

**Lékařská fakulta Masarykovy univerzity**

Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

Centrum molekulární biologie a genové terapie

Včasná diagnostika oportunních infekcí pomocí  
molekulárně biologických metod

Habilitační práce

Mgr. Martina Lengerová, Ph.D.

Brno 2016

#### Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem svým současným i bývalým kolegům a studentům ze Sekce oportunních infekcí Centra molekulární biologie a genové terapie. Všechny zde zmíněné publikace jsou výsledkem naší společné práce. Ráda bych také poděkovala mé milé kolegyni, Ing. Daně Dvořákové, CSc., zejména za to, že mi vždy byla a je nápomocná a že mi v mých počátcích vštípila ten správný pocit zodpovědnosti a empatie, která k práci v diagnostické laboratoři určitě patří. Můj dík patří také mým kolegům, Prof. MUDr. Zdeňku Ráčilovi a Mgr. Ivě Kocmanové, za kritický přístup k našim výsledkům, a za diskuse, která nás neustále posunují dále ve snažení o lepší diagnostiku. Nelze opomenout Prof. MUDr. Jiřího Mayera, přednostu Interní hematologické a onkologické kliniky Fakultní nemocnice Brno, kterému děkuji za svěřenou důvěru a trpělivost. Samozřejmě největší dík patří mé rodině, bez jejího pochopení a podpory bych toho nikdy tolik nezvládla.

## Obsah

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Oportunní infekce u imunokompromitovaných nemocných.....   | 7  |
| 2     | Bakteriální infekce.....   | 9  |
| 3     | Mykotické infekce .....  | 11 |
| 3.1   | Molekulárně biologická diagnostika mykotických infekcí.....  | 12 |
| 3.1.1 | Diagnostika invazivní aspergilózy .....  | 13 |
| 3.1.2 | Diagnostika invazivní mukormykózy.....   | 14 |
| 3.1.3 | Panfungální PCR .....  | 15 |
| 3.1.4 | Molekulární detekce mykotických patogenů ve Fakultní nemocnici Brno...   | 16 |
| 4     | Virové infekce .....   | 17 |
| 4.1   | Molekulárně biologická diagnostika virových infekcí .....  | 19 |
| 4.1.1 | Herpesvirové infekce.....  | 20 |
| 4.1.2 | Infekce způsobené neherpetickými viry .....  | 23 |
| 5     | Závěr.....   | 25 |
| 6     | Literatura .....   | 26 |
| 7     | Kompletní bibliografie předkladatelky habilitační práce .....  | 38 |
| 8     | Seznam příloh.....   | 45 |
|       | Příloha 1: Lengerová M., Ráčil Z., Hrnčířová K., Volfová P., Lochmanová J.,<br>Dvořáková D., Mayer J. Detekce invazivní aspergilózy pomocí PCR a real-time PCR<br>- přednosti a úskalí. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2007, roč. 13, č. 5, s.<br>184-190..... | 48 |

|  |    |
|--|----|
| Příloha 2: Lengerová M., Hrnčířová K., Ráčil Z., Mayer J., Kocmanová I., Pospíšilová Š., Dvořáková D. Způsob diagnostiky invazivní aspergilózy a oligonukleotidy pro použití při tomto způsobu. 2011. Patent. Číslo: 302670. Vydavatel: Úřad průmyslového vlastnictví. Místo vydání: Praha. Název vlastníka: Masarykova univerzita Brno. Datum registrace: 21. 4. 2009. Datum přijetí: 13. 7. 2011. ....                                       | 56 |
| Příloha 3: Lengerova M., Kocmanova I., Racil Z., Hrnčirova K., Pospisilova S., Mayer J., Najvar L.K., Wiederhold N.P., Kirkpatrick W.R., Patterson T.F. Detection and measurement of fungal burden in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis by novel quantitative nested real-time PCR compared with galactomannan and (1,3)-beta-D-glucan detection. Journal of Clinical Microbiology, 2012, roč. 50, č. 3, s. 602-608. .... | 67 |
| Příloha 4: Hrnčirova K., Lengerova M., Kocmanova I., Racil Z., Volfova P., Palousova D., Moulis M., Weinbergerova B., Winterova J., Toskova M., Pospisilova S., Mayer J. Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. Journal of Clinical Microbiology, 2010, roč. 48, č. 9, s. 3392-3394. ....   | 75 |
| Příloha 5: Lengerova M., Racil Z., Hrnčirova K., Kocmanova I., Volfova P., Ricna D., Bejdak P., Moulis M., Pavlovsky Z., Weinbergerova B., Toskova M., Mayer J. Rapid detection and identification of mucormycetes in bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients with pulmonary infiltrates by use of high-resolution melt analysis. Journal of Clinical Microbiology, 2014, roč. 52, č. 8, s. 2824-2828. ....             | 79 |
| Příloha 6: Bezdicek M., Lengerova M., Ricna D., Weinbergerova B., Kocmanova I., Volfova P., Drgona L., Poczova M., Mayer J., Racil Z. Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with  |    |

|   |     |
|---|-----|
| high resolution melting analysis. <i>Medical Mycology</i> . 2016 May 9. [Epub ahead of print] .....   | 85  |
| Příloha 7: Lengerová M., Bezdíček M., Ráčil Z., Mayer J., Kocmanová I. Sada pro detekci a identifikaci mykotických patogenů. 2016, PUV 2015-31689, Vydavatel: Úřad průmyslového vlastnictví. Místo vydání: Praha. Název vlastníka: Fakultní nemocnice Brno a Masarykova univerzita Brno. Datum přihlášení: 26. 10. 2015. Datum zapsání: 15. 3. 2016. ....                   | 96  |
| Příloha 8: Lengerová M., Volfová P., Říčná D., Palacková M., Ráčil Z. Diagnostika pneumocystové pneumonie molekulárněbiologickými metodami. <i>Postgraduální medicína, Mladá fronta a.s.</i> , 2013, roč. 15, příl. 4, s. 24-27.....  | 109 |
| Příloha 9: Lengerova M., Racil Z., Volfova P., Lochmanova J., Berkovcova J., Dvorakova D., Vorlicek J., Mayer J. Real-time PCR diagnostics failure caused by nucleotide variability within exon 4 of human cytomegalovirus major immediate-early gene. <i>Journal of Clinical Microbiology</i> , 2007, roč. 45, č. 3, s. 1042-1044.....                                     | 114 |
| Příloha 10: Volfova P., Lengerova M., Lochmanova J., Dvorakova D., Ricna D., Palackova M., Weinbergerova B., Mayer J., Racil Z. Detecting human cytomegalovirus drug resistant mutations and monitoring the emergence of resistant strains using real-time PCR. <i>Journal of Clinical Virology</i> , Amsterdam: Elsevier Science Inc, 2014, roč. 61, č. 2, s. 270-274..... | 118 |
| Příloha 11: Volfova P., Lengerova M., Winterova J., Racil Z., Dvorakova D., Mayer J. Monitoring of Epstein Barr virus load in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. <i>Infection</i> , Mnichov: Springer-Verlag, 2012, roč. 40, č. 5, s. 583-587.....  | 124 |

|  |     |
|--|-----|
| Příloha 12: Lengerová M., Volfová P., Ráčil Z. Laboratorní diagnostika CMV infekce u nemocných s hematologickou malignitou. Postgraduální medicína, Mladá fronta a.s., 2013, roč. 15, Příl. 4, s. 45-50 .....  | 130 |
| Příloha 13: Volfová P., Lengerová M., Dvořáková D., Paloušová D., Hrnčířová K., Ráčil Z., Mayer J., Pospíšilová Š. Význam PCR detekce a kvantifikace herpetických virů v bronchoalveolární laváži imunokompromitovaných pacientů. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, Praha: TRIOS, spol. s r. o., 2011, roč. 17, č. 6, s. 194-200..... | 137 |

## 1 Oportunní infekce u imunokompromitovaných nemocných

Oportunní infekce jsou infekce vyvolané patogeny, které u jedinců s plně fungujícím imunitním systémem většinou nezpůsobují onemocnění na rozdíl od pacientů s oslabeným imunitním systémem, kde se objevují ve vyšší četnosti a mají často závažnější průběh.

Jako imunokompromitované označujeme pacienty s poruchou vrozené nebo získané imunitní odpovědi (1). Mezi stavy, které vedou k imunodeficienci, se řadí zejména protinádorová terapie zhoubných hematologických onemocnění a solidních nádorů, transplantace hematopoetických kmenových buněk, infekce virem HIV, vrozené imunodeficience a moderní biologická léčba monoklonálními protilátkami (Tabulka 1) (2-4). Další skupinou ohroženou oportunními infekcemi jsou také nemocní dlouhodobě hospitalizovaní na jednotkách intenzivní péče. Nejčastějšími původci těchto infekcí jsou bakterie, následovány plísněmi a kvasinkami, nejméně se na etiologii podílí viry.

| Příčina                                     | Funkce v obraně proti infekci  | Důsledek  |
|---|--|---|
| Snížený počet neutrofilních granulocytů     | Buňky imunitního systému přímo odpovědné za ničení bakterií, kvasinek a vláknitých hub                 | Vysoké riziko bakteriálních a mykotických infekcí   |
| Snížený počet nebo porucha funkce lymfocytů | Buňky zodpovědné za ničení především virů, dále pak za tvorbu protilátek a kontrolu imunitního systému | Vysoké riziko virových infekcí, při snížení tvorby protilátek také riziko bakteriálních infekcí |
| Snížená tvorba protilátek                   | Nutné k zabránění průniku a eliminaci bakterií   | Riziko bakteriálních infekcí  |

**Tabulka 1. Příčiny zvýšeného rizika infekcí u onkologických nemocných (5)**

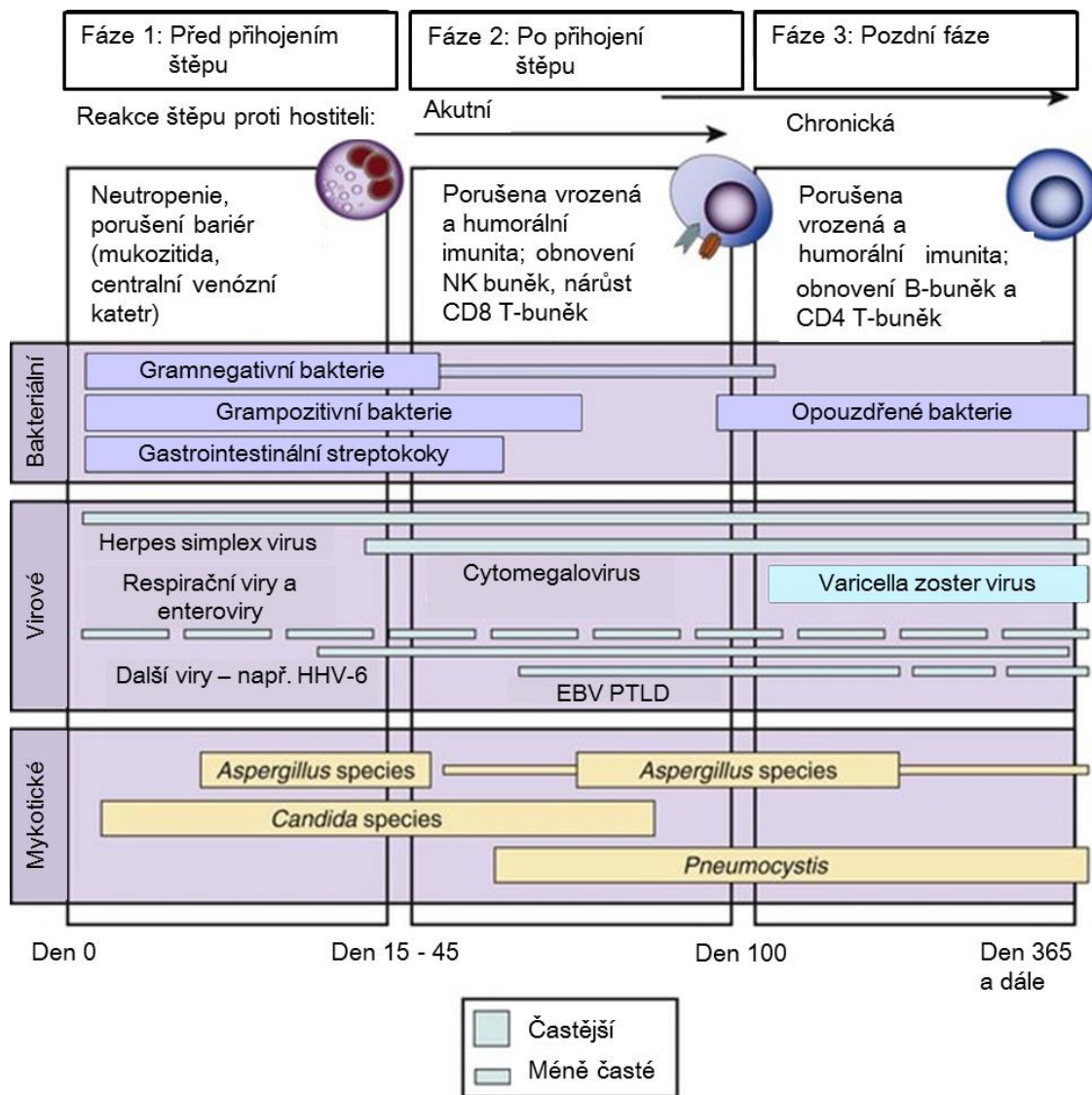
S rozšiřujícími se možnostmi v léčbě závažných hematologických onemocnění roste počet pacientů v riziku oportunních infekcí a zvyšují se nároky na jejich včasnou diagnostiku (6). Mezi nejrizikovější patří pacienti v indukční fázi léčby akutní leukémie a pacienti pro alogenní transplantaci buněk krve tvorné tkáně (Tabulka 2).

| <b>Riziko vzniku infekčních komplikací</b> | <b>Typ choroby/ léčby</b>                | <b>Hlavní defekt vedoucí ke zvýšenému riziku infekčních komplikací</b> |
|--|--|--|
| Vysoké                                     | Alogenní transplantace krvetvorné tkáně  | Deficit neutrofilů, T lymfocytů, protilátek                            |
|  | Akutní leukémie - indukční léčba         | Deficit neutrofilů   |
| Střední                                    | Akutní leukémie - konsolidační léčba     | Deficit neutrofilů   |
|  | Autologní transplantace krvetvorné tkáně | Deficit neutrofilů   |
|  | Chronická lymfocytární leukémie          | Defekt tvorby protilátek   |
|  | Mnohočetný myelom                        | Defekt tvorby protilátek   |
| Nízké                                      | Non-Hodgkinské lymfomy                   |  |
|  | Hodgkinův lymfom                         |  |
|  | Chronická myeloidní leukémie             |  |

**Tabulka 2. Zjednodušené rozdělení onkologických nemocných podle rizika vzniku infekčních komplikací (5)**

Klinické projevy a management infekcí jsou u imunokompromitovaných nemocných odlišné od pacientů imunokompetentních: a) vzhledem k absenci mediátorů imunologické a zánětlivé odpovědi jsou klinické projevy méně prominentní a velmi nespecifické; b) často jsou přítomny pouze febrilie či dokonce subfebrilie; c) příznaky podobné infekci mohou být způsobeny také neinfekčními procesy (reakcí štěpu proti hostiteli, imunitním rekonstitučním zánětlivým syndromem atd.); d) ke zhoršení klinického stavu dochází často velmi rychle, e) při podezření na infekci je neprodleně zahájena terapie širokospektrálními antimikrobiálními látkami; f) léčba by měla být co nejdříve zacílena na konkrétní agens. Z výše uvedeného vyplývá, že pro přežití pacienta je zcela zásadní rychlá identifikace původce infekce a zahájení cílené antimikrobiální terapie (7). Příklad podílu různých mikrobiálních agens na infekcích v různých obdobích po alogenní transplantaci buněk krvetvorné tkáně (dále HSCT, z angl. Hematopoietic Stem Cell Transplantation) je znázorněn na Obrázku 1.





Obrázek 1. Oportunní infekce v různých fázích po alogenní transplantaci buněk krvetvorné tkáně. Upraveno podle Tomblyn *et al.* (8)

## 2 Bakteriální infekce

Bakterie jsou hlavními původci infekcí u pacientů s hematologickou malignitou a to zejména v období neutropenie, jejíž délka a hloubka jsou podstatné pro určení stupně rizika. Přibližně 50 % pacientů s febrilní neutropenií má horečku jako jediný projev infekce, jen asi u poloviny se podaří infekci lokalizovat a určit jejího původce (9). V současnosti je zastoupení grampozitivních (G+) a gramnegativních (G-) bakterií jako

původců bakteriemií přibližně vyrovnané. G- jsou ale zodpovědné za většinu dokumentovaných infekcí letalita infekcí jimi způsobených je vysoká (10). Závažný je nárůst infekcí způsobených multirezistentními kmeny bakterií (enterobakterie s produkcí širokospektrých betalaktamáz a karbapenemáz, vankomycin rezistentní enterokoky atd.).

Management bakteriálních infekcí je vzhledem k jejich závažnosti a fulminantnímu průběhu založen na iniciální empirické léčbě širokospektrými antibiotiky (často v kombinaci), která jsou nasazena okamžitě při podezření na infekci (po provedení příčinných odběrů pro mikrobiologickou diagnostiku) (9). Volba antibiotik vychází ze znalostí lokální epidemiologie v daném nemocničním zařízení a u vysoce rizikových nemocných je preferován tzv. deeskalační přístup (podání antibiotik s nejširším spektrem v první linii s následnou deeskalací na antibiotika s omezenějším spektrem na základě mikrobiologických výsledků a klinického stavu) (11).

Zlatým standardem v diagnostice bakteriálních infekcí je mikroskopie a kultivace. Kultivační vyšetření umožní nejen identifikaci původce obtíží pacienta, ale také stanovení citlivosti k antibiotikům, která umožní cílenou léčbu dané infekce (12).

Metody molekulární biologie založené na průkazu bakteriální DNA v klinických vzorcích metodou PCR (případně real-time PCR) můžeme rozdělit na i) cílená vyšetření na specifické původce (nejčastější původci meningitidy, původci atypické pneumonie atd.), ii) tzv. širokospektrální metody (broad-range PCR) založené na detekci konzervativních úseků v genomu bakterií a jejich identifikaci na základě sekvenace DNA (13-16). Molekulárně biologické metody mohou mít významný přínos v detekci obtížně kultivovatelných mikroorganismů ve sterilních vzorcích (např. vyšetření srdečních chlopní pro objasnění původce infekční endokarditidy). Nevýhodou molekulárně biologické detekce bakterií je nejasná interpretace výsledků získaných z nesterilních vzorků, zejména při zachytu neobvyklých nebo oportunních patogenů, protože odlišení infekce od kolonizace nebo kontaminace vzorku je často obtížné (17, 18). Druhou významnou nevýhodou je, že tato vyšetření většinou neposkytují informaci o citlivosti k antibiotikům a nemohou proto sloužit jako podklad pro cílenou antibiotickou léčbu. Na trhu již ale existují komerční soupravy, které umožňují současně detekovat bakteriální DNA a nejčastější geny zodpovědné za rezistentní fenotyp. Náklady na tyto testy však mnohonásobně převyšují náklady vynaložené na kultivační vyšetření a je třeba zvážit jejich přínos pro rutinní praxi.

### 3 Mykotické infekce

Invazivní mykotické infekce jsou závažnou infekční komplikací nemocných imunokompromitovaných nádorovým onemocněním a jeho léčbou, HIV-pozitivitou a v poslední době i nemocných dlouhodobě hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče, po těžkých chirurgických zákrocích atd. V porovnání s bakteriálními infekcemi je jejich výskyt méně častý, nicméně jejich incidence narůstá a jsou spojeny s vysokou letalitou (19, 20).

Kvasinky a plísně nejsou až na výjimky (dermatofyty, endemické mykózy) primárně patogenní, ale mohou kolonizovat např. kůži nebo gastrointestinální trakt. Ke vzniku onemocnění (invazivního/neinvazivního) napomáhají predispozice hostitele - tzv. rizikové faktory (onkologická onemocnění a jejich léčba, léčba kortikoidy, diabetes, pobyt na JIP, léčba antibiotiky atd.). Pro vznik život ohrožujících invazivních mykotických infekcí (IMI), je největším rizikem neutropenie, protože obrana organismu proti mikroskopickým houbám závisí nejvíce na buněčné imunitě. Vstupní branou infekce jsou v případě vláknitých hub většinou dýchací cesty, proto se nejčastěji vyskytuje plicní forma těchto onemocnění. Nejčastějším původcem infekcí je *Aspergillus fumigatus*, dále další druhy rodu *Aspergillus* (*A. terreus*, *A. flavus* a další). Mezi tzv. vzácné původce IMI pak patří mukormycety (např. *Mucor*, *Rhizopus*), *Fusarium*, *Scedosporium* aj. Naopak septické stavy nejčastěji způsobují zástupci rodu *Candida* (21-25), ale po zavedení profylaxe flukonazolem nastal rapidní pokles těchto infekcí a dominantními původci IMI u pacientů s hematologickými malignitami se staly vláknité houby (26).

Včasná diagnostika IMI a promptní zahájení adekvátní léčby je zcela zásadní pro prognózu pacienta.

V současné době je rutinní diagnostika IMI založena na kombinaci klinických příznaků, radiologického nálezu a výsledků mikrobiologických testů. Dušnost, horečka a kašel jsou časně, ale velmi nespecifické příznaky. Jako velmi přínosný, zejména pro diagnostiku invazivní aspergilózy, se ukázal radiologický nález na HRCT (počítačová tomografie s vysokou rozlišovací schopností, z angl. High Resolution Computed Tomography) hrudníku (jako nejčastějšího místa postižení). Bohužel např. obraz halo-sign,

typický pro aspergilózu, je přítomen pouze v dočasně a air-crescent sign až v pokročilých stádiích infekce (27).

Zlatým standardem laboratorní diagnostiky invazivