

Pemeriksaan Antigen pp65 dan mRNA pp67 Cytomegalovirus (CMV) Pada Wanita Hamil dengan IgG anti-CMV positif di RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta

T.W. UTAMI
A. HESTIANTORO
A. BUSTAMI*
E.J. SURJANA

*Divisi Imunoendokrinologi Reproduksi
Departemen Obstetri dan Ginekologi
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/
RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo
Jakarta*

**Makmal Terpadu Imunoendokrinologi
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
Jakarta*

Tujuan: Mengetahui proporsi seropositif CMV pada wanita hamil dengan riwayat abortus dan gambaran hasil pemeriksaan antigen pp65 CMV, mRNA pp67 CMV, serta kesesuaiannya pada wanita hamil dengan IgG anti-CMV yang positif.

Rancangan/rumusan data: Studi deskriptif. Kesesuaian hasil pemeriksaan antara antigen pp65 dan mRNA pp67 CMV dinilai dengan menghitung nilai kappa (k).

Tempat: (1) IGD lantai III dan Poliklinik kebidanan dan kandungan RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta, (2) Bagian Mikrobiologi dan (3) Makmal Terpadu Imunoendokrinologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.

Bahan dan cara kerja: Sampel berasal dari darah wanita hamil dengan riwayat abortus dan darah tali pusat janin yang dilahirkan. Pemeriksaan IgM dan IgG CMV dilakukan dengan metode ELISA, pemeriksaan antigen pp65 CMV dengan teknik imunohistokimia, dan pemeriksaan mRNA pp67 CMV dengan teknik NASBA.

Hasil: Selama kurun Januari - Juni 2005, terkumpul 50 sampel yang berasal dari 25 subjek; terdiri dari 25 darah ibu dan 25 darah janin. Seluruh (100%) wanita hamil dengan riwayat abortus dalam penelitian ini memberikan hasil IgG antiCMV yang positif. Tidak ada subjek dengan IgM anti-CMV yang positif. Pada pemeriksaan antigen pp65 CMV terdapat 6% hasil yang positif, yaitu 2% dari sampel ibu dan 4% sampel tali pusat. Tidak terdapat hasil yang positif pada pemeriksaan NASBA mRNA pp67 CMV. Terdapat 26% sampel, yaitu 12% sampel ibu dan 14% sampel janin dengan hasil mRNA pp67 CMV tidak dapat ditentukan.

Kesimpulan: Proporsi seropositif IgG anti-CMV pada wanita hamil dengan riwayat abortus dalam penelitian ini adalah sangat tinggi. Pada pemeriksaan antigen pp65 CMV terdapat 6% hasil yang positif. Tidak ada hasil mRNA pp67 CMV yang positif. Penelitian ini menunjukkan bahwa pada individu yang imunokompeten, jarang sekali terjadi reaktivasi sehingga risiko infeksi CMV kongenital adalah kecil. Dalam penelitian ini tidak terdapat kesesuaian hasil antara pemeriksaan antigen pp65 dan NASBA mRNA pp67 CMV, dengan nilai kappa 0%.

[Maj Obstet Ginekol Indones 2006; 30-4: 203-12]

Kata kunci: antigen pp65, mRNA pp67 CMV, IgG anti-CMV, wanita hamil, riwayat abortus.

Objective: To gain proportion of CMV seropositivity in pregnant women with history of miscarriage and the accordance between CMV pp65 antigen and CMV pp67 mRNA in pregnant women with positive IgG.

Design/data identification: Descriptive study. Kappa (k) was calculated to evaluate the accordance between CMV pp65 antigen and CMV pp67 mRNA.

Setting: (1) Emergency Room and Polyclinic of Obstetry and Gynecology Dr. Cipto Mangunkusumo Hospital Jakarta, (2) Microbiology Department and (3) Makmal Terpadu Imunoendocrinology, Medical Faculty University of Indonesia, Jakarta.

Material and methods: Blood serum blood of mother (pregnant women with miscarriage history) and fetal umbilical cord. CMV IgM and IgG were performed by ELISA, CMV pp65 antigen by immunohistochemistry, and CMV pp67 mRNA by NASBA.

Results: From January until June 2005, we collected 50 samples consist of 25 blood mother's samples and 25 blood fetal samples. In this study, all of pregnant women with history of miscarriage show positive IgG. There were no subjects with positive IgM. 6% samples showed positive CMV pp65 antigen; 2% from mother's samples and 4% from fetal samples. There was no positive result on CMV pp67 mRNA by means of NASBA. Twentysix percent samples showed undetermined result.

Conclusions: In this study, the proportion of anti-CMV IgG seropositivity in pregnant women with miscarriage history was high. 6% samples showed positive CMV pp65 antigen. There was no positive result on CMV pp67 mRNA by NASBA. This study showed that CMV reactivation was very rare in immunocompetent person, so the risk of CMV congenital infection would be low. There was no accordance observed between CMV pp65 antigen and CMV pp67 mRNA, with kappa 0%.

[Indones J Obstet Gynecol 2006; 30-4: 203-12]

Keywords: CMV pp65 antigen, CMV pp67 mRNA, IgG, pregnant woman, miscarriage history.

Cytomegalovirus (CMV) ditemukan secara universal,¹ dan telah menjadi endemik di dunia.^{1,2} Seroprevalensinya sangat tinggi di negara-negara Asia Tenggara dan daerah tropik, dilaporkan hampir mencapai 100%.^{2,3} Seroprevalensi yang tinggi ini juga dijumpai di negara-negara berkembang dan di daerah yang mempunyai kondisi sosial ekonomi rendah dengan kepadatan penduduk yang tinggi.^{1,4} Proporsi wanita usia reproduksi yang seropositif adalah 55 - 85%.⁵ Berdasarkan survei dan penelitian terhadap wanita hamil dengan riwayat abortus di RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta pada tahun 2000 dan 2001, didapatkan prevalensi infeksi CMV yang cukup tinggi yaitu 25% dan 26,7%.⁶ Pada infeksi primer, tingkat transmisi vertikal adalah tinggi, mencapai hampir 50%.^{1,4} Secara keseluruhan, jumlah bayi yang terinfeksi CMV tiap tahunnya rata-rata 50.000 ribu bayi, di mana sekitar 8000 bayi di antaranya memperlihatkan berbagai gangguan akibat infeksi kongenital ini.⁸

Wanita hamil diketahui rentan terhadap infeksi CMV.¹ Infeksi dapat terjadi secara primer, rekuren atau reinfeksi oleh *strain* CMV yang berbeda, kemudian bertahan seumur hidup.⁹ Selama kehamilan, infeksi yang asimtomatik sering disertai eksresi virus yang positif. Kehamilan itu sendiri meningkatkan kecenderungan seorang wanita terinfeksi CMV atau mengalami reaktivasi dari infeksi yang laten. Selain kehamilan, kondisi lain yang juga rentan terhadap infeksi CMV adalah resipien organ transplantasi, penderita penyakit dengan terapi immunosupresan lama, dan pasien-pasien yang *immunocompromised*.¹⁰

CMV dapat mengakibatkan morbiditas yang berat dan mortalitas yang tinggi pada pasien yang *immunocompromised* dan resipien organ transplantasi.^{2,11} Pada kehamilan, CMV merupakan penyebab ter sering infeksi kongenital di dunia. CMV juga merupakan faktor infeksius mayor yang berhubungan dengan masalah morbiditas jangka panjang.¹² Prognosis bayi dengan infeksi CMV kongenital umumnya buruk, di mana tingkat mortalitasnya mencapai hingga 30%.³

Diagnostik klinik infeksi CMV adalah sulit. Diperlukan teknik diagnostik yang sensitif dan spesifik dan terstandarisasi dengan baik untuk mendeteksi secara cepat dan akurat pasien-pasien yang berisiko mengalami perkembangan penyakit ini. Berbagai metode diagnostik telah tersedia, namun masih sedikit data tentang perbandingan berbagai metode diagnostik tersebut. Hingga saat ini yang menjadi masalah utama adalah bagaimana cara mendeteksi replikasi virus yang aktif secara dini sehingga dapat ditentukan terapi yang tepat.¹³

Penentuan terapi yang tepat sasaran sangat diperlukan untuk mencegah komplikasi penyakit serta timbulnya efek samping dan resistensi ganciclovir akibat terapi yang tidak tepat. Banyak upaya skrining antenatal baik secara molekuler maupun non-molekuler, dilakukan dalam rangka menurunkan tingkat kerusakan janin.⁸ Hambatan utama yang sering dijumpai adalah peningkatan kadar antibodi anti-CMV dalam darah seorang wanita hamil belum mampu mencegah atau melindungi kejadian infeksi CMV intrauterin.^{3,8} Pada infeksi primer dengan kadar antibodi anti-CMV yang tinggi, masih terjadi infeksi janin pada 18% kasus, sedangkan pada infeksi berulang terjadi 8% infeksi pada janin.⁷ Selain itu, pemeriksaan serologi untuk melihat adanya antibodi anti-CMV juga tidak dapat memastikan apakah virus tersebut masih aktif berada dalam tubuh atau tidak. Metode molekuler amplifikasi asam nukleat berdasarkan sekuens (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification/NASBA*) dan reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction/PCR*) dinyatakan lebih superior dalam menentukan infeksi CMV pada manusia, dibandingkan metode konvensional, termasuk antigenemia CMV.¹³

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini dirancang sebagai studi deskriptif untuk mendapatkan gambaran pemeriksaan antigen pp65 dan *NASBA* mRNA pp67 CMV pada wanita hamil trimester III dengan IgM dan atau IgG anti-CMV yang positif, selama periode 6 bulan (Januari - Juni 2005). Tempat penelitian ini adalah IGD lantai III, Poliklinik Kebidanan RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta, Bagian Mikrobiologi, dan Makmal Terpadu Imunoendokrinologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Pengumpulan data penelitian dilakukan pada bulan Januari - Juni 2005.

Subjek penelitian diambil dari populasi wanita hamil trimester III yang datang untuk memeriksakan kehamilannya di poliklinik kebidanan dan melahirkan di IGD lantai III RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusinya adalah: 1) bersedia mengikuti penelitian; 2) wanita hamil trimester III dengan riwayat abortus dan atau melahirkan janin *IUFD*; 3) belum pernah menjalani pengobatan medikamentosa untuk CMV; 4) hasil pemeriksaan serologi IgM dan atau IgG CMV (+). Sedangkan kriteria eksklusinya adalah: 1) Menolak mengikuti penelitian; 2) wanita hamil yang sedang mendapat terapi pengobatan acyclovir untuk CMV; 3) wanita

hamil yang mendapat terapi immunosupresan; 4) wanita hamil yang disertai penyakit berat; seperti: asma, penyakit jantung, PEB perburukan, dll; serta 5) wanita hamil penderita AIDS.

$$\text{Besarnya sampel dihitung dengan rumus } n = \frac{Z\alpha^2 PQ}{d^2}$$

Proporsi kejadian CMV pada wanita hamil dengan riwayat abortus berdasarkan penelitian Santana pada tahun 2001 adalah 25%. Dari perhitungan didapatkan besar sampel 51. Untuk mengantisipasi kemungkinan *drop out*, besar sampel ditambah 10%, sehingga jumlah sampel menjadi 56 subjek.

Pemeriksaan Antigen pp65 CMV

Proses yang dilakukan yaitu:

- Sembilan mililiter darah yang telah diberi EDTA 1% ditambahkan dengan 1,8 ml larutan Dekstran, inkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C.
- Supernatan sebanyak 2 - 4 ml dimasukkan ke dalam tabung sentrifugal, tambahkan 8 ml PBS 1x (*Phosphate Buffered Saline* pengenceran 1 kali)
- Lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 850 rpm selama 10 menit pada suhu 20°C.
- Supernatan dibuang, endapannya ditambahkan dengan 2 ml *Erythrocytes Lysing solution*.
- Campuran tersebut diinkubasi selama 2 - 4 menit pada suhu kamar, setelah itu tambahkan lagi dengan 8 ml PBS.
- Lakukan sentrifugasi lagi dengan kecepatan 850 rpm selama 10 menit pada suhu 20°C.
- Supernatan dibuang, endapannya ditambahkan dengan 0,5 ml PBS.
- Campuran diencerkan 10 kali kemudian dilakukan penghitungan jumlah leukosit dengan alat *haemocytometer*.
- Setelah penghitungan leukosit, lakukan fiksasi dengan cara berikut:
 - Slide yang telah diberikan bahan yang akan diperiksa, direndam dalam larutan fiksatif selama 10 menit pada suhu kamar.
 - Tiriskan dan rendam dalam larutan pencuci selama 5 menit, tiriskan.
 - Rendam kembali dalam larutan permeabilisasi 5 menit, tiriskan lagi.
 - Slide kemudian direndam dalam larutan pencuci selama 5 menit - 1 jam.
- Setelah proses fiksasi, dilanjutkan proses pewarnaan sebagai berikut:
 - Siapkan Cinapool 1/20
 - Masukkan 20 ul Cinapool ke dalam preparat tadi, kemudian diinkubasi selama 30 menit dalam keadaan lembab pada suhu 37 C.
 - Selama menunggu, siapkan *Antibodies dilution buffer* dengan pengenceran 1/200 kemudian

simpan dalam suhu es 4°C.

- Setelah diinkubasi, preparat dicuci dengan PBS 3 kali 1 menit, kemudian teteskan 20 ul *Antibodies dilution buffer* 1/200.
 - Preparat diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dalam keadaan lembab dan gelap.
 - Cuci preparat tadi dengan PBS 3 kali 1 menit, dilanjutkan pencucian dengan aqua, lalu rendam dalam *Evans blue* selama 5 menit, tiriskan.
 - Teteskan PBS 50% Gliserol secukupnya. Slide siap dibaca dengan alat mikroskop fluoresensi.
- k. Bila hasil pembacaan didapatkan satu sel positif, maka disimpulkan antigen CMV (+).

Pemeriksaan mRNA pp67 CMV

Pemeriksaan mRNA CMV dengan teknik *NASBA* (*NucliSens*[®]) terdiri dari 4 tahap:

- Pelepasan asam nukleat
- Isolasi asam nukleat
- Amplifikasi asam nukleat
- Deteksi asam nukleat

HASIL

Setelah dilakukan penapisan pada bulan Desember 2004 hingga September 2005, tercatat 50 sampel yang berasal dari 25 subjek; terdiri dari 25 darah ibu hamil dan 25 darah tali pusat janin yang dilahirkan. Keseluruhan pasien bersedia ikut serta dalam penelitian, yang terdiri dari wanita hamil dengan riwayat abortus minimal satu kali. Pada penelitian ini tidak ada subjek dengan riwayat pernah melahirkan janin *IUFD*.

Usia terbanyak subjek adalah di atas 35 tahun (56%) dengan rerata 34,5 ± 6,14 ($\chi \pm SD$) tahun. Keseluruhan subjek adalah multigravida (100%), di mana sebagian besarnya multipara (64%) dengan riwayat abortus kurang dari 3 kali (84%). Rerata untuk gravida adalah 4,5 ± 2,3 ($\chi \pm SD$), paritas 1,8 ± 1 ($\chi \pm SD$), dan rerata riwayat abortus 1,7 ± 1,7 ($\chi \pm SD$). Proporsi subjek yang mengalami abortus satu kali 72%, abortus 2 kali 12%, dan abortus rekuren 16%.

Tidak ada subjek yang hamil pertama kali pada usia di bawah 15 tahun dan juga tidak ada satupun subjek yang mempunyai pasangan seks multipel. Kebanyakan subjek yaitu 88% adalah ibu rumah tangga. Sebagian besar subjek yaitu 80% melahirkan pada kehamilan aterm. Berat badan lahir terbanyak adalah 2500 - 3999 gram yaitu pada 84% subjek. Reratanya adalah 3061 ± 308,9 ($\chi \pm SD$) gram. Terdapat satu bayi dengan kelainan kongenital mayor anensefalus. Usia pertama kali subjek

hamil terbanyak pada usia 16 - 35 tahun (80%) dengan rerata $28,7 \pm 5,5$ ($\chi \pm SD$) tahun.

Sebanyak 68% subjek melahirkan spontan, 32% lainnya melahirkan dengan *sectio caesarea* (SC). Indikasi operasi bervariasi, yaitu 2/8 subjek atas indikasi malposisi dan gawat janin. Yang lain masing-masing satu subjek atas indikasi ketuban pecah dini pada janin presentasi bokong belum in partu, perdarahan antepartum karena plasenta previa totalis (PPT), air ketuban habis, dan makro-somia. Hanya satu tindakan SC elektif, yaitu atas indikasi makrosomia. Sebaran ciri subjek dan data kelahiran dapat dilihat di Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Sebaran ciri subjek

Ciri	n	%
Umur (tahun)		
≤ 20	1	4
21 - 35	10	40
≥ 35	14	56
Gravida		
≤ 1	0	0
≥ 2	25	100
Paritas		
0	3	12
1	6	24
≥ 2	16	64
Usia pertama kali hamil (tahun)		
≤ 15	0	0
16 - 35	20	80
> 35	5	20
Pekerjaan		
Ibu rumah tangga	22	88
Karyawan swasta	2	8
Perawat	1	4

Tabel 2. Data kelahiran

Data	n	%
Usia gestasi saat melahirkan (minggu)		
< 37	5	20
37 - 42	20	80
Berat badan lahir (gram)		
< 2500	3	12
2500 - 3999	21	84
≥ 4000	1	4
Cara kelahiran		
Spontan	17	68
SC	8	32
Indikasi SC		
Sungsang KPD belum in partu	1	12,5
HAP ec PPT	1	12,5
Gawat janin	2	25
Air ketuban habis	1	12,5
Makrosomia	1	12,5
Malposisi	2	25

Rekapitulasi hasil pemeriksaan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3 berikut.

