

Detección de ADN de CMV en plasma mediante PCR en tiempo real utilizando SYBR-Green I como señal de amplificación

Eduardo Varela-Ledo^a, Susana Romero-Yuste^b, Patricia Ordóñez-Barbosa^a, Patricia Romero-Jung^a, Elisabeth Prieto-Rodríguez^a, Antonio Aguilera-Guirao^a y Benito Regueiro-García^a

^aServicio de Microbiología. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. ^bServicio de Reumatología. Complejo Hospitalario de Pontevedra. España.

OBJETIVO. El objetivo del presente estudio es evaluar una técnica rápida y sencilla de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real en LightCycler 2.0 revelada con SYBR-Green I, comparándola con otra técnica de PCR en tiempo real que utiliza sondas FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) para revelar la amplificación.

MÉTODOS. Los dos métodos de PCR en tiempo real se compararon utilizando muestras de plasma de pacientes inmunodeprimidos con sospecha clínica de enfermedad por citomegalovirus (CMV), de pacientes monitorizados sin sintomatología, y de adultos sanos. El estudio se completó con otras muestras de plasma congeladas de casos positivos por antigenemia pp65, y con ADN de CMV de la cepa Towne (ATCC VR-977) obtenido de cultivo en MRC-5, con el que elaboramos una curva estándar para su cuantificación.

RESULTADOS. La PCR revelada con SYBR-Green I resultó ser claramente la más rentable por su alta sensibilidad, rapidez y sencilla realización, además de su bajo coste.

CONCLUSIÓN. La determinación cuantitativa de ADN de CMV en plasma utilizando un método sensible, rápido y de bajo coste, como el que proponemos, supone una clara ventaja para el diagnóstico y seguimiento de estos cuadros, especialmente en hospitales como el nuestro, donde en los últimos años se ha incrementado sensiblemente el número de pacientes susceptibles de padecer esta infección oportunista.

Palabras clave: Citomegalovirus. LightCycler. PCR en tiempo real.

CMV DNA detection in plasma using real-time PCR based on the SYBR-Green I dye method

OBJECTIVE. The aim of this study is to assess a real-time PCR technique on the LightCycler 2.0 with SYBR-Green I

Correspondencia: Dr. E. Varela-Ledo.
Hospital de Conxo. C.H.U.S.
Ramón Baltar, s/n. 15706 Santiago de Compostela. A Coruña. España.
Correo electrónico: eduardo.varela.ledo@sergas.es

Manuscrito recibido el 15-3-2006; aceptado el 1-6-2006.

detection as compared to another real-time PCR method based on detection with FRET (fluorescence resonance energy transfer) probes for the quantification of CMV DNA.

METHODS. The two real-time PCR methods were used to test plasma samples from immunocompromised patients with clinically suspected CMV disease, patients under follow-up without symptoms, and healthy adults.

A standard curve for quantitative analysis by the SYBR-Green I method was performed with 10-fold diluted solutions of DNA from the CMV Towne strain (ATCC VR-977) cultured in MRC-5 monolayer. In addition, frozen samples from patients positive for CMV pp65 antigenemia were also analyzed and results compared using the two real time PCR methods.

RESULTS. The real-time PCR technique using SYBR-Green I on the LightCycler 2.0 was a highly specific, fast, simple and reliable test to quantify CMV; moreover, it was cost-effective.

CONCLUSION. Quantification of CMV DNA in plasma using this sensitive, fast, low-cost method was advantageous for the diagnosis and follow up of patients with opportunistic CMV infection, which are increasingly more frequent in our daily hospital clinical practice.

Key words: Cytomegalovirus. LightCycler. Real-time PCR.

Introducción

El citomegalovirus (CMV) puede ser responsable de graves complicaciones infecciosas que comprometen la vida de pacientes con inmunosupresión severa. Siguiendo a una infección primaria o reactivándose desde su estado de latencia, puede provocar enfermedad multisistémica o cuadros localizados en distintos órganos, y con frecuencia, su actividad asocia un incremento de infecciones bacterianas y fúngicas o la aparición de rechazo en pacientes con órgano trasplantado¹.

La viremia que sigue a la infección activa por CMV² supone el mayor factor de riesgo para la progresión a enfermedad³, especialmente en pacientes con trasplante alogénico de médula ósea³⁻⁵. En cambio en el trasplante de órgano sólido y en la infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) la presencia de viremia es en menor

medida predictiva de enfermedad⁶⁻⁹. De hecho, el CMV puede ser detectado en plasma con baja carga viral en un número importante de pacientes con infección asintomática que nunca progresó a enfermedad^{10,11}.

Aunque la profilaxis antiviral puede reducir tanto la morbilidad como la mortalidad por CMV, la toxicidad de los agentes antivirales como ganciclovir, foscarnet y cidofovir continúa siendo un problema importante.

El desarrollo de métodos altamente sensibles para detectar y cuantificar la carga de CMV en sangre o plasma puede ser de gran ayuda para la indicación de la terapia temprana^{5,12,13} sólo en aquellos pacientes con mayor o verdadero riesgo de padecer la enfermedad.

La antigenemia pp65 demostró durante años ser de gran utilidad para el control de estos pacientes, pero supone una técnica muy laboriosa que requiere de cierta experiencia, su interpretación es relativamente subjetiva y el procesamiento de las muestras no puede demorarse demasiado. Además, resulta inadecuada para algunos pacientes que pueden presentar leucopenia¹⁴.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real es un método muy sensible y capaz de cuantificar el ADN viral en plasma más precozmente que la antigenemia^{15,16}, que no se afecta por el retraso de 24 h en la separación del plasma¹⁷ y que permite obtener los resultados de múltiples muestras en breve tiempo, al realizar simultáneamente la amplificación y detección del producto, evitando así manipulaciones post-PCR¹⁸.

Existen múltiples ensayos de PCR en tiempo real para CMV basados en sistemas de sondas FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) que, si bien suponen un método específico de detección, tienen la desventaja de su mayor coste y manipulación con respecto a la PCR revelada con SYBR-Green I.

Nosotros proponemos un sistema de PCR en tiempo real rápido, sensible, de bajo coste y de sencilla realización para detección de CMV en muestras de plasma, usando SYBR-Green I como marcador de la amplificación.

Materiales y métodos

Muestras

Para comparar las dos técnicas de PCR en tiempo real seleccionamos 4 grupos de muestras clínicas y utilizamos ADN de CMV obtenido de cultivos en MRC-5.

El primer grupo incluyó 53 muestras pertenecientes a 32 pacientes con sospecha clínica de enfermedad por CMV de los que 8 eran portadores de trasplante renal, 8 de trasplante alogénico de médula ósea y 7 de hígado; 3 eran VIH positivos, 3 procedían del servicio de oncopediatría, otros 2 de neonatología, y uno de digestivo.

El segundo grupo estaba formado por 14 alícuotas de plasma congeladas de muestras con resultado positivo por antigenemia pp65.

Posteriormente añadimos un tercer grupo de 50 muestras de 27 pacientes asintomáticos sometidos a monitorización: de los que 11 eran trasplantados de riñón, 8 de médula ósea, 4 de hígado y 4 de oncopediatría. Y finalmente, incluimos un cuarto grupo de 5 muestras de adultos sanos.

Extracción de ADN

Un total de 300 µl de plasma de cada muestra se procesan para extracción TNNAI (*total nucleic acid isolation*) mediante el sistema automático COBAS AmpliPrep (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, EE.UU., y Roche Diagnostics [SchWeiz] Rotkreuz, Suiza)

siguiendo las indicaciones del fabricante. La solución sobrante de ADN que no se utiliza en la PCR se almacena a -20 °C para posteriores ensayos.

PCR en LightCycler 2.0

Revelada con SYBR-Green I

La mezcla de reacción, en 15 µl, incluye: MgCl₂ 4 mM; 0,2 µM (concentración final) de cada uno de los *primers* (Invitrogen, Paisley, Escocia) que reconocen una región del gen de *pp65*¹⁹ y 2 µl de LC-FastStart DNA Master SYBR-Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). A esta mezcla añadimos 5 µl del ADN obtenido en el proceso de extracción, completando un volumen total de 20 µl para cada capilar de reacción. Los capilares se alojan en el cárretero del LightCycler 2.0 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) tras una breve centrifugación a 3.000 rpm y se pone en marcha el siguiente programa: 10 min de preincubación a 95 °C, seguidos de 50 ciclos de 2 s de desnaturación a 95 °C, 10 s de hibridación a 60 °C y 15 s de elongación a 72 °C. La medición de la señal de fluorescencia se efectúa durante la fase de extensión en modo *single* a 530 nm.

Al finalizar la amplificación se efectúa un análisis de las curvas de disociación del producto de amplificación aumentando la temperatura a razón de 0,1 °C/s desde 65 hasta 95 °C mientras se registra la señal de fluorescencia a 530 nm en modo continuo.

Sondas FRET

Un total de 5 µl del ADN extraído de las muestras de plasma se añaden a 15 µl de mezcla de reacción: con MgCl₂ 4 mM, 0,66 µM de cada *primer* para una región del gen de la glucoproteína B y 0,4 µM de las sondas marcadas con LC-Red 640 y fluoresceína (TIB MOLBIOL, Berlín, Alemania)²⁰, más 2 µl de LightCyclerFastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). El protocolo de amplificación fue el siguiente: 10 min a 95 °C de preincubación para la activación de la Fast Start taq DNA polimerasa, seguidos de 55 ciclos de 5 s de desnaturación a 95 °C, 15 s de hibridación a 57 °C y 13 s de elongación a 72 °C. La fluorescencia se mide en modo *single* a 640 nm durante la fase de hibridación. La *melting curve* se hace desde 40 °C hasta 85 °C, subiendo la temperatura a 0,1 °C/s y monitorizando la señal en modo continuo a 640 nm.

Cuantificación

El set de TIB MOLBIOL se complementa con un estándar de cuantificación que se obtiene mediante clonación del producto de PCR con TA cloning system (Invitrogen K2000-01) y que alcanza una concentración de 10⁹ copias/ml. La amplificación de una serie de diluciones 1:10 del concentrado inicial permite elaborar una curva de referencia para cuantificación mediante el Software 4.0 (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Alemania) del LightCycler 2.0.

De cada una de las diluciones preparadas se guardan alícuotas a -80 °C para utilizar en posteriores análisis.

Cultivo de CMV

Con objeto de comprobar los límites de detección y la correlación entre ambos sistemas de PCR, preparamos un cultivo de la cepa Towne de CMV ATCC VR-977 (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU.) en monocapas de células MRC-5 (VIRCELL, Granada, España), mantenidas en botellas de 25 cm² con EMEM suplementado con suero bovino fetal (SBF) 10% y L-glutamina 1%. Cuando el efecto citopático se había generalizado a toda la monocapa, las células se recogieron en suspensión en el medio de cultivo desprendiéndolas del fondo de la botella con una pipeta estéril. De esta suspensión celular concentrada se realizó extracción de ADN mediante el DNA Mini Kit de QIAGEN (Hilden, Alemania).

Con el ADN obtenido preparamos diluciones seriadas 1:10 de las que se guardaron alícuotas a -80 °C y se realizó un ensayo de cuantificación mediante el sistema de sondas FRET de TIB MOLBIOL, que

nos permitió obtener una gráfica estándar de referencia para cuantificación con SYBR-Green I (fig. 1).

