

*SILMARA DE SOUZA*

*UTILIDADE DA DETERMINAÇÃO DA AVIDEZ DOS  
ANTICORPOS IgG ANTI-CITOMEGALOVÍRUS HUMANO  
(HCMV) PARA O IMUNODIAGNÓSTICO DA  
CITOMEGALOVIROSE*

*CAMPINAS*

*2003*

**SILMARA DE SOUZA**

**UTILIDADE DA DETERMINAÇÃO DA AVIDEZ DOS  
ANTICORPOS IgG ANTI-CITOMEGALOVÍRUS HUMANO  
(HCMV) PARA O IMUNODIAGNÓSTICO DA  
CITOMEGALOVIROSE**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para a obtenção do título de Mestre em Ciências  
Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

**Orientador:** Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi

**CAMPINAS**

**2003**

UNIDADE	BR
Nº CHAMADA	UNICAMP
	So 89u
V	EX
TOMBO BCI	56272
PROC.	16.12.4103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	4/11/03
Nº CPD	

CM00191455-1

Bibid 304406

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

So89u      Souza, Silmara de  
 Utilidade da determinação da avidéz dos anticorpos IgG anti-citomegalovírus humano (HCMV) para o imunodiagnóstico da citomegalovirose. / Silmara de Souza. Campinas, SP : [s.n.], 2003

Orientador : Cláudio Lúcio Rossi  
 Dissertação ( Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
 Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sorologia. 2. Técnicas imunoenzimáticas. 3. Virologia - técnica. I. Cláudio Lúcio Rossi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**

**Orientador: Prof. Dr.**

**Cláudio Lúcio Rossi**

**Membros:**

**1. Profa. Dra. Aparecida Yulie Yamamoto**

**2. Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa**

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

**Data: 20/08/2003**

*A Deus, dedico a realização deste trabalho.*

*Aos meus pais, pelo amor, incentivo e compreensão.*

## ***AGRADECIMENTOS***

---

Ao meu orientador, Dr. Cláudio Lúcio Rossi pelo profissionalismo, apoio e compreensão.

À Dra. Sandra Cecília Botelho Costa, pelo apoio e cooperação.

Aos funcionários da Seção de Imunologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da Unicamp, pela atenção e apoio técnico.

Às minhas amigas e companheiras, Sandra Helena Alves Bonon, Lisandra Akemi Suzuki e Mariza Lins Gondo, que me incentivaram e apoiaram em muitos momentos do meu trabalho e cuja amizade sempre me fortaleceu.

Às minhas irmãs, que sempre me deram força e amizade.

Aos meus pais, por nunca deixarem de acreditar em mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio à realização do presente trabalho.

## *SUMÁRIO*

---

	<i>PÁG.</i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>vii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>x</i>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>OBJETIVO</b> .....	28
<b>ARTIGO</b> .....	30
Summary.....	32
Introduction.....	33
Materials and Methods.....	35
Results.....	38
Discussion.....	39
Resumo.....	41
References.....	42
Figure.....	45
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	46
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	48



***RESUMO***



A infecção causada pelo citomegalovírus humano (HCMV) é geralmente assintomática ou está associada a sintomas clínicos brandos e não específicos em pessoas imunocompetentes. Entretanto, o vírus pode causar doença grave em determinados tipos de pacientes, como crianças com infecção congênita e pessoas com comprometimento do sistema imune.

O diagnóstico sorológico da infecção primária recente pelo HCMV é usualmente baseado na detecção de anticorpos específicos da classe IgM, soroconversão e/ou aumento significativo dos títulos de anticorpos específicos IgG. Como a soroconversão e a elevação significativa das concentrações de anticorpos dificilmente são observadas, a detecção de anticorpos IgM tem sido o marcador sorológico mais frequentemente usado para o diagnóstico da infecção aguda. Entretanto, a baixa especificidade de muitos testes utilizados na pesquisa de IgM anti-HCMV e a persistência desses anticorpos em algumas pessoas durante vários meses, ou mesmo anos, têm gerado diagnósticos incorretos de infecção aguda, causando preocupações desnecessárias, especialmente em mulheres grávidas e em pacientes com comprometimento do sistema imune.

Com base na observação que a avidéz dos anticorpos aumenta gradualmente após a exposição a um imunógeno, vários trabalhos têm mostrado que a determinação da avidéz dos anticorpos IgG pode ser utilizada para identificar infecções recentes e antigas, incluindo a infecção pelo HCMV.

No Brasil, os testes comerciais para a determinação da avidéz dos anticorpos IgG anti-HCMV, além de muito caros, não estão disponíveis prontamente no mercado. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um teste de avidéz imunoenzimático para o HCMV (ELISA HCMV), capaz de distinguir a infecção primária recente da infecção de longa duração. Na idealização do teste, foram considerados parâmetros importantes para laboratórios de rotina, como simplicidade e baixo custo. O teste foi padronizado com o kit comercial ETI-CYTOK G Plus (Sorin Biomedica, Itália), utilizando uréia 8 M para a dissociação dos anticorpos de baixa avidéz. Para a validação do teste ELISA HCMV, a sua performance foi comparada com a do teste de avidéz comercial automatizado VIDAS CMV IgG (bioMérieux, França), utilizando 24 soros de pacientes com infecção recente primária e 25 soros de pacientes com infecção de longa duração apresentando persistência de anticorpos específicos IgM. Resultados similares foram obtidos com os dois métodos de

avidez. Todos os 24 soros de pacientes com infecção recentemente adquirida apresentaram índices de avidez compatíveis com infecção aguda utilizando o teste VIDAS CMV IgG, enquanto que um dos soros apresentou resultado duvidoso no teste ELISA HCMV. Os 25 soros de pacientes com infecção de longa duração apresentaram resultados idênticos com os dois métodos, com apenas um dos soros apresentando um valor não compatível. Estes resultados sugerem que o nosso teste de avidez pode ser potencialmente útil para o imunodiagnóstico da infecção pelo HCMV.



***ABSTRACT***

The infection caused by human cytomegalovirus (HCMV) is generally asymptomatic or is associated with mild non-specific clinical symptoms in immunocompetent subjects. The virus can, however, cause serious illness in congenitally infected infants and in immunocompromised patients.

The serological diagnosis of a recently acquired HCMV infection is usually based on the detection of specific IgM antibodies, seroconversion, and/or a four-fold or greater rise in the titre of HCMV-specific IgG antibodies. Since seroconversion and a rise in IgG titres are seldom demonstrable, the detection of HCMV-specific IgM antibodies has been the most frequently used serological marker for diagnosing acute infection. However, the use of tests with a low specificity and the persistence, in some patients, of specific IgM antibodies for a long time have led to the misdiagnosis of acute HCMV infection and unnecessary concern, especially with respect to pregnant women and immunocompromised patients.

Based on the observation that antibody avidity gradually increases after exposure to an immunogen, several reports have shown that the avidity of IgG antibodies can be used as a marker for identifying recent primary and long-term infections, including HCMV infections.

In Brazil, commercial assays for evaluating the avidity of HCMV-specific IgG are expensive and are not readily available. The aim of this study was to standardize an economical and simple in-house HCMV-enzyme-linked immunosorbent assay avidity test (ELISA HCMV) for distinguishing recent primary from long-term infection. The test was standardized with the commercial kit ETI-CYTOK G Plus (Sorin Biomedica, Italy) using 8 M urea in phosphate-buffered saline to dissociate low-avidity antibodies. To validate the ELISA HCMV test, its performance was compared with that of the commercial automated VIDAS CMV IgG avidity assay (bioMérieux, France), using well-characterized sera from patients with recent primary and long-term HCMV infections. Forty-nine sera, 24 from patients with a recent primary HCMV infection and 25 from patients with a long-term HCMV infection with a sustained persistence of specific IgM antibodies, were tested. Similar results were obtained with the two avidity methods. All sera from the 24 patients with recently acquired infection had avidity indices compatible with acute HCMV infection by the VIDAS test, whereas with the in-house test, one serum sample had an equivocal

result. In the 25 sera from patients with long-term infection, identical results were obtained with the two methods, with only one serum sample having an incompatible value. These findings suggest that our in-house avidity test could be a potentially useful tool for the immunodiagnosis of HCMV infection.



***INTRODUÇÃO  
GERAL***

O citomegalovírus humano (HCMV) origina a formação de células grandes apresentando inclusões intranucleares (e eventualmente citoplasmáticas), facilmente visualizadas quando coradas com hematoxilina-eosina, Giemsa ou Papanicolau. Essas células foram descritas pela primeira vez, no início do século passado, em diversos órgãos de crianças que haviam morrido em consequência de síndromes clínicas diversas (RIBBERT, 1904; RILEY, 1997). Nos anos subsequentes, mesmo sem a identificação do agente etiológico, a associação freqüente dessas células com determinados quadros clínicos originou a designação doença de inclusão citomegálica. Em 1921, GOODPASTURE e TALBOT sugeriram que a citomegalia poderia ser devido ao efeito indireto de um vírus sobre a célula. Nos anos de 1956 e 1957, vários autores descreveram o isolamento do HCMV, a partir de materiais biológicos de pessoas com a doença de inclusão citomegálica (ROWE et al., 1956; SMITH, 1956; WELLER et al., 1957). Em 1960, WELLER et al., sugeriram a designação citomegalovirose, em substituição a doença de inclusão citomegálica, buscando uma denominação que refletisse as alterações celulares provocadas pelo HCMV. A partir do isolamento do HCMV, a possibilidade de replicação do vírus em cultura de fibroblastos humanos permitiu o desenvolvimento de procedimentos diagnósticos que resultaram em muitas observações clínicas e epidemiológicas importantes (RILEY, 1997).

O HCMV pertence à família dos herpesvírus, assim como os vírus herpes simplex tipos 1 e 2, o vírus da varicela-zoster, os herpesvírus humanos 6, 7 e 8 e o vírus de Epstein-Barr (YEN-LIEBERMAN, 2000). O HCMV é um DNA vírus, de simetria icosaédrica, com 162 capsômeros envolvidos por um envelope lipídico, tendo um diâmetro de aproximadamente 200 nm (CONCEIÇÃO et al., 1991; YEN-LIEBERMAN, 2000). O HCMV é considerado um dos vírus mais termolábeis, com vida média de 45 minutos a 37 °C e de 10 minutos a 56 °C (CONCEIÇÃO et al., 1991; PANNUTI, 2001). O vírus é também inativado em pH inferior a 5, pela exposição ao éter a 20% por duas horas e pela luz ultravioleta por 5 minutos (CONCEIÇÃO et al., 1991). Como outros beta-herpesvírus, o HCMV tem um ciclo reprodutivo longo, dissemina-se lentamente de célula para célula, produz inclusões intranucleares após a infecção celular e causa um efeito citopático característico, tornando a célula infectada maior (ROIZMANN, 1992; RAWLINSON, 1999).

O HCMV, com uma distribuição geográfica universal, é considerado um dos principais causadores de doença na espécie humana. O vírus pode ser detectado em vários materiais biológicos do hospedeiro, incluindo sangue, urina, líquido cefalorraquidiano (LCR), saliva, sêmen, fezes, lágrimas, leite materno e secreções cervical e vaginal (YEN-LIEBERMAN, 2000). O risco de infecção pelo vírus começa já na vida intra-uterina (infecção congênita transplacentária), continua durante o período próximo ao nascimento (infecção perinatal) e persiste durante a infância e a idade adulta (infecção pós-natal adquirida). Estudos soropidemiológicos têm mostrado que 40 a 100% da população adulta das comunidades pode apresentar níveis significativos de anticorpos anti-HCMV (VAN DER MEER et al., 1996; DE JONG et al., 1998; RAWLINSON, 1999; ALMEIDA et al., 2001). A infecção é mais freqüente em países em desenvolvimento, particularmente em áreas apresentando menor condição sócio-econômica (VAN DER MEER et al., 1996; PANNUTI, 2001). Entretanto, o contato estreito de pessoas dentro dos grupos populacionais parece ser um fator de risco mais importante para a transmissão do vírus do que o status sócio-econômico da população (VAN DER MEER et al., 1996). A urina e a saliva são as fontes mais importantes de disseminação do vírus, e por isso as taxas de infecção adquirida costumam ser muito altas em berçários e creches, devido ao contato íntimo entre as pessoas que estão excretando o vírus e as pessoas susceptíveis (POMEROY e ENGLUND, 1987; MERIGAN e RESTA, 1990; BALE et al., 1999; PANNUTI, 2001; LIGON, 2002). Taxas elevadas de soropositividade são também encontradas em prostitutas, homossexuais, usuários de drogas intravenosas e pessoas que receberam múltiplas transfusões sangüíneas, consistente com a difusão parenteral e sexual do vírus (RAWLINSON, 1999).

De modo similar a outras infecções por herpesvírus, após a fase aguda da infecção, o HCMV não é eliminado do organismo, podendo gerar uma infecção crônica de baixo grau ou evoluir para um estado de latência (DE JONG et al., 1998; SWEET, 1999). Os sítios de latência do vírus ainda não estão totalmente definidos, mas provavelmente incluem células precursoras da medula óssea e monócitos periféricos (DE JONG et al., 1998).



A infecção pelo HCMV é definida pelo isolamento do vírus (ou de seus componentes, como proteínas e ácidos nucléicos) em qualquer tecido ou fluido biológico ou por evidência sorológica de contato recente (RAWLINSON, 1999; LJUNGMAN et al., 2002). Existem três padrões epidemiológicos de infecção pelo HCMV: infecção primária, reativação de infecção pré-existente e reinfeção (RUBIN et al., 1979). Infecção primária ocorre quando o vírus infecta uma pessoa pela primeira vez. Infecção recorrente é definida como uma nova detecção do HCMV em um paciente em que previamente havia sido documentada infecção viral e que não teve o vírus detectado durante um período de pelo menos 4 semanas (RAWLINSON, 1999). Infecção recorrente pode resultar de reativação de um vírus latente ou reinfeção com uma linhagem distinta do vírus (RAWLINSON, 1999; LJUNGMAN et al., 2002). Doença clínica pelo HCMV é definida como infecção apresentando manifestações clínicas sugestivas associadas com achados histológicos do efeito citopático viral ou evidências de infecção recente (cultura positiva para HCMV ou soroconversão) (RAWLINSON, 1999).

Em pessoas imunocompetentes, a grande maioria das infecções pelo HCMV é assintomática (VAN DER MEER et al., 1996; DE JONG et al., 1998; KANO e SHIOHARA, 2000). Nos pacientes com sintomatologia, na maioria dos casos, o quadro clínico assemelha-se à mononucleose infecciosa. Esse quadro clínico ocorre principalmente em adultos, caracterizando-se por febre prolongada (freqüentemente com 10 ou mais dias de duração), sensação de fraqueza, sudorese e, eventualmente, hepatoesplenomegalia (KANO e SHIOHARA, 2000; PANNUTI, 2001; FOTI et al., 2002; SISSONS e CARMICHAEL, 2002; TAYLOR, 2003). Em crianças, a presença de linfadenomegalia cervical é comum, ocorrendo em cerca de 90% dos casos (PANNUTI, 2001). Entretanto, nos adultos, ao contrário do que se verifica na mononucleose infecciosa, a linfadenomegalia cervical é rara (PANNUTI, 2001; SISSONS e CARMICHAEL, 2002). Muito menos freqüentemente, podem ocorrer doenças envolvendo o sistema nervoso central (síndrome de Guillain-Barré e meningite asséptica), o trato gastrointestinal (hepatite, esplenomegalia, ulcerações e hemorragias), o trato respiratório (pneumonite) e o sistema hematológico (trombocitopenia e anemia hemolítica) (PANNUTI, 2001; SISSONS e CARMICHAEL, 2002). Ocasionalmente, também, têm sido descritos fenômenos autoimunes, como a detecção temporária de anticorpos anti-nucleares (FAN), fator

reumatóide e crioglobulinas. Com relação aos exames laboratoriais, condizente com as manifestações clínicas observadas na maioria dos casos, os pacientes freqüentemente possuem um hemograma apresentando linfocitose, com a presença de grande número de linfócitos atípicos. As enzimas hepáticas (AST e ALT) estão moderadamente elevadas em aproximadamente 80% dos casos (PANNUTI et al., 1985; PANNUTI, 2001). Diferentemente do que ocorre em pessoas imunocompetentes, a infecção primária ou recorrente pelo HCMV, em pessoas apresentando comprometimento do sistema imune, como receptores de transplantes de órgãos, pacientes com câncer e pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), freqüentemente resultam em manifestações clínicas graves que, se não tratadas rápida e adequadamente, podem levar o paciente ao óbito (TONG, 1997; RAWLINSON, 1999; FOTI et al., 2002; SISSONS e CARMICHAEL, 2002; TAYLOR, 2003). Nesses grupos de pacientes, a infecção pelo HCMV é fortemente associada com o aumento da incidência de infecções por fungos e bactérias, particularmente as gram-negativas (RAWLINSON, 1999; LJUNGMAN et al., 2002). As manifestações clínicas mais comumente observadas são quadros febris prolongados com alterações hematológicas ou hepáticas, quadros de pneumonia intersticial, retinite, ulcerações gastrointestinais e encefalite (PANNUTI, 2001; FOTI et al., 2002). Vários trabalhos têm mostrado que os quadros clínicos variam de acordo com o grupo clínico estudado (PANNUTI, 2001). Nesse contexto, retinite e pneumonia são, respectivamente, as manifestações clínicas principais em pacientes com infecção pelo HIV e receptores de transplante (FOTI et al., 2002).

A infecção pelo HCMV durante a gravidez pode resultar em graves conseqüências para a criança, principalmente se a infecção primária for adquirida nos primeiros meses de gestação (AZAM et al., 2001). Vários estudos, em diferentes partes do mundo, têm mostrado taxas de infecção congênita variando de 0.3 a 2.5%, considerando todos nascimentos vivos (STAGNO et al., 1982; STAGNO et al., 1986; HAGAY et al., 1996; VAN DER MEER et al., 1996; AZAM et al., 2001). No Brasil, existem poucos estudos com relação à incidência de infecção congênita pelo HCMV. Na cidade de São Paulo, foram encontradas taxas variando de 0,49 a 0,98%, dependendo do nível sócio-econômico da população estudada (PANNUTI, 2001). Em uma população apresentando elevada soroprevalência para o HCMV (95,7%), na cidade de Ribeirão Preto,

Yamamoto et al. (2001) detectaram infecção congênita pelo vírus em 1,8% e 2,1% dos recém-nascidos a termo e pré-termos, respectivamente. Infecção congênita ocorre em 30 a 40% das mulheres grávidas com infecção primária pelo HCMV (AZAM et al., 2001). Aproximadamente 10% das crianças infectadas apresentam sintomas clínicos ao nascimento, sendo a doença fatal em 10 a 20% dos casos (RAYNOR, 1993; VAN DER MEER et al., 1996). Infecção congênita fulminante caracteriza-se clinicamente por icterícia, hepatoesplenomegalia, petéquias, microcefalia, calcificações cerebrais, perda parcial ou total da audição e coriorretinite (STAGNO et al., 1977; RAYNOR, 1993; VAN DER MEER et al., 1996). A infecção materna recorrente pelo HCMV (reativação endógena ou reinfecção exógena) em mulheres imunes pode resultar em infecção congênita (VAN DER MEER et al., 1996; AZAM et al., 2001; BOPPANA et al., 2001; PANNUTI, 2001). Enquanto alguns estudos têm mostrado que a infecção materna recorrente pelo HCMV em mulheres imunes, raramente resulta em problemas graves para a criança (STAGNO et al., 1982; FOWLER et al., 1992; VAN DER MEER et al., 1996), outros têm documentado que infecção congênita sintomática e crianças apresentando déficits neurológicos permanentes podem ser mais comuns do que se imagina (MORRIS et al., 1994; BOPPANA et al., 1999; BOPPANA et al., 2001).

A infecção perinatal ocorre principalmente devido ao contato da criança com secreções uterinas maternas contaminadas pelo HCMV durante sua passagem pelo canal de parto ou nas primeiras semanas de vida pela contaminação com leite materno contendo o vírus (DEMMLER, 1991; RAWLINSON, 1999; PANNUTI, 2001). Uma vez ingerido, o HCMV, usualmente, infecta as glândulas salivares do neonato, sendo o vírus excretado pela saliva e pela urina por tempo prolongado. Nos estudos realizados, a incidência de infecção perinatal tem variado de 7 a 38%, com taxas de infecção mais altas ocorrendo em populações de menor nível sócio-econômico (MACHADO et al., 1991; PANNUTI, 2001). A infecção perinatal, na grande maioria dos casos, é assintomática, embora alguns casos de pneumonite tenham sido descritos (VAN DER MEER et al., 1996; PANNUTI, 2001).

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo HCMV pode ser feito por diferentes métodos, incluindo exame direto de amostras (microscopia eletrônica, demonstração de células com corpúsculos de inclusão característicos e detecção de antígenos ou DNA viral),

isolamento do vírus em cultura de células e testes sorológicos. Apesar das várias metodologias disponíveis, um dos maiores problemas na citomegalovirose é a diferenciação entre infecção e doença (TONG, 1997).

A microscopia eletrônica além de fornecer resultados rapidamente, em cerca de 30 minutos, permite a identificação do HCMV em materiais eventualmente contaminados por fungos e bactérias (PANNUTI, 2001). A técnica, entretanto, não tem sido utilizada em laboratórios de rotina, pois além de possuir sensibilidade relativamente baixa, requer equipamento sofisticado e caro e pessoal altamente treinado (RAWLINSON, 1999; PANNUTI, 2001).

As células com inclusões intranucleares características da infecção pelo HCMV podem ser observadas em vários materiais, incluindo fragmentos de tecidos (pulmão, fígado, rim, etc), sedimento urinário e lavado bronquioalveolar. A detecção dessas células é considerada um forte indicador de doença ativa. Entretanto, além dessas células não serem detectadas em um número significativo de pacientes com doença comprovada, as inclusões intranucleares causadas pelo HCMV podem, ocasionalmente, ser confundidas com inclusões causadas por outros vírus (TONG, 1997; RAWLINSON, 1999; KANO e SIOHARA, 2000).

Desde a identificação inicial do HCMV em meados do século passado (ROWE et al., 1956; SMITH, 1956; WELLER et al., 1957), a inoculação do material suspeito em cultura de fibroblastos humanos continua sendo o método diagnóstico mais específico para a demonstração de infecção pelo HCMV (CONCEIÇÃO et al., 1991). O vírus pode ser isolado de diferentes materiais, incluindo sangue, urina, saliva, LCR, sêmen, secreção de orofaringe, secreção cervical e fragmentos de tecidos obtidos em procedimentos de biópsia ou autópsia (CONCEIÇÃO et al., 1991; YEN-LIEBERMAN, 2000).

No procedimento clássico de cultura, materiais biológicos de pessoas com suspeita clínica da infecção são inoculados em recipientes contendo uma monocamada de fibroblastos humanos em meio apropriado. A cultura é mantida a 37 °C em uma incubadora de CO<sub>2</sub>, sendo periodicamente examinada, com o intuito de observar se os fibroblastos apresentam o efeito citopático característico causado pelo vírus. Entre as desvantagens do

método, salientam-se: a necessidade de laboratórios especializados com alto investimento em equipamentos, a possibilidade dos materiais clínicos apresentarem efeito citotóxico para as células, os problemas freqüentes de contaminação das culturas, o tempo requerido para a liberação dos resultados (freqüentemente 28 dias) e a sensibilidade relativamente baixa da técnica para prever doença clínica, em torno de 60% (LEVIN, 1990; RAWLINSON, 1999; YEN-LIEBERMAN, 2000). Mais recentemente, procedimentos de cultura menos demorados, como o método "shell-vial", foram desenvolvidos (GLEAVES et al., 1985; VAN DER MEER et al., 1996; GRANGEOT-KEROS e COINTE, 2001). No método "shell-vial", os materiais biológicos são inoculados em cavidades de placas de cultura contendo lamínulas revestidas com uma monocamada de fibroblastos humanos imersas em meio apropriado. Após centrifugação e incubação das placas (usualmente 16 a 72 horas, a 37 °C, em uma incubadora de CO<sub>2</sub>), os antígenos virais podem ser revelados com anticorpos monoclonais, utilizando técnicas enzimáticas ou de imunofluorescência (DEGIROLAMI et al., 1987; AGHA et al., 1988; LEE e HALSWORTH, 1990; RAWLINSON, 1999).

Vários trabalhos têm mostrado que a detecção e quantificação do HCMV no sangue utilizando métodos de cultura (viremia) podem auxiliar o prognóstico da infecção e prever a doença (PILLAY et al., 1992; TONG, 1997; LJUNGMAN et al., 2002). O HCMV pode ser quantificado no método "shell vial", mantendo o inóculo viral constante e contando o número de focos infecciosos por cavidade (GERNA et al., 1990) ou inoculando diluições seriadas da amostra e determinando o título, o qual é definido como a recíproca da última diluição capaz de detectar o vírus (SLAVIN et al., 1992). É importante ressaltar que os resultados da determinação da viremia com o método "shell-vial", têm sido muito variáveis, dependendo de uma série de fatores, tais como a toxicidade do inóculo, o número de células polimorfonucleares e mononucleares inoculadas, o número de "shell vials" inoculadas para cada amostra e o tipo de anticorpo monoclonal utilizado (TONG, 1997).

A detecção de antígenos do HCMV, em materiais provenientes de pacientes com suspeita clínica da infecção, tem sido realizada com anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos virais, utilizando técnicas imunoenzimáticas e de imunofluorescência. Vários materiais têm sido utilizados, incluindo fragmentos de tecidos obtidos por biópsia,

urina, lavado broncoalveolar e preparações de leucócitos. O teste de antigenemia para HCMV é baseado na detecção de antígenos virais, como o antígeno estrutural precoce (fosfoproteína de 65 kDa – pp 65 - encontrada na matriz viral), em preparações de leucócitos (VAN DER BIJ et al., 1988; THE et al., 1990; GREFTE et al., 1992; VAN DER MEER et al., 1996). Fundamental para o teste, a pp 65 não é expressa em leucócitos que possuem o vírus em estado de latência.

O teste de antigenemia permite estimar o número de células portadoras de pp 65 encontradas na população de leucócitos do paciente, tornando possível monitorar a atividade do HCMV e a eficácia de terapia antiviral para os pacientes (VAN DER MEER et al., 1996). Vários estudos clínicos têm mostrado que tanto a viremia como a detecção de um número alto de células contendo a pp 65 no teste de antigenemia, são capazes de identificar receptores de transplante de órgãos e pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) apresentando alto risco de desenvolver doença pelo HCMV (GERNA et al., 1991; LANDRY e FERGUSON, 1993; TONG, 1997). Entretanto, resultados discordantes de viremia e antigenemia, também têm sido observados. GERNA et al. (1998) mostraram em receptores de transplantes de órgãos sólidos que o aumento nos números de células portadoras de pp 65 durante o início do tratamento antiviral correspondia a uma queda significativa na viremia. Outros autores também têm mostrado que o aumento do número de células pp 65 durante a terapia antiviral após transplante de medula óssea não está associado com o risco para a doença pelo HCMV (YEN-LIEBERMAN, 2000). Segundo esses autores, enquanto o tratamento antiviral rapidamente bloqueia a replicação viral, a pp 65 previamente sintetizada continua ainda sendo fagocitada por leucócitos periféricos do sangue por vários dias após a descontinuação do tratamento, causando resultados falso-positivos.

O teste de antigenemia é bastante trabalhoso, requerendo o processamento das amostras o mais rapidamente possível (VAN DER MEER et al., 1996). Em pacientes com neutropenia, o exame não pode ser realizado, pois o número reduzido de células pode causar interferência no resultado (TONG, 1997). Além disso, muitos fatores que influenciam o desempenho do teste têm sido registrados, incluindo o método de fixação dos

leucócitos, o tipo de anticorpo monoclonal utilizado e a leitura subjetiva das reações. (VAN DER MEER et al., 1996; GRANGEOT-KEROS e COINTE, 2001).

Os métodos laboratoriais baseados na detecção do DNA do genoma viral ou de RNAm sintetizado em diferentes períodos do ciclo de replicação do vírus têm sido cada vez mais utilizados para o diagnóstico da infecção pelo HCMV (COSTA, 1999; RAWLINSON, 1999; GRANGEOT-KEROS e COINTE, 2001; PANNUTI, 2001). Vários desses procedimentos, comerciais e não comerciais, têm sido descritos na literatura, utilizando vários materiais, incluindo fragmentos de tecido, urina, sangue, soro, plasma e preparações de leucócitos. Entre os métodos mais utilizados, salientam-se os procedimentos de hibridização de ácidos nucleicos e de amplificação de material genético utilizando a reação em cadeia catalisada pela polimerase (PCR) (VAN DER MEER et al., 1996; TONG, 1997; COSTA, 1999; YEN-LIEBERMAN, 2000; GRANGEOT-KEROS e COINTE, 2001). Uma das principais vantagens desses métodos é que o material coletado não necessita ser processado tão rapidamente quanto o necessário nos procedimentos de cultura e antigenemia (TONG, 1997; YEN-LIEBERMAN, 2000).

Entre os procedimentos comerciais disponíveis no presente momento, destacam-se: o teste de captura de híbridos da Digene (Digene Corp., Gaithersburg, MD), o teste NucliSens (Organon Teknika Inc., Durham, NC) e o teste AMPLICOR CMV (Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN) (TONG, 1997; YEN-LIEBERMAN, 2000). No teste de hibridização, designado para detectar DNA do HCMV em sangue total, sondas específicas de RNA não marcadas ligam-se ao DNA viral, anticorpos monoclonais para os híbridos DNA-RNA amplificam o sinal e um sistema de detecção por quimioluminescência é utilizado para a leitura das reações, podendo ser obtidos resultados qualitativos ou quantitativos. O teste NucliSens, realizado com sangue total, baseia-se na amplificação de uma seqüência de ácidos nucleicos do RNAm do HCMV, expresso em altas concentrações durante a infecção ativa e responsável pela transcrição de uma fosfoproteína da matriz viral com 67 kDa (pp 67). O teste AMPLICOR utiliza amplificação de ácidos nucleicos por PCR para a detecção do DNA do HCMV no plasma, considerada um marcador de doença ativa em receptores de transplantes de medula óssea, fígado e rim (WOLF e SPECTOR, 1993; ASPIN et al., 1994; PATEL et al., 1995; YEN-LIEBERMAN, 2000). O teste AMPLICOR

CMV pode ser feito de modo qualitativo ou quantitativo. O teste quantitativo, realizado utilizando o aparelho automatizado COBAS, apresenta sensibilidade maior do que o teste qualitativo (YEN-LIEBERMAN, 2000).

Métodos qualitativos com alta sensibilidade para a detecção do material genético do HCMV podem apresentar baixos valores preditivos para a doença (TONG, 1997). O desenvolvimento de procedimentos capazes de quantificar o material genético viral presente nas amostras testadas pode ser uma alternativa de grande potencial para o diagnóstico da infecção pelo HCMV, principalmente em pacientes com comprometimento do sistema imune (TONG, 1997; YEN-LIEBERMAN, 2000; GRANGEOT-KEROS e COINTE, 2001).

Várias técnicas imunológicas têm sido utilizadas para a pesquisa de anticorpos específicos anti-HCMV, incluindo a reação de fixação de complemento, aglutinação passiva, reação de imunofluorescência indireta e técnicas imunoenzimáticas (ELISA) (CONCEIÇÃO et al., 1991; RAWLINSON, 1999). Vários estudos têm mostrado que as técnicas ELISA apresentam sensibilidade e especificidade superiores às outras técnicas utilizadas para o imunodiagnóstico da citomegalovirose (WEBER et al., 1994; WEBER et al., 2001).

Como em outras infecções, o diagnóstico sorológico de infecção primária recente (< 4 meses) pelo HCMV é baseado na detecção de anticorpos IgM específicos, soroconversão e/ou elevação significativa dos títulos de anticorpos IgG. A soroconversão, critério sorológico mais fidedigno para a identificação da infecção primária recente, dificilmente é identificada. A elevação significativa dos títulos de anticorpos IgG, também dificilmente detectada na infecção primária, pode ser detectada na reativação da infecção em pacientes com comprometimento do sistema imune (COSTA et al., 1994).

Na grande maioria das pessoas imunocompetentes, os anticorpos IgM anti-HCMV são detectados somente durante a fase aguda da infecção. Em alguns casos, como ocorre em outras infecções, níveis significativos desses anticorpos podem ser detectados meses, ou mesmo anos, após a fase aguda da infecção (KANGRO, 1982; VAN DER MEER et al., 1996; RAWLINSON, 1999). Diferentemente do que ocorre em pessoas



imunocompetentes, em um número significativo de pacientes com comprometimento do sistema imune, os anticorpos IgM anti-HCMV são detectados somente na reativação da infecção (PASS et al., 1983; VAN DER MEER et al., 1996; RAWLINSON, 1999). Ainda com relação aos anticorpos da classe IgM, vários trabalhos têm ressaltado a possibilidade de reações cruzadas entre o HCMV e outros agentes infecciosos (WEBER et al., 1994; LAZZAROTTO, et al., 1997a; RAWLINSON, 1999; DEYI et al., 2000; LANG et al., 2001). Desse modo, a confirmação do diagnóstico de infecção pelo HCMV, baseada somente na detecção de anticorpos IgM, pode resultar em preocupações desnecessárias, especialmente em gestantes e pessoas com comprometimento do sistema imune. Assim, quando anticorpos IgM são detectados, é recomendável realizar testes complementares para confirmação da infecção pelo HCMV. Atualmente, na maioria das vezes, a confirmação de infecção recente pelo HCMV em pacientes apresentando IgM positiva é realizada avaliando-se a avidéz dos anticorpos IgG.

A avidéz dos anticorpos aumenta gradualmente após a exposição a um imunógeno (EISEN e SIKIND, 1964; WERBLIN et al., 1973). Assim, no início da infecção primária, uma alta porcentagem dos anticorpos mostra baixa avidéz para os antígenos correspondentes. Durante semanas ou meses, esses anticorpos vão apresentando avidéz crescente, de modo que nas infecções de mais longa duração encontra-se um predomínio marcante de anticorpos apresentando alta avidéz para seus antígenos correspondentes (CAMARGO et al., 1991). As técnicas de determinação da avidéz dos anticorpos IgG são baseadas na maior ou menor facilidade com que esses anticorpos são dissociados de complexos imunes, pela ação de substâncias desestabilizantes de ligações de pontes de hidrogênio, tais como uréia, dietilamina e cloridrato de guanidina.

Vários estudos têm mostrado que a determinação da avidéz dos anticorpos IgG anti-HCMV pode distinguir infecções recentes e antigas em várias infecções, incluindo a citomegalovirose (BLACKBURN et al., 1991; GRANGEOT-KEROS et al., 1997; LAZZAROTTO et al., 1997b; BODÉUS et al., 1998; EGGERS et al., 2000; BODÉUS et al., 2001; BACCARD-LONGERE et al., 2001; PRINCE e LEBER, 2002).

Levando em consideração as características e limitações dos vários métodos diagnósticos disponíveis, cada apresentação clínica requer a escolha do recurso laboratorial adequado. Para o diagnóstico de infecção congênita no período pré-natal, a metodologia mais confiável é o isolamento do HCMV no líquido amniótico (AZAM et al., 2001). No recém-nascido, o teste de eleição é o isolamento do HCMV na urina, embora o vírus possa também ser isolado de outros materiais biológicos (STAGNO et al., 1980; RAWLINSON, 1999; SANTOS et al., 2000; PANNUTI, 2001; LEUNG et al., 2003). Nesse sentido, a detecção do HCMV na urina nas três primeiras semanas de vida define o diagnóstico de infecção congênita (NUMAZAKI e CHIBA, 1997; LEUNG et al., 2003). Com relação ao imunodiagnóstico, a detecção de anticorpos IgM específicos no soro do recém-nascido sugere o diagnóstico de infecção congênita, pelo fato desses anticorpos não atravessarem a barreira placentária, sendo necessária confirmação com um método virológico. Por outro lado, a ausência desses anticorpos ao nascimento não descarta a possibilidade de infecção congênita, uma vez que apenas 30 a 70% dos recém-nascidos com diagnóstico de infecção congênita pelo HCMV, confirmado pela detecção do vírus na urina, apresentam pesquisa de IgM positiva (DEMMLER et al., 1996; NUMAZAKI e CHIBA, 1997). As imunoglobulinas da classe IgG são capazes de atravessar a barreira placentária, de modo que a determinação qualitativa dos anticorpos IgG anti-HCMV no soro do recém-nascido não tem valor diagnóstico. A manutenção ou elevação dos títulos de anticorpos IgG anti-HCMV nos primeiros meses de vida pode indicar tanto infecção congênita como perinatal. Para facilitar a interpretação dos resultados sorológicos na criança, é sempre importante a pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-HCMV no soro materno à época do nascimento.

Com relação à infecção perinatal pelo HCMV, como na infecção congênita, o teste de eleição é o isolamento do vírus em amostras de urina do recém-nascido. Levando em consideração a possibilidade de resultados falso-negativos nos procedimentos de isolamento viral, culturas negativas do vírus nas primeiras três semanas de vida, com positividade entre a 4<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semana, é indicativo de infecção perinatal (CONCEICÃO et al., 1991; YAMAMOTO et al., 1998; PANNUTI, 2001; PASS, 2002). Nas primeiras semanas de vida, os testes sorológicos para o diagnóstico de infecção perinatal devem ser interpretados com cautela, pois em casos de infecção congênita no final da gestação, a

presença de IgM ou a elevação dos títulos de IgG podem ser observadas somente nas semanas subseqüentes ao nascimento.

Mais recentemente, vários trabalhos têm ressaltado a potencialidade de técnicas de biologia molecular quantitativas para o diagnóstico de infecção congênita e perinatal pelo HCMV, em substituição aos procedimentos tradicionais de isolamento viral (MAINE et al., 2001; GOUARIN et al., 2002; REVELLO et al., 2003).

A grande maioria das pessoas adultas imunocompetentes infectadas pelo HCMV são assintomáticas (VAN DER MEER et al., 1996; DE JONG et al., 1998; KANO e SHIOHARA, 2000). Quando há suspeita clínica de infecção pelo HCMV, as técnicas imunológicas para a pesquisa de anticorpos anti-HCMV e para a determinação da avidéz dos anticorpos específicos da classe IgG são usualmente utilizadas para o diagnóstico laboratorial. De um modo geral, os resultados obtidos com as técnicas de cultura e de amplificação de ácidos nucléicos do HCMV são pouco conclusivos, devido à presença de excretores assintomáticos do vírus na população em geral (PANNUTI, 2001).

Nos pacientes com comprometimento do sistema imune, é essencial fazer o diagnóstico de infecção pelo HCMV o mais rápido possível, com o intuito de avaliar a terapia imunossupressora e/ou instituir a terapia antiviral o mais rapidamente possível para evitar danos extensos nos tecidos infectados.

A disseminação do HCMV no sangue ocorre durante a infecção ativa e a viremia tem sido considerada o principal fator de risco de progressão para a doença clínica. Como já enfatizado, as técnicas de cultura apresentam sensibilidade relativamente baixa para a detecção do HCMV. Estudos com metodologias mais sensíveis, tais como as técnicas de PCR, hibridização e antigenemia, têm mostrado que o HCMV pode ser detectado em quase todos os pacientes apresentando a doença. Entretanto, é importante ressaltar que devido à alta sensibilidade desses procedimentos, o vírus pode também ser detectado em um número significativo de pessoas assintomáticas, que nunca terão a doença. Levando em consideração que os pacientes com sintomas clínicos freqüentemente têm uma carga viral maior do que as pessoas assintomáticas, vários trabalhos têm proposto que a quantificação da carga viral por procedimentos altamente sensíveis poderia prever o

desenvolvimento de doença causada pelo HCMV (BOECKH e BOIVIN, 1998; YEN-LIEBERMAN, 2000; PANNUTI, 2001).

A avaliação sorológica em pacientes imunocomprometidos é muito importante, na medida em que a detecção de anticorpos específicos reflete infecção prévia, com todas as pessoas soropositivas sendo portadoras do HCMV (RAWLINSON, 1999). É preciso salientar que um resultado sorológico positivo indica a presença de infecção, não necessariamente implicando em doença (TONG, 1997). Por outro lado, como já enfatizado, os pacientes imunocomprometidos podem apresentar alteração ou redução da resposta imune para o HCMV, com conseqüentes resultados sorológicos falso-negativos (TONG, 1997; RAWLINSON, 1999). Nos pacientes apresentando sintomatologia compatível com a infecção, as técnicas de determinação da avidéz dos anticorpos IgG anti-HCMV permitem identificar infecções recentes e antigas.

No Brasil, os testes comerciais para a determinação da avidéz dos anticorpos IgG anti-HCMV, além de muito caros, não estão disponíveis prontamente no mercado. Considerando as complicações resultantes da infecção pelo HCMV, a complexidade do diagnóstico clínico e as limitações do diagnóstico laboratorial, este estudo foi motivado pela necessidade de aumentar a eficiência do imunodiagnóstico dessa infecção. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um teste de avidéz imunoenzimático para o HCMV (ELISA HCMV), capaz de distinguir a infecção primária recente da infecção de longa duração. Na idealização do teste, foram considerados parâmetros importantes para laboratórios de rotina, como simplicidade e baixo custo.



***OBJETIVO***

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um teste de avidéz imunoenzimático para o HCMV, capaz de distinguir a infecção primária recente da infecção de longa duração. Na idealização do teste, foram considerados parâmetros importantes para laboratórios de rotina, como simplicidade e baixo custo.



***ARTIGO***

**EVALUATION OF AN IN-HOUSE SPECIFIC IMMUNOGLOBULIN G (IgG)  
AVIDITY ELISA FOR DISTINGUISHING RECENT PRIMARY FROM LONG-  
TERM HUMAN CYTOMEGALOVIRUS (HCMV) INFECTION**

**Silmara de SOUZA(1), Sandra H. A. BONON(2), Sandra C. B. COSTA(2) & Cláudio  
L. ROSSI(1)**

(1) Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas (FCM),  
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), C. P. 6111, 13083-970 Campinas, S.P.,  
Brasil.

(2) Departamento de Clínica Médica, FCM/Unicamp, Campinas, S.P., Brasil.

**Correspondence to:** Cláudio Lúcio Rossi, Departamento de Patologia Clínica,  
Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, C. P. 6111, 13083-  
970, Brazil, Phone 55 19 3289 3273, Fax 55 19 3788 9434, e-mail: clr@fcm.unicamp.br



## **SUMMARY**

This article describes the standardization and evaluation of an in-house specific IgG avidity ELISA for distinguishing recent primary from long-term human cytomegalovirus (HCMV) infection. The test was standardized with the commercial kit ETI-CYTOK G Plus (Sorin Biomedica, Italy) using 8 M urea in phosphate-buffered saline to dissociate low-avidity antibodies after the antigen-antibody interaction. The performance of the in-house assay was compared to that of the commercial automated VIDAS CMV IgG avidity test (bioMérieux, France). Forty-nine sera, 24 from patients with a recent primary HCMV infection and 25 from patients with a long-term HCMV infection and a sustained persistence of specific IgM antibodies, were tested. Similar results were obtained with the two avidity methods. All 24 sera from patients with recently acquired infection had avidity indices compatible with acute HCMV infection by the VIDAS method, whereas with the in-house method, one serum sample had an equivocal result. In the 25 sera from patients with long-term infection, identical results were obtained with the two methods, with only one serum sample having an incompatible value. These findings suggest that our in-house avidity test could be a potentially useful tool for the immunodiagnosis of HCMV infection.

**KEYWORDS:** HCMV; Avidity test; Immunodiagnosis.

## INTRODUCTION

Human cytomegalovirus (HCMV) is a member of the herpes family of viruses, which also includes herpes simplex virus, varicella-zoster virus, human herpes virus 6 and Epstein-Barr virus. Although HCMV has a world-wide distribution, infection with HCMV is more common in developing countries, particularly in areas with poor socioeconomic conditions<sup>5,22</sup>. As with other herpesvirus infections, primary HCMV infection is followed by chronic infection or viral latency from which the virus may be reactivated<sup>21</sup>. Primary infection or reactivation of HCMV is usually either subclinical or self-limiting in immunocompetent persons<sup>5,12,18</sup>. However, in immunocompromised hosts such as organ transplant recipients, patients with cancer and individuals infected with human immunodeficiency virus (HIV), or in congenital infections, a significantly adverse clinical course and outcome is often seen<sup>18-22</sup>.

HCMV is the most common agent of viral intrauterine infection and affects 0.5-2.5% of all live births in different parts of the world<sup>1,10,19,20</sup>. In pregnant women, distinguishing the primary from non-primary HCMV infection is important, since the former is much more deleterious to the fetus than the latter<sup>22</sup>. This is also true for immunocompromised patients, in whom primary infections is often accompanied by symptoms whereas non-primary infection is usually asymptomatic<sup>14</sup>.

The diagnosis of recently acquired HCMV infection is usually based on the detection of specific immunoglobulin (Ig) M antibodies, seroconversion or a significant increase in specific IgG antibody concentrations. Since seroconversion, the most dependable serological marker, and a rise in IgG titres are seldom demonstrable, the detection of HCMV-specific IgM antibodies has been the most frequently used serological procedure for diagnosing acute infection. However, in some persons, IgM may be detected for many months following primary infection and may also be produced following reinfection or reactivation<sup>11,15,22,13,17</sup>.

Moreover, false-positive HCMV results may occur with other herpesviruses and with some autoimmune disorders<sup>6,13,17</sup>.

Based on the observation that antibody avidity gradually increases after exposure to an immunogen<sup>8,23</sup>, several reports have shown that the avidity of IgG antibodies can be used as a marker for distinguishing recent primary from long-term infections, including HCMV infections<sup>2-4,7,9,16</sup>.

In Brazil, commercial assays for evaluating the avidity of HCMV-specific IgG are expensive and are not readily available. The aim of this study was to standardize an economical in-house HCMV-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) avidity test for routine use. To validate this in-house assay, its performance was compared with that of the commercial automated VIDAS CMV IgG avidity assay (bioMérieux, France), using well-characterized sera from patients with recent primary and long-term HCMV infections.

## MATERIALS AND METHODS

### Avidity tests

The in-house avidity assay was standardized using a commercial ELISA kit for detecting specific IgG antibodies (ETI-CYTOK-G Plus, Sorin Biomedica, Italy) modified to incorporate an elution step with urea to remove low-avidity antibodies from HCMV antigen. For the assay, 100 µl of each serum diluted 1:101 were added to wells of polystyrene plates coated with HCMV antigen. All serum samples were run twice in duplicate. After incubation for 1 h at 37°C, the wells were washed four times with 0.15 M phosphate-buffered saline, pH 7.2 (PBS), and 100 µl of 8 M urea in PBS were added to two wells, whereas 100 µl of PBS were added to the other two wells. After incubation for 5 min at room temperature and washing two times with PBS, 100 µl of the optimal dilution of the conjugate in PBS were added to the wells. After a further 1 h incubation at 37°C and washing four times with PBS, 100 µl of the substrate system (tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide) were added to the wells. Thirty minutes after the addition of substrate, 100 µl of 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were added to each well to stop the reaction and the resulting absorbances were measured in an ELISA reader (Spectra SLT, SLT Instruments, Austria) at 450 and 405 nm, with 620 nm used as the reference wavelength. The results obtained at 405 nm were used only when the reactions read at 450 nm had an O.D. higher than the linear range of the ELISA reader.

The avidity index was calculated as the mean absorbance of reactions in which the immune complexes were exposed to urea divided by the mean absorbance of reactions in which the immune complexes were not exposed to urea, expressed as a percentage. The run-to-run variation was determined by assaying an HCMV positive serum pool on five alternate days. On each day, the serum pool was tested in duplicate and the mean absorbance determined. The interassay CV was determined from the mean absorbance obtained in the five assays. The cut-off value was calculated using a modification of the J index<sup>24</sup>. The J index was calculated for avidity indices ranging from 30% to 70% at 5% intervals, using the formula:  $J = (a/b) + (c/d) - 1$ , where a is the number of sera with a compatible avidity index in the group of sera from patients with a recent infection, b is the

total number of sera from patients with a recent infection,  $c$  is the number of sera with a compatible avidity index in the group of sera from patients with a long-term infection and  $d$  is the total number of sera from patients with a long-term infection. Low and high avidity indices were defined based on the cut-off value and the interassay CV.

The automated VIDAS system (bioMérieux, France) combines a two-step enzyme immunoassay sandwich method with a final fluorescent detection (ELFA). In the VIDAS CMV IgG assay, the results are expressed as a relative fluorescence value (RFV) and, in the absence of international units, as VIDAS arbitrary units (AU per milliliter). For the determination of avidity, two strips containing the reagents are used. In one strip a buffer containing 6 M urea is used to elute low-avidity antibodies. In the other strip, which serves as the reference test, the buffer with urea is replaced by a wash buffer without urea. The avidity index is determined by calculating the ratio of the RFV result obtained for the sample with the strip containing urea relative to the RFV result obtained for the sample with the strip without urea. According to the manufacturer, an index  $\geq 0.80$  excludes a recent primary infection of less than 3 months whereas an index  $< 0.8$  does not.

### **Patients and serum samples**

The avidity tests were evaluated by testing sera from 24 patients with a recent primary HCMV infection and sera from 25 patients with a long-term HCMV infection and a sustained persistence ( $> 1$  year) of specific IgM antibodies detected by ELISA. Serum HCMV-IgM and HCMV-IgG antibodies were determined using the automated VIDAS system (bioMérieux, France). Patients were diagnosed as having a recent HCMV infection based on serodiagnostic criteria: seroconversion (appearance of specific IgM and IgG antibodies in a previously seronegative patient) and/or detection of significant levels of specific IgM antibodies. All 24 patients in this group had clinical manifestations compatible with acute HCMV infection and the sera were collected in the first 3 months after the onset of the symptoms. All 25 patients with long-term HCMV infection had a well-documented history of pre-existing HCMV infection and the sera were collected no less than one year

after the beginning of infection. Most (n=20) of the sera in this latter group were from transplant recipients (13 renal, 3 liver, and 4 bone marrow).

## RESULTS

Preliminary experiments with the in-house IgG avidity assay using varying concentrations of urea and different treatment times showed that a 5 min incubation step with 8 M urea was the best combination for discriminating antibody avidities in patients with recent primary and long-term HCMV infections. The IgG avidity indices obtained with the in-house and VIDAS CMV methods for the sera from patients with recent primary and long-term HCMV infections are shown in Figure 1.

The in-house avidity indices for the 24 acute-phase serum samples ranged from 10.3% to 52.1% (mean index = 29.5%) whereas for the 25 serum samples from patients with a long-term infection, the indices ranged from 44.4% to 96.4% (mean index= 78.4%). The highest J index was obtained with an avidity index of 55%. Considering the interassay CV (4.9%), avidity indices < 50% and > 60% were considered indicative of recent and long-term HCMV infection, respectively. Based on this criterion 23 (95.8%) of 24 sera from patients with a recent primary HCMV infection and 24 (96%) of 25 sera from patients with a long-term infection had in-house avidity indices compatible with the stage of infection.

The VIDAS-CMV avidity indices for the 24 acute-phase sera ranged from 0.06 to 0.67 (mean index = 0,25) whereas for the 25 serum samples from patients with a long-term infection, the indices ranged from 0.71 to 1 (mean index = 0.93). According to the manufacturer, an index  $\geq 0.80$  excludes a recent primary infection of less than 3 months whereas an index < 0.8 does not.

Based on the criteria for interpreting avidity assays, divergent results were found in one acute-phase serum sample (avidity index = 52.1%) with the in-house method and in one long-term serum sample with the in-house (avidity index = 44.4%) and VIDAS (avidity index = 0.71) methods. The long-term infection sample was taken 15 months after seroconversion from a patient who acquired primary HCMV infection after a renal transplant.

## DISCUSSION

HCMV is a serious, life-threatening opportunistic pathogen in immunocompromised persons, and is one of the principal causes of congenital malformations and neurological defects in infected neonates<sup>19-22</sup>.

The diagnosis of a recently acquired HCMV infection is usually based on the detection of specific IgM antibodies, seroconversion, or a four-fold or greater rise in the titre of HCMV-specific IgG antibodies. Since seroconversion and a rise in IgG titres are seldom demonstrable, the detection of HCMV-specific IgM antibodies has been the most frequently used serological marker for diagnosing acute infection. However, the use of tests with a low specificity and the persistence, in some patients, of specific IgM antibodies for a long time have led to the misdiagnosis of acute HCMV infection and unnecessary concern, especially with respect to pregnant women and immunocompromised patients. The determination of antibody avidity represents an important additional serological marker in the immunodiagnosis of several infections because low - and high-avidity antibodies occur predominantly in recent and long-term infections, respectively. The use of IgG avidity assays to confirm or exclude acute HCMV infection in cases of an IgM-positive result strengthens the serological diagnosis and could prevent unnecessary invasive procedures in numerous cases.

In this work, we standardized and evaluated an in-house specific IgG avidity ELISA for distinguishing recent primary from long-term HCMV infection. The performance of the in-house assay was compared with that of a commercial automated VIDAS CMV IgG avidity test. Forty-nine sera, 24 from patients with a recent primary HCMV infection and 25 from patients with a long-term HCMV infection with a sustained persistence of specific IgM antibodies, were tested. Similar results were obtained with the two avidity methods. All sera from the 24 patients with recently acquired infection had avidity indices compatible with acute HCMV infection by the VIDAS method, whereas with the in-house method, one serum sample had an equivocal result. In the 25 sera from patients with long-term infection, identical results were obtained with the two methods, with only one serum sample having an incompatible value. The avidity indices used to



discriminate between low (< 50%) and high (> 60%) IgG avidity in our in-house avidity assay were similar to values published by other investigators. BODÉUS *et al.*<sup>4</sup>, who used an avidity test with 8 M urea as the dissociating agent to screen serum samples from patients with a recent primary or long-term HCMV infection, showed that an avidity index < 50% corresponded to a recent primary infection, whereas an avidity index > 65% was highly suggestive of a past infection. GRANGEOT-KEROS *et al.*<sup>9</sup> also used an avidity test with 8 M urea as the dissociating agent to screen serum samples from pregnant women in different stages of HCMV infection. These authors showed that sera from women with a past or secondary HCMV infection had an avidity index > 60%, whereas most of the sera from women with HCMV primary infection had avidity index < 50%. In a similar study, using 6 M urea as dissociating agent, Eggers *et al.*<sup>7</sup> defined avidity indices of < 40% and > 60% as indicative of acute primary and past HCMV infection, respectively. In a study of sera from pregnant women who had recently seroconverted following primary HCMV infection (within 4 months of the last negative sample) and of sera from individuals with long-term HCMV infection, Prince & Leber<sup>16</sup> showed that 99% of the acute-phase serum samples had avidity indices < 50%, whereas 96% of serum samples from persons with past infection had avidity indices > 60%.

Variations in the ranges for low- and high-avidity antibodies are expected and are probably related to several factors, including patient heterogeneity, immune status at the time of blood collection, time of blood sampling relative to the onset of infection, assay technique, antigen preparation, type and concentration of hydrogen bond-disrupting agent, and the method of calculating antibody avidity.

The results of this study suggest that our in-house avidity test may be a potentially useful tool for the immunodiagnosis of HCMV infections.

## **RESUMO**

### **Avaliação de um teste de avidéz imunoenzimático para o citomegalovírus humano (ELISA-HCMV) para distinguir a infecção primária recente da infecção de longa duração**

Este artigo descreve a padronização e avaliação de um teste de avidéz imunoenzimático para o citomegalovírus humano (ELISA-HCMV) para distinguir a infecção primária recente da infecção de longa duração. O teste foi padronizado com o kit comercial ETI-CYTOK G Plus (Sorin Biomedica, Itália), utilizando uréia 8 M para a dissociação dos anticorpos de baixa avidéz. A performance do teste ELISA-HCMV foi comparada com a do teste de avidéz comercial automatizado VIDAS CMV IgG (bioMérieux, França), utilizando 24 soros de pacientes com infecção primária recente e 25 soros de pacientes com infecção de longa duração apresentando persistência de anticorpos específicos IgM. Resultados similares foram obtidos com os dois métodos de avidéz. Todos os 24 soros de pacientes com infecção recentemente adquirida apresentaram índices de avidéz compatíveis com infecção aguda pelo HCMV utilizando o teste VIDAS CMV IgG, enquanto que um dos soros apresentou resultado duvidoso no teste ELISA-HCMV. Os 25 soros de pacientes com infecção de longa duração apresentaram resultados idênticos com os dois métodos, com apenas um dos soros apresentando um valor não compatível. Estes resultados sugerem que o teste de avidéz descrito pode ser potencialmente útil para o imunodiagnóstico da infecção pelo HCMV.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

Silmara de Souza was supported by a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES), Brazil.

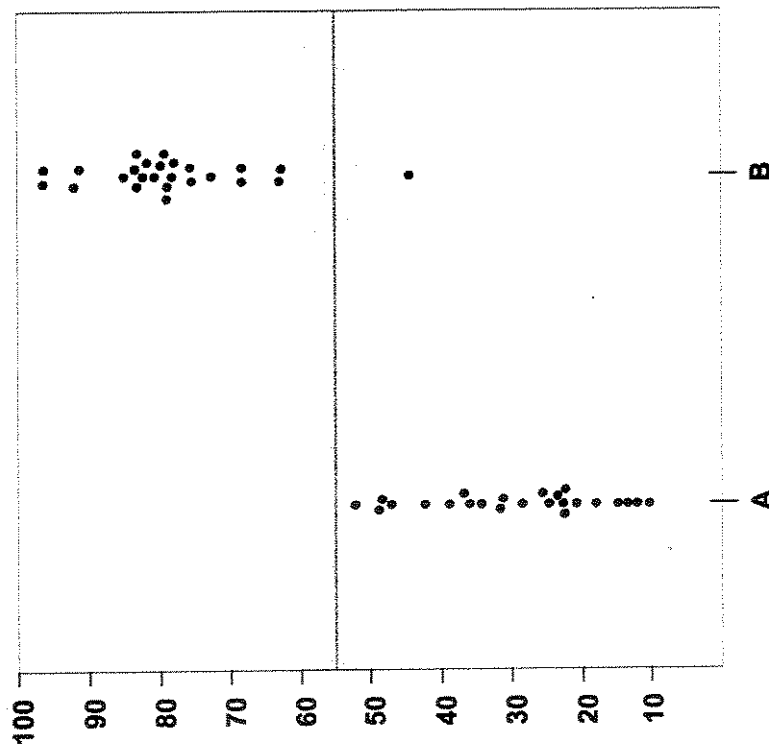
## REFERENCES

1. AZAM, A.Z.; VIAL, Y.; FAWER, C.L.; ZUFFEREY, J. & HOHLFELD, P. - Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. **Obstet. and Gynec.**, **97**: 443-448, 2001.
2. BLACKBURN, N.K.; BESSELAAR, T.G.; SCHOUB, B.D. & O' CONNELL, K.F. - Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity. **J. med. Virol.**, **33**: 6-9, 1991.
3. BODÉUS, M.; BEULNÉ, D. & GOUBAU, P. - Ability of three IgG-avidity assays to exclude recent cytomegalovirus infection. **Europ. J. clin. Microbiol. infect. Dis.**, **20**: 248-252, 2001.
4. BODÉUS, M.; FEYDER, S. & GOUBAU P. - Avidity of IgG antibodies distinguishes primary from non-primary cytomegalovirus infection in pregnant women. **Clin. diagn. Virol.**, **9**: 9-16, 1998.
5. DE JONG, M.D.; GALASSO, G.J.; GAZZARD, B. *et al.* - Summary of the II international symposium on cytomegalovirus. **Antivir. Res.**, **39**: 141-162, 1998.
6. DEYI, Y.M.; GOUBAU, P. & BODÉUS, M. - False-positive IgM antibody tests for cytomegalovirus in patients with acute Epstein-Barr virus infection. **Europ. J. clin. Microbiol. infect.**, **19**: 557-560, 2000.
7. EGGERS, M.; BÄDER, U. & ENDERS, G. - Combination of microneutralization and avidity assays: improved diagnosis of recent primary human cytomegalovirus infection in single serum sample of second trimester pregnancy. **J. med. Virol.**, **60**: 324-330, 2000.
8. EISEN, H.N. & SISKIND, G.W. - Variations in affinities of antibodies during the immune response. **Biochemistry**, **3**: 996-1008, 1964.
9. GRANGEOT-KEROS, L.; MAYAUX, M.J.; LEBON, P. *et al.* - Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. **J. infect. Dis.**, **175**: 944-946, 1997.

10. HAGAY, Z.J.; BIRAN, G.; ORNOY, A. & REECE, E.A. - Congenital cytomegalovirus infection: a long-standing problem still seeking a solution. **Amer. J. Obstet. Gynec.**, **174**: 241-245, 1996.
11. KANGRO, H.O.; GRIFFITHS, P.D.; HUBER, T.J. & HEATH, R.B. - Specific IgM class antibody production following infection with cytomegalovirus. **J. med. Virol.**, **10**: 203-212, 1982.
12. KANO, Y. & SHIOHARA, T. - Current understanding of cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. **J. dermatol. Sci.**, **22**: 196-204, 2000.
13. LAZZAROTTO, T.; BROJANAC, S.; MAINE, G.T. & LANDINI, M.P. - Search for cytomegalovirus-specific immunoglobulin M: comparison between a new western blot, conventional western blot, and nine commercially available assays. **Clin. diagn. Lab. Immunol.**, **4**: 483-486, 1997.
14. LAZZAROTTO, T.; SPEZZACATENA, P.; PRADELLI, P. *et al.* - Avidity of immunoglobulin G directed against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. **Clin. diagn. Lab. Immunol.**, **4**: 469-473, 1997.
15. PASS, R.F.; GRIFFITHS, P.D. & AUGUST, A.M. - Antibody response to cytomegalovirus after renal transplantation: comparison of patients with primary and recurrent infections. **J. infect. Dis.**, **147**: 40-46, 1983.
16. PRINCE, H.E. & LEBER, A.L. - Validation of an in-house assay for cytomegalovirus immunoglobulin G (CMV IgG) avidity and relationship of avidity to CMV IgM levels. **Clin. diagn. Lab. Immunol.**, **9**: 824-827, 2002.
17. RAWLINSON, W.D. - Broadsheet number 50: diagnosis of human cytomegalovirus infection and disease. **Pathology**, **31**: 109-115, 1999.
18. SISSONS, J.G.P. & CARMICHAEL, A.J. - Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection. **J. Infect.**, **44**: 78-83, 2002.

19. STAGNO, S.; PASS, R.F.; CLOUD, G. *et al.* - Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. **J. Amer. med. Ass.**, **256**: 1904-1908, 1986.
20. STAGNO, S.; PASS, R.F.; DWORSKY, M.E. *et al.* - Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infection. **New Engl. J. Med.**, **306**: 945-949, 1982.
21. SWEET, C. - The pathogenicity of cytomegalovirus. **FEMS Microbiol. Rev.**, **23**: 457-482, 1999.
22. VAN DE MEER, J.T.M.; DREW, W.L.; BOWDEN, R.A. *et al.* - Summary of the international consensus symposium on advances in the diagnosis, treatment and prophylaxis of cytomegalovirus infection. **Antivir. Res.**, **32**: 119-140, 1996.
23. WERBLIN, T.P.; KIM, Y.T.; QUAGLIATA, F. & SISKIND, G.W. - Studies on the control of antibody synthesis. III. Changes in heterogeneity of antibody affinity during the course of the immune response. **Immunology**, **24**: 477-492, 1973.
24. YODEN, W.J. - Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, **3**: 32-35, 1950.

(a) In-house avidity IgG ELISA  
avidity indices (%)



(b) VIDAS CMV IgG  
avidity indices (RFVu / RFVa)

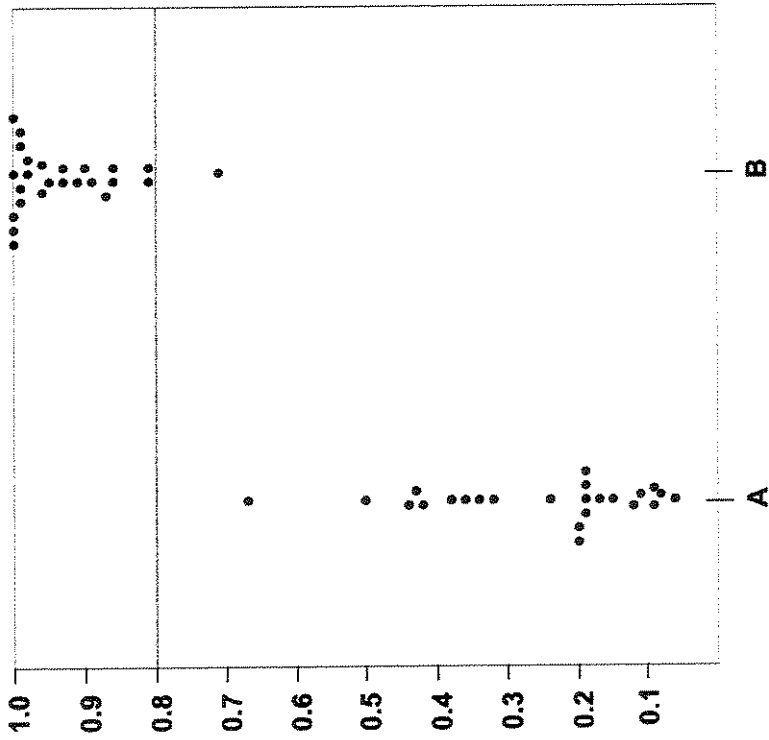


Fig 1. Avidity index results in sera from patients with HCMV infection obtained with the in-house (a) and VIDAS (b) methods. A=recent primary infection (n=24); B=long-term infection (n=25). RFVu= relative fluorescence value in the presence of urea; RFVa= relative fluorescence value in the absence of urea. In the in-house test, avidity indices < 50% and > 60% were considered compatible with recent primary and long-term HCMV infections, respectively. In the VIDAS test, according to the manufacturer, an index  $\geq 0.8$  excludes a recent primary infection of less than 3 months whereas an index < 0.8 does not.



