

Diagnóstico de infecção congênita e perinatal por citomegalovírus utilizando a reação em cadeia da polimerase

Diagnosis of congenital and perinatal cytomegalovirus infection by using the polymerase chain reaction

Aparecida Yulie Yamamoto, Victor Hugo Aquino, Luis Tadeu Moraes Figueiredo e Marisa Marcia Mussi-Pinhata

Resumo Aplicou-se uma reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico de infecção congênita e perinatal por citomegalovírus, comparando-a com a técnica de isolamento viral em cultura celular. Foram processadas 305 amostras de urina de crianças de 0 a 6 meses, por ambas as técnicas. Utilizou-se na PCR os primers que amplificam parte do gene codificador do principal antígeno precoce imediato de CMV. Detectou-se virúria em 47 amostras por PCR e comparando os resultados com aqueles obtidos pelo isolamento viral, observou-se copositividade de 89,6% e conegatividade de 98,5%. Estas amostras positivas tiveram o resultado confirmado por PCR utilizando outros primers que amplificam regiões dos genes codificadores das glicoproteínas B e H de CMV. O diagnóstico de infecção congênita e perinatal por CMV pela PCR mostrou sensibilidade comparável à do isolamento viral e o uso de vários primers conferiu alta especificidade ao teste.

Palavras-chaves: Citomegalovírus. Diagnóstico da citomegalovirose. Reação em cadeia da polimerase. Infecção congênita e perinatal.

Abstract The practical application of a polymerase chain reaction (PCR) amplification for the diagnosis of congenital and perinatal cytomegalovirus (CMV) infections was evaluated. Three hundred five urine samples were tested by PCR and conventional virus isolation in cell culture. Viruria was detected in 47 urine samples by PCR using a primer pair which amplifies part of the major immediate-early (MIE) CMV genome. The PCR compared to virus isolation showed 89,6% sensitivity, 98,5% specificity and 91,5% positive predictive value. PCR with primer pairs amplifying parts of the glycoprotein B and glycoprotein H genes of CMV were used for confirmation of the positivity of the 47 urine samples. We concluded that this CMV PCR assay in urine has a suitable sensitivity for the diagnosis of congenital and perinatal infections and its specificity is highly increased by use of more than one pair of primers among the ones we used.

Key-words: Cytomegalovirus. Cytomegalovirus diagnosis. Polymerase chain reaction. Congenital and perinatal infection.

Unidade Multidisciplinar de Pesquisa em Virologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP. Trabalho financiado parcialmente pela FAPESP e CNPq.

Endereço para correspondência: Dr^a Aparecida Yulie Yamamoto, Unidade Multidisciplinar de Pesquisa em Virologia, FMRP/USP, Av. Bandeirantes 3900, Campus da USP, Bairro Monte Alegre, 14049-900 Ribeirão Preto, SP. Fax (016) 633-6695.

Recebido para publicação em 03/01/97.

Os citomegalovirus (CMV) representam atualmente os agentes etiológicos mais comuns de infecção congênita e perinatal em diversas partes do mundo. A infecção congênita ocorre em 0,2 a 2,2% dos recém-nascidos, com incidência maior em populações de classe sócio-econômica baixa^{1 18 23}. A infecção perinatal, como resultado da transmissão durante o parto, pelo leite materno ou por transfusões de sangue, é muito freqüente, com incidência de 5 a 38%^{1 15}.

Os CMV pertencem ao gênero *Citomegalovirus*, subfamília *β-Herpesvirinae* da família *Herpesviridae*. Medem 200nm e possuem envelope, tegumento e capsídeo protéico com simetria icosaédrica. Seus genomas são constituídos por ácido desoxirribonucleico de fita dupla contendo cerca de 230000 pares de bases^{3 14}.

Na compreensão da história natural da citomegalovirose grandes avanços tem ocorrido. Sabe-se que a infecção congênita por CMV pode resultar em sequelas importantes como a surdez e o retardo do desenvolvimento neuromotor. A infecção perinatal pode estar associada a pneumonites de longa evolução e gravidade variável. Entretanto, por não se procurar o diagnóstico rotineiro e precoce de citomegalovirose nessas crianças, fica prejudicada a intervenção com recursos terapêuticos que poderiam minimizar a gravidade dos casos e particularmente nas infecções congênitas, possibilitaria diminuir a intensidade das seqüelas e também definir uma população de risco para o desenvolvimento de anormalidades futuras^{8 23}.

O isolamento viral na urina é o método clássico utilizado no diagnóstico da citomegalovirose congênita e perinatal²⁰. Porém, atualmente, métodos alternativos vem sendo utilizados para a detecção de virúria por CMV^{4 13 21}.

Objetivamos com este estudo avaliar a aplicação no diagnóstico de infecção congênita e perinatal por CMV de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando 3 pares de iniciadores (*primers*) e comparar esta técnica com o isolamento viral.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testadas 305 amostras da urina de 204 crianças com idade entre 0 e 6 meses, que foram atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), no

período de 1993 a 1995. Também, utilizou-se amostra do protótipo de CMV humano cepa AD 169 em fluido da cultura de fibroblastos humanos.

Isolamento viral na urina em cultura de fibroblastos humanos com identificação do CMV por imunofluorescência usando anticorpo monoclonal^{10 20}. Cem µl de urina fresca tratada por 1 hora com amicacina (500µg/ml) eram inoculados em duplicata nas monocamadas de uma linhagem celular diplóide de fibroblastos humanos, cultivadas em meio mínimo essencial com sais de Earle. As células eram mantidas em microplacas plásticas de 24 orifícios, a 37°C e em estufa de CO₂. As culturas celulares eram observadas diariamente em microscópio invertido (Zeiss, Alemanha), por período de até 30 dias, buscando detectar a infecção por CMV através da visualização de efeito citopático (ECP) característico. Neste caso, o ECP é definido pela presença de células grandes e arredondadas, dispostas em lesões focais ou por toda a monocamada e contendo numerosas granulações intranucleares e citoplasmáticas. Fazia-se confirmação posterior do isolamento viral nas células infectadas utilizando teste de imunofluorescência com anticorpo monoclonal específico para CMV conjugado à fluoresceína (Baxter, USA).

Reação de amplificação gênica em cadeia catalisada pela polimerase (PCR)^{5 6}. Amostras de urina frescas ou armazenadas a -70°C foram testadas por PCR inicialmente utilizando o par de *primers* MIE^{3 6} (Tabela 1) que permite a amplificação de uma região do gene que codifica o principal antígeno precoce imediato dos CMV. As amostras de urina nas quais foi possível a detecção do ADN viral com os *primers* MIE, foram testadas novamente por PCR para confirmação da presença viral. Nos testes confirmatórios, em todas as amostras previamente positivas com o primer MIE, utilizou-se separadamente outros 2 pares de *primers*, denominados gB e gH^{2 3} (Tabela 1), que amplificam regiões do genoma dos CMV codificadoras das glicoproteínas B e H, respectivamente. Em 11 dessas amostras positivas, foi realizado também um PCR *multiplex*, utilizando conjuntamente os 3 pares de *primers* em um mesmo teste⁹. Os *primers* MIE foram sintetizados no Laboratório de Hematologia do HCFMRP-USP e os *primers* gB e gH por GIBCO-BRL (USA).

Tabela 1- Seqüência dos primers utilizados na PCR para CMV.

