

# Sitomegalovirusun neden olduğu enfeksiyonlarda tanısal yaklaşımlar ve sorunlar

Yasemin Özsürekci<sup>1,\*</sup>, Eda Karadağ Öncel<sup>1</sup>, Mehmet Ceyhan<sup>2</sup>

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi <sup>1</sup>Pediyatri Uzmanı, <sup>2</sup>Pediyatri Profesörü

\*İletişim: yas.oguz99@yahoo.com

**SUMMARY:** Özsürekci Y, Karadağ Öncel E, Ceyhan M. (Department of Pediatrics, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey). Diagnostic approaches and problems of infections caused by cytomegalovirus. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2016; 59: 182-187.

Cytomegalovirus (CMV) is a ubiquitous pathogen that establishes a lifelong asymptomatic infection in healthy individuals. Infection of immunosuppressed individuals causes serious illness. Patients with solid organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation and AIDS are highly susceptible to CMV infection leading to life threatening end organ disease. In addition, in these groups, CMV causes acute and latent infection and also reactivation may occur in immunosuppressed conditions. Another vulnerable population is the developing fetus in utero, where congenital infection can result in surviving newborns with long-term developmental problems. Therefore an accurate and reliable diagnosis of a CMV infection will provide the best and appropriate management of the infection and will decrease the morbidity and mortality of the disease. The most frequently used method for diagnosis of the virus in clinical practice is the serological and molecular exposure of the viral antigens and DNA in the blood, plasma or the affected tissues. The latent and reactivating nature of the infection causes a main problem in the diagnosis of CVM; the evaluation of the laboratory tests is a problem since CMV DNA and CMV antigens might be detected in some patient with no active diseases. Therefore, diagnostic investigations are only of limited use regarding the distinction of CMV infection and disease especially in patients with immune deficiency. For these reasons, the purpose of this study is to develop a test capable of rapidly and correctly diagnosing CMV infections, which are able to detect the active infection and are also able to provide a completely virus focused, correct result as well.

*Key words:* CMV infection, diagnostic challenge.

**ÖZET:** Sitomegalovirus (CMV), dünyada yaygın olarak görülen ve sağlıklı bireylerde yaşam boyu asemptomatik enfeksiyon oluşturan bir patojendir. Bağışıklığı baskılanmış kişilerde ise CMV enfeksiyonu ciddi hastalıklara neden olmaktadır. Solid organ transplantasyonu, hematopoetik kök hücre transplantasyonu yapılan hastalarda ve edinsel immün yetmezlik sendromlu (AIDS) hastalarda yaşamı tehdit eden organ tutulumlarına neden olmaktadır. Bu hastalar gibi immün yetmezlikle giden hastalıklarda CMV akut ve latent enfeksiyona ayrıca reaktivasyonlara neden olabilmektedir. Diğer bir savunmasız popülasyon olan anne karnında gelişmekte olan fetusda ise enfeksiyon geliştiğinde uzun dönemde gelişimsel sorunlara neden olan konjenital anomalilerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle CMV enfeksiyonunun tanısının doğru ve güvenilir bir şekilde konulması enfeksiyonun yönetiminin en hızlı ve en uygun şekilde yapılmasını sağlayacak ve hastalığın morbidite ve mortalitesini azaltacaktır. Tanı için bugüne kadar klinik pratikte en sık kullanılan yöntemler virusun, viral antijenlerinin veya deoksiribonükleik asitin (DNA), kanda, plazma veya etkilenen dokularda serolojik ve moleküler olarak gösterilmesidir. Enfeksiyonun latent kalma veya reaktive olma doğası nedeniyle CMV hastalığının tanısındaki en temel sorun virusun, CMV DNA ve CMV antijenlerinin aktif hastalığı olmayan bazı hastalarda da tespit edilebilmesi nedeniyle mevcut laboratuvar testlerinin yorumlanmasıdır. Bu

nedenle bu tanısal incelemelerin özellikle immün yetmezlikli hastalarda CMV enfeksiyonu ve hastalığını ayırmadaki yararı sınırlıdır. Bu çalışmanın amacı CMV enfeksiyonlarının hızlı ve doğru tanısında kullanılacak, aktif enfeksiyonu tanıyabilen ve kısa bir sürede tamamen virus odaklı en doğru sonucu verebilecek bir testin geliştirilmesidir.