Tabel 3. Rekapitulasi hasil pemeriksaan IgM, IgG, antigen pp65 dan *NASBA* mRNA pp67 CMV

Nomor subjek	IgM	IgG	Antigen darah ibu	mRNA darah ibu	Antigen tali pusat	mRNA tali pusat
1.	(-)	57	(-)	(-)	(-)	(-)
2.	(-)	27	(-)	(-)	(-)	(-)
3.	(-)	58	(-)	(-)	(-)	(-)
4.	(-)	25	(-)	(-)	(-)	(-)
5.	(-)	65	(-)	(-)	(-)	(-)
6.	(-)	79	(-)	(-)	(-)	(-)
7.	(-)	64	(-)	(-)	(+)	(-)
8.	(-)	32	(-)	(-)	(-)	(-)
9.	(-)	61	(-)	(-)	(-)	(-)
10.	(-)	60	(-)	(-)	(-)	(-)
11.	(-)	73	(-)	(-)	(-)	(-)
12.	(-)	55	(-)	(-)	(-)	(-)
13.	(-)	21	(-)	(-)	(-)	(-)
14.	(-)	41	(-)	(-)	(-)	(-)
15.	(-)	83	(-)	(-)	(-)	(-)
16.	(-)	52	(-)	(-)	(-)	TDD
17.	(-)	18	(-)	TDD	(-)	(-)
18.	(-)	90	(+)	(-)	(+)	(-)
19.	(-)	52	(-)	(-)	(-)	TDD
20.	(-)	49	(-)	(-)	(-)	(-)
21.	(-)	42	(-)	TDD	(-)	TDD
22.	(-)	53	(-)	TDD	(-)	TDD
23.	(-)	65	(-)	TDD	(-)	TDD
24.	(-)	64	(-)	TDD	(-)	TDD
25.	(-)	20	(-)	TDD	(-)	TDD

Keterangan: *CMV*: cytomegalo virus; *Ig*: imunoglobulin; *mRNA*: messenger ribonucleic acid; *NASBA*: Nucleic Acid Sequence Based Amplification; *TDD*: tidak dapat ditentukan

Antibodi anti-CMV

Dari 25 subjek yang bersedia ikut serta dalam penelitian ini, 100% hasil IgG CMV-nya positif. Titer tertinggi 90 dan terendah 20, dengan rerata $52,2 \pm 19,94$ ($\chi \pm SD$). Tidak ada satupun hasil pemeriksaan IgM yang positif.

Antigen pp65 CMV

Dari pemeriksaan antigen pp65 CMV terhadap 50 sampel, hanya terdapat tiga (6%) sampel yang positif, yaitu satu sampel (2%) dari darah ibu dan dua sampel (4%) dari darah tali pusat. Hasil pemeriksaan mRNA pp67 CMV pada ketiga sampel tersebut negatif.

NASBA mRNA pp67 CMV

Tidak ada satupun pemeriksaan mRNA yang memberikan hasil positif. Dari keseluruhan pemeriksaan mRNA CMV berdasarkan teknik *NASBA* (*Nucleic Sens[®] Reader*) ini terdapat 13 di antara 50 sampel yang hasilnya tidak dapat ditentukan (TDD). Sepuluh di antaranya merupakan pasangan darah ibu dan tali pusatnya, sedangkan tiga lainnya TDD pada salah satunya. Oleh karena itu hanya 37 sampel pemeriksaan antigen dan mRNA yang dapat diproses;

yaitu berasal dari 19 sampel darah ibu dan 18 sampel darah tali pusat.

Antigen pp65 dan NASBA mRNA pp67 CMV dalam Darah Ibu

Pada pemeriksaan antigen pp65 terhadap 25 subyek, hanya satu yang positif, 24 sisanya negatif. Pada pemeriksaan NASBA mRNA pp67, tidak ada satupun yang positif. Terdapat enam sampel yang hasilnya TDD, sisanya negatif. Dari 19 sampel darah yang negatif mRNAnya, hampir seluruhnya (18/19) memberikan hasil antigen yang negatif pula. Dengan demikian, terdapat 1/19 sampel darah ibu yang memberikan perbedaan hasil antara antigen dan mRNAnya. Derajat kesesuaian ($kappa/k$) hasil antara pemeriksaan antigen pp65 dan NASBA mRNA pp67 dalam darah ibu adalah 0%. Hasil ini dapat dilihat pada Tabel 4 dan 5.

Tabel 4. Hasil pemeriksaan antigen pp65 dan mRNA pp67 CMV dalam darah ibu

Antigen Ibu	mRNA ibu			Jumlah
	Positif	Negatif	TDD	
Positif	0	1	0	1
Negatif	0	18	6	24
Jumlah	0	19	6	25

Keterangan: TDD: tidak dapat ditentukan

Tabel 5. Kesesuaian hasil antara pemeriksaan antigen pp65 dan mRNA pp67 CMV dalam darah ibu

Antigen Ibu	mRNA ibu			$k = 0\%$
	Positif	Negatif	Jumlah	
Positif	0	1	1	
Negatif	0	18	18	
Jumlah	0	19	19	

Antigen pp65 dan NASBA mRNA pp67 CMV dalam Darah Tali Pusat

Dalam darah tali pusat janin, terdapat dua sampel yang positif antigennya, 23 sisanya negatif. Pada pemeriksaan NASBA mRNA pp67, tidak ada satupun yang positif. Terdapat tujuh sampel yang TDD, sisanya negatif. Dari 18 sampel darah yang negatif mRNAnya, hampir seluruhnya (16/18) memberikan hasil antigen yang negatif juga. Terdapat 2/18 sampel darah tali pusat yang memberikan perbedaan hasil antara antigen dan mRNAnya. Nilai $kappa$ antara hasil pemeriksaan antigen pp65 dan NASBA mRNA pp67 dalam darah tali pusat adalah 0%. Hasil ini dapat dilihat pada Tabel 6 dan 7.

Tabel 6. Hasil pemeriksaan antigen pp65 dan mRNA pp67 CMV dalam darah tali pusat

Antigen tali pusat	mRNA ibu			Jumlah
	Positif	Negatif	TDD	
Positif	0	2	0	2
Negatif	0	16	7	23
Jumlah	0	18	7	25

Tabel 7. Kesesuaian hasil antara pemeriksaan antigen pp65 dan mRNA pp67 CMV dalam darah tali pusat

Antigen tali pusat	mRNA tali pusat			$k = 0\%$
	Positif	Negatif	Jumlah	
Positif	0	2	2	
Negatif	0	16	16	
Jumlah	0	18	18	

Antigen pp65 dalam Darah Ibu dan Darah Tali Pusat

Dari 25 sampel darah ibu, hanya satu yang positif antigennya, 24 sisanya negatif. Pada sampel darah tali pusat terdapat dua sampel yang positif. Dengan demikian, terdapat perbedaan hasil pada 1/25 sampel, di mana dalam darah tali pusat janin ditemukan antigen CMV sedangkan dalam darah ibunya tidak. Hasil ini dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil pemeriksaan antigen pp65 CMV dalam darah ibu dan tali pusat

Antigen ibu	Antigen tali pusat		Jumlah
	Positif	Negatif	
Positif	1	0	1
Negatif	1	23	24
Jumlah	2	23	25

NASBA mRNA pp67 dalam Darah Ibu dan Darah Tali Pusat

Hasil pemeriksaan mRNA CMV pp67 terhadap darah ibu dan darah tali pusat janin tidak ada satupun yang positif. Terdapat enam sampel darah ibu dan tujuh sampel darah tali pusat yang TDD. Dari 19 sampel darah ibu yang negatif mRNAnya, hampir seluruhnya (17/19) juga negatif pada sampel darah tali pusat janin yang dilahirkan. Hasil ini dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil pemeriksaan mRNA pp67 CMV dalam darah ibu dan tali pusat

mRNA darah ibu	mRNA darah tali pusat			Jumlah
	Positif	Negatif	TDD	
Positif	0	0	0	0
Negatif	0	17	2	19
TDD	0	1	5	6
Jumlah	0	18	7	25

IgM anti-CMV dan mRNA pp67 dalam Darah Ibu

Dalam darah ibu tidak ada satupun hasil pemeriksaan IgM dan mRNA CMV yang positif. Terdapat tujuh sampel dengan IgM negatif yang hasil mRNA-nya TDD. Hasil ini dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Hasil pemeriksaan IgM dan mRNA pp67 CMV dalam darah ibu

IgM	mRNA ibu			Jumlah
	Positif	Negatif	TDD	
Positif	0	0	0	0
Negatif	0	19	6	25
Jumlah	0	19	6	25

Tabel 11. Hasil pemeriksaan IgM dan mRNA pp67 CMV dalam darah tali pusat

IgM	mRNA darah tali pusat			Jumlah
	Positif	Negatif	TDD	
Positif	0	1	0	0
Negatif	0	18	7	25
Jumlah	0	18	7	25

IgG anti-CMV dan mRNA pp67 dalam Darah Ibu

Keseluruhan darah ibu memberikan hasil antibodi IgG yang positif. Tidak satupun hasil mRNA pp67 CMV yang positif. Hasil yang sama terjadi pada sampel darah tali pusat janin, bahwa tidak ada sampel darah tali pusat yang memberikan hasil positif pada pemeriksaan mRNA pp67 (Tabel 12 dan 13).

Tabel 12. Hasil pemeriksaan IgG dan mRNA pp67 CMV dalam darah ibu

IgG	mRNA darah ibu			Jumlah
	Positif	Negatif	TDD	
Positif	0	19	6	25
Negatif	0	0	0	0
Jumlah	0	19	6	25

Tabel 13. Hasil pemeriksaan IgG dan mRNA pp67 CMV dalam darah tali pusat

IgG	mRNA darah tali pusat			Jumlah
	Positif	Negatif	TDD	
Positif	0	18	7	25
Negatif	0	0	0	0
Jumlah	0	18	7	25

DISKUSI

Kelemahan Penelitian

Meski jumlah subjek penelitian belum mencukupi angka yang telah diperhitungkan sebelumnya, pengolahan data tetap dilakukan, tetapi dengan kon-

sekuensi lemahnya kekuatan hasil yang diperoleh. Dengan demikian, hasil penelitian ini baru merupakan laporan pendahuluan dan belum dapat diterapkan (diekstrapolasikan) pada populasi yang lebih luas. Data hasil penelitian ini disajikan secara deskriptif.

Sebaran Ciri Subjek

Berdasarkan hasil sebaran ciri subjek, keseluruhan subjek merupakan multigravida yang mayoritas berusia cukup tua yaitu di atas 35 tahun dan multipara. Multigravida dan usia yang lebih tua memang berhubungan dengan seropositivitas CMV.¹ Usia merupakan faktor yang sangat mempengaruhi prevalensi IgG anti-CMV, di mana seropositivitas akan meningkat 80 - 98% pada kelompok usia di atas 35 tahun.^{1,4,14} Sheehan dkk. juga mendapatkan peningkatan prevalensi CMV yang signifikan pada wanita multipara.¹ Sedangkan faktor lain yang juga berhubungan dengan status seropositif, yaitu kehamilan pertama pada usia muda (15 tahun) dan pasangan seks multipel,⁵ tidak terdapat pada penelitian ini. Status seropositif juga berhubungan dengan status sosial ekonomi yang rendah, namun pada penelitian ini tidak dicari karena penentu status sosial ekonomi bersifat multifaktorial.

Proporsi Seropositif Antibodi anti-CMV Wanita Hamil dengan Riwayat Abortus**IgG anti-CMV**

Pada penelitian ini didapatkan proporsi seropositif CMV yang sangat tinggi pada wanita hamil dengan riwayat abortus, ditunjukkan dengan IgG anti-CMV yang positif pada 100% (25/25) subjek dengan titer yang bervariasi. Tingginya IgG anti-CMV pada populasi subjek memberikan implikasi bahwa kejadian infeksi primer CMV pada kehamilan adalah sangat kecil. Ini berarti infeksi CMV kongenital pada neonatus sangat rendah pada individu yang imunokompeten. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Turbadkar dkk.³ terhadap 380 wanita hamil, diperoleh seroprevalensi yang tinggi yaitu 91%. Sheevani dkk.¹ juga menemukan seroprevalensi yang tinggi pada wanita usia reproduksi, yaitu 87,4%.

Hasil IgG yang negatif cenderung menyingkirkan adanya infeksi. Hasil serologi IgG yang positif atau titernya tinggi dapat saja dijumpai pada infeksi yang aktif, namun tidak otomatis begitu saja diinterpretasikan sebagai infeksi CMV yang aktif. Bila hasil tes antibodi pada sampel serum berpasangan menunjukkan peningkatan hingga 4 kali lipat dalam

waktu 2 - 4 minggu dan diperoleh kadar IgM yang bermakna (rata-rata minimal 30% dari nilai IgG), atau virus dapat dikultur dari urin atau spesimen tenggorok, maka hal ini menandakan infeksi CMV aktif sedang terjadi.⁸ Umumnya, keberadaan antibodi IgG hanya merupakan informasi riwayat pasien terinfeksi CMV.^{8,15} Serokonversi atau peningkatan ke suatu rasio kritis (unit ELISA) akan mengidentifikasi infeksi primer. Pada kecurigaan adanya infeksi primer pada kehamilan berdasarkan hasil serologi, aviditas IgG berperan penting. Pemeriksaan ini dapat memprediksi kemungkinan terjadinya infeksi kongenital. Aviditas IgG sangat kuat membedakan infeksi primer dan non-primer, terutama pada usia kehamilan kurang dari 18 minggu. Indeks aviditas (*avidity index/AI*) yang tinggi menunjukkan bahwa risiko infeksi kongenital kecil. Sebaliknya, AI yang rendah menunjukkan risiko infeksi CMV kongenital yang tinggi.¹⁶

IgM anti-CMV

Pada penelitian ini, tidak ada satupun subjek dengan IgM anti-CMV yang positif. Pada penelitian Turbadkar dkk,³ diperoleh IgM anti-CMV yang relatif rendah, yaitu 8,42%. Hasil IgM yang negatif tidak menyingkirkan infeksi CMV, dikarenakan pada infeksi kongenital pun didapatkan IgM yang positif pada 30 - 89%.¹⁴ Walaupun telah terjadi infeksi primer, IgM tidak selalu positif, dan adanya IgM tidak selalu menandakan infeksi primer.¹⁴ IgM juga dapat timbul selama reaktivasi karena IgM spesifik akan dihasilkan pada reaktivasi CMV, walaupun dalam kadar yang rendah. Selain itu, terdapat tenggang waktu antara terjadinya infeksi primer dengan diproduksinya antibodi IgM, sehingga mungkin saja IgM tidak terdeteksi karena serokonversi yang tertunda akibat agen immunosupresif. Respon antibodi IgM ini berhubungan dengan perbedaan ekspresi IE dan L.¹⁷ Walaupun angka kejadiannya rendah, IgM ternyata juga dapat positif pada infeksi rekuren. Hal ini disebabkan oleh karena IgM dapat menetap hingga 18 bulan setelah infeksi primer. Antibodi IgM juga dapat bertahan dalam jangka waktu yang lama setelah infeksi. Tidak didapatkannya hasil IgM yang positif mungkin pula berhubungan dengan sensitivitasnya yang rendah. Hasil IgM yang negatif palsu mungkin berhubungan dengan sensitivitas tes yang memang tidak memadai ataupun pada individu yang mengalami gangguan sistem imun.¹⁴

Untuk memperoleh hasil diagnostik terbaik, tes laboratorium terhadap antibodi CMV memang sebaiknya dilakukan dengan menggunakan sampel serum yang berpasangan. Suatu tes tunggal yang

memberikan hasil IgM yang positif belum tentu menunjukkan infeksi kini, dikarenakan sekitar 50% orang dewasa seropositif. Dianjurkan untuk melakukan pemeriksaan lebih lanjut pada 4 minggu kemudian untuk membuktikan tidak adanya serokonversi atau peningkatan titer yang bermakna. Karena walau bagaimanapun, parameter terbaik untuk menyatakan adanya infeksi primer adalah dengan spesimen berpasangan. Pengecualian berlaku pada populasi pasien yang mengalami immunosupresi di mana peningkatan atau penurunan kadar antibodi tidak menunjukkan diagnosis aktual infeksi CMV karena seringnya terjadi reaktivasi virus.

Memang sangat sulit membuktikan adanya infeksi primer dengan satu metode pemeriksaan saja. Hal ini seharusnya menjadi perhatian, dikarenakan wanita hamil yang terinfeksi CMV secara primer, terutama pada pasien yang *immunocompromised* sangat tinggi tingkat transmisi vertikalnya yaitu rata-rata 50%. Kelainan kongenital yang terjadi akan sangat memperburuk kualitas hidup selanjutnya.

Antigen pp65 CMV dalam Darah Ibu dan Tali Pusat Janin

Dalam penelitian ini, terdapat kejanggalan pada pemeriksaan antigen pp65 CMV. Dari 50 sampel darah yang diperiksa, terdapat dua sampel (4%) darah tali pusat yang positif, sedangkan pada sampel darah ibu yang positif hanya satu (2%). Hasil pemeriksaan *NASBA* mRNA pp67 pada ketiga sampel tersebut adalah negatif. Didapatkannya hasil pemeriksaan antigen pp65 yang berbeda tersebut memberikan implikasi bahwa kemungkinan terjadi positif palsu. Tidak mungkin terjadi transmisi vertikal apabila di dalam darah ibunya sendiri tidak dijumpai antigen tersebut. Kemungkinan terjadi kesalahan sampel atau tertukar dengan sampel yang lain juga kecil, karena pengambilan dan pengiriman sampel masing-masing dilakukan oleh satu orang yang sama. Antigen pp65 merupakan salah satu protein matriks yang banyak dihasilkan pada proses replikasi virus, namun hal ini bukan merupakan indikator langsung replikasi virus *in vivo*.¹⁴ Analisis antigenemia dengan menggunakan cara kuantitatif bisa dipakai untuk memprediksi infeksi CMV. Hal lain yang juga mempengaruhi perbedaan hasil tersebut adalah langkah pengerjaan dan evaluasi leukosit yang terinfeksi bersifat subjektif.

NASBA mRNA pp67 CMV dalam Darah Ibu dan Tali Pusat Janin

Tidak ada satupun pemeriksaan *NASBA* mRNA pp67 CMV yang positif. Dari 50 sampel, terdapat

26% yang hasilnya tidak dapat ditentukan. Berdasarkan kepustakaan, pemeriksaan *NucliSens* mRNA pp67 tidak dapat ditentukan pada multiplisitas infeksi yang rendah, karena tidak terbentuk transkrip mRNA pp67 yang adekuat.^{18,19} Hal ini menyebabkan NPP yang rendah.^{19,20} Kemungkinan lain yang dapat menyebabkannya adalah sampel rusak saat penyimpanan, karena *freezer* pernah kurang berfungsi akibat kepadaman listrik lebih dari 24 jam. Hasil tersebut terjadi pada sampel yang diolah pada periode akhir. Langkah-langkah pemeriksaan untuk meminimalisasi kontaminasi RNase yang dapat mendegradasi mRNA juga telah dilakukan sesuai dengan standar.

Dalam penelitian ini, tidak ada hasil mRNA pp67 CMV yang positif pada IgG yang positif. Ekspresi mRNA pp67 hanya terjadi selama replikasi virus.¹¹ Dengan demikian, penelitian ini membuktikan bahwa memang jarang sekali terjadi reaktivasi pada wanita hamil yang imunokompeten.²¹

Kesesuaian Hasil antara Antigenemia pp65 dengan NASBA mRNA pp67 CMV

Dalam penelitian ini diperoleh nilai *kappa* 0%. Berarti, tidak terdapat kesesuaian antara hasil pemeriksaan antigen pp65 dengan *NASBA* mRNA pp67 CMV. Blok dkk,¹³ juga mendapatkan derajat kesesuaian hasil yang sangat lemah.

Terdapat perbedaan hasil pada 8% sampel, yaitu sebanyak 3/37 sampel antigen pp65 positif sedangkan *NASBA* mRNA pp67 negatif. Perbedaan hasil yang terjadi mungkin disebabkan oleh rendahnya nilai batas sel positif pada pemeriksaan antigen pp65 yang digunakan dalam penelitian ini. Rendahnya nilai batas antigen pp65 yaitu 1/200.000 sel memberikan hasil mRNA pp67 yang negatif. Hasil ini didukung pula oleh Blok dkk, bahwa terdapat korelasi yang kuat antara hasil *NASBA* pp67 yang negatif dan hasil antigen pp65 yang positif dengan jumlah sel yang sedikit.¹⁵ Reaktivitas silang yang mungkin memberikan hasil antigen yang positif tersebut belum dapat disingkirkan.⁸ Hasil mRNA yang negatif dengan antigen yang positif juga disebabkan oleh hilangnya mRNA secara cepat, berminggu-minggu sebelum antigen pp65 dan jumlah kopi DNA mulai menurun. Pemeriksaan *NASBA NucliSens* mRNA pp67 akan positif pada kadar antigen dan viral load yang tinggi.

Fryda dan Mihailidi¹¹ telah membuktikan bahwa ekspresi mRNA pp67 lebih sensitif daripada antigen pp65. Keduanya sama-sama spesifik dalam menentukan *onset* infeksi CMV. Deteksi mRNA IE-1 merupakan petanda yang lebih akurat dalam menentukan inisiasi dini dari pemberian terapi anti-

virus. Dari studi tersebut juga didapatkan kecenderungan hasil yang positif pada pemeriksaan antigenemia pp65 dibandingkan *NASBA* mRNA pp67 pada monitoring pemberian obat antivirus ganciclovir. Fenomena ini dapat diterangkan berdasarkan sintesis transkrip L virus. Protein pp65 lebih stabil dibandingkan mRNA pp67, sehingga protein pp65 ini bisa saja tetap ada di dalam darah pada saat di mana mRNA pp67 sudah didegradasi. Selain itu, kemungkinan protein pp65 ini masih disintesis selama terapi antivirus. Tidak seperti mRNA pp67, pp65 bukan transkrip L yang sebenarnya. Transkripsinya tidak langsung dipengaruhi oleh inhibisi sintesis DNA virus.¹³ Bestetti dkk,²³ membuktikan sensitivitas mRNA pp67 yang tinggi.

Sebagai perbandingan, berdasarkan studi uji diagnostik yang dilakukan selama tujuh tahun (1987 - 1994) di berbagai negara untuk mendeteksi infeksi CMV in utero, telah digunakan berbagai metode deteksi infeksi CMV mulai dari pemeriksaan ultrasonografi, IgM, deteksi antigen, kultur virus dari cairan amnion dan darah janin, hingga pemeriksaan PCR. Dari berbagai studi tersebut didapatkan hasil bahwa pemeriksaan *NASBA* dan PCR merupakan uji diagnostik terbaik untuk CMV. Pada studi-studi tersebut tidak mungkin untuk membandingkan akurasi dari tes-tes yang berbeda dikarenakan tidak semua spesimen berasal dari pasien yang sama dan juga karena jumlah subjek yang diteliti masih sedikit dan heterogen.⁵

Dari berbagai penelitian tentang pemeriksaan CMV, baik serologi, antigen pp65, maupun *NASBA* mRNA pp67 masih memberikan hasil yang bervariasi dan belum menunjukkan suatu pola yang konsisten. Hingga kini pengalaman dalam diagnosis CMV prenatal memang masih terbatas dan didasarkan pada laporan-laporan kasus yang masih sedikit.

KESIMPULAN

Sebagai laporan pendahuluan, dapat disimpulkan bahwa proporsi seropositif IgG anti-CMV pada wanita hamil dengan riwayat abortus dalam penelitian ini adalah sangat tinggi. Dibuktikan dengan hasil serologi IgG anti-CMV yang positif pada 100% subjek. Tidak ada subjek dengan IgM anti-CMV yang positif. Pada pemeriksaan antigen pp65 CMV terdapat 6% hasil yang positif, yaitu 2% dari sampel ibu dan 4% sampel tali pusat. Tidak terdapat hasil yang positif pada pemeriksaan *NASBA* mRNA pp67 CMV. Penelitian ini menunjukkan bahwa pada individu yang imunokompeten, jarang sekali terjadi

reaktivasi sehingga risiko infeksi CMV kongenital adalah kecil. Terdapat 26% sampel, yaitu 12% sampel ibu dan 14% sampel janin dengan hasil mRNA pp67 CMV tidak dapat ditentukan. Dalam penelitian ini tidak terdapat kesesuaian hasil antara pemeriksaan antigen pp65 dan *NASBA* mRNA pp67 CMV, dengan nilai *kappa* 0%.