Primer	Seqüência	Tamanho do produto em pares de bases	Localização no genoma
MIE	5' CAGCACCATCCTCCTCTCTCTGG 3'	434	171074 a 171508
MIE	5' CCAAGCGGCCTCTGATAACCAAGCC 3'		
gB	5' GAAACGCGCGGCAATCGG3'	293 a 296	81874 a 82176
gB	5' TGGAAGTGGAAACGTTTGGC 3'		
gH	5' TGGTGTTCACGCAGGAA 3'	215	109961 a 110174
gH	5' CCACCTGGATCACGCCGCTG 3'		

A PCR era efetuada acrescentando-se a 2µl da amostra de urina, 2,5µmol de cada um dos 4 trifosfatos de desoxinucleotídeo, 15 pmol de cada primer, 5µl de tampão contendo 5mM de Tris (pH 9,0), 750µM de MgCl₂, 25mM de KCl e água destilada e deionizada, completando um volume de 50µl. A mistura era incubada a 94°C por 6 minutos (*hot start*), adicionava-se 1U de Taq ADN polimerase (Pharmacia) e a mesma era submetida a 40 ciclos de amplificação, em ciclador térmico (Techne, Inglaterra), a 95°C por 60 segundos, 55°C por 90 segundos e 72°C por 120 segundos, seguidos ao final por 3 minutos a 72°C. Utilizou-se como controle positivo da PCR fluido da cultura de fibroblastos humanos infectados com CMV cepa AD169 e como controle negativo usou-se água deionizada.

Após eletroforese em gel de agarose a 2%, os produtos da PCR eram corados em solução de brometo de etídio e visualizados à luz ultravioleta.

Titulação do CMV AD169. Diluições decimais e seriadas, até 1:1000, da amostra de CMV cepa AD169 foram inoculadas, em quadruplicata, 10µl por orifício, numa microplaca de 96 orifícios contendo monocamadas de fibroblastos humanos. As colônias foram observadas no 15º dia pós-inoculação quando determinou-se os orifícios em que as monocamadas apresentavam ECP característico. Com base nesta leitura do teste, calculou-se o título viral em dose infectante para 50% das culturas celulares (TCID₅₀), utilizando a técnica de Reed Muench¹¹. As mesmas diluições decimais e seriadas, até 1:1000, da semente do CMV cepa AD169 foram testadas por PCR, em quadruplicata, utilizando os 3 pares de primers.

Análise estatística. Os resultados dos testes PCR foram comparados com os obtidos pela técnica padrão, o isolamento viral, utilizando tabelas 2 x 2, com determinação da sensibilidade e da especificidade do método. Análise da associação entre PCR e isolamento viral foi feita por teste qui-quadrado ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Os resultados observados com os controles positivo (fluido da cultura de fibroblastos infectados com CMV cepa AD169) e negativo (água deionizada), foram compatíveis em todos os testes efetuados.

Deteção do CMV na urina. Conforme mostrado na Tabela 2, das 305 amostras de urina testadas, isolou-se o CMV em 48 (15,7%) e a amplificação de ADN do CMV com o par de primers MIE foi possível em 47 (15,4%). Em 5 urinas das quais o CMV foi isolado, não se conseguiu amplificação do DNA viral e em 4 amostras em que a PCR foi positiva, o vírus não foi isolado. Assim, em 52/305 (17%) das urinas foi possível a deteção do vírus, por isolamento e/ou por PCR e, destas, 43/52 (82,7%) foram positivas por ambas as técnicas.

Tabela 2 - Comparação entre resultados do isolamento viral e da PCR.

	Isolamento viral positivo	Isolamento viral negativo	Total
PCR positivo	43	4	47
PCR negativo	5	253	258
Total	48	257	305

$\chi^2 = 233,72$ e $p < 0,0001$

As 52 amostras urinárias, nas quais a virúria foi detectada por isolamento e/ou PCR, eram de 9 recém-nascidos com diagnóstico de infecção congênita e de 15 lactentes com infecção perinatal por CMV. Foram analisadas pelo menos 2 amostras da urina de cada uma destas crianças.

Comparação da PCR utilizando primers MIE e o isolamento viral. Com base nos números mostrados na Tabela 2, a copositividade entre isolamento viral e PCR foi de 89,6% e a conegatividade de 98,5%. O valor preditivo positivo da PCR para o isolamento viral foi de 91,5% e o valor preditivo negativo de 98%. A concordância entre os dois testes foi de 97%. Observou-se alta associação entre as técnicas ($\chi^2 = 233,72$ e $p < 0,0001$).

Resultados obtidos com os diferentes pares de primers. Em todas as 47 amostras de urina positivas por PCR com os primers MIE, foi possível a amplificação do ADN viral com os primers gB e gH, utilizados isoladamente. Em 11 amostras, nas quais foi realizado um PCR multiplex, ocorreu amplificação de 3 fragmentos distintos do ADN viral, obtidos com os 3 pares

de primers simultaneamente. Produtos genômicos de CMV amplificados com o par de primers MIE estão apresentados na Figura 1 e na Figura 2 os produtos amplificados em PCR multiplex com os primers MIE, gB e gH.

Titulação da amostra do CMV AD169 e análise da sensibilidade da PCR. A detecção da presença viral por PCR utilizando os primers

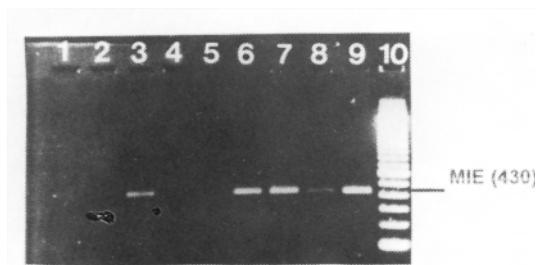


Figura 1 - Gel de eletroforese corado com brometo de etídio mostrando na coluna 1 controle negativo (água deionizada); colunas 2, 4 e 5 amostras de urina negativas; colunas 3, 6, 7 e 8 amostras de urina apresentando fragmento amplificado do ADN de CMV com 430 pares de bases; coluna 9 controle positivo (CMV AD 169); coluna 10 marcador de peso molecular.

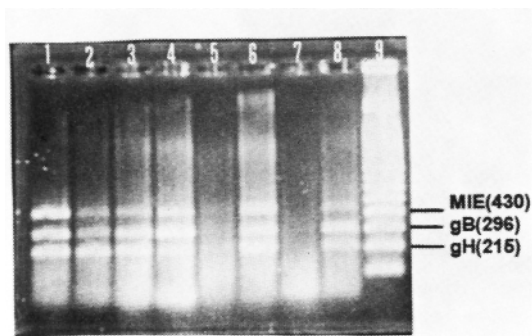


Figura 2 - Gel de eletroforese corado com brometo de etídio mostrando 3 fragmentos amplificados do genoma de CMV com 430, 296 e 215 pares de bases, obtidos pela PCR com o uso simultâneo dos primers MIE, gB e gH, respectivamente. Na coluna 8 encontra-se o controle positivo (CMV AD169) e amostras positivas de urina nas colunas 1, 2, 3, 4, 5 e 6. A coluna 7 corresponde ao controle negativo (água deionizada) e a coluna 9 ao marcador de peso molecular.

MIE e gB, nos testes com as diluições decimais da amostra de CMV AD169, ocorreu até a diluição 1:100 e na PCR com o *primer* gH até a diluição 1:10, conforme mostra a Figura 3.

A amostra do CMV AD169 mostrou título de $10^{3,5}$ TCID₅₀/ml, com base na detecção do efeito citopático. Comparando este resultado com aqueles obtidos por PCR nas diferentes diluições da mesma semente viral (Tabela 3)

observou-se uma sensibilidade 50 vezes maior da PCR com os *primers* MIE e gB o que permitiria detectar a presença viral em amostras com título viral tão baixo quanto $10^{1,8}$ TCID₅₀/ml. Também, observou-se uma sensibilidade 5 vezes maior da PCR com os *primers* gH, sugerindo capacidade para detectar amostras virais com título de $10^{2,8}$ TCID₅₀/ml.