*Anahtar kelimeler: CMV enfeksiyon, tanısal zorluklar.*

Sitomegalovirus (CMV) *Herpesviridae* virus ailesinin en geniş üyesi olup hemen tüm insanları hayatlarının bir döneminde enfekte etmektedir.<sup>1</sup> Bağışıklık sistemi normal olan kişilerde nadiren ciddi hastalığa neden olmakta, ancak solid organ transplant alıcıları, hematopoetik kök hücre alıcıları, insan immün yetmezlik virusu (HIV) ile enfekte kişiler veya immünomodülatör ilaç alan kişiler gibi bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde çok önemli hastalıklara yol açar. Bu kişilerde CMV'ye bağlı klinik hastalıklar febril sendrom, hepatit, pnömoni, retinit, ensefalit, ösefajit ve kolit gibi oldukça geniş bir hastalık spektrumuna neden olarak önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. Ayrıca primer enfeksiyondan sonra CMV latent kalıp yıllar sonra, özellikle immün sistem baskılandığında yeniden aktive olup yine yukarıda belirtilen organların tutulumlarına neden olabilmektedir.<sup>2,3</sup> Ayrıca insanları etkileyen en önemli konjenital viral enfeksiyonlardan biri olup, çocuklarda genetik olmayan sensörinöral işitme kayıplarının en sık nedeni konjenital CMV enfeksiyonudur.<sup>4</sup>

CMV enfeksiyonu ve hastalığı eş anlamlı kelimeler olmayıp CMV ile enfekte bir kişi hayatı boyunca klinik hastalığı hiç geliştirmeyebilir. CMV enfeksiyonunda hiçbir belirti ve bulgu olmaksızın CMV replikasyonu vardır. CMV ile latent olarak enfekte olan hücreler virus-spesifik antijenini yayarlar ve tipik sitomegali veya sitopatik etki göstermeden viral nükleik asitleri taşırlar.<sup>5</sup> CMV hastalığında ise ateş, halsizlik, lökopeni ve trombositopeni gibi CMV enfeksiyonunu düşündüren belirti ve bulgular veya invazif doku hastalığı kanıtı vardır.<sup>6,7</sup> Farklı hastalık gruplarında görülen CMV hastalık tipleri de farklıdır, ancak tanısal yaklaşımlar aynıdır. CMV hastalığının tanısı, özellikle immünsüprese hastalarda çok önemli olup, öykü ve laboratuvar incelemeleriyle birlikte klinik bulgularına dayanmaktadır. Tanıda seroloji, kalitatif ve kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), pp65 antijenemi,

kültür ve histopatoloji gibi tanısal yaklaşımlar kullanılmaktadır.<sup>1,8-10</sup> Ancak buradaki en temel sorun virusun, CMV DNA ve CMV antijenlerinin aktif hastalığı olmayan bazı hastalarda da tespit edilebilmesi nedeniyle laboratuvar bulgularının yorumlanmasıdır. Çünkü CMV'nin her yerde yaygın bulunması, asemptomatik viral atılım oranının yüksek olması, enfeksiyonların reaktivasyon sıklığı, bazen reaktivasyon atakları sırasında IgM tipi CMV spesifik antikorların gelişmesi ve aynı anda diğer patojenlerle enfeksiyonun sık olması gibi özellikler, CMV hastalığının tanısını zorlaştırmaktadır.

### Serolojik testler

Serolojik testlerin kullanımının klinikte iki ana nedeni olup, bunlardan biri primer enfeksiyona eğilimin değerlendirilmesi, diğeri ise kanın test edilmesidir. Serokonversiyon (seronegatiften seropozitive dönme) primer CMV enfeksiyonunun tanısında güvenilir bir yöntem olmaya devam etmekte, ancak genellikle sadece transplant hastaları gibi transplant öncesi ve sonrası enfeksiyon durumlarına ulaşılabilen ve yakın izlenen hastalarda uygulanabilmektedir. CMV antikor ölçüm yöntemlerinin doğru, hızlı ve etkin olması çok önemlidir. Geleneksel yöntemler bu gereksinimlerin tümünü karşılamamasına rağmen seropozitiviteyi tespit edebilme özellikleri nedeniyle oldukça kıymetli incelemelerdir.<sup>11</sup>

Serolojik testler hastalık sırasında farklı zaman dilimlerindeki antikor titrelerindeki değişikliklere bağlı olarak şu anki veya daha önceki CMV enfeksiyonunu dolaylı olarak göstermektedir. Bu testler anti-CMV IgM ve IgG varlığını ölçme mantığıyla çalışmaktadırlar. Serolojik testler geçmişte CMV enfeksiyonu geçirmiş bir hasta varlığında CMV IgG antikorlarının varlığı veya yokluğunu tespit etmede oldukça kullanışlıdırlar. Klinik laboratuvarlarda kompleman fiksasyon, enzim-ilişkili immünosorbent assay

(ELISA), antikompleman immüno Floresans, radyoimmünassay ve indirekt hemaglutinin gibi bir çok yöntem bu amaçla kullanılmaktadır.<sup>10</sup> Ancak bu testlerin klinikte kullanımını ve yorumunu oldukça zorlaştıran bazı durumlar vardır. CMV IgG antikoları semptomların başlangıcından sonra iki üç haftaya kadar tespit edilemeyebilir. CMV IgM antikoları ise semptomların gelişmesinden sonra iki hafta içinde tespit edilebilmekte ve aylarca serumda pozitif kalabilmektedir. Yine reaktif CMV enfeksiyonlarında da IgM pozitifliği olabilmektedir. Bu durum yalancı pozitifliklere neden olabileceği için testin spesifitesini düşürmektedir.<sup>12,13</sup>

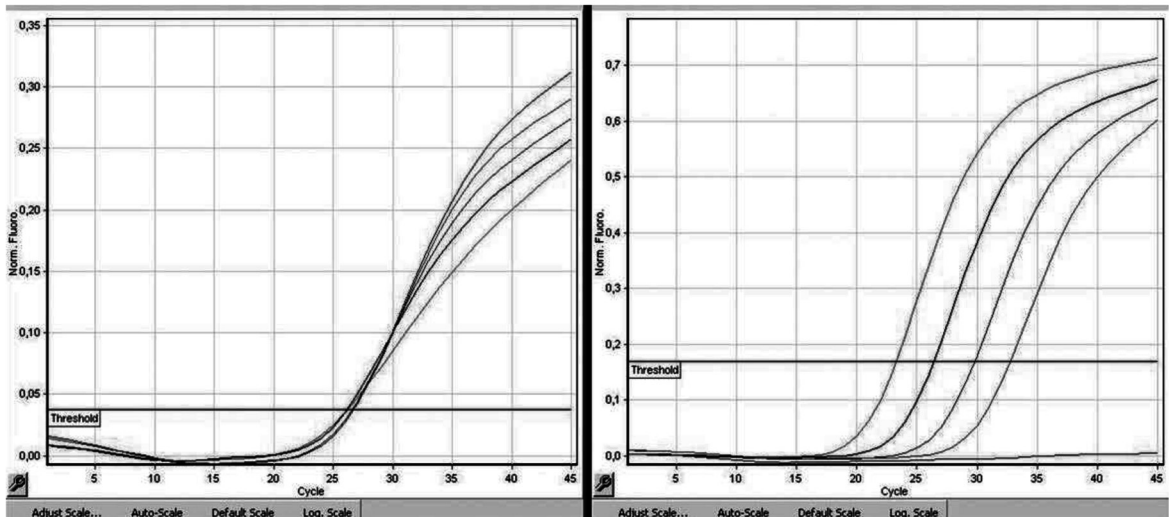
### Moleküler yöntemler

Moleküler yöntemlerden biri olan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), nükleik asit amplifikasyonuna dayalı bir yöntem olup oldukça geniş kullanım alanına sahip, hızlı ve duyarlı bir yöntemdir. PZR kalitatif (tanısal PZR) ve virus yükünü ölçmek amaçlı kantitatif olarak kullanılabilir. Teknik genellikle CMV DNA'nın kendi iyi korunmuş bölgeleri içindeki erken ve geç antijen genlerini hedeflemektedir. DNA tam kan, lökosit, plazma veya doku biyopsisi örnekleri gibi diğer dokular veya idrar, beyin-omurilik sıvısı (BOS) ve bronkoalveolar lavaj sıvısı (BAL) gibi diğer sıvılardan izole edilebilmektedir.<sup>8,14,15</sup> Bu yöntem kalitatif veya kantitatif olabilmekte, ancak kalitatif yöntemlerde eşik değerin çok

iyi ayarlanması gerekmektedir. Kantitatif PZR (real-time PZR) özellikle immün yetmezlikli hastaların devamlı monitörizasyonu ve tedavi cevabının takibinde oldukça kullanışlıdır (Şekil 1).<sup>16,17</sup> Ters transkriptaz (RT-PZR) DNA'nın varlığından bağımsız olarak periferik kan lökositlerindeki viral mRNA kopyalarını tespit etmek için kullanılabilen, ancak diğer moleküler yöntemlere göre duyarlılığı daha düşük görünmektedir.<sup>18</sup> Ancak bu yöntemlerin de çok çeşitli kısıtlılıkları vardır. Öncelikle oldukça pahalı yöntemlerdir. Testlerin standardizasyonunda ciddi sorunlar olup aynı örnek için farklı laboratuvarlardan farklı sonuçlar gelebilmekte ve bu uygun bir viral yük eşik değeri belirlenememesine neden olarak testlerin yorumunun güçleşmesine neden olmaktadır.<sup>19</sup> Doku örnekleri, BOS ve BAL gibi invazif örneklerden tanıya gidilen hastalarda örnek tekrarındaki sıkıntılar nedeniyle hastalığın durumunun veya tedaviye cevabın değerlendirilmesindeki güçlükler bu testlerin en önemli kısıtlılıklarından bazılarıdır.

### Antijenemi testleri

Antijenemi testleri kan örneklerinde CMV virus ölçümünde uzunca yıllardır kullanılmaktadır. Bu yöntemin temeli CMV virus replikasyonunun erken fazında kan lökositlerinde ekspres olan ve geç bir yapısal protein olan viral pp65 antijeninin floresan-ışaretli monoklonal antikor kullanılarak tespit edilmesine dayanmaktadır. Antijenemi bir immüno Floresans çalışmada



Şekil 1. Real-time polimeraz zincir reaksiyonu sonucunun değerlendirilmesi. Soldaki kontrollerin, sağda hastaların sonuçlarının eşik değere göre yorumlanması görülmektedir.

pozitif lökosit nükleuslarının sayılması ile ölçülmektedir.<sup>20-22</sup> Testin klinik perspektif açısından ve laboratuvar pratikleri bağlamında önemli avantajları vardır. Örneklemeden sonra 4-5 saat içinde virus tespitine imkân veren çok hızlı bir yöntemdir. CMV antijen pozitif kan hücreleri aktif enfeksiyonun serolojik bulguları oluşmadan önce 1-3 hafta içinde ortalama olarak dokuz günde görülmektedir. Bu nedenle CMV pp65 antijen tespiti CMV IgM'den daha erken bir aktif enfeksiyon indikatörü gibi görünmektedir. Bu klinik pratikte erken tanı ve antiviral tedavinin erken başlanmasında önemlidir.<sup>23</sup> Bu testlerin kantitatif doğası viral yük ile ilgili de bir tahmin yapmayı sağlayabilmekte ve hastanın tedavi öncesinde, tedavi sırasında ve tedavi sonrasında değerlendirilmesini olanaklı hale getirmektedir. CMV antikor negatifliği olan hastalarda ardışık olan viral pp65 antijeninin ölçümü primer CMV enfeksiyonunun ve CMV Ig G antikor pozitifliği olan hastalarda da CMV reaktivasyonunun erken tespitini sağlayacaktır. Erken pozitiflik veya yükselen antijenemi değerleri aktif CMV hastalığının erken başlangıcı için bir ipucu olabilir ve özellikle transplant alıcıları gibi hasta gruplarında erken preemtif tedavi başlanabilmesi için yol gösterici olabilmektedir. Gansiklovir ile tedavi edilen klinik CMV enfeksiyonu olan transplant alıcılarında klinik düzelmeye paralel olarak antijenemi düzeylerinde hızlı bir düşüş görülmüştür. Uygun tedaviye rağmen ısrarlı bir şekilde yüksek kalan veya yükselen antijenemi seviyeleri ilerleyici CMV hastalığının veya viral direnç gelişiminin bir belirtisi olabilir.<sup>24</sup>

Ancak bu test sadece lökositler içindeki virüsü ölçmek ile sınırlıdır.<sup>9</sup> Halbuki CMV vücudun pek çok bölgesini tutabilen bir virus olup bu bölgelerdeki enfeksiyonları kanıtlamak çoğu zaman mümkün olmamaktadır. Bu testler çok düşük bir çıktı ile yoğun iş gücü gerektirmekte ve otomasyona uygun sistemler gibi görünmemektedir. Bu nedenle doğru test performansı ve sonuçların yorumu subjektif olup yetişmiş kişilerin donanımı sonuçları etkileyebilmektedir.<sup>1</sup> Örneklerin altı saat içinde çalışılması gerekliliği ve gecikmelerin testin sensitivitesini düşüreceği bildirilmiştir. Testin temel mantığı yeterli polimorfonükleer lökosit sayısına (>1000 hücre/ $\mu$ L) dayandığı için nötropenik hastalarda yalancı negatif sonuçlara neden olabilmektedir.<sup>25</sup>

## Hücre kültürü

Hücre kültüründe insan fibroblast kültürü kullanılarak CMV kan, BOS, BAL, idrar ve biyopsi materyalleri gibi birçok örnekten izole edilebilmektedir. Enfekte insanların çoğunda idrar ılımlıdan büyük miktarlara kadar enfeksiyöz virus partikülleri içermekte olup idrarın kültür için çalışılması hem kolay hem de güvenlidir. Ancak virüri sıklıkla asemptomatik enfeksiyonu göstermekte ve aylardan yıllara kadar uzayabilmektedir. Lökositlerin kültüre edilmesi ile kanıtlanmış viremi, pek çok viremik kişinin asemptomatik olmasına rağmen aktif hastalık ile daha iyi ilişki göstermektedir.<sup>26-28</sup>

Konvansiyonel kültür CMV tespitinde en geleneksel yöntem olmakla birlikte yine bir çok kısıtlılıkları vardır. CMV sadece insan diploid fibroblast hücre kültürlerinde ürettiği için spesmen WI-38, MA-184 veya Flow 2000 gibi hücre dizilerine inoküle edilmelidir. Ancak bu geleneksel virus izolasyonunun en temel kısıtlılığı hücre kültüründe görünür sitopatolojik etki gelişmesi için gerek sürenin uzun olmasıdır. Yöntem oldukça yavaştır; sonucun negatif olarak rapor edilmesine kadar geçen süre 1-6 hafta arasında değişmekte olup kan örneklerinden kültürün duyarlılığı CMV hastalığı tanısı için yetersizdir. Pozitif bir kan kültürü CMV için özgün ve prediktif olmakla beraber diğer alanlardan alınan örneklerde virüsün tespiti sadece virüsün varlığına işaret etmekte ve aktif CMV enfeksiyonunu göstermemektedir.<sup>27,28</sup>

Bu yöntemlerde de yeni gelişmeler olup bunlardan biri CMV'nin 72-KDa erken proteinine karşı monoklonal antikorların gelişimidir. Bu antikorlar Shell vial tüp kültürleri sentrifügasyon ve amplifikasyon teknikleri ile modifiye edilmiş ve virus tespit süresinin 2-3 güne kadar indirildiği testlerdir. Fakat konvansiyonel kültürlerde olduğu gibi testin kan örnekleri için duyarlılığı düşüktür.<sup>29</sup> İmmünohistokimyasal yöntemler primer olarak dokularda veya vücut sıvılarında uygulanır. Erken CMV antikorlarına karşı monoklonal veya poliklonal antikorlar uygulanarak substrattaki değişimin flöresans işaretli veya enzim işaretli sekonder antikorlarla gösterilmesi temeline dayanmaktadır. Ancak deneyimli personel gerekliliği ve sistemin otomatizasyonunun güçlüğü ve virüsün fokal dağılımı nedeniyle yalancı negatifliklerinin olabilmesi en önemli kısıtlılıklarıdır.<sup>30,31</sup>



## Sitoloji ve Histoloji

Sitolojik teknik örnekteki karakteristik intranükleer inklüzyonları bulmak için kullanılmaktadır. Inklüzyon içeren hücreler tükürük, süt, trakeal sekresyonlar ve biyopsi ve nekropsi doku preparatlarında bulunabilmektedir. CMV enfeksiyonu için en ayırıcı mikroskopik özellik geniş, merkezi ve bazofilik intranükleer inklüzyon içeren “baykuş gözü” olarak tanımlanan geniş hücrelerdir. Bu inklüzyonlar Papanicolaou veya hemotoksilen-eozin boylarıyla birlikte en iyi görünmektedir. CMV enfekte hücrelerde küçük intrasitoplazmik inklüzyonlarda görülebilmekte ve bunlar en iyi Wright-Giemsa boylarıyla görünmektedir.<sup>32</sup> Ancak bu standart sitolojik tekniklerin duyarlılığı örneğin türüne bakılmaksızın oldukça düşüktür. Ayrıca bu hücrelerin idrar sedimentinde bulunması CMV için patognomonik değildir.<sup>26</sup>

## Nükleik asit hibridizasyonu

Direkt veya indirekt olarak CMV DNA tespitini kullanan yöntemler CMV enfeksiyonun tanısında kullanılabilir. In situ sitohibridizasyon on yıldan daha uzun süredir yapılmakta olup enfekte olan tek hücreyi bile tespit edebilmektedir. Klinik örneklerde CMV tespiti için DNA-DNA hibridizasyonunun kullanılması 1983 tarihine kadar dayanmaktadır. Chou ve arkadaşları<sup>33</sup> idrar örneklerini kullanarak P-ışaretili klonlanmış proba birlikte hibridizasyon yapmışlardır. Bu klonlanan prob CMV AD-169 suşunun EcoRI restriksiyon enzimi ile sindirilmesiyle hazırlanmıştır.<sup>34</sup> Ancak testin hem duyarlılığının çok düşük olması, hem de çok fazla iş gücü gerektirmesi araştırma alanı dışında klinik kullanımını oldukça kısıtlamaktadır.