Primers y sondas

	Dirección 5'-3'	Tamaño del producto	Tm
gB For:	ATAggAggCgCCACgTATT		57,6 °C
gB Rev:	TACCCCTATCgCgTgTgTTC	254 bp	57,1 °C
gB-FL:	CgTTTCgTAgCTACgCTTACAT-FL		62,0 °C
gB-LC:	LC-640-ACACCACTTATCTgCTgggCAGC-p		62,2 °C
pp65 For:	gACACAAACACCgTAAAGC		43 °C
pp65Rev:	CAgCgTTCgTgTTTCC	278 bp	41 °C

Antigenemia pp65

En nuestro laboratorio utilizamos una técnica de inmunoperoxidasa para la detección de Ag temprano de CMV en leucocitos polimorfonucleares (PMN) de sangre periférica: CMV-vue (DiaSorin. Minnesota, EE.UU.). Los leucocitos se separan con dextrano al 5%, se lisan los hematíes, y se lavan dos veces con tampón fosfato (PBS). Una vez ajustada la concentración a 2×10^6 céls./ml, se fijan por duplicado en un portaobjetos con controles + y -, y se sigue la tinción con inmunoperoxidasa según las recomendaciones del fabricante. El resultado lo expresamos en número de células positivas/ 10^5 .

Resultados

El ADN de CMV obtenido del cultivo en células MRC-5 se cuantificó mediante el set de TIB MOLBIOL²⁰, y con él preparamos una serie de diluciones desde 10^{10} hasta 10^2 copias/ml que se amplificaron en LightCycler con FastStart DNA Master SYBR-Green I en repetidas ocasiones. La dilución con 10^3 copias/ml presenta el inicio de su señal de amplificación próxima al ciclo 45. El límite de detección de la técnica con el inóculo de 5 μ l estaría alrededor de las 200 copias/ml, más que suficiente si tenemos en

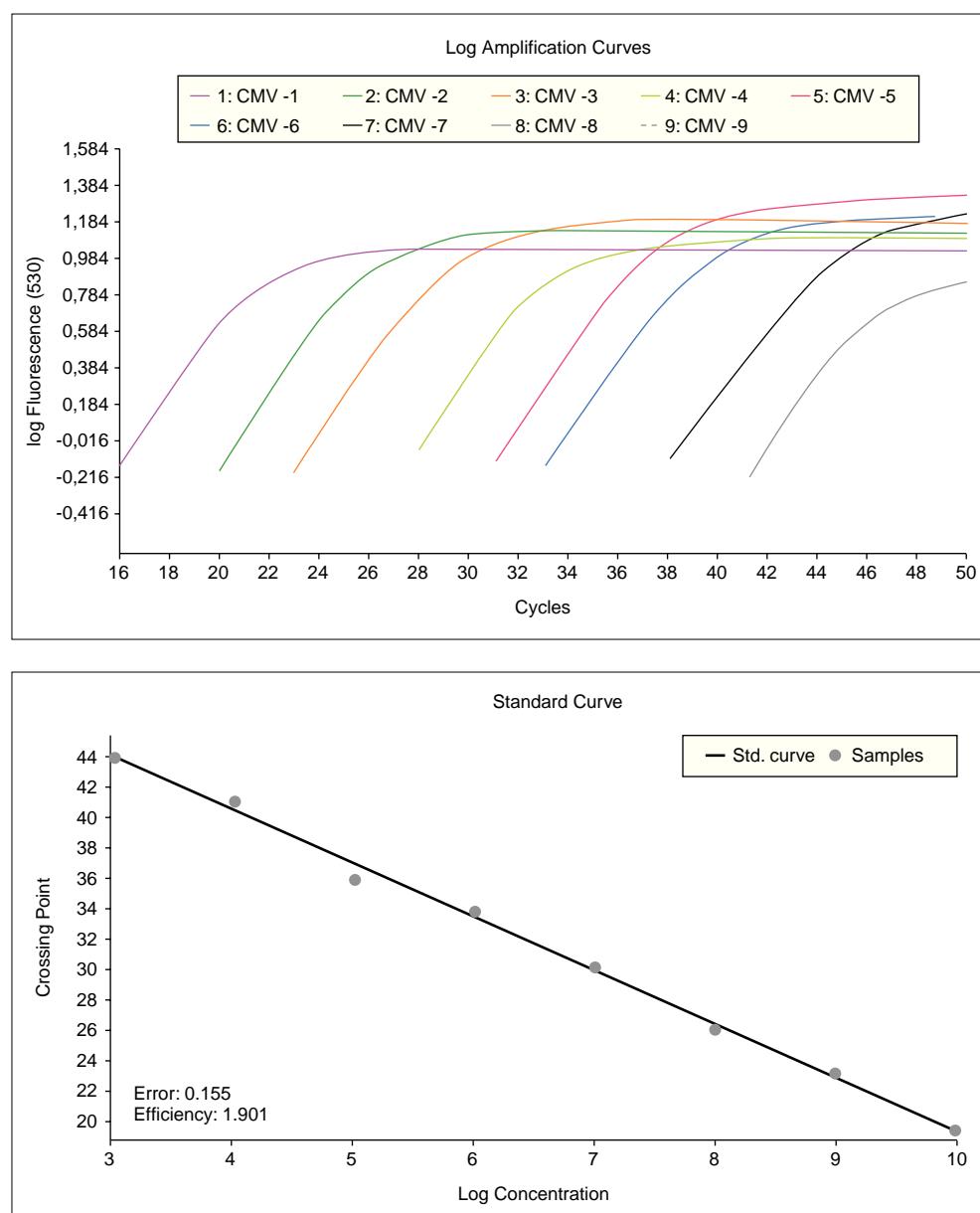


Figura 1. Gráfica y curvas estándar de referencia para cuantificación con SYBR-Green I.

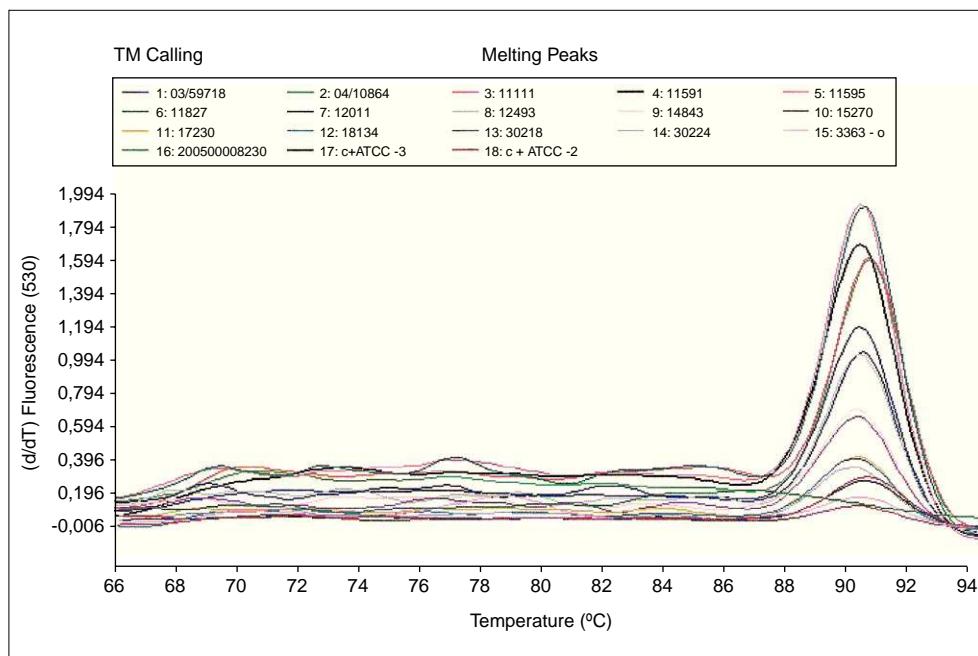


Figura 2. “Melting peaks” que muestran los productos de amplificación con SYBR-Green I de algunas de las muestras clínicas positivas para CMV.

cuenta la mayoría de los puntos de corte propuestos para el inicio de la terapia antiviral^{20,21}.

El análisis de las curvas de disociación de los productos nos permite distinguir las verdaderas señales de amplificación de la secuencia buscada en el gen *pp65*, de aquéllas debidas a dímeros de *primers* o a amplificaciones inespecíficas que a veces se observan con algunas muestras clínicas cuando se revelan con SYBR-Green I: las muestras positivas presentan una *melting curve* muy bien definida, con un pico próximo a 90-91 °C, mientras que las debidas a señales inespecíficas de amplificación están siempre por debajo de esta temperatura (fig. 2).

Los valores positivos obtenidos con las muestras clínicas oscilaron entre las 5×10^6 copias/ml y próximos a las 200 copias/ml, que supone el límite teórico de detección. En el primer grupo de 53 muestras, se detectaron 26 positivos en total (23 con sondas FRET y 24 con SYBR-Green I) con 5 casos discrepantes (2 a favor de sondas FRET y 3 a favor de SYBR-Green I) en todos los cuales la carga viral era muy baja. El seguimiento de ellos permitió confirmar su positividad al observarse incrementos en la carga de muestras posteriores.

La cuantificación mediante SYBR-Green I aproximó los valores a los obtenidos con las sondas FRET, especialmente en aquellas muestras con 10^4 copias/ml o más, que son los valores con los que casi siempre se correlacionan la actividad viral y los diferentes cuadros clínicos²⁰⁻²⁴. Igualmente, la disminución de la carga postratamiento se pudo seguir de manera equivalente con ambas técnicas.

Las 14 muestras positivas para antigenemia *pp65* lo fueron también por ambos sistemas de PCR a tiempo real, mostrando una buena correlación entre la carga viral obtenida y el número de células *pp65* positivas.

De las 50 muestras de pacientes en monitorización, en seis se amplificó ADN de CMV por ambos métodos de PCR: cuatro de ellas eran de 2 mujeres con trasplante alógénico de médula ósea, una de las cuales presentaba una carga viral inferior a 500 copias/ml, que se mantuvo du-

rante una semana postratamiento para desaparecer al cabo de 10 días. En la otra paciente, la cuantificación alcanzó los 3×10^6 copias/ml, coincidiendo con un cuadro de neumonitis intersticial, y descendió hasta $1,5 - 2 \times 10^5$ copias/ml (FRET y SYBR-Green I, respectivamente) a los 8 días del tratamiento con ganciclovir. Las otras 2 muestras positivas pertenecían a 2 pacientes con trasplante renal asintomáticos, ambos con menos de 500 copias/ml, que en las determinaciones posteriores se negativizaron sin recibir tratamiento.

Las 5 muestras de adultos sanos fueron negativas con ambas técnicas.

Discusión

El creciente aumento de pacientes con cuadros de inmunosupresión y el número de muestras, cada vez mayor, que se reciben en el laboratorio para detectar ADN de CMV, hacen necesaria la utilización de métodos de diagnóstico ágiles, que se puedan incluir en la rutina de trabajo diaria. Disponer de una técnica rápida, sensible, de bajo coste y que exige una manipulación mínima, representa un claro beneficio a la hora de organizar esta rutina del servicio, disminuyendo posibles errores técnicos y acortando la demora en la emisión de informes, que en algunas ocasiones se solicitan con máxima urgencia.

La PCR en tiempo real revelada con SYBR-Green I reúne todas estas condiciones, a nuestro juicio, mejor que otras técnicas de diagnóstico para CMV: en nuestros ensayos, se muestra al menos tan sensible como las sondas FRET y obtenemos valores cuantitativos muy similares.

En la PCR revelada con SYBR-Green I utilizamos *primers* para la región UL83 que codifica la proteína de matriz *pp65*¹⁹ en lugar que los de gB del *set* de TIB MOL-BIOL (Ikewaki et al²⁵ observan en algunos pacientes una tendencia a detectar menor carga viral de CMV con *primers* para gB que con otros para US17 y UL65). La ampli-

ficación de un segmento de mayor tamaño con nuestros *primers*, nos permite obtener un *melting peak* a mayor temperatura, confiriendo más especificidad a la técnica.

Al no necesitar sondas marcadas se simplifica la preparación de las mezclas, y se evitan problemas de almacenamiento y/o disponibilidad de reactivos además de reducir el coste²⁶. (La PCR a tiempo real con SYBR-Green I podría resultar incluso más barata que la antigenemia pp65 dependiendo del método de extracción de ADN que se utilice).

Para la mayoría de las muestras que recibimos, un método de cribado sensible que permita descartar los casos negativos sería suficiente, pero la PCR en tiempo real con SYBR-Green I puede ser útil también para aproximar la carga viral y establecer una mejor correlación entre el diagnóstico de laboratorio y el cuadro clínico²⁰⁻²⁴.

Como inconvenientes cabe citar la posible aparición de señales inespecíficas de amplificación con algunas muestras y la falta de un control interno que permita poner de relieve la presencia de inhibidores de la reacción. No obstante, la inhibición total de la amplificación con muestras de plasma o suero es muy infrecuente: en nuestro laboratorio no ocurrió en ningún caso después de amplificar más de 300 muestras de plasma y suero con el kit CMV Monitor AMPLICOR (Roche. Branchburg, Nueva Jersey, EE.UU.) que incluye un control interno de amplificación) y en último caso, la inhibición parcial no impide la detección cualitativa²⁷, permitiendo al menos realizar el seguimiento del paciente dependiendo de su cuadro clínico.

En cuanto a las señales inespecíficas de amplificación, el análisis final de las curvas de disociación nos permite distinguir los productos obtenidos de la secuencia de CMV de aquellos debidos a dimeros de *primers* u otras secuencias que, de presentarse, suelen hacerlo iniciando su curva de amplificación en los últimos ciclos.

Financiación

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto: PGI-DIT03BTF91802PR de la Xunta de Galicia.