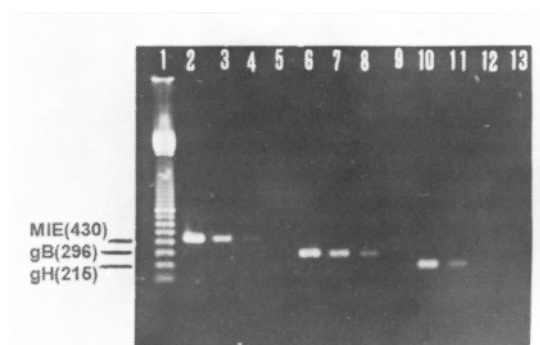


Figura 3 - Gel de agarose mostrando produtos amplificados a partir das diferentes diluições do CMV AD169, com os 3 pares de primers pela PCR. Nas colunas 2 (material puro), 3 (1/10), 4 (1/100) e 5 (1/1000) observa-se os resultados obtidos com os primers MIE, nas colunas 6 (material puro), 7 (1/10), 8 (1/100) e 9 (1/1000) observa-se os resultados obtidos com os primers gB e nas colunas 10 (material puro), 11 (1/10), 12 (1/100) e 13 (1/1000) observa-se os resultados obtidos com os primers gH.

Tabela 3 - Positividade para CMV observada nas diferentes diluições da amostra de CMV AD169 pela inoculação em células (efeito citopático) e pela PCR, avaliando separadamente os três pares de primers.

Diluições da amostra de CMV AD169	Efeito citopático		PCR com Primers MIE		PCR com Primers gB		PCR com Primers gH	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
Não diluído	4	100	4	100	4	100	4	100
1:10	4	100	4	100	4	100	4	100
1:100	0	0	4	100	4	100	0	0
1:1000	0	0	0	0	0	0	0	0

Volume das diluições da semente viral inoculadas nas células: 10µl;

Volume das diluições da semente viral utilizadas na PCR: 2µl.

DISCUSSÃO

É conhecido que crianças com citomegalovirose excretam grandes quantidades de vírus na urina e por períodos prolongados. As quantidades de vírus excretadas costumam ser bem superiores às observadas em adultos

com infecção adquirida²³. A detecção do CMV na urina de recém-nascidos nas 3 primeiras semanas de vida define a infecção congênita^{1 7 23}. Por outro lado, a infecção perinatal é diagnosticada quando crianças em que a virúria era negativa

ao nascimento, passam a apresentá-la entre a 4^a e 12^a semana de vida^{1 15 23}. Assim, a observação da presença viral na urina é a técnica mais comumente utilizada para o diagnóstico dessas infecções.

Método clássico para a detecção de virúria, o isolamento viral, tem seu uso rotineiro dificultado por necessitar recursos laboratoriais dispendiosos que permitam a manutenção de culturas celulares de fibroblastos humanos e por exigir que as amostras de urina sejam colhidas com assepsia rigorosa e inoculadas logo após a coleta, uma vez que os CMV são muito lábeis. Outro inconveniente desta técnica é a demora na obtenção do resultado do exame, uma vez que os CMV são de replicação lenta, podendo levar semanas para o aparecimento do ECP²⁰. A aplicação da PCR no diagnóstico da infecção por CMV apresenta algumas vantagens sobre o isolamento viral. Para o teste utiliza-se volumes diminutos de material (1 a 2µl) e o seu resultado pode ser obtido em menos de 24 horas. Também, as amostras clínicas a serem testadas por PCR podem ser congeladas e armazenadas.

Utilizamos na PCR os *primers* MIE, gB e gH com base em estudos prévios mostrando que estes *primers* amplificam regiões distintas do genoma altamente conservadas nas diversas cepas do vírus e, também, possuem alta especificidade para CMV, não amplificando o ADN de outros herpesvirus^{2 5 8 16 17}.