## Elektron mikroskopisi

İdrarda CMV’yi tanımlamak için kullanılmakta olup konjenital olarak enfekte süt çocuklarında %25-95 viral kültür kadar duyarlıdır. Viral infektivite titresi önemli olup titre  $10^4$  /ml altına inince tekniğin duyarlılığı %95’e kadar inmektedir ve bu tekniğin kullanımını kısıtlayan en önemli unsur olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle klinik viroloji laboratuvarlarında sık kullanılmamaktadır.<sup>26</sup>

## Sonuç

CMV hastalığı daha sıklıkla fetusta, prematür yenidoğanda, transplant alıcılarında ve AIDS hastaları gibi T hücre cevabında yetersizlik olan hastalar ciddi CMV hastalığı geliştirmesi açısından risklidir.<sup>35</sup> Ağır ve yaygın CMV hastalığı tüm organların tutulumu ile gidebilir. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda her zaman enfeksiyon ve hastalık ayırımı kesin yapılamamakta ve bu tedaviler ölümcül CMV enfeksiyonu riski nedeniyle gansiklovir, foskarnet ve sidofovir gibi oldukça toksik tedaviler empirik olarak başlanabilmektedir; bu da hem gereksiz toksisiteye hem de artan hastane maliyetlerine neden olabilmektedir.<sup>36,37</sup>

Tüm bu bilgilerin ışığında CMV enfeksiyonlarının hızlı ve doğru tanısında yeni testlerin gerekliliği çok açıktır. Özellikle de enfeksiyonun latent kalma doğası göz önünde bulundurulduğunda hem hastaların klinik değerlendirilmesinde hem de bu testlerin yorumlanmasında bu latent olarak enfekte hücrelerin etkisinin de göz önünde bulundurulduğu testlere ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. Ross SA, Novak Z, Pati S, Boppana SB. Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infections. *Infect Disord Drug Targets* 2011; 11: 466-474.
2. Jacobson MA, Mills J. Serious cytomegalovirus disease in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) Clinical findings, diagnosis, and treatment. *Ann Intern Med* 1988; 108: 585-594.
3. Winston DJ, Ho WG, Champlin RE. Cytomegalovirus infections after allogeneic bone marrow transplantation. *Rev Infect Dis* 1990; 12: S776-S792.
4. Demmler GJ. Infectious Diseases Society of America and Centers for Disease Control. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. *Rev Infect Dis* 1991; 13: 315-329.
5. Demmler-Harrison GJ. Cytomegalovirus, In: Feigin RD, Cherry JD, Demmler-Harrison GJ, Kaplan SL. (eds). *Feigin & Cherry’s Textbook of Pediatric Infectious Diseases* (6<sup>th</sup> ed). Philadelphia: WB Saunders, 2009: 2022-2043.
6. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1094-1097.
7. Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2013; 13: 93-106.
8. Carraro E, Granato CF. Single human cytomegalovirus gB genotype shed in multiple sites at the time of diagnosis in renal transplant recipients. *J Med Virol* 2003; 70: 240-243.

