Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 7:38 +0330 on Saturday March 17th 2018

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(85): 20-26

Comparison of human cytomegalovirus load in whole blood and plasma samples of transplant recipient patients

Khansarinejad B[1], Mondanizadeh M[2], Rafeie M[3], Mirab Samiee S[4*]

1- Department of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
2- Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3- Department of Biostatistics and Epidemiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
4- Food and Drug Laboratory Research Center, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

Received:25 Jan 2014, Accepted: 5 March 2014

Abstract

Background: The Real-time PCR assay has been established as the standard method for Human Cytomegalovirus (HCMV) quantitation in immunocompromised patients. However, the question of which one of whole blood or plasma specimens is better for viral quantitation is still unresolved for many clinical laboratories. To answer this question, the current study compares HCMV DNA load in whole blood and plasma samples.

Materials and Methods: In this prospective study, the whole blood and plasma samples were obtained from 41 transplantated patients and the viral load was detected using a validated, in-house Real-time PCR assay.

Results: Of the total 193 examined specimens, 174 were negative and 19 samples, from 16 patients, were positive in at least one of whole blood or plasma samples. Based on the results of linear regression analysis, the cytomegalovirus viral load was correlated in whole blood and plasma samples (R^2: 0.872). However, the regression equation shows that the HCMV load in whole blood samples is higher than load of this virus in plasma. The validity of the quantitative results was confirmed by repeating the tests and analyzing the results using the repeated measure analysis.

Conclusion: Based on the results of the present study, HCMV quantitation in whole blood samples has a higher analytical sensitivity than in plasma samples.

Keywords: Human cytomegalovirus, viral load, quantitation, Real-time PCR

*Corresponding author:
Address: Food and Drug Laboratory Research Center, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.
Email: siamak.samiee@gmail.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 17، شماره 4 (شماره پیاپی 85)، تیر 1393، 26-20

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 7:38 +0330 on Saturday March 17th 2018

مقایسه بار ویروس سیتومگال انسانی در نمونه‌های خون تام و پلاسما بیماران دریافت کننده پیوند

بهزاد خوانساری نژاد[1]، مهدیه موندنی زاده[2]، محمد رفیعی[3]، سیامک میراب سمیعی[4*]

1. استادیار، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
2. دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
3. دانشیار، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
4. استادیار، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 92/11/5 تاریخ پذیرش: 92/12/14

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از روش Real-time PCR کمّی به عنوان روش استاندارد به منظور کمّیت سنجی ویروس سیتومگال انسانی در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی مطرح شده است. با این وجود این سوال که کدامیک از نمونه‌های خون تام یا پلاسما برای اندازه‌گیری تیتر ویروس بهتر است برای بسیاری از آزمایشگاه‌های بالینی هنوز پاسخ داده نشده است. به منظور پاسخ دادن به این سوال، مطالعه حاضر به مقایسه بار DNA ویروس سیتومگال انسانی در دو نمونه پلاسما و خون کامل می‌پردازد.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه آینده‌نگر نمونه‌های خون تام و پلاسما از 41 بیمار دریافت کننده پیوند مورد ارزیابی قرار گرفت و بار ویروس سیتومگال به وسیله روش Real-time PCR خانگی معتبر شده سنجش گردید.

یافته‌ها: از مجموع 193 نمونه بررسی شده، تعداد 174 نمونه دارای نتایج منفی بودند و تعداد 19 نمونه از 16 بیمار در دست کم یکی از نمونه‌های پلاسما یا خون کامل مثبت شدند. بر اساس نتایج آنالیز رگرسیون خطی، بین تیتر ویروس سیتومگال در دو نمونه خون تام و پلاسما هم‌بستگی وجود دارد(R^2= 0/872). با این وجود معادله رگرسیون نشان می‌دهد که تیتر ویروس سیتومگال انسانی در نمونه‌های خون تام بالاتر از تیتر این ویروس در نمونه‌های پلاسما می‌باشد. اعتبار سنجی نتایج کمّی به وسیله تکرار آزمایش‌ها و آنالیز نتایج به وسیله آزمون آماری اندازه گیری مکرر مورد تأیید قرار گرفت.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، انجام آزمون‌های کمّیت سنجی ویروس سیتومگال انسانی در نمونه خون تام دارای حساسیت آنالیتیک بیشتری نسبت به نمونه پلاسما است.

واژگان کلیدی: ویروس سیتومگال انسانی، بار ویروسی، کمّیت سنجی، Real-time PCR

***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
Email: siamak.samiee@gmail.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 7:38 +0330 on Saturday March 17th 2018

مقدمه

ویروس سیتومگال انسانی(Human Cytomegalovirus-HCMV) عضوی از خانواده هرپس ویریده است. این ویروس از طریق بزاق، ترشحات تنفسی، ادرار، شیر و ترشحات تناسلی فرد آلوده به محیط دفع می‌شود. به علاوه HCMV می‌تواند از طریق انتقال خون، پیوند اعضا و تماس جنسی نیز منتقل شود(1). پس از عفونت اولیه، این ویروس به صورت نهفته و برای تمام طول عمر در بدن فرد باقی می‌ماند و می‌تواند در فواصل زمانی نامشخص دوباره فعال شود. به طور کلی عفونت اولیه یا عود مجدد HCMV در افراد دارای نقص سیستم ایمنی یا در جنین و نوزادان که سیستم ایمنی آنها ناکامل است، می‌تواند بسیار شدید و سیستمیک باشد(2). بیماران دریافت کننده‌ی پیوند آلوژن، به علت مصرف داروهای سرکوب کننده‌ی سیستم ایمنی، همواره مستعد بیماری با HCMV هستند. بنابر این توجه به کنترل عفونت و بیماری HCMV در این بیماران یک فرایند بسیار مهم محسوب می‌شود(3). برای درمان HCMV معمولاً ازداروی گانسیکلوویر استفاده می‌شود و در مواقع مقاومت دارویی، داروی فوسکارنت به عنوان جایگزین استفاده می‌گردد(4). استراتژی مورد قبول برای درمان HCMV، درمان پیشدستانه است و مطالعات مختلف بیانگر ارجحیت این نوع درمان بر پروفیلاکسی همگانی‌اند. در این روش دارو تنها زمانی تجویز می‌شود که میزان ویروس در خون به سطحی معنی‌داری که پیش‌گویی کننده بیماری HCMV، در زمانی پیش از شروع علائم کلینیکی باشد، برسد. بنابر این روش درمانی پیشدستانه نیازمند تعیین کمیت HCMV در خون است(5، 6). امروزه روش Real-time PCR کمّی(qPCR) به عنوان روش استاندارد در تعیین کمّیت ویروس سیتومگال در خون بیماران دارای نقص سیستم ایمنی محسوب می‌شود. این روش برای اندازه‌گیری بار DNA ویروسی در نمونه‌های مختلف، به خصوص خون کامل(Whole Blood-WB) و پلاسما استفاده می‌شود. البته در مورد این که کدامیک از اجزای خونی فوق بهترین نمونه برای اندازه‌گیری بار ویروسی است اتفاق نظر وجود ندارد. برخی از محققین ترجیح می‌دهند از خون کامل یا PBLها استفاده کنند و گروهی دیگر پلاسما را به عنوان نمونه مناسب انتخاب می‌کنند(12-7).

از این رو مطالعه حاضر به مقایسه بار DNA ویروس سیتومگال انسانی در دو نمونه پلاسما و خون کامل با استفاده از روش Real-time PCR می‌پردازد. در بررسی‌های به عمل آمده از نمونه‌های دریافت کننده پیوند کلیه و پیوند سلول‌های بنیادی خونساز(HSCT) استفاده شده است و تلاش شده است تا نمونه مناسب‌تر جهت کمّیت سنجی معرفی گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها

در یک مطالعه آینده‌نگر در فاصله زمانی بین تیر ماه تا مهر 1391 تعداد 193 نمونه از 29 بیمار دریافت کننده پیوند سلول‌های بنیادی خونساز و 12 دریافت کننده پیوند کلیه، به ترتیب از بخش هماتولوژی-انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی و آزمایشگاه بیمارستان دی در لوله‌های استریل Venipuncture حاوی EDTA جمع‌آوری شدند. مقدار 200 میکرولیتر از نمونه خون کامل به طور مستقیم جهت استخراج DNA استفاده گردید و سپس نمونه پلاسما به وسیله سانتریفیوژ در دور 2500 rpm به مدت 20 دقیقه جدا سازی شد تا مقدار 200 میکرولیتر از آن نیز مورد استخراج DNA قرار گیرد. مطالعه حاضر متعاقب اخذ مجوز اخلاق پزشکی به شماره 11690 از کمیته اخلاق بخش هماتولوژی-انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی صورت پذیرفت.

به منظور استخراج DNA، مقدار 200 میکرولیتر از نمونه‌های WB و پلاسمای هر بیمار با استفاده از کیت QIAamp DNA mini Kit (Qiagen، آلمان) و بر اساس دستور العمل شرکت سازنده مورد تخلیص قرار گرفت. در نهایت DNA استخراج شده در حجم 50 میکرولیتر از بافر رقیق کننده و نگهدارنده کیت حل شد تا

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 7:38 +0330 on Saturday March 17th 2018

مقدار 5 میکرولیتر از آن در واکنش Real-time PCR مورد استفاده قرار گیرد.

تعیین کمّیت HCMV در نمونه‌ها به وسیله یک آزمون Real-time PCR خانگی معتبر و با استفاده از دستگاه LightCycler®1.2 (Roche، آلمان) صورت گرفت. این آزمون بر اساس تکنولوژی TaqMan بوده و به صورت یک روش دوپلکس از ژنوم ویروس لارنگوتراکئیت پرندگان (ILT) به عنوان کنترل داخلی اگزوژن بهره می‌گیرد(6). به طور خلاصه، واکنش‌های تکثیری در حجم 20 میکرولیتر شامل: 4 میکرولیتر مستر میکس LightCycler® TaqMan®(Roche، آلمان)، 0/4 میکرولیتر از هر یک از پرایمرها، 0/2میکرولیتر از پروب‌ها و 5 میکرولیتر DNA استخراج شده صورت پذیرفت. فرایند تکثیر در دستگاه شامل یک سیکل فعال سازی آنزیم در 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه و به دنبال آن 45 سیکل شامل 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 ثانیه، 58 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 ثانیه و 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 ثانیه، همراه با قرائت فلورسانس در کانال F1/F3 دستگاه می‌باشد. توالی الیگونوکلئوتیدهای به کار گرفته شده در این واکنش در جدول 1 نشان داده شده است.

جدول 1. توالی پرایمرها و پروب‌های به کار گرفته شده در واکنش Real-time PCR

اهداف ویروسی	توالی (`5 به `3)	اندازهٔ محصول (جفت باز)
HCMV		
پرایمر سنس	CAGTCCCGAGACMGTGAGAC	137
پرایمر آنتی‌سنس	TGAACATCCCCAGCATCAACG	
پروب سنس	FAM-TGCCACATCTGCTTGCCCGACGC-BBQ	
ILT		
پرایمر سنس	TATCACCCTGAGGTCCAGACTG	96
پرایمر آنتی‌سنس	AGGCACAAAGACAAAATCATCTCC	
پروب آنتی سنس	DYXL-AAGCCGCAGGTCGCCGCACG-BBQ	

در پایان به منظور تعیین همبستگی بین نتایج کمّی از آنالیز رگرسیون خطی و جهت بررسی اعتبار سنجی از آنالیز تکرارهای مکرر(Repeated measures) استفاده شد. کلیه بررسی‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 16 انجام گرفت.