Bibliografía

1. Caliendo AM, Kirsten St. George, Allega J, Bullota AC, Gilbane L., Rinaldo CR. Distinguishing Cytomegalovirus (CMV) Infection and Disease with CMV Nucleic Acid Assays. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1591-86.
2. Saltzman RL, Quirk MR, Jordan MC. High levels of circulating Cytomegalovirus DNA reflect visceral organ disease in viremic immunosuppressed Patients other than marrow recipients. *J Clin Invest.* 1992;90:1832-8.
3. Meyers JC, Ljungman P, Fisher LD. Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: importance of cytomegalovirus viremia. *J Infect Dis.* 1990;162:373-80.
4. Haake EHR, Weisdorf D, Ramsay N, McGlave P, Kersey J, Thomas W, et al. Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation. Risk factors and response to therapy. *Transplantation.* 1993;55:1339-46.
5. Schmidt GM, Hoak DA, Niland JC, Duncan SR, Forman SJ, Zaia JA. A randomized, controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogenic bone marrow transplants. The City of Hope-Stanford-Syntex CMV Study Group. *N Engl J Med.* 1991;324: 1005-111.
6. Falagas M, Snydman DR, Ruthazer R, Werner BG, Griffith J, and The Boston Center for Liver Transplantation CMVIG Study Group. Surveillance of blood, urine, and throat specimens are not valuable for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 1997;24: 824-9.
7. Gerard J, Leport C, Flandre P, Houhou N, D. Salmon-Cer JM, Mandet PC, et al. Cytomegalovirus (CMV) viremia and the CD4+ lymphocyte count as predictors of CMV disease in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 1997;24:836-40.
8. Wetherill PE, Landry ML, Alcabe P, Friedland G. Use of a quantitative cytomegalovirus (CMV) antigenemia test in evaluating HIV+ patients with and without CMV disease. *J Acquired Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1996;12:33-7.
9. Zurlo J, O'Neill D, Polis MA, Manischewitz J, Yarchoan R, Baseler M, et al. Lack of clinical utility of cytomegalovirus blood and urine cultures with HIV infection. *Ann Intern Med.* 1993;118:12-7.
10. Boeckh M, Hawkins G, Myerson D, Zaia J, Bowden RA. Plasma PCR for cytomegalovirus DNA after allogenic marrow transplantation: comparison with PCR using peripheral blood leukocytes, pp65 antigenemia, and viral culture. *Transplantation.* 1997;64:108-13.
11. Vlieger AM, Boland GJ, Jiwa NM, De Weger RA, Willemze, De Gast GC, et al. Cytomegalovirus antigenemia assay or PCR can be used to monitor ganciclovir treatment in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 1992;9:247-53.
12. Goodrich JM, Mori M, Gleaves CA, Du Mond C, Cays M, Ebeling DF, et al. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus diseases after allogeneic bone marrow transplant. *N Engl J Med.* 1991;325:1601-7.
13. Rubin RH. Preemptive therapy in immunocompromised hosts. *N Engl J Med.* 1991;324:1057-9.
14. Kalpoe JS, Kroes AC, De Jong MD, Schinkel J, De Brouwer CS, Beersma MF, et al. Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1498-504.
15. Ikewaki J, Ohtsuka E, Kawano R, Ogata M, Kikuchi H, Nasu M. Real-Time PCR assay compared to nested PCR and antigenemia assays for detecting cytomegalovirus reactivation in adult T-cell leukemia-lymphoma patients. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4382-7.
16. Gouarin S, Vabret A, Gault E, Petitjean J, Regeasse A, Hurault de Ligny B, et al. Quantitative analysis of HCMV DNA load in whole blood of renal patients using real-timePCR assay. *J Clin Virol.* 2004;29:194-201.
17. Nesbitt SE, Cook L, Jerome KR. Cytomegalovirus quantitation by Real-Time PCR is unaffected by delayed separation of plasma from whole blood. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1296-7.
18. Foy CA, Parkes HC. Emerging Homogeneous DNA-based Technologies in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry.* 2001;47:990-1000.
19. Stöcher M, Leb V, Bozic M, Kessler HH, Halwachs-Baumann G, Landt O, et al. Parallel detection of human herpes virus DNAs by a set of real-time polymerase chain reactions in a single run. *J Clin Virol.* 2003;26:85-93.
20. Lars S, Kockelkorn P, Ritter K, Kleines M. Detection of CMV DNA in Human Specimens by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4006-9.
21. Li H, Dummer JS, Estes WR, Meng S, Wright PF, Yi-Wei T. Measurement of Human Cytomegalovirus Loads by Quantitative Real-Time PCR for Monitoring Clinical Intervention in Transplant Recipients. *J Clin Microbiol.* 2003;41:187-91.
22. Bowen EF, Sabin CA, Wilson P, Griffiths PD, Davey CC, Johnson MA, et al. Cytomegalovirus viraemia detected by polymerase chain reaction identifies a group of HIV-positive patients at high risk of CMV disease. *Aids.* 1997;11:889-93.
23. Gerna G, Furione M, Baldanti F, Sarasini A. Comparative quantitation of human cytomegalovirus DNA in blood leukocytes and plasma of transplant and AIDS patients. *J Clin Microbiol.* 1994;32:2709-17.
24. The TH, Van der Ploeg M, Van den Berg AP, Vlieger AM, Van der Giessen M, Van Son WJ. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes – a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation.* 1992;54:193-8.
25. Ikewaki J, Ohtsuka E, Satou T, Kawano R, Ogata M, Kikuchi H, et al. Real-Time PCR assays based on distinct genomic regions for CMV reactivation following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2005;35:403-10.
26. Aldea C, Alvarez CP, Folgueira L, Delgado R, Otero JR. Rapid detection of HSV DNA in Genital Ulcers by Real-Time PCR using SYBR-Green I Dye as the Detection Signal. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1060-2.
27. Stocher M, Berg J. Normalized Quantification of Human Cytomegalovirus DNA by Competitive Real-Time PCR on the LightCycler Instrument. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4547-53.