

Serologische Diagnose der Cytomegalievirus-Infektion: Evaluierung von drei Enzymimmunoassays zum Nachweis von HCMV-spezifischen IgM-Antikörpern in Serumproben von immunkompetenten und immunsupprimierten Patienten

Serodiagnosis of Human Cytomegalovirus Infection: Evaluation of Three Enzyme Immunoassays for the Detection of HCMV-specific IgM antibodies in Immunocompetent and Immunodeficient Patients

C. Jethon¹, H. W. Doerr¹, B. Weber^{1,2,3}

Zusammenfassung: Neben dem Erregernachweis beruht die Labordiagnose der Cytomegalie auf der Bestimmung HCMV spezifischer IgG-, IgM- und IgA-Antikörper. Von der Industrie werden jedes Jahr neue Antikörpertests basierend auf der ELISA-Technologie angeboten. In der vorliegenden Studie wurden ein neues Testverfahren (Freka CMV-M-ELISA, Fresenius, Bad Homburg) mit bereits seit mehreren Jahren etablierten und zugelassenen ELISAs (Enzygnost CMV-IgM; Behringwerke, Marburg und CMV-ELA, Medac, Hamburg) verglichen. Zur Bestimmung der Sensitivität wurden Verlaufsproben von 15 Organtransplantierten mit einer aktiven HCMV-Infektion, welche in den meisten Fällen über ein positives Ergebnis in der HCMV-DNA-PCR und/oder Virusisolierung und/oder quantitative pp65-Antigenbestimmung bestätigt wurde, untersucht. Zur Ermittlung der Spezifität wurde ein Kollektiv von bekannten HCMV-IgM-negativen Serumproben sowie potentiell kreuzreaktive Seren mit Antikörpern gegen andere Herpesviren und Rheumafaktor- bzw. Antinukleär-Antikörper-positive Seren untersucht. Die höchste Sensitivität wurde für den Medac-ELA ermittelt. Der Freka CMV-M ELISA zeigte eine ähnliche Sensitivität und Spezifität wie der Enzygnost CMV-IgM. Relativ zum Erregernachweis über PCR, Virusisolierung und quantitative pp65-Antigenbestimmung dauerte es bei vielen Patienten bis zu mehreren Wochen, ehe eine humorale Immunantwort über die Bildung von spezifischem IgM nachweisbar war. Bei zwei Patienten waren trotz dem Vorliegen einer floriden Cytomegalie keine HCMV-IgM-Antikörper bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nachweisbar. Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, daß es relativ große Unterschiede in bezug auf die Sensitivität der verschiedenen ELISAs gibt.

Schlüsselwörter: Cytomegalie; Serodiagnose; Enzyme-linked Immunosorbent Assay; Polymerasekettenreaktion; Sensitivität und Spezifität; Transplantation/Immunologie; Virale Matrixproteine.

Summary: Laboratory diagnosis of human cytomegalovirus (HCMV) infection is mainly based on virus detection and determination of specific IgG, IgM and IgA antibodies. New commercially available assays based on the ELISA technology are introduced every year on the international market. In the present study, a new assay (Freka CMV-M-ELISA, Fresenius, Bad Homburg) was compared to two established and licensed ELISAs (Enzygnost CMV-IgM, Behringwerke, Marburg; CMV-ELA Medac, Hamburg). Follow-up samples from organ transplant recipients suffering from active infection confirmed mostly by a positive result in HCMV DNA PCR and/or quantitative pp65-antigen determination and/or virus isolation were investigated in order to determine the sensitivity of the different assays. To ascertain the specificity of the different ELISAs, well known HCMV-IgM negative serum samples and potentially cross-reactive sera with antibodies against other herpes viruses and rheumatoid factor and antinuclear antibody positive samples were tested. The Medac CMV-ELA showed the highest sensitivity in comparison to the alternative assays. The Freka CMV-M had a nearly equivalent sensitivity and specificity as the Enzygnost CMV-IgM. In most cases time delays up to several weeks were observed until specific IgM antibody was detectable in follow-up serum samples of transplant recipients in comparison to PCR, virus isolation, and quantitative pp65 antigenemia. In two patients with active infection, no HCMV IgM antibody was detectable until the end of the observation period. The results of our study show, that there are relatively great differences in terms of sensitivity between the different ELISAs.

