples during the follow up did not present CMV related disease. The results suggest that the PCR multiplex can be used for the identification of HIV positive patients with higher risk of development of CMV disease.

Key-words: Disease. Cytomegalovirus. PCR multiplex. HIV. AIDS.

1. Disciplina de Microbiologia, 2. Doenças Infecciosas e Parasitárias e 3. Bioquímica da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG.

Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer AC. Camargo⁴, São Paulo, SP.

Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer⁵, Laboratório de Genética do Câncer, São Paulo, SP.

Endereço para correspondência: Ana Paula Sarreta Terra. Praça Manoel Terra s/nº, Abadia, 38080-015 Uberaba, MG, Brasil.

Tel: 55 34 318-5441/318 5480.

e-mail: csarreta@zaz.com.br

Recebido para publicação em 13/10/99.

O citomegalovírus (CMV) continua sendo um dos agentes oportunistas mais comuns em pacientes com infecção avançada pelo vírus da imunodeficiência (HIV), sendo um dos grandes causadores de morbidade e mortalidade nesses pacientes^{3 7 10 16}. Os fatores de risco para o desenvolvimento da doença por CMV nesta população incluem o aumento do estágio de imunossupressão, manifestado pelo decréscimo da contagem de células T CD4⁺ e a presença da viremia por CMV³.

As manifestações clínicas mais comuns nos pacientes com AIDS incluem retinite, envolvimento gastrointestinal, pneumonia e alterações do sistema nervoso central e periférico, tais como encefalite, polirradiculoneurite e neuropatia periférica^{6 7 8}. Doença disseminada é encontrada em autópsia em até 90% dos pacientes com o agravamento da imunodeficiência¹³. A doença por CMV no sistema nervoso central (SNC) tem sido documentada no exame pós-morte em 15 a 30% dos pacientes com AIDS²³. Estudos de necropsias mostram que a infecção por CMV pode não ser diagnosticada durante a vida em pacientes com AIDS¹³.

Desde a introdução da terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART)^{8 9}, a incidência da doença por CMV tem diminuído^{14 26 27}. Antes dessa terapia, a retinite por CMV ocorria em até 40% dos pacientes, tipicamente naqueles com menores contagens de células CD4⁺¹⁶. Entretanto, o sucesso terapêutico não é mantido para uma significativa proporção dos pacientes e também devido à alta toxicidade e altos custos da terapia, muitos pacientes ainda permanecem sob risco de desenvolvimento de doença por CMV, principalmente nos países em desenvolvimento.

A identificação de fatores adicionais de risco é extremamente importante, porque esses pacientes podem ser beneficiados com a introdução de drogas anti-CMV para reduzir o risco de doença ligada a esse vírus²⁵.

Os processos usados para a detecção do CMV incluem o isolamento do vírus por cultura, detecção da antigenemia¹⁸ ou de ácidos nucleicos virais. A reação em cadeia da polimerase (PCR) detecta o DNA do CMV em leucócitos e é considerada um método sensível e promissor^{1 2 24}. Uma grande variedade de iniciadores específicos e diferentes estratégias de PCR para DNA de CMV já foram descritas^{6 24}. Embora a detecção de DNA do CMV por PCR seja uma técnica sensível, a sua positividade não necessariamente correlaciona-se com doença ativa, porque os vírus que se encontram em estado latente também podem ser amplificados²⁸. Entretanto, o valor preditivo positivo aumenta quando são usadas técnicas de PCR quantitativo^{8 12 15 17}, mas estas geralmente são técnicas trabalhosas e pouco úteis para o uso em laboratórios clínicos de rotina.

Para o acompanhamento de pacientes transplantados renais para o desenvolvimento de doença relacionada ao CMV foi desenvolvido um protocolo de PCR *multiplex*⁴. Esse teste foi usado para o acompanhamento de 50 pacientes transplantados renais e pôde identificar aqueles pacientes sob maior risco de desenvolver infecção clinicamente relevante pelo CMV⁴.

O nosso objetivo é avaliar a utilidade do protocolo de detecção qualitativa do DNA de CMV por PCR *multiplex*⁴ no acompanhamento prospectivo de pacientes com AIDS para a identificação dos pacientes sob maior risco de desenvolvimento de doença por CMV.

POPULAÇÃO E MÉTODOS

Duzentos e setenta pacientes com AIDS sem suspeita de doença ligada ao CMV foram incluídos neste estudo, sendo acompanhados no Ambulatório da Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Escola da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro ou internados na enfermaria desta clínica, durante o período de novembro de 1997 a janeiro de 1999.

Cada coleta de sangue, coincidiu com a avaliação clínica destes pacientes. Foram coletados 5ml de sangue em tubo de coleta a vácuo (Vacutainer) com EDTA, homogeneizado por inversão, para evitar a formação de coágulos,

e identificados. Um total de 1.164 amostras seriadas de sangue foram coletadas desses pacientes.

Segundo o protocolo do Ministério da Saúde, a contagem de células T CD4⁺ foi feita pelo método de citometria de fluxo utilizando o FacScout (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Califórnia) instalado no laboratório da Regional de Saúde Pública de Uberaba. Todas as amostras foram submetidas a PCR *multiplex* para DNA de CMV. A extração do DNA foi realizada seguindo a técnica de fenol/clorofórmio²¹. O DNA foi ressuspenso em 50µl de TE para o uso na PCR. A qualidade da preparação do DNA foi

testada através da amplificação de um fragmento de 110 pares de bases do gene da β -globina¹⁹.

A Reação em Cadeia da Polimerase utilizada foi realizada segundo o método antes descrito⁴. O DNA extraído das amostras de sangue foi submetido à amplificação na presença de dois pares de iniciadores específicos para duas regiões do genoma do citomegalovírus e que amplificam 136 pb do gene LA²⁴ e o outro 393 pb do gene IE², em mistura de reação contendo 2 μ l de DNA, 2 unidades de Taq DNA polimerase, 10mM de Tris – HCl, 50mM de KCl, 1,5mM de MgCl₂, 12,5 μ mol de cada iniciador e 200 μ M de cada dNTP em um volume final de 50 μ l. A reação iniciou-se com uma desnaturação a 94°C por 5 minutos, o emparelhamento e a extensão a 72°C

por 2 minutos e a partir daí foram realizados 34 ciclos de 94°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos e 1 ciclo de 94°C por 30 segundos e 72°C por 8 minutos. As condições de PCR incluíram um protocolo de aquecimento inicial⁵, utilizando o Kit Hot Start 50™ (Mbp). Todos os experimentos foram feitos com dois controles negativos, um sem DNA e o outro com um DNA humano negativo para CMV. Quatro microlitros dos produtos amplificados após a PCR foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida a 6% em cuba BIO-RAD e corados pela prata²².

Os géis foram analisados quanto à presença de bandas do gene da β -globina, para a verificação da qualidade do DNA (Figura 1) e dos genes do CMV, LA de 136 pb e/ou IE (393 pb) (Figura 2).

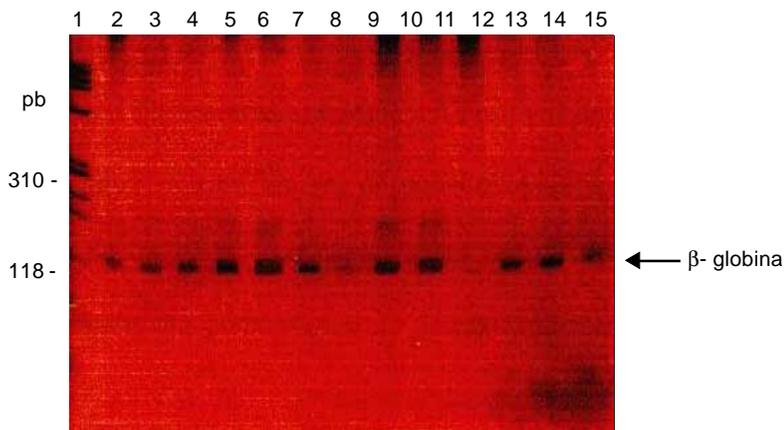


Figura 1 - Gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata, mostrando produtos da amplificação de um fragmento de 110 bp do gene da β -globina do DNA obtido de 13 pacientes. Canaleta 1 - padrão de peso molecular ϕ X 174 Hae III, canaleta 11 controle negativo, onde não foi adicionado DNA.

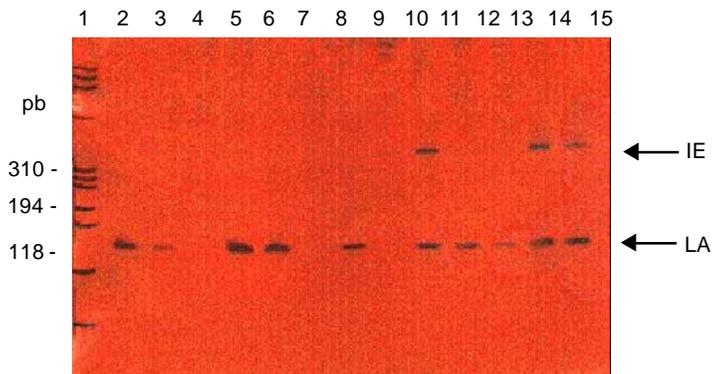


Figura 2 - Gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata, mostrando produtos da amplificação dos genes LA (136 pb) e IE (393 pb) do genoma do CMV. Canaleta 1 - padrão de peso molecular ϕ X HAE III, canaleta 14 - controle positivo, canaleta 15 - controle negativo, canaletas 2, 4, 5, 12 - positivo somente para LA e nas canaletas 3, 6, 7, 8, 11, 13 - positivo para LA e IE.

RESULTADOS

Dentre os duzentos e setenta pacientes com AIDS sem suspeita de doença ligada ao CMV acompanhados durante o período de novembro de 1997 a janeiro de 1999, 157 (58,9%) pacientes eram do sexo masculino. A distribuição quanto à cor foi 214 (79,2%) de cor branca e 56 (20,7%) pacientes de cor não branca. Do total de pacientes 132(48,9%) tinham idade inferior a 30 anos. Um total de 1.164 amostras seriadas de sangue foram coletadas desses pacientes. O número de amostras por paciente do ambulatório variou de 1 a 13 com uma média de 5,7 e mediana

de 8 amostras por paciente. O número de amostras por paciente internado no Hospital Escola foi de 1 a 9 amostras com média de 2,3 e mediana de 2 amostras por paciente. Estes pacientes apresentaram várias manifestações clínicas no decorrer do estudo (Tabela 1). Dos 270 pacientes acompanhados, 20 apresentaram manifestações clínicas relacionadas ao CMV, diagnosticadas clínica e/ou histopatologicamente, sendo mais freqüente a coriorretinite (55%) (Tabela 2). Em sete desses pacientes, o diagnóstico de doença por CMV foi somente feito à necropsia.

Tabela 1 - Manifestações clínicas em 270 pacientes com AIDS.

Diagnóstico	Pacientes	%
Manifestação clínica		
Pneumonia	72	26,6
Toxoplasmose	42	15,5
Tuberculose	35	13,0
Monilíase	31	11,5
Herpes Zoster	28	10,4
Criptococose	22	8,1
Outras manifestações	35	13,0
Sem intercorrências	5	1,9

Tabela 2- Manifestações clínicas relacionadas ao citomegalovírus em 20 (74%) pacientes com AIDS.

Diagnóstico	Pacientes	%
Coriorretinite	10	3,7
Pneumonite	2	0,7
Estômago	3	1,1
Esofagite	1	0,4
Intestino	1	0,4
Supra-renal	2	0,7
Disseminada	1	0,4

Todos os pacientes tiveram contagem de células T CD4⁺ cujo valor variou de 7 a 1.269 células/mm³, com uma mediana de 185. Dos 270 pacientes, 147 apresentaram valores de células T CD4⁺ > 100/mm³ e destes quatro pacientes (2,72%) apresentaram manifestações clínicas por CMV. Em contraste, dos 123 pacientes que apresentaram células T CD4⁺ < 100/mm³, 14 (11,4%) apresentaram manifestações clínicas relacionadas ao CMV.

Dentre os 270 pacientes acompanhados, 104 apresentaram todas as amostras negativas para

DNA de CMV e 37 apresentaram todas as amostras positivas. Dentre os pacientes que apresentaram positividade para DNA de CMV em alguma das coletas, 50 apresentaram somente amplificação de um gene viral, positiva em todas amostras, 20 apresentaram somente amplificação de dois alvos em todas amostras e 27 apresentaram alternância de amostras positivas e negativas. Vinte e três pacientes apresentaram positividade para IE e LA por duas vezes consecutivas e 9 pacientes apresentaram positividade para IE e LA simultaneamente por 3 ou mais vezes.

A Figura 2 mostra um gel de poliacrilamida contendo os produtos da amplificação por PCR do fragmento dos genes LA (136pb) e IE (393pb). A Tabela 3 mostra a distribuição dos pacientes quanto à positividade na PCR multiplex, assim como a porcentagem de pacientes que adoeceram em cada um desses grupos.

Os pacientes que apresentaram a menor porcentagem de doença por CMV foram aqueles que apresentaram todas as amostras negativas

ou amostras positivas com somente a amplificação de um gene viral (IE ou LA). A maior porcentagem de pacientes apresentando doença por CMV foi observada naqueles em que houve positividade para IE e LA simultaneamente por 3 ou mais vezes consecutivas. A Tabela 4 mostra a sensibilidade, especificidade e valores preditivos da amplificação de duas bandas na PCR *multiplex* para o diagnóstico de doença por CMV.

Tabela 3 - Relação entre a positividade na PCR Multiplex e o desenvolvimento de doença por CMV em pacientes com AIDS.

Resultados	Paciente ambulatorial	Paciente internado	Pacientes com doença por CMV	
			nº	%
Todas as amostras negativas	52	52	1/104	0,9
Todas as amostras positivas	9	28	11/37	29,7
Somente 1 banda positiva em todas as amostras	25	25	2/50	4,0
Somente 2 bandas positivas em todas as amostras	5	15	7/20	35,0
Alternância de amostras positivas e negativas	21	6	0/27	0,0
Positividade para IE e LA simultaneamente por 2 ou mais vezes consecutivas	13	10	12/23	52,0
Positividade para IE e LA simultaneamente por 3 ou mais vezes consecutivas	6	3	7/9	77,7

Tabela 4 - Relação entre a amplificação dos genes LA e IE e o desenvolvimento de doença por CMV nos pacientes com PCR positiva em todas as amostras.

	Doença por CMV		Total
	presente	ausente	
Pacientes com amplificação dos genes IE e LA em todas as amostras (2 genes virais)	7	13	20
Pacientes com amplificação dos genes IE ou LA em todas as amostras (1 gene viral)	2	48	50
Total	9	61	70

Sensibilidade = 78% Especificidade = 79% VPP = 35% VPN = 96%

DISCUSSÃO

O número de células T CD4⁺ é de fundamental importância para o aparecimento de doenças oportunistas nos pacientes com AIDS¹⁰, principalmente quando este se apresenta abaixo de 100 células/mm³. Neste estudo os pacientes que apresentavam uma contagem de células T CD4⁺ menor que 100 células por milímetro cúbico apresentaram maior incidência de doença por CMV. De acordo com a literatura, em pacientes com contagem de células T CD4⁺>100/mm³ a incidência dessa doença é muito baixa, menor

que 5% após 18 a 20 meses^{10,16}. Em contraste, naqueles com número de células T CD4⁺< 50/mm³, a doença por CMV ocorre em aproximadamente 40% dos casos em 12 meses¹⁶.

Os pacientes acompanhados neste estudo apresentaram várias manifestações clínicas no decorrer do período, sendo que 20 apresentaram doença por CMV. Esse trabalho mostra que os grupos que apresentaram a menor porcentagem de pacientes com doença por CMV foram aqueles que apresentaram todas as amostras

negativas ou amostras positivas com somente a amplificação de um gene viral (IE ou LA). A maior porcentagem de pacientes apresentando doença por CMV mostrou positividade para IE e LA simultaneamente por 3 ou mais vezes consecutivas (77,7%).

Nos pacientes com PCR negativa em todas as amostras, somente um apresentou doença ligada ao CMV, mostrando assim, um valor preditivo negativo alto para este teste. A maioria dos pacientes apresentou PCR positiva pelo menos uma vez no decorrer do estudo. Estudos mostram que cerca de 15 a 20% dos pacientes são negativos para DNA de CMV por PCR ao diagnóstico de retinite, tendo o pico de viremia ocorrido meses antes da manifestação clínica¹⁷. Portanto, uma determinação isolada da presença do DNA de CMV nesses pacientes não é útil para a discriminação do risco.

O acompanhamento desses pacientes com PCR multiplex discriminou o grupo de pacientes que apresentava a maior probabilidade do desenvolvimento de doença por CMV. Alguns estudos sugerem que a profilaxia oral com Aciclovir® pode reduzir significativamente a incidência de doença por CMV²⁵. A discriminação do grupo de risco com a PCR multiplex poderia auxiliar na indicação do uso de terapia profilática.

Cerca de 50% dos pacientes positivos para DNA de CMV por PCR vão desenvolver retinite no prazo de um ano³. Mesmo fazendo uso de terapia anti-HIV altamente ativa, a doença por CMV ainda tem uma incidência bastante significativa com conseqüências graves para estes pacientes.

A carga viral no sangue parece ser o principal fator determinante dos sintomas clínicos relacionados ao CMV em pacientes imunossuprimidos¹⁷. Vários métodos baseados em PCR para a determinação da carga viral já foram relatados. Com o uso de métodos quantitativos ou semi-quantitativos^{8 12 15 17}, no monitoramento de pacientes transplantados de órgãos sólidos ou de medula, há evidências de

que a quantificação de genomas de CMV permite a diferenciação entre infecções por CMV sintomáticas e assintomáticas. Além disso, essas técnicas permitem a discriminação entre infecções clinicamente relevantes e DNAemias não relevantes^{11 15}. Geralmente esses métodos quantitativos são bastante trabalhosos, o que impede o seu estabelecimento como um método útil para o acompanhamento de rotina de pacientes sob risco de doença por CMV.

O ensaio de PCR multiplex⁴ provê informações quantitativas, por causa do seu formato. Os casos em que há a amplificação de somente um único alvo contém significativamente menos DNA viral do que os casos onde os dois alvos são amplificados. Como essa PCR qualitativa com dois alvos já se mostrou útil para estimar a carga viral em pacientes transplantados em relação ao desenvolvimento de doença por CMV, nós nos propusemos a avaliar o seu uso para o acompanhamento de pacientes imunocomprometidos pelo HIV. Observamos que os pacientes que tiveram as amostras positivas para um gene viral ou alternância de resultados positivo e negativo, adoeceram em menor proporção. Dentre os 77 pacientes que apresentaram este perfil somente dois adoeceram. Por outro lado, pacientes com amplificação de dois genes virais em todas as amostras ou pelo menos por duas vezes consecutivas, tiveram maior probabilidade de adoecer. Em conclusão, a amplificação de dois genes virais é um marcador que parece refletir a presença de uma maior carga viral nestes pacientes.

A PCR *multiplex* é uma técnica rápida e fácil de ser realizada em qualquer laboratório de Patologia Clínica equipado para a realização de PCR. É um método sensível e específico, que pode auxiliar com uma maior clareza e segurança os diagnósticos clínicos ou histopatológicos. Portanto, essa reação pode ser usada no acompanhamento desses pacientes e também servir como um parâmetro para a administração de terapia profilática para CMV em pacientes HIV positivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blank BS, Meenhorst PL, Mulder JW, Weverling GJ, Putter H, Pauw W, van Dijk WC, Smits P, Lie-A-Ling S, Reiss P, Lange JM. Value of different assays for detection of human cytomegalovirus (HCMV) in predicting the development of HCMV disease in human immunodeficiency virus-infected patients. *Journal Clinical Microbiology* 38:563-569, 2000
- Borg KL, Nordb P, Winge AD. Detection of cytomegalovirus using 'boosted' nested PCR. *Molecular and Cellular Probes* 9:251-257, 1995.
- Bowen, EF, Griffiths PD, Davey CC, Emery VC, Johnson MA. Lessons from the natural history of cytomegalovirus. *AIDS* 10(supl 1):S37-S41, 1996.