9. Lo CY, Ho KN, Yuen KY, et al. Diagnosing cytomegalovirus disease in CMV seropositive renal allograft recipients: a comparison between the detection of CMV DNAemia by polymerase chain reaction and antigenemia by CMV pp65 assay. *Clin Transplant* 1997; 11: 286-293.
10. Pass RF, Britt WJ, Stagno S. Cytomegalovirus. In: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, (eds). *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections* (5th ed). Washington D.C.: American Public Health Association, 1995: 253-271.
11. O'Neill HJ, Shirodaria PV, Connolly JH, Simpson DIH, McGeown MG. Cytomegalovirus-specific antibody responses in renal transplant patients with primary and recurrent CMV infections. *J Med Virol* 1988; 24: 461-470.
12. Bhatia J, Shah BV, Mehta AP, Deshmukh M, Sirsat RA, Rodrigues C. Comparing serology, antigenemia assay and polymerase chain reaction for the diagnosis of cytomegalovirus infection in renal transplant patients. *J Assoc Physicians India* 2004; 52: 297-300.
13. Naumnik B, Malyszko J, Chyczewski L, Kovalchuk O, Mysliwiec M. Comparison of serology assays and polymerase chain reaction for the monitoring of active cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2007; 39: 2748-2750.
14. Evans PC, Soin A, Wreghitt TG, Alexander GJ. Qualitative and semiquantitative polymerase chain reaction testing for cytomegalovirus DNA in serum allows prediction of CMV related disease in liver transplant recipients. *J Clin Pathol* 1998; 51: 914-921.
15. Einsele H, Ehninger G, Steidle M, et al. Polymerase chain reaction to evaluate antiviral therapy for cytomegalovirus disease. *Lancet* 1991; 338: 1170-1172.
16. Kim DJ, Kim SJ, Park J, et al. Realtime PCR assay compared with antigenemia assay for detecting cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2007; 39: 1458-1460.
17. Mhiri L, Kaabi B, Houimel M, Arrouji, Z, Slim A. Comparison of pp65 antigenemia, quantitative PCR and DNA hybrid capture for detection of cytomegalovirus in transplant recipients and AIDS patients. *J Virol Methods* 2007; 143: 23-28.
18. Patel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 86-124.
19. Pang XL, Fox JD, Fenton JM. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *Am J Transplant* 2009; 9: 258-268.
20. Gerna G, Zipeto D, Percivalle E, et al. Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence for initial viral replication in polymorphonuclear leukocytes from viremic patients. *J Infect Dis* 1992; 166: 1236-1244.
21. Revello MG, Percivalle E, Zavattoni M, Parea M, Grossi P, Gerna G. Detection of human cytomegalovirus immediate early antigen in leukocytes as a marker of viremia in immunocompromised patients. *J Med Virol* 1989; 29: 88-93.
22. van der Bij W, Torensma R, van Son WJ, et al. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leucocytes. *J Med Virol* 1988; 25: 179-188.
23. Landery ML, Ferguson D. Comparison of quantitative cytomegalovirus with culture methods and correlation with clinical disease. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2851-2856.
24. Mazzulli T, Rubin RH, Ferraro MJ, et al. Cytomegalovirus antigenemia: Clinical correlations in transplant recipients and in persons with AIDS. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2824-2827.
25. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2013; 96: 333-360.
26. Jahan M. Laboratory diagnosis of CMV infection: a review. *Bangladesh J Med Microbiol* 2010; 4: 39-44.
27. 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.
28. Wreghitt TG, Teare EL, Sule O, Devri R, Rice P. Cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 1603-1606.
29. Reina J, Ballia P, Salva F, et al. Utility of different analytical techniques in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997; 15: 502-503.
30. Colina F, Juca NT, Moreno E, et al. Histological diagnosis of cytomegalovirus hepatitis in liver allografts. *J Clin Pathol*. 1995; 48: 351-357.
31. Paya CV, Holley KA, Wiesner RH, et al. Early diagnosis of cytomegalovirus hepatitis in liver transplant recipients: role of immunostaining, DNA hybridization and culture of hepatic tissue. *Hepatology*, 1990; 12: 119-126.
32. Shulman HM, Hackman RC, Sale GE, Meyers JD. Rapid cytologic diagnosis of cytomegalovirus interstitial pneumonia on touch imprints from open-lung biopsy. *Am J Clin Pathol* 1982; 77: 90-94.
33. Chou S, Merigan TC. Rapid detection and quantitation of human cytomegalovirus in urine through DNA hybridization. *N Eng J Med* 1983; 308: 921-925.
34. Spector DH, Vacquier JP. Human cytomegalovirus (strain AD169) contains sequences related to the avian retrovirus oncogene v-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 3889-3893.
35. Griffiths P, Grundy J. Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. *Biochem J* 1987; 241: 313.
36. Buhles WC Jr, Mastre BJ, Tinker AJ, Strand V, Koretz SH. Ganciclovir treatment of life-or sight-threatening cytomegalovirus infection experience in 314 immunocompromised patients. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 495-506.
37. Plosa EJ, Esbenshade JC, Fuller MP, Weitkamp JH. Cytomegalovirus infection. *Pediatr Rev* 2012; 33: 156-163.