¹ Institut für Med. Virologie, Universitätskliniken Frankfurt

² Laboratoire Lieners et Hastert, Diekirch, Luxemburg

³ Korrespondenzadresse: Priv. Doz. Dr. Bernard Weber, Laboratoire Lieners et Hastert, 18, rue de l'Hopital, L-9244 Luxemburg. Fax: +352- 80 26 05

Eingegangen: 26. April 1996

Keywords: Cytomegalovirus Infektion; Enzyme-linked Immunosorbent Assay; Polymerase Chain Reaction; Sensitivity and Specificity; Serodiagnosis; Transplantation/immunology; Viral Matrix Proteins.

Für die frühe Diagnose und Behandlung der Zytomegalie bei Immunsupprimierten und Neugeborenen sowie zur differentialdiagnostischen Abgrenzung von anderen Erregern ist die Entwicklung von schnellen Nachweisverfahren von großer Bedeutung.

Über den Nachweis von HCMV-„Frühproteinen“ in beimpften Vorhautfibroblasten („shell vial culture“) ist es möglich, innerhalb von 24–36 Stunden eine HCMV-Infektion im Urin, Bronchoalveolarlavage, Amnionflüssigkeit und Biopsiematerial nachzuweisen [1,2] und die Infektiosität des Untersuchungsmaterials approximativ zu quantifizieren. Seit ihrer Einführung Ende der achtziger Jahre wird diese Technik bevorzugt neben der Serologie für die frühe Diagnose der Zytomegalie bei Neugeborenen und Immunsupprimierten eingesetzt [3,4].

Vor wenigen Jahren wurde ein neuer Antigennachweis mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen das pp65-Matrixphosphoprotein eingeführt [5,6]. Dieses Testsystem erlaubt eine direkte immunzytochemische Identifikation von HCMV-haltigen Leukozyten während der Virämie und ermöglicht im Gegensatz zur Kokultivation eine sichere Identifizierung und Quantifizierung der HCMV-phagozitierenden Zellen. Der Antigennachweis kann innerhalb weniger Stunden ohne größeren Material- und Geräteaufwand durchgeführt werden. Seine klinische Relevanz (als Pathogenitätsmarker) übertrifft die der „shell vial culture“.

Die Amplifizierung von HCMV-Genomsequenzen aus klinischen Proben mit der Polymerase-Kettenreaktion wird bisher in spezialisierten Laboratorien für die frühe Diagnose der Zytomegalie und zur Klärung der Pathogenese eingesetzt. Die PCR ist eine sehr sensitive Technik, die eine theoretische Nachweisgrenze von einem Molekül HCMV-DNA in 10 µg GesamtdNA besitzt [7]. Verlaufsstudien haben gezeigt, daß die HCMV-DNA-PCR für die frühe Diagnose einer Primärinfektion und Reaktivierung und für das Monitoring der antiviralen Prophylaxe bzw. Chemotherapie geeignet sei [8-13].

Neben dem Erregernachweis haben sich für die Labordiagnose einer Zytomegalie, der Enzymimmunoas-

say (ELISA) sowie der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) zum Nachweis von Antikörpern der Immunglobulinklasse M gegen die „Spätantigene“ (late antigens) von HCMV bewährt [14]. Auch bei der Reaktivierung einer latent gewordenen Infektion werden häufig HCMV-spezifische IgM-Antikörper neu gebildet. Dies gilt ebenso meist für immunsuppressiv behandelte Patienten nach Organtransplantation. Bei Patienten mit LAS und AIDS bleibt die Bildung von spezifischem IgM öfters aus, obwohl eine aktive HCMV-Infektion abläuft [15].

In den letzten Jahren sind von der Industrie eine Vielzahl an Testkits zum technisch problemlosen Nachweis der is:CMV-IgM-Antikörper entwickelt und amtlich zugelassen worden. Ein neuer kommerzieller ELISA wurde kritisch im Hinblick auf einen routinemäßigen Einsatz in der virologischen bzw. immunologischen Labordiagnostik im Vergleich zu zwei seit mehreren Jahren bewährten Immunoassays und zum Erregernachweis bewertet.

Material und Methoden

HCMV-IgM-ELISAs

In dieser Studie wurden ein neuer µ-capture ELISA (Freka CMV-M ELISA, Fresenius, Bad Homburg, mit bereits etablierten Verfahren, dem Enzygnost CMV-IgM, Behringwerke, Marburg, und dem CMV-IgM-ELA, Medac, Hamburg) verglichen.

Alle ELISAs wurden entsprechend den vom Hersteller mitgelieferten Bedienungsanleitungen durchgeführt und interpretiert. Die entsprechenden Qualitätskontrollen wurden berücksichtigt. Beim Enzygnost CMV-IgM wurde eine Vorbehandlung der Serumproben mit Rheumafaktor-Absorbens durchgeführt.

HCMV-IgG-ELISA

Spezifische IgG-Antikörper gegen HCMV wurden mit Hilfe des Enzygnost HCMV-IgG entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt und nach der Methode von Doerr et al. [14] über eine Einpunktmessung quantifiziert.

HCMV-DNA-PCR, Infektionsversuch über den Nachweis von HCMV-„early antigen“ in infizierten Fibroblasten und pp65-Antigen-Nachweis

Die HCMV-DNA Amplifizierung mit Hilfe der PCR, die quantitative pp65-Antigen-Bestimmung aus peripheren Leukozyten und die schnelle Virusisolierung aus dem Urin wurden, wie bereits beschrieben, durchgeführt [1,16,17].

Serumproben

Insgesamt wurden mit jedem Test 224 Serumproben untersucht. 83 davon waren Verlaufspröben von 15 Organtransplantierten, welche in der Frankfurter Uniklinik während den Jahren 1993 bis 1995 stationär behandelt wurden. Bei allen diesen Patienten wurde eine aktive Infektion über den Erregernachweis bzw.

Nicht standardisierte Abkürzungen: AIDS, acquired immunodeficiency syndrome; CMV, cytomegalovirus; EBV, Epstein-Barr Virus; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; HCMV, human cytomegalovirus; HSV, Herpes simplex Virus; IFT, Immunfluoreszenztest; IPF, Immunperoxidasefärbung zum Nachweis von HCMV-„early antigen“ in infizierten Fibroblasten; LAS, lymphadenopathy syndrome; PCR, polymerase chain reaction; VZV, Varicella-Zoster Virus.

Serologie diagnostiziert. Bei diesen Patienten wurden zur Verlaufskontrolle kurz vor der Transplantation und in meistens wöchentlichen Intervallen Blutproben zum Erregernachweis und zur Bestimmung HCMV-spezifischer Antikörper entnommen. Es lagen Daten zum Serostatus des Empfängers und Spenders sowie zu den klinischen Manifestationen, welche evtl. auf eine HCMV-Infektion zurückzuführen waren, vor.

Weiterhin wurden 38 potentiell kreuzreaktive Proben, welche von Patienten mit einer anderen Erkrankung als einer Cytomegalie stammten, untersucht. Es handelte sich um Proben mit IgM-Antikörpern gegen HSV, VZV und EBV. Zur weiteren Ermittlung der Spezifität wurden auch 20 Rheumafaktor- und/oder antinukleäre Antikörper-positive Seren sowie ein Kollektiv von 81 bekannten CMV-IgM-negativen Serumproben getestet.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Verlaufsseren von Organtransplantierten sind in Tabelle 1 dargestellt. Bei 10 von den 15 Organtransplantierten handelte es sich um eine HCMV-Primärinfektion. Bei 2 Patienten wurde eine primäre Cytomegalie nicht über die Bestimmung spezifischer IgM-Antikörper in allen drei Vergleichstests erkannt. Bei vier Patienten wurde die HCMV-Infektion gleichzeitig mit allen drei Tests nachgewiesen.

Mit dem Medac CMV-ELA (n = 34) wurde die höchste Anzahl an positiven Seren beobachtet. Dagegen wurden bei nur 25 bzw. 28 Serumproben HCMV-spezifische IgM-Antikörper mit dem Freka CMV-M ELISA und Enzygnost CMV-IgM nachgewiesen. Mit diesen beiden Tests wurden HCMV-IgM Antikörper später nachgewiesen als mit dem Medac-ELISA. Bei den Patienten VP, NI, SC, AU und WM wurde der Freka CMV-M ELISA 5 bis 8 Tage später positiv als der Medac-Test. Beim Patienten DA waren im Gegensatz zu den Vergleichstests mit dem Freka-Test keine IgM-Antikörper über den gesamten Beobachtungszeitraum nachweisbar. Der Enzygnost CMV-IgM war der einzige Test, der im Vergleich bei zwei Patienten (AH und AU) eine HCMV-Infektion über die Bildung spezifischer IgM-Antikörper nicht erkannte.

Relativ zum Erregernachweis über PCR, Virusisolierung und quantitative pp65-Antigenbestimmung dauerte es bei vielen Patienten bis zu mehreren Wochen, ehe eine humorale Immunantwort über die Bildung von spezifischem IgM nachweisbar war. In den Serumproben von zwei Patienten (EM und KM) konnten trotz positiver PCR oder IPF (Virusisolierung) mit keinem der drei ELISAs HCMV-spezifische IgM-Antikörper nachgewiesen werden.

Bei einem Patienten (SC) mit klinischem Verdacht auf eine primäre HCMV-Infektion wurde eine HCMV-IgM-Antikörperbildung beobachtet, dagegen

Tabelle 1 Evaluierung verschiedener HCMV-IgM-ELISAs im Vergleich zum Erregernachweis anhand von Verlaufproben von Patienten mit einer aktiven HCMV-Infektion

Patient	Alter (J)	Transplantat	HCMV-Serostatus Empfänger/Spender	Klinische Manifestationen der Cytomegalie	Ergebnis bzw. erstes positives Ergebnis (Tage nach Transplantation)							
					Erregernachweis			Serologie/Testkithersteller				
					PCR	pp65-Ag	IPF	IgG*		IgM		
			Behring	Behring	Medac	Freka						
VP	30	Niere	E-/S+	asymptomatisch	36	n.d.	n.d.	77	77	77	82	
SH	37	Niere	E-/S+	Leukopenie, Thrombozytopenie, Fieber	25	25	n.d.	neg.	110	110	110	
AH	30	Niere	E-/S+	Fieber, Leukopenie	n.d.	22	neg.	neg.	neg.	91	91	
LD	50	Niere	E+/S+	Thrombozytopenie, erhöhte Leberwerte	neg.	neg.	neg.	neg.	35	35	35	
NI	55	Niere	E+/S+	Fieber	n.d.	45	45	neg.	45	45	53	
RG	47	Niere	E-/S+	asymptomatisch	neg.	neg.	n.d.	neg.	61	61	61	
SC	33	Niere	E-/S+	Leukopenie, erhöhte Leberwerte, Fieber	n.d.	n.d.	n.d.	91	89	91	91	
OZ		Herz	E+/S?		n.d.	n.d.	n.d.	neg.	150	150	150	
DA		Niere	E+/S+		n.d.	n.d.	n.d.	32	32	32	neg.	
AU	45	Niere	E-/S+	asymptomatisch	62	n.d.	n.d.	neg.	neg.	76	91	
EM	68	Niere	E-/S-	Fieber	33	n.d.	n.d.	neg.	neg.	neg.	neg.	
KM	23	Herz	E-/S?	Pneumonie	n.d.	n.d.	1	69	neg.	neg.	neg.	
MK	50	Niere	E+/S?	asymptomatisch	125	n.d.	n.d.	107	107	95	95	
SB	50	Niere	E-/S+	Leukopenie, Thrombozytopenie	71	n.d.	n.d.	neg.	neg.	neg.	neg.	
WM	38	Niere	E-/S+	Leukopenie	25	neg.	n.d.	neg.	74	70	77	

PCR: HCMV-DNA -Amplifizierung aus peripheren Leukozyten mit Hilfe einer „nested“-PCR; IPF: 24 Std. Virusisolierung aus verschiedenen Patientenmaterialien (Urin und bronchoalveoläre Lavage) Peroxydase-Färbung in infizierten Vorhautfibroblasten; * vierfacher Titeranstieg unabhängig von einer Immunglobulingabe.

Tabelle 2 Austestung von CMV-IgM-negativen und potentiell kreuzreaktiven Seren mit den Behring-, Medac- und Freka-ELISAs

Serumkollektiv	Anzahl falsch positiver Ergebnisse		
	Behring	Medac	Freka
potentiell kreuzreaktive Seren (n = 58)	2	1	0
CMV-IgM-negative Seren (n = 81)	0	2	1
Gesamt (n = 139)	2	3	1

blieb die Virusisolierung negativ. Zwei weitere asymptomatische Patienten (RG und OZ) wiesen bei negativem Erregernachweis in mehreren Serumproben mit den verschiedenen Immunoassays IgM-Antikörper auf.

Die HCMV-IgM-negativen Proben, die als Referenz für die Spezifitätsbestimmung dienen wurden mit dem Enzygnost CMV-IgM als solche bewertet. Während der Freka-ELISA kein falsch positives Ergebnis lieferte, wurden mit dem Medac CMV-ELA zwei Proben als falsch positiv ermittelt. Bei der Austestung der potentiell kreuzreaktiven sowie der Rheumafaktor- und antinukleär Antikörper-positiven Seren zeigte der Enzygnost CMV-IgM die höchste Anzahl falsch positiver Ergebnisse (n = 2).

Der Medac CMV-ELA zeigten die höchste Sensitivität (Tabelle 3). Eine insgesamt gute Spezifität zeigten alle Vergleichstests.

Diskussion

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß es relativ große Unterschiede in der Sensitivität zwischen den verschiedenen kommerziell erhältlichen ELISAs gibt. Mit dem Enzygnost CMV-IgM wurde bei 5 Patienten eine floride Cytomegalie nicht erkannt. Auf die relativ niedrige Sensitivität des Behring Enzygnost CMV-IgM-ELISAs und des Vorgängertests (Enzygnost Cytomegalie IgM) wurde bereits in früheren Studien mehrfach hingewiesen [4,17-21].

Der Freka-Test zeigte eine ähnliche Sensitivität wie der Enzygnost CMV-IgM-ELISA, obwohl dieser auf dem μ -capture-Prinzip basiert. Der sensitivste Test in dieser Vergleichstudie war eindeutig der Medac CMV-ELA.

Obwohl mit sehr sensitiven ELISAs das diagnostische Fenster vom Erregernachweis bis zum Auftreten spezifischer IgM-Antikörper um ein bis zwei Wochen verkürzt werden kann, beruht die frühe Diagnose der Cytomegalie bei immunsupprimierten Patienten nach wie vor auf dem Erregernachweis. Mit der quantitativen Bestimmung von pp65-Antigen in peripheren Blutleukozyten steht ein schnelles Nachweisverfahren zur Verfügung, welches innerhalb von 6 Stunden eine klinisch relevante Diagnose der HCMV-Infektion ermöglicht [6,17].

Über den zusätzlichen Nachweis von HCMV-spezifischem IgA konnte in früheren Studien die serologische Diagnostik der Cytomegalie bestimmter Risikoprobanden (speziell AIDS-Patienten) verbessert werden [19,22]. Zur Zeit werden neuere Testverfahren entwickelt, welche auf der α -capture-Technik beruhen. Erste Evaluierungen haben bereits gezeigt, daß im Vergleich zu μ -capture ELISAs, bei einem Teil der Patienten, eine humorale Immunantwort über die spezifische IgA-Bestimmung früher nachweisbar ist (unveröffentlichte Ergebnisse).

Ein großes Problem ist die Definition des „goldenen Standards“ für die Evaluierung der Sensitivität und Spezifität von HCMV-IgM Tests. Einerseits kann das Virus aus dem Urin bei einer asymptomatischen Infektion isoliert werden, andererseits muß eine offensichtlich aufgetretene Infektion nicht unbedingt von einer Virämie oder Antigenämie begleitet werden [17]. Auf Grund der hohen Sensitivität der PCR kann die Virus DNA gelegentlich auch aus peripheren Leukozyten asymptomatischer HCMV-seropositiver und sogar seronegativer Patienten amplifiziert werden [23]. Bei 8 von 15 Patienten wurde eine aktive HCMV-Infektion mit dem Auftreten entsprechender für die HCMV-Infektion typischer klinischer Symptome serologisch diagnostiziert, und bei 7 Patienten wurde sie mit mindestens zwei verschiedenen Untersuchungsmethoden gesichert. Bei den 6 asymptomatischen Patienten von denen drei eine positive PCR oder Virurie hatten wurde die aktive HCMV-Infekti-

Tabelle 3 Sensitivität, Spezifität und positiver Vorhersagewert verschiedener HCMV-IgM-ELISAs im Vergleich zum Enzygnost-Cytomegalie oder Medac CMV-ELA

Referenztest: Behring	Medac CMV-ELA	Freka CMV-M-ELISA
Sensitivität (%)	96,4	70
Spezifität (%)	95,3	98,4
pos. Vorhersagewert (%)	75	87,5
Referenztest: Medac CMV-ELA	Enzygnost CMV-IgM	Freka CMV-M-ELISA
Sensitivität (%)	76,5	66,6
Spezifität (%)	97,3	99,4
pos. Vorhersagewert (%)	83,9	96,3

on von allen (bis auf den Patient DA) mit den HCMV-IgM-ELISAs erkannt.

Frühere Studien haben gezeigt, daß Seren, die bei der Paul-Bunnell-Reaktion positiv reagieren oder antinukleäre Antikörper enthalten, oft falsch positive Ergebnisse liefern [24]. Kreuzreaktionen mit Infektionen anderer Viren der Herpesfamilie werden oft mit kommerziell erhältlichen Kits beobachtet [25]. Die Ursache hierfür liegt in der Kreuzreaktivität verschiedener Proteine der Herpesviren und in einem Wirtszellprotein aus den Golgivesikeln, welches in die Virus-hülle eingebaut werden [26].

Der IgM-Test ist nach wie vor der am leichtesten durchführbare und daher häufigste Parameter der akuten oder reaktivierten HCMV-Infektion. Daher wird ständig an seiner Verbesserung gearbeitet. Das Ziel ist hierbei eine hohe Spezifität und Sensitivität miteinander zu kombinieren. Ein besonderer Nachholbedarf besteht bei Immunschwäche, -suppression oder -unreife.

Literatur

- Schacherer Ch, Braun W, Doerr HW. Detection of Cytomegalovirus in bronchial lavage and urine using a monoclonal antibody to an HCMV early nuclear protein. *Infection* 1988;16:288-92.
- Thiele GM, Bicak MS, Young A, Kinsey J, White RJ, Purtilo DT. Rapid detection of cytomegalovirus, centrifugation and immunofluorescence with a monoclonal antibody to an early nuclear antigen. *J Virol Meth* 1987;16:327-38.
- Marsano L, Perrillo RP, Flye MW, Hanto DW, Spitzer ED, Thomas JR, Murray PR, Windus DW, Brunt EM, Storch GA. Comparison of culture and serology for the diagnosis of cytomegalovirus infection in kidney and liver transplant recipients. *J Infect* 1990;161:454-61.
- Weber B, Hamann A, Ritt B, Rabenau H, Doerr HW. Comparison of shell vial culture and serology for the diagnosis of human cytomegalovirus infection in neonates and immunocompromised subjects. *Clin Investig* 1992;70:503-7.
- Thé TH, van den Berg AP, van Son WJ, Tegzess AM, Sloof MJH, Klompmaaker JJ, Haagsma EB, van der Bij W, van der Giesen M. Recent advances in the early and reliable immunodiagnosis of cytomegalovirus infection in immunocompromised hosts. In: Landini MP, editor. *Progress in Cytomegalovirus Research*. Amsterdam (The Netherlands): Elsevier, 1991;209-20.
- Van der Bij W, Torensma R, Van Son WJ, Anema J, Schirm J, Tegzess AM, The TH. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. *J Med Virol* 1988;25:179-88.
- Kühn JE, Braun RW, Schäfer P, Wieland U, Eggers HJ. Diagnostik der Zytomegalievirus (HCMV)-Infektion mittels der Polymerase-Kettenreaktion. *Klin Lab* 1992;38:261-70.
- Boland GJ, Weger RA, Tilanus MGJ, Ververs C, Bosboom-Kalsbeek K, De Gast GC. Detection of cytomegalovirus (CMV) in granulocytes by polymerase chain reaction compared with the antigen test. *J Clin Microbiol* 1992;30:1763-67.
- Einslele H, Steidle M, Vallbracht A, Saal JG, Ehninger G, Müller CA. Early occurrence of human cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation as demonstrated by the polymerase chain reaction technique. *Blood* 1991;77:1104-10.
- Gerna G, Zipeto D, Parea M, Percivalle E, Zavattoni M, Gaballo A, Milanese G. Early virus isolation, early structural antigen detection and DNA amplification by the polymerase chain reaction in polymorphonuclear leucocytes from AIDS patients with human cytomegalovirus viraemia. *Mol Cell Probes* 1991;5:365-74.
- Gerna G, Zipeto D, Parea M, Revello MG, Silini E, Percivalle E, Zavattoni M, Grossi P, Milanese G. Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia, and DNAemia. *J Infect Dis* 1991;164:488-98.
- Olive DM, Simsek M, Al-Mufti S. Polymerase chain reaction assay for the detection of human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 1989;27:1238-42.
- Zipeto D, Revello MG, Silini E, Parea M, Percivalle E, Zavattoni M, Milanese G, Gerna G. Development and clinical significance of a diagnostic assay based on the polymerase chain reaction for detection of human cytomegalovirus DNA in blood samples from immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1992;30:527-30.
- Doerr HW, Rentschler M, Scheiffler G. Serologic detection of active infections with human herpes viruses (CMV, EBV, HSV, VZV): diagnostic potential of IgA class and IgG subclass-specific antibodies. *Infection* 1987;15:93-98.
- Braun W, Weber B, Moell U, Hamann A, Doerr HW. Comparison of specific immunoglobulin A and M patterns in human cytomegalovirus infection studied by a modified Western blot method. *J Virol Meth* 1993;43:65-76.
- Bein G, Bitsch A, Hoyer J, Kirchner H. The detection of human cytomegalovirus immediate early antigen in peripheral blood leukocytes. *J Immunol Meth* 1991;137:175-8.
- Weber B, Nestler U, Ernst W, Rabenau H, Braner J, Birkenbach A, Scheuermann EH, Schoeppe W, Doerr HW. Low correlation of human cytomegalovirus DNA amplification by polymerase chain reaction with cytomegalovirus disease in organ transplant recipients. *J Med Virol* 1994;43:187-93.
- Steinmann J, Bischoff J. Vergleich serologischer Methoden zum Nachweis einer Cytomegalievirus-Infektion. *Lab med* 1991;15:585-9.
- Weber B, Braun W, Tyralla B, Doerr HW. Human cytomegalovirus (HCMV) specific IgE in primary HCMV infection. *Clin Investig* 1992;70:497-502.
- Weber B, Stemmler A, Ernst W, Scheuermann EH, Braun W, Doerr HW. Improvement of serological diagnosis of human cytomegalovirus infection in renal transplant recipients by testing for specific immunoglobulin E by ELISA. *Infection* 1993;21:158-64.
- Weber B, Opp M, Born HJ, Langenbeck U, Doerr HW. Laboratory diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection using PCR and shell vial culture: a case report. *Infection* 1992;20:155-7.
- Braun W, Hehr B, Rabenau H, Doerr HW. Serologische Diagnostik der Zytomegalie bei immunsupprimierten Patienten. *AIFO* 1987;11:634-8.
- Taylor-Wiedeman J, Hayhurst GP, Sissons JGP, Sinclair JH. Polymorphonuclear cells are not sites of persistence of human cytomegalovirus in healthy individuals. *J Gen Virol* 1993;74:265-8.
- Nielsen SL, Sorensen I, Andersen HK. Kinetics of specific immunoglobulins M, E, A, and G in congenital, primary, and secondary cytomegalovirus infection studied by antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1988;26:654-61.
- Doerr HW, Albert S. New developments in CMV antibody screening. *Biotest Bull* 1990;4:125-30.
- Severi B, Landini MP, Govoni E. Human cytomegalovirus morphogenesis: An ultrastructural study of the late cytoplasmic phases. *Arch Virol* 1988;98:51-64.