4. Caballero OL, Menezes CLP, Costa MCSL, Fernandes SC, Anacleto TM, Oliveira RM, Viotti EA, Távora ERF, Vilaça SS, Sabbaga E, Paula FJ, Távora PF, Villa LL, Simpson AJG. A single-step PCR protocol for high sensitivity human cytomegalovirus infection diagnosis and monitoring in renal transplant recipients. *Journal Clinical Microbiology* 35:3192-3197, 1997.
5. Chou KL, Russel M, Birch DE, Raymond, Bloch, W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research* 20:1717-1723, 1992 .
6. Cinque P, Vago L, Brytting M, Castagna A, Accordini A, Sundqvist V, Zancherta N, Monforte AD, Lazzarin A, Linde A. Cytomegalovirus infection of the central nervous system in patients with AIDS: Diagnosis by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *Journal of Infectious. Diseases* 166:1408-1411, 1992. D
7. Drew WL. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clinical Infectious Diseases* 14:608-615, 1992.
8. Gallant JE, Moore RD, Richman DD, Keruly J, Chaisson RE, The incidence and the natural history of the Cytomegalovirus in the patients with illness advanced human being of the treated virus of immunodeficiency with Zidovudine. *Journal of Infectious. Diseases* 166: 1223-1227, 1992.
9. Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, Eron JJ Jr, Feinberg JE, Balfour HH Jr, Deyton LR, Chodakewitz JA, Fischl MA A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team *New England Journal of Medicine* 11:725-733, 1997.
10. Jacobson MA, Mills J. Serious cytomegalovirus disease in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): clinical findings, diagnosis and treatment. *Annals of Internal Medicine* 108:585-594, 1998.
11. Kühn JE, Wendland T, Eggers HJ, Lorentzen E, Wieland U, Eing M, gass P. Quantitation of human Cytomegalovirus genomes in the brain of AIDS patients. *Journal of Medical Virology* 47:70-82, 1995.
12. Kühn JE, T. Wendland P Schäfer K, Möhring U. Wieland M, Elgas and H.J. Eggers. Monitoring of renal allograft recipients by quantitation of human cytomegalovirus genomes in peripheral blood leukocytes. *Journal of Medical Virology* 44:398-405, 1994.
13. Morgello S, Cho ES, Nielsen S, Devinsky O, Petito CK. Cytomegalovirus encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: an autopsy study of 30 cases and a review of the literature. *Human Pathology* 18:289-297, 1987.
14. Nichols WG, Boeckh M. Recent advances in the therapy and prevention of CMV infections *Journal of Clinical Virology* 16:25-40, 2000.
15. Peiris JSM, Taylor CE, Main J, graham K, Madeley C.R. Diagnosis of cytomegalovirus (CMV) disease in renal allograft recipients: the role of semiquantitative polymerase chain reaction. *Nephrology Dialysis Transplantation* 10:1198-1205, 1995.
16. Perfel P, Hirschtick R, Phair J. Risk of developing cytomegalovirus retinitis in persons infected with the human immunodeficiency virus. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 5:1069-1074, 1992.
17. Rasmussen L, Morris S, Zipeto D, Fessel J, Wolitz R, Dowling A, Merigan TC. Quantitation of human Cytomegalovirus DNA from peripheral blood cells of human imunodeficiency Virus-infected patients could predict Cytomegalovirus retinitis. *Journal of Infectious Diseases* 171:177-182, 1995.
18. Revello MG, Percivalle E, Sarasini A, Baldanti F, Furione M, Gerna G. Diagnosis of human cytomegalovirus infection of the central nervous system by pp65 detection in polymorphonuclear leukocytes of cerebrospinal fluid from AIDS patients. *Journal of Infectious Diseases* 170:1275-1279, 1994.
19. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuch R, Hornig T, Mullis KB, Erlich, HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491, 1988.
20. Salazar A, Podzamczar D, Rene R, Santin M, Perez JL Cytomegalovirus ventriculoencephalitis in AIDS patients. *Scand. Journal of Infectious Diseases* 7:165-169, 1995.
21. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd edition, Cold Spring Harbor, 1989.
22. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJG. Rapid Silver Staining and Recovery of PCR Products Separated on Polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17:915-919, 1994.
23. Setinek U, Wondrusch E, Jellinger K, Steuer A, Drlicek M, Grisold W, Lointner F. Cytomegalovirus infection of the brain in AIDS: a clinicopathological study. *Acta Neuropathologica* 90:511-515, 1995.
24. Shibata D, Martin WJ, Appleman DM, Causey, JM, Leedom N. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *Journal of Infectious Diseases* 158:1185-1192, 1988.
25. Spector AS, McKinley F, Lalezari JP. Oral ganciclovir for the prevention of cytomegalovirus disease in persons with AIDS. *New England Journal of Medicine* 334:1491-1497, 1996.
26. Verbraa FD, Boom R, Dillen PME, Horng JD, Kustra A, Smet MD. Influence of highly active antiretroviral therapy on the development of CMV disease in HIV positive patients at high risk for CMV disease. *BR. Journal Ophthalmology* 83:1186-1189, 1999.
27. Whitcup SM. Cytomegalovirus retinitis in the era of highly active antiretroviral therapy. *Journal of the American Medical Association* 2:653-657, 2000.
28. Wiselka MJ, Nicholson KG, Rowley S, Bibby K Cytomegalovirus viraemia has poor predictive value for the development of cytomegalovirus disease in patients with advanced HIV-infection. *Journal of Infection* 39:187-192, 1999.