Analisando os resultados obtidos pela PCR em nosso estudo e sua comparação com os obtidos pelo isolamento viral, observamos associação altamente significativa entre as técnicas ($\chi^2 = 233,72$ e $p < 0,0001$) e resultados comparáveis, com sensibilidade (89,6%), especificidade (98,5%) e valor preditivo positivo (91,5%) adequados. Demmler e colaboradores⁶, utilizando os *primers* MIE, analisaram por PCR urinas de recém-nascidos com infecção congênita e comparando estes resultados com os obtidos pelo isolamento viral, encontraram sensibilidade de 93%, especificidade de 100% e valor preditivo positivo de 100%, valores semelhantes aos observados em nosso estudo.

Apesar de alguns trabalhos, como o de Khan e colaboradores¹², demonstrarem que existem inibidores na urina para a reação da PCR, como a uréia, sabe-se que os recém-nascidos, habitualmente, possuem baixos teores de uréia, lipídios e proteínas urinárias, o que

reduz esta interferência com a ligação dos *primers* e a amplificação do genoma viral. Assim, a metodologia simplificada da PCR que utilizamos neste estudo permitiu realizar teste sem nenhum tratamento prévio com a vantagem de evitar os complexos procedimentos para extração do DNA viral^{5 16 17 21}. Em nosso estudo, observamos 5 amostras com isolamento positivo e PCR negativa. Acreditamos que, nestes casos, a presença de inibidores urinários tenha interferido nos resultados, reduzindo a sensibilidade da PCR. Estas urinas pertenciam a 4 crianças com idade entre 3 a 4 meses e portanto, com teores urinários de uréia superiores aos observados nos recém-nascidos.

Neste trabalho, observamos uma adequada sensibilidade da PCR utilizando os 3 pares de *primers*. Em todos as urinas que tiveram amplificação viral por MIE o teste mostrou-se positivo quando utilizou-se gB ou gH. Também, a adequada sensibilidade da técnica pode ser observada nos experimentos com o CMV AD 169, em que baixos níveis de vírus ($10^{1,8} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$) mostraram-se detectáveis pelos *primers* MIE e gB. Nestes experimentos a sensibilidade de gH mostrou-se 10 vezes inferior (Tabela 3 e Figura 3).

A confirmação dos resultados obtidos na PCR para CMV pode ser realizada através de hibridação com seqüência de nucleotídeos específica para a região do genoma amplificada, marcada com isótopo radioativo ou enzima^{5 22}. Entretanto, tal técnica apesar de ser altamente específica, aumenta a complexidade e o custo do teste. A confirmação da seqüência dos nucleotídeos de CMV obtida por PCR, também pode ser feita por técnica denominada *nested* PCR, em que se produz nova amplificação genômica com o emprego de *primers* internos à seqüência inicialmente amplificada¹⁹. Em nosso estudo, foi possível a confirmação da PCR para CMV utilizando mais de um par de *primers* separadamente ou através de um PCR *multiplex*, em que os diferentes pares de *primers* são usados conjuntamente. Assim na PCR *multiplex*, utilizando 3 pares distintos de *primers*, amplificadores de regiões diferentes do genoma de CMV, conseguimos obter de forma rápida, o resultado característico com a presença de fragmentos de tamanhos diferentes (Figura 2), relacionados especificamente a cada um dos *primers*. Nesta situação, cada produto amplificado corresponde a um controle interno da especificidade dos outros fragmentos detectados no mesmo teste, dispensando

procedimentos posteriores para a confirmação destes produtos⁹.