***CONCLUSÕES  
GERAIS***

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um teste de avidéz imunoenzimático para o HCMV, capaz de distinguir a infecção primária recente da infecção de longa duração. Na idealização do teste, foram considerados parâmetros importantes para laboratórios de rotina, como simplicidade e baixo custo.

Nosso estudo nos permitiu chegar às seguintes conclusões:

- ✱ A concentração do agente utilizado para a dissociação dos anticorpos de baixa avidéz é muito importante. Resultados preliminares mostraram que o desempenho do teste ELISA HCMV com uréia 8 M foi superior aquele obtido utilizando uréia 6 M.
- ✱ O teste ELISA HCMV apresentou performance similar a obtida com o teste comercial automatizado VIDAS CMV IgG (bioMérieux, França).
- ✱ O teste ELISA HCMV foi capaz de distinguir a infecção primária recente da infecção de longa duração, sendo particularmente importante em pacientes apresentando persistência de anticorpos específicos da classe IgM.
- ✱ O teste ELISA HCMV, pela sua performance, simplicidade e baixo custo, pode ser potencialmente útil para o imunodiagnóstico da infecção pelo HCMV.





AGHA, S.A.; COLEMAN, J.C.; SELWYN, S.; MAHMOUD, L.A.; ADD-ELAAL, A.M. Combined use of sonication and monoclonal antibodies for the detection of early and late cytomegalovirus antigens in centrifugation cultures. **J Virol Methods**, 22: 41 – 50, 1988.

ALMEIDA, L.N.B.; AZEREDO, R.S.; AMAKU, M.; MASSAD, E. Cytomegalovirus seroepidemiology in an urban community of São Paulo, Brazil. **Rev Saúde Pública**, 35: 124 – 9, 2001.

ASPIN, M.M.; GALLEZ-HAWKINS, G.M.; GIUGNI, T.D.; TEGTMEIER, B.; LANG, D.J.; SCHMIDT, G.M. et al. Comparison of plasma PCR and bronchoalveolar lavage fluid culture for detection of cytomegalovirus infection in adult bone marrow transplantation recipients. **J Clin Microbiol**, 32: 2266 – 9, 1994.

AZAM, A.Z.; VIAL, Y.; FAWER, C.L.; ZUFFEREY, J.; HOHLFELD, P. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. **Obstet Gynecol**, 97: 443 – 8, 2001.

BACCARD-LONGERE, M.; FREYMUTH, F.; COINTE, D.; SEIGNEURIN, J.M.; GRANGEOT-KEROS, L. Multicenter evaluation of a rapid and convenient method for determination of cytomegalovirus immunoglobulin G avidity. **Clin Diagn Lab Immunol**, 8: 429 - 31, 2001.

BALE, J.F. JR.; ZIMMERMAN, B.; DAWSON, J.D.; SOUZA, I.E.; PETHERAM, S.J.; MURPH, J.R. Cytomegalovirus transmission in child care homes. **Arch Pediatr Adolesc Med**, 153: 75 – 9, 1999.

BLACKBURN, N.K.; BESSELAAR, T.G.; SCHOUB, B.D.; O' CONNELL, K.F. Differentiation of primary cytomegalovirus infection from reactivation using the urea denaturation test for measuring antibody avidity. **J Med Virol**, 33: 6 – 9, 1991.

BODÉUS, M.; BEULNÉ, D.; GOUBAU, P. Ability of three IgG-avidity assays to exclude recent cytomegalovirus infection. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 20: 248 – 52, 2001.

BODÉUS, M.; FEYDER, S.; GOUBAU, P. Avidity of IgG antibodies distinguishes primary from non-primary cytomegalovirus infection in pregnant women. **Clin Diagn Virol**, 9: 9 –16, 1998.

BOECKH, M.; BOIVIN, G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. **Clin Microbiol Rev**, 11: 533 – 54, 1998.

BOPPANA, S.B.; FOWLER, K.B.; BRITT, W.J.; STAGNO, S.; PASS, R.F. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. **Pediatrics**, 104: 55 – 60, 1999.

BOPPANA, S.B.; SURESH, B.; RIVERA, L.B.; FOWLER, K.B.; MACH, M.; BRITT, W.J. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. **N Engl J Med**, 344: 1366 – 71, 2001.

CAMARGO, M.E.; da SILVA, S.M.; LESER, P.G.; GRANATO, C.H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 33: 213 – 8, 1991.

CONCEIÇÃO, O.J.G.; FOCACCIA, R.; VERONESI, R. Citomegalia. In: FOCACCIA, R. e DIETZE, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 206 – 11.

COSTA, S.C.B. Infecção por citomegalovírus (CMV): epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Rev Bras Clin Ter**, 25: 18 – 28, 1999.

COSTA, S.C.; MIRANDA, S.R.; ALVES, G.; ROSSI, C.L.; FIGUEIREDO, L.T.; COSTA, F.F. Donated organs as a source of cytomegalovirus (CMV) in renal transplant patients. **Braz J Med Biol Res**, 27: 2573 – 8, 1994.

DEGIROLAMI, P.C.; DAKOS, J.; EICHELBERGER, K.; MILLS, L.S.; DELUCA, A.M. Rapid detection of cytomegalovirus in clinical specimens by immunofluorescent staining of shell vial cultures. **Am J Clin Pathol**, 89: 528 – 32, 1987.

DE JONG, M.D.; GALASSO, G.J.; GAZZARD, B.; GRIFFITHS, P.D.; JABS, D.A.; KERN, E.R. et al. Summary of the II International Symposium on cytomegalovirus. **Antiviral Res**, 39: 141 – 62, 1998.

DEMMLER, G. J. Congenital cytomegalovirus infection and disease. **Adv Pediatric Infect Dis**, 11: 135 – 62, 1996.

DEMMLER, G. J. Infectious Diseases Society of America and Center for Disease Control. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. **Rev Infect Dis**, 13: 315 – 29, 1991.

DEYI, Y.M.; GOUBAU, P.; BODÉUS, M. False-positive IgM antibody for cytomegalovirus in patients with acute Epstein-Barr virus infection. **Eur J Clin Microbiol Infect**, 19: 557 – 60, 2000.

EGGERS, M.; BÄDER, U.; ENDERS, G. Combination of microneutralization and avidity assays: improved diagnosis of recent primary human cytomegalovirus infection in single serum sample of second trimester pregnancy. **J Med Virol**, 60: 324 – 30, 2000.

EISEN, H.; SISKIND, G.W. Variations in affinities of antibodies during the immune response. **Biochemistry**, 3: 996 – 1008, 1964.

FOTI G.; HYERACI M.; KUNKAR, A.; IEROPOLI, G.; SOFO, D.; DE LORENZO, S. Cytomegalovirus infection in the adult. **Minerva Med**, 93: 109 –17, 2002.

FOWLER, K.B.; STAGNO, S.; PASS, R.F.; BRITT, W.J.; BOLL, T.J.; ALFOR, C.A. The outcome of congenital cytomegalovirus infections in relation to maternal antibody status. **N Engl J Med**, 326: 663 – 7, 1992.

GERNA, G.; REVELLO, M.G.; PERCIVALLE, E.; ZAVATTONI, M.; PAREA, M.; BATTAGLIA, M. Quantification of human cytomegalovirus viremia by using monoclonal antibodies to different viral proteins. **J Clin Microbiol**, 28: 2681 - 8, 1990.

GERNA, G.; ZAVATTONI, M.; PERCIVALLE, E.; GROSSI, P.; TORSELLINI, M.; REVELLO, M.G. Rising levels of human cytomegalovirus (HCMV) antigenemia during initial antiviral treatment of solid-organ transplant recipients with primary HCMV infection. **J Clin Microbiol**, 36: 1113 – 6, 1998.

GERNA, G.; ZIPETO, D.; PAREA, M.; REVELLO, M.G.; SILINI, E.; PERCIVALLE, E. et al. Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia and DNAemia. **J Infect Dis**, 164: 488 – 98, 1991.

GLEAVES, C.A.; SMITH, T.F.; SHUSTER, E.A.; PEARSON, G.R. Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. **J Clin Microbiol**, 21: 217 – 21, 1985.

GOODPASTURE, E.; TALBOT, F.B. Concerning the nature of protozoan - like cells in certain lesions of infancy. **Am J Dis Child**, 21: 415 - 25, 1921.

GOUARIN, S.; GAULT, E.; VABRET, A.; COINTE, D.; ROZENBERG, F.; GRANGEOT-KEROS, L. et al. Real – Time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. **J Clin Microbiol**, 40: 1767 – 72, 2002.

GRANGEOT-KEROS, L.; COINTE, D. Diagnosis and prognostic markers of HCMV infection. **J Clin Virol**, 21: 213 - 21, 2001.

GRANGEOT-KEROS, L.; MAYAUX, M.J.; LEBON, P.; FREYMUTH, F.; EUGENE, G.; STRICKER, R. et al. Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. **J Infect Dis**, 175: 944 – 6, 1997.

GREFTE, J.M.; VAN DER GUN, B.T.; SCHMOLKE, S.; VAN DER GIESSEN, M.; VAN SON, W.J.; PLACHTER, B. et al. The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. **J Gen Virol**, 73: 2923 – 32, 1992.

HAGAY, Z.J.; BIRAN, G.; ORNOY, A.; REECE, E.A. Congenital cytomegalovirus infection: a long-standing problem still seeking a solution. **Am J Obstet Gynecol**, 174: 241 – 5, 1996.

KANGRO, H.O.; GRIFFITHS, P.D.; HUBER, T.J.; HEATH, R.B. Specific IgM class antibody production following infection with cytomegalovirus. **J Med Virol**, 10: 203 – 12, 1982.

KANO, Y.; SHIOHARA, T. Current understanding of cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. **J Dermatol Sci**, 22: 196 – 204, 2000.

LANDRY, M.L.; FERGUSON, D. Comparison of quantitative cytomegalovirus antigenemia with culture methods and correlation with clinical disease. **J Clin Microbiol**, 31: 2851 – 6, 1993.

LANG, D.; VORNHAGEN, R.; ROTHE, M.; HINDERER, W.; SONNEBORN, H.; PLACHTER, B. Cross-reactivity of Epstein-Barr virus-specific immunoglobulin M antibodies with antigens containing glycine homopolymers. **Clin Diagn Lab Immunol**, 8: 747 – 56, 2001.

LAZZAROTTO, T.; BROJANAC, S.; MAINE, G.T.; LANDINI, M.P. Search for cytomegalovirus-specific immunoglobulin M: comparison between a new western blot, conventional western blot, and nine commercially available assays. **Clin Diagn Lab Immunol**, 4: 483 – 6, 1997a.

LAZZAROTTO, T.; SPEZZACATENA, P.; PRADELLI, P.; ABATE, D.A.; VARANI, S.; LANDINI, M.P. Avidity of immunoglobulin G directed against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. **Clin Diagn Lab Immunol**, 4: 469 – 73, 1997b.

LEE, P.C.; HALSWORTH, P. Rapid viral diagnosis in perspective. **British Med J**, 300: 1413 – 8, 1990.

LEUNG, A.K.C.; SAUVE, R.S.; DAVIES, H.D. Congenital cytomegalovirus infection. **J Natl Med Assoc**, 95: 213 – 8, 2003.

LEVIN, M.J. Current approaches to the prevention and treatment of cytomegalovirus disease after bone marrow transplantation: an overview. **Semin Hematol**, 27: 1 – 4, 1990.

LIGON, B.L. Thomas Huckel Weller, MD: Nobel Laureate and research pioneer in poliomyelitis, varicella-zoster virus, cytomegalovirus, rubella, and other infectious diseases. **Semin Pediatr Infect Dis**, 13: 55 – 63, 2002.

LJUNGMAN, P.; GRIFFITHS, P.; PAYA, C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. **Clin Infect Dis**, 34: 1094 – 7, 2002.

MACHADO, C.M.; FINK, M.C.; VILAS BOAS, L.S.; SUMITA, L.M.; WEINBERG, A.; SHIGUEMATSU, K. et al. Infecção perinatal pelo citomegalovírus em hospital público do município de São Paulo: estudo prospectivo. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 33: 159 – 66, 1991.

MAINE, G.T.; LAZZAROTTO, T.; LANDINI, M.P. New developments in the diagnosis of maternal and congenital CMV infection. **Expert Rev Mol Diag**, 1: 19 –29, 2001.

MERINGAN, T.C.; RESTA, S. Cytomegalovirus: where have we been and where are we going? **Rev Infect Dis**, 12: 693 – 700, 1990.

MORRIS, D.J.; SIMS, D.; CHISWICK, M; DAS, V.K.; NEWTON, V.E. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection after maternal recurrent infection. **Pediatr Infect Dis J**, 13: 61 – 4, 1994.

NUMAZAKI, K.; CHIBA, S. Current aspects of diagnosis and treatment of cytomegalovirus infection in infants. **Clin Diagn Virol**, 8: 169 – 81, 1997.

PANNUTI, C.S. Citomegalia. In: FERREIRA, A.W. e ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 68 – 73.

PANNUTI, C.S.; VILAS BOAS, L.S.; ÂNGELO, M.J.; AMATO NETO, V.; LEVI, G.C.; de MENDONÇA, J.S. et al. Cytomegalovirus mononucleosis in children and adults: differences in clinical presentation. **Scand J Infect Dis**, 17: 153 – 6, 1985.

PASS, R.F. Cytomegalovirus infection. **Pediatr Rev**, 23: 163 – 70, 2002.

PASS, R.F.; GRIFFITHS, P.D.; AUGUST, A.M. Antibody response to cytomegalovirus after renal transplantation: comparison of patients with primary and recurrent infections. **J Infect Dis**, 147: 40 - 6, 1983.

PATEL, R.; KLEIN, D.W.; ESPY, M.J.; HARMSSEN, W.S.; ILSTRUP, D.M.; PAYA, C.V. et al. Optimization of detection of cytomegalovirus viremia in transplantation recipients by shell vial assay. **J Clin Microbiol**, 33: 2984 – 6, 1995.

PILLAY, D.; CHARMAN, H.; LOK, J.; GRIFFITHS, P.D. Detection of cytomegalovirus by a rapid culture system: a comparison of monoclonal antibodies in clinical setting. **J Virol Methods**, 40: 219 – 24, 1992.

POMEROY, C.; ENGLUND, J.A. Cytomegalovirus: epidemiology and infection control. **Am J Infect Control**, 15: 107 – 19, 1987.

PRINCE, H.; LEBER, A.L. Validation of an in-house assay for cytomegalovirus immunoglobulin G (CMV IgG) avidity and relationship of avidity to CMV IgM levels. **Clin Diagn Lab Immunol**, 9: 824 – 7, 2002.

RAWLINSON, W.D. Diagnosis of human cytomegalovirus infection and disease. **Pathology**, 31: 109 – 15, 1999.

RAYNOR, B.D. Cytomegalovirus infection in pregnancy. **Semin Perinatol**, 17: 394 – 402, 1993.

REVELLO, M.G.; LILLERI, D.; ZAVATTONI, M.; FURIONE, M.; MIDDELDORP, J.; GERNA, G. Prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection in amniotic fluid by nucleic acid sequence-based amplification assay. **J Clin Microbiol**, 41: 1772 – 4, 2003.

RIBBERT, H. Veber protozoenartige zellen in der niere eines syphilitischen negeborenen und in der parotis von kindern. **Zentralbl Allg Pathol**, 15: 945 - 8, 1904.

RILEY, H.D. Jr. History of the cytomegalovirus. **South Med J**, 90: 184 - 90, 1997.



ROIZMANN, B.; DESROSIERS, R.C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A.C.; STUDDERT, M.J. The family herpesviridae: an update. The herpesvirus study group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Arch Virol**, 123: 425 - 49, 1992.

ROWE, W.P.; HARTLEY, J.W.; WATERMAN, S.; TURNER, H.C.; HUEBNER, R.J. Cytopathogenic agent resembling salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. **Proc Soc Exp Biol Med**, 92: 418 - 24, 1956.

RUBIN, R.H.; LEVIN, M.; COHEN, C. Summary of a workshop on cytomegalovirus infections during organ transplantation. **J Infect Dis**, 139: 728 - 34, 1979.

SANTOS, D.V.V.; SOUZA, M.M.R.; GONÇALVES, S.H.L.; COTTA, A.C.S.; MELO, L.A.O.; ANDRADE, G.M.Q. et al. Congenital cytomegalovirus infection in neonatal intensive care unit in Brazil evaluated by PCR and association with perinatal aspects. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 42: 129 - 32, 2000.

SISSONS, J.G.P.; CARMICHAEL, A.J. Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection. **J Infect**, 44: 78 - 83, 2002.

SLAVIN, M.A.; GLEAVES, C.A.; SCHOCH, H.G.; BOWDEN, R.A. Quantification of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage fluid after allogeneic marrow transplantation by centrifugation culture. **J Clin Microbiol**, 30: 2776 - 9, 1992.

SMITH, M. G. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. **Proc Soc Exp Biol Med**, 92: 424 - 30, 1956.

STAGNO, S.; PASS, R.F.; CLOUD, G.; BRITT, W.J.; HENDERSON, R.E.; WALTON, P.D. et al. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. **J Amer Med Ass**, 256: 1904 - 8, 1986.

STAGNO, S.; PASS, R.F.; DWORSKY, M.E.; HENDERSON, R.E.; MOORE, E.G.; WALTON, P.D. et al. Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infection. **N Engl J Med**, 306: 945 - 9, 1982.

STAGNO, S.; PASS, R.F.; REYNOLDS, D.W.; MOORE, M.A.; NAHMIAS, A.J.; ALFORD, C.A. Comparative study of diagnostic procedures for congenital cytomegalovirus infection. **Pediatrics**, 65: 251 - 7, 1980.

STAGNO, S.; REYNOLDS, D.W.; HUANG, E.S.; THAMES, S.D.; SMITH, R.J.; ALFORD, C.A. Congenital cytomegalovirus infection. **N Engl J Med**, 296: 1254 – 8, 1977.

SWEET, C. The pathogenicity of cytomegalovirus. **FEMS Microbiol Rev**, 23: 457 – 82, 1999.

TAYLOR, G.H. Cytomegalovirus. **Am Fam Physician**, 67: 519 – 24, 2003.

THE, T.H.; VAN DER BIJ, W.; VAN DER BERG, A.P.; VAN DER GIESSEN, M.; WEITS, J.; SPRENGER, H.G. et al. Cytomegalovirus antigenemia. **Rev Infect Dis**, 12: 734 - 44, 1990.

TONG, C.Y. Diagnosis of cytomegalovirus infection and disease. **J Med Microbiol**, 46: 717 – 9, 1997.

VAN DER BIJ, W.; TORENSMA, R.; VAN SON, W.J.; ANEMA, J.; SCHIRM, J.; TEGZESS, A.M. et al. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. **J Med Virol**, 25: 179 - 88, 1988.

VAN DER MEER, J.T.M.; DREW, W.L.; BOWDEN, R.A.; GALASSO, G.J.; GRIFFITHS, P.D.; JABS, D.A. et al. Summary of the international consensus symposium on advances in the diagnosis, treatment and prophylaxis of cytomegalovirus infection. **Antiviral Res**, 32: 119 – 40, 1996.

WEBER, B.; BERGER, A.; RABENAU, H. Human cytomegalovirus infection: diagnostic potential of recombinant antigens for cytomegalovirus antibody detection. **J Virol Methods**, 96: 157 – 70, 2001.

WEBER, B.; PROSSER, F.; MUNKWITZ, A.; DOERR, H.W. Serological diagnosis of cytomegalovirus infection: comparison of 8 enzyme immunoassays for the detection of HCMV-specific IgM antibody. **Clin Diagn Virol**, 2: 245 –59, 1994.

WELLER, T.H.; HASHAW, I.B.; SCOTT, D.E. Serologic differentiation of viroses responsible for cytomegalic inclusion disease. **Virology**, 12: 130 - 2, 1960.

WELLER, T.H.; MACAULEY, J.C.; CRAIG, J.M.; WIRTH, P. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. **Proc Soc Exp Biol Med**, 94: 4 – 12, 1957.

WERBLIN, T.P.; KIM, Y.T.; QUAGLIATA, F.; SISKIND, G.W. Studies on the control of antibody synthesis. III. Changes in heterogeneity of antibody affinity during the course of the immune response. **Immunology**, 24: 477 – 92, 1973.

WOLF, D.G.; SPECTOR, S.A. Early diagnosis of human cytomegalovirus disease in transplant recipients by DNA amplification in plasma. **Transplantation**, 56: 330 – 4, 1993.

YAMAMOTO, A.Y.; AQUINO, V.H.; FIGUEIREDO, L.T.M.; MUSSI-PINHATA, M.M. Diagnóstico de infecção congênita e perinatal por citomegalovírus utilizando a reação em cadeia da polimerase. **Rev Soc Bras Med Trop**, 31: 19 - 26, 1998.

YAMAMOTO, A.Y.; MUSSI-PINHATA, M.M.; PINTO, P.C.G.; FIGUEIREDO, L.T.M.; JORGE, S.M. Congenital cytomegalovirus infection in preterm and full-term newborn infants from a population with a high seroprevalence rate. **Pediatr Infect Dis J**, 20: 188 – 92, 2001.

YEN-LIEBERMAN, B. Diagnosis of human cytomegalovirus disease. **Clin Microbiol Newslett**, 22: 105 – 9, 2000.