یافته‌ها

نمونه‌ها و بیماران

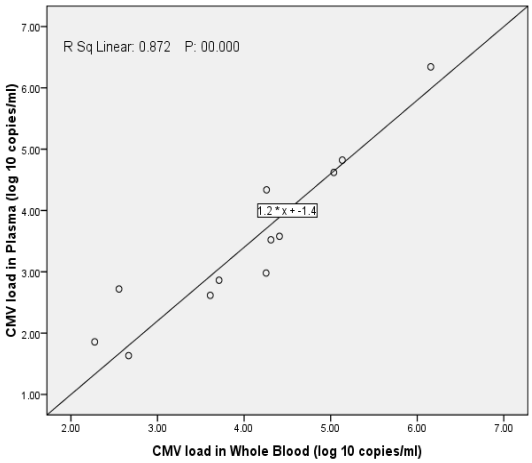
میانه تعداد نمونه‌های اخذ شده از هر بیمار 3 نمونه(دامنه 1 تا 6 نمونه) بود. از مجموع 193 نمونه بررسی شده، تعداد 174 نمونه دارای نتایج منفی بودند و تعداد 19 نمونه از 16 بیمار در دست کم یکی از نمونه‌های پلاسما یا خون کامل مثبت شدند. بدین صورت که 15 بیمار دارای نتیجه مثبت WB و 10 بیمار دارای نتیجه مثبت پلاسما بودند. در 7 بیمار علائم بالینی و شواهد آزمایشگاهی دال بر وجود بیماری HCMV تشخیص داده شد و مداخله درمانی به وسیله داروی گانسیکلوویر توسط پزشکان معالج صورت پذیرفت. تمامی بیمارانی که مورد درمان قرار گرفتند در بازه زمانی 3 تا 10روز(میانه 4) پیش از وقوع علائم بالینی، عود عفونت HCMV را در هر دو نمونه خون کامل و پلاسما نشان داده بودند و تیتر ویروس در هر دو نوع نمونه همواره بالا گزارش شد(دامنه 730 تا 2201000 کپی در میلی‌لیتر).

مقایسه تیتر ویروس HCMV در نمونه خون تام و پلاسما

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز رگرسیون خطی، بین تیتر ویروس سیتومگال در دو نمونه خون کامل و پلاسما

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 7:38 +0330 on Saturday March 17th 2018

همبستگی وجود داشت (R^2= 0/872 ،p= 00/000). با این وجود بر مبنای نتایج حاصل از معادله رگرسیون، تیتر ویروس در نمونه‌های خون کامل بالاتر از تیتر این ویروس در نمونه‌های پلاسما می‌باشد(شکل 1).



شکل 1. آنالیز همبستگی نتایج کمّیت سنجی HCMV بین دو نمونه خون تام و پلاسما. نتایج بر حسب کپی در میلی‌لیتر به صورت لگاریتمی نشان داده شده‌اند. ضریب تعیین همبستگی مربوطه در قسمت بالا و سمت چپ شکل نمایان است.

اعتبار سنجی نتایج کمّی

به منظور بررسی پایداری نتایج کمّی، تمامی نمونه‌های مثبت دو بار دیگر از مرحله استخراج تا آنالیز نتایج مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از آنالیز Repeated measures نشان می‌دهد که اختلاف آماری معنی‌داری بین میانگین اعداد حاصل از تکرار نمونه‌های پلاسما و نیز نمونه‌های WB دیده نشد که این یافته موید معتبر بودن سنجش اندازه گیری‌ها و نتایج آنالیز رگرسیون خطی اولیه می‌باشد(جدول 2).

جدول 2. نتایج حاصل از تکرار کمّیت سنجی نمونه‌ها بر روی نمونه‌های خون تام و پلاسما

مقادیر p مربوط به آزمون آماری Repeated measure می‌باشد. همان گونه که ملاحظه می‌شود فرظیه صفر رد نشده است که این مسأله موید تکرار پذیر بودن نتایج حاصل از اندازه گیری می‌باشد.

	خون کامل		پلاسما	
	میانگین± انحراف معیار	p	میانگین±انحراف معیار	p
تکرار اول	$9/56\times10^4\pm3/26$	0/27	$1/23\times10^5\pm5/03$	0/216
تکرار دوم	$1/52\times10^5\pm5/91$		$1/18\times10^5\pm4/82$	
تکرار سوم	$1/53\times10^5\pm5/87$		$1/31\times10^5\pm5/28$	

مقادیر p مربوط به ازمون آماری

بحث

اگرچه روش qPCR به عنوان روش استاندارد به منظور تعیین بار ویروس HCMV در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی مطرح شده است، ولی در مورد نمونه مورد کمّیت سنجی توسط این روش اتفاق نظر وجود ندارد. در برخی از آزمایشگاه‌های کشور نمونه خون تام مورد ارزیابی قرار می‌گیرد و در برخی از آزمایشگاه‌های دیگر نمونه پلاسما ترجیح داده می‌شود. اهمیت این موضوع در این نکته نهفته است که اعداد حاصل از بررسی بار HCMV در نمونه‌های خون کامل و پلاسما بر یکدیگر منطبق نیستند و با توجه به این واقعیت که معمولاً عفونت HCMV در بخش‌های پیوند بر اساس یک Cut off عددی خاص درمان می‌شود، ممکن است پزشکان معالج که عفونت ویروس سیتومگال را در نمونه‌های بیماران پایش می‌نمایند، دچار سردرگمی و اشتباه در تصمیم گیری شوند.