Portanto, a PCR tem uma grande aplicabilidade, comparável ao isolamento viral no diagnóstico da citomegalovirose, particularmente na infecção congênita e perinatal e o uso simultâneo de mais de um par de *primers* na PCR pode aumentar a especificidade do teste, sua rapidez, praticidade e economia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alford CA, Stagno S, Pass RF. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Reviews of Infectious Diseases* 12:745-752, 1990.
- Barber L, Egan JJ, Lomax J, Yonan N, Deiraniya AK, Turner AJ, Woodcock AA, Fox AJ. Comparative study of three PCR Assays with antigenaemia and serology for the diagnosis of HCMV infection in thoracic transplant recipients. *Journal of Medical Virology* 49:137-144, 1996.
- Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, Horsnell T, Hutchison CA, Kouzarides T, Martignetti JA, Preddie E, Satchwell SC, Tomlinson P, Weston KM, Barrel BG. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Current Topics Microbiology and Immunology* 154:125-169, 1990.
- Chou S. Newer methods for diagnosis of cytomegalovirus infection. *Reviews of Infectious Diseases* 12:727-736, 1990.
- Costa SCB. Citomegalovirus em transplantados renais: Diagnóstico pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e impacto clínico. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1993.
- Demmler GJ. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus diseases. *Reviews of Infectious Diseases* 13:315-329, 1991.
- Demmler GJ. Congenital cytomegalovirus infections. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 5:52-55, 1994.
- Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using Polymerase Chain Reaction DNA amplification. *Journal of Infectious Diseases* 158:1177-1184, 1988.
- Edwards MC, Gibbs RA. Multiplex PCR. *In: Dieffenbach CW, Dveksler GS (eds) PCR Primer a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York p. 157-171, 1995.
- Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC5 cells inoculated with urine specimens by use of low speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *Journal of Clinical Microbiology* 19:917-19, 1984.
- Hawkes RA. General principles underlying laboratory diagnosis of viral infections. *In: Lennette EH, Schmidt NJ (eds) Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, 5th edition, American Public Health Association, New York, p.3-48, 1979.
- Khan G. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *Journal of Clinical Pathology* 44:360-365, 1991.
- Landini MP. New approaches and perspectives in cytomegalovirus diagnosis. *Progress in Medical Virology* 40:157-177, 1993.
- Mocarski Jr ES. Cytomegaloviruses and their replication. *In: Fields BN, Knipe PM (eds) Fields Virology*, 3th edition, Raven Press, New York, p. 2447-2492, 1996.
- Machado CM, Fink MCDS, Vilas Boas LS, Sumita LM, Weinberg A, Shiguematsu K, Souza IC, Casanova LD, Pannuti CS. Infecção perinatal pelo citomegalovirus em hospital público do município de São Paulo: estudo prospectivo. *Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 33:159-166, 1991.
- Olive DM, Mulfi SA, Simsek M, Fayez H, Nakib WA. Direct detection of human cytomegalovirus in urine specimens from renal transplant patients following polymerase chain reaction amplification. *Journal of Medical Virology* 29:232-237, 1989.
- Olive DM, Simsek M, Al-Mufti S. Polymerase Chain Reaction Assay for detection of human cytomegalovirus. *Journal of Clinical Microbiology* 27:1238-1242, 1989.
- Pannuti CS, Vilas-Boas LS, Angelo MJO, Carvalho RPS, Segre CM. Congenital cytomegalovirus infection. Occurrence in two socioeconomically distinct populations of a developing country. *Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo* 27:105-107, 1985.
- Porter-Jordan K, Rosenberg EI, Keiser JF, Gross JD, Ross AM, Nasim S, Garrett CT. Nested Polymerase Chain Reaction Assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA. *Journal of Medical Virology* 30:85-91, 1990.

20. Reynolds DW, Stagno S, Alford CA. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infections. *In*: Lennette EH, Schmidt NJ (eds) *Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, 5o edition, American Public Health Association, New York, p.3-48, 1979.
21. Smith KL, Dunstan RA. PCR detection of cytomegalovirus: a review. *British Journal of Haematology* 84:187-190, 1993.
22. Spector S, Ruz JA, Spector DH, McMillan R. Detection of human cytomegalovirus in clinical specimens by DNA-DNA hybridization. *Journal of Infectious Diseases* 150: 121-126, 1984.
23. Stagno S, Pass RF. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Seminars in Perinatology* 7:31-42, 1983.