SARAN

Setiap wanita usia reproduksi sebaiknya mengetahui serostatus terhadap CMV.⁸ Pada kecurigaan infeksi primer berdasarkan serologi, aviditas IgG perlu diperiksa. Pemeriksaan *NASBA* mRNA CMV pp67 perlu dilakukan bersama antigenemia pp65 pada pasien berisiko tinggi, karena pemeriksaan biomolekuler tunggal kurang dapat mengidentifikasi perkembangan penyakit CMV.^{21,24}

Pada individu yang imunokompeten, nilai batas jumlah sel yang positif pada pemeriksaan antigen pp65 perlu ditingkatkan untuk mencegah misinterpretasi, efek samping dari terapi yang tidak perlu, serta resistensi ganciclovir.²⁵ Deteksi CMV prenatal dengan amniosentesis sebelum kehamilan 18 minggu, teknik RT-PCR untuk mengetahui *viral load*, serta *NASBA* mRNA IE-1 sebagai parameter baru deteksi dini infeksi CMV¹³ perlu dipertimbangkan, terutama pada kehamilan dengan individu yang immunocompromised (penderita AIDS/HIV positif).

Perlu diadakan penelitian lanjutan secara prospektif dengan besar sampel yang memadai untuk mempelajari kemungkinan terjadinya respon imun neonatus terhadap CMV serta reaktivasi CMV pada kehamilan, terutama pada wanita hamil dengan HIV positif yang berisiko tinggi mengalami reaktivasi.

RUJUKAN

1. Sheevani, Jindal N, Aggarwal A. A pilot seroepidemiological study of cytomegalovirus infection in women of child bearing age. *Ind J Med Microbiol* 2005; 23(1): 34-6
2. Weller TH. Cytomegaloviruses: a historical perspective. *HERPES* 2000; 7(3): 66-9
3. Turbadkar D, Mathur M, Rele M. Seroprevalence of TORCH infection in bad obstetric history. *Ind J Med Microbiol* 2003; 21(2): 108-10
4. Ward. PL. Roizman B. Herpesviruses: BASICS. In Roizman B. *Fields Virology*. 3rd edition. Chapter 71; Trends Genet. 10: 267, 1994
5. Hagay ZJ, Biran G, Ornoy A. Congenital cytomegalovirus infection: A long standing problem still seeking a solution. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174(1): 1-14
6. Santana S. Temuan antigen cytomegalo virus pada ibu hamil

dengan riwayat abortus di RSUPN Cipto Mangunkusumo Jakarta. Tesis 2001

7. Fowler KB, Stagno S, Pass RF. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* 1992; 326(10): 663-7
8. Asikin N, Zakiyah E, Marnilda. Diagnosis of human CMV infection. Dalam: Abstrak dan makalah masalah infeksi cytomegalovirus di Indonesia. Dies Natalis UI. Jakarta. 1997: 7
9. Polic B, Hengel H, Krmpotic A. Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J Exp Med* 1998; 188(6): 1047-54
10. Baldanti F, Sarasini A, Silini E. Four dually resistant human cytomegalovirus strains from AIDS patients: Single mutation in UL97 and UL54 open reading frames are responsible for ganciclovir- and foscarnet-specific resistance, respectively. *Scand J Infect Dis* 1995; Suppl. 99: 103-4
11. Fryda, Mihailidi I. Assays for the detection of human cytomegalovirus infection. *Hippokratia* 2003; 7(2): 93-6
12. Demmler GJ. CMV Updates. Congenital CMV disease: effects on vision. 2003; 8(1): 1-5
13. Blok MJ, Lautenschlager I, Goossens VJ. Diagnostic implications of human cytomegalovirus Immediate Early-1 and pp67 mRNA detection in whole blood samples from liver transplant patients using Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *J Clin Microbiol* 2000; 38(12): 4485-91
14. Piiparinen H. Quantitative PCR in the diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus infection in organ transplant patients. Academic Dissertation Department of Virology. Faculty of Biosciences. University of Helsinki 2004: 10-45
15. Gupta CK, Leszczynski J, Gupta RK. An enzyme immunoassay based micro-neutralization test for titration of antibodies to human cytomegalovirus (CMV) and its correlation with direct ELISA measuring CMV IgG antibodies. *Biologicals* 1996; 24(1): 41-9
16. Prince HE, Leber AL. 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* 2002; 9(4): 824-7
17. Goossens VJ, Vink C, Mullers W. Different profiles of cytomegalovirus RNA transcripts and anti-cytomegalovirus IgM antibodies in renal transplant recipients. *J Clin Virol*. 2001; 23(1-2): 87-95
18. Giebel S, Maccario R, Lilleri D. The immunosuppressive effect of human cytomegalovirus infection in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2005; 36(6): 503-9
19. Caliendo AM, Yen-Lieberman B, Baptista J. Comparison of molecular tests for detection and quantification of cell-associated cytomegalovirus DNA. *J Clin Microbiol* 2003; 41(8): 3509-13
20. Diaz-Mitoma F, Leger C, Miller H. Comparison of DNA amplification, mRNA amplification, and DNA hybridization techniques for detection of cytomegalovirus in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2003; 41(11): 5159-66
21. Caliendo AM, St George K, Allegra J. Distinguishing cytomegalovirus (CMV) infection and disease with CMV nu-

- cleic acid assays. *J Clin Microbiol* 2002; 40(5): 1581-6
22. Watal C, Joshi S, Gupta A. The pp67 mRNA assay in treatment and monitoring of cytomegalovirus disease in renal transplant patients in India. *Transpl Infect Dis.* 2004; 6(2): 90-2
23. Blok MJ, Goosens VJ, Vanherle SJV. Diagnostic value of monitoring human cytomegalovirus late pp67 mRNA expression in renal-allograft recipients by nucleic acid sequence-based amplification. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1341-6
24. Hamprecht K, Maschmann J, Muller D. Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breastmilk: reassessment of pasteurization and freezethawing. *Ped Res* 2004; 56(4): 529-35
25. Amorim ML, Cabeda JM, Seca R. CMV infection of liver transplant recipients: comparison of antigenemia and molecular biology assays. *BMC Infect Dis* 2001; 1(1): 2