در بررسی حاضر اگرچه بین نتایج حاصل از تعیین بار ویروس در نمونه‌های خون کامل و پلاسما همبستگی وجود دارد، ولی تیتر HCMV در نمونه‌های WB همواره بالاتر از نمونه‌های پلاسما تشخیص داده شد. از این رو می‌توان نتیجه گرفت که حساسیت آنالیتیک بررسی نمونه‌های خون تام نسبت به نمونه‌های پلاسما بهتر است. این یافته مطابق با برخی عمده مطالعات انجام شده مشابه در کشورهای دیگر می‌باشد. در یکی از کامل‌ترین مطالعات صورت گرفته، گاریکو و همکاران در سال 2008 با مطالعه بر روی 1474 نمونه خون تام و پلاسما نتیجه گیری کردند که حساسیت آنالیتیک بررسی خون تام بیشتر از نمونه‌های

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 7:38 +0330 on Saturday March 17th 2018

پلاسما است. این یافته در تطابق بسیاری از مطالعات دیگر است که نشان داده‌اند تیتر HCMV در خون کامل بالاتر از پلاسما است(14-۱۰،۱۲-7). از جهت دیگر برخی از محققین اعلام می‌دارند که استفاده از پلاسما دارای این مزیت است که حضور HCMV در پلاسما نشان دهنده تکثیر فعال ویروس و آزاد شدن آن از لکوسیت‌های در گردش و برخی از سلول‌های دیگر است. به علاوه عنوان می گردد که پلاسما دارای پیچیدگی‌های ژنومی کمتری از WB است و از این‌رو استفاده از آن منجر به افزایش ویژگی واکنش می گردد(17-15). در این مطالعه نیز با بررسی ضرایب تغییرات حاصل از سه بار کمّیت سنجی نمونه‌ها هم مشخص شد که در مقایسه با نمونه‌های WB تغییرات اعداد کمّی در نمونه‌های پلاسما کمتر است(داده‌ها نشان داده نشده است) و اعداد حاصل از کمّیت سنجی پلاسما به یکدیگر نزدیک‌تر می‌باشند. از آن جایی که در بررسی حاضر تمامی نمونه‌های مثبت سه بار مجزا مورد ارزیابی قرار گرفتند، نتایج به دست آمده معتبر بوده و به عبارت دیگر این نتایج حاصل از خطاهای تصادفی نمی‌باشند. بالا بودن تیتر ویروس در نمونه خون تام احتمالاً به این علت است که ویروس سیتومگال یک پاتوژن داخل سلولی بوده و به صورت داخل سلولی تکثیر می کند(5، 18).

نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، انجام آزمون‌های ملکولی کمّی برای تعیین بار ویروس سیتومگال انسانی در نمونه خون تام دارای حساسیت آنالیتیک بیشتری نسبت به نمونه پلاسما است. از این رو در مواردی که حساسیت بالا در تشخیص عفونت با HCMV اهمیت دارد، استفاده از نمونه خون کامل نسبت به نمونه‌های پلاسما دارای ارجحیت است. هر چند در مواردی که حساسیت بالا مد نظر نباشد و تشخیص ویژه از اهمیت بالینی بیشتری برخوردار باشد، ممکن است استفاده از پلاسما کمک کننده‌تر باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مراتب قدردانی خود را از تمامی پرسنل مرکز هماتولوژی-انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیارستان شریعتی تهران، به ویژه خانم اشرف‌السادات حسینی و نیز پرسنل آزمایشگاه بیمارستان دی، اعلام می‌داریم. از جناب آقای دکتر مهدی پریان، عضو هیأت علمی انستیتو پاستور ایران نیز به خاطر مشاوره علمی تشکر می‌شود.

منابع

1. Mocarski ES, Shenk T, Pass RF. Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2701-72.
2. Jarvis AM, Nelson JA. HCMV: Molecular basis of persistence and latency. In: Arvin AM, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K, editors. Human herpesviruses : biology, therapy, and immunoprophylaxis. New York: Cambridge University Press; 2007.
3. Boaretti M, Sorrentino A, Zantedeschi C, Forni A, Boschiero L, Fontana R. Quantification of cytomegalovirus DNA by a fully automated real-time PCR for early diagnosis and monitoring of active viral infection in solid organ transplant recipients. Journal of Clinical Virology. 2013;56(2):124-8.
4. Asberg A, Humar A, Jardine A, Rollag H, Pescovitz M, Mouas H, et al. Long-Term Outcomes of CMV Disease Treatment with Valganciclovir Versus IV Ganciclovir in Solid Organ Transplant Recipients. American Journal of Transplantation. 2009;9(5):1205-13.
5. Gerna G, Lilleri D, Furione M, Baldanti F. Management of human cytomegalovirus infection in transplantation: validation of virologic cut-offs for preemptive therapy and immunological cut-offs for protection. New Microbiol. 2011;34(3):229-54.
6. Khansarinejad B, Soleimanjahi H, Mirab Samiee S, Hamidieh AA, Paryan M, Sanahmadi Y. Quantitation of human cytomegalovirus DNA in plasma using an affordable in-house qPCR assay. Journal of virological methods. 2012; 183(2):170-5.
7. Barrett-Muir W, Breuer J, Millar C, Thomas J, Jeffries D, Yaqoob M, et al. CMV viral load measurements in whole blood and plasma-

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 7:38 +0330 on Saturday March 17th 2018

which is best following renal transplantation? Transplantation. 2000;70(1):116-9.
8. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. Clinical microbiology reviews. 1998;11(3):533-54.
9. Garrigue I, Boucher S, Couzi L, Caumont A, Dromer C, Neau-Cransac M, et al. Whole blood real-time quantitative PCR for cytomegalovirus infection follow-up in transplant recipients. Journal of Clinical Virology. 2006;36(1):72-5.
10. Garrigue I, Doussau A, Asselineau J, Bricout H, Couzi L, Rio C, et al. Prediction of cytomegalovirus (CMV) plasma load from evaluation of CMV whole-blood load in samples from renal transplant recipients. Journal of clinical microbiology. 2008; 46(2): 493-8.
11. Mengelle C, Sandres-Saune K, Pasquier C, Rostaing L, Mansuy J-M, Marty M, et al. Automated extraction and quantification of human cytomegalovirus DNA in whole blood by real-time PCR assay. Journal of clinical microbiology. 2003;41(8):3840-5.
12. Razonable RR, Brown RA, Wilson J, Groettum C, Kremers W, Espy M, et al. The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. Transplantation. 2002;73(6):968-73.
13. Mengelle C, Pasquier C, Rostaing L, Sandres-Sauné K, Puel J, Berges L, et al. Quantitation of human cytomegalovirus in recipients of solid organ transplants by real-time quantitative PCR and pp65 antigenemia. Journal of medical virology. 2003;69(2):225-31.
14. Thorne LB, Civalier C, Booker J, Fan H, Gulley ML. Analytic validation of a quantitative real-time PCR assay to measure CMV viral load in whole blood. Diagnostic Molecular Pathology. 2007;16(2):73-80.
15. Boivin G, Belanger R, Delage R, Beliveau C, Demers C, Goyette N, et al. Quantitative analysis of cytomegalovirus (CMV) viremia using the pp65 antigenemia assay and the Cobas Amplicor Cmv Monitor PCR test after blood and marrow allogeneic transplantation. Journal of clinical microbiology. 2000;38(12):4356-60.
16. 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. Journal of clinical microbiology. 2004; 42(4): 1498-504.
17. Piiparinen H, Helanterä I, Lappalainen M, Suni J, Koskinen P, Grönhagen-Riska C, et al. Quantitative PCR in the diagnosis of CMV infection and in the monitoring of viral load during the antiviral treatment in renal transplant patients. Journal of medical virology. 2005; 76(3): 367-72.
18. Martín-Gandul C, Pérez-Romero P, Sánchez M, Bernal G, Suárez G, Sobrino M, et al. Determination, validation and standardization of a CMV DNA cut-off value in plasma for preemptive treatment of CMV infection in solid organ transplant recipients at lower risk for CMV infection. Journal of Clinical Virology. 2013;56(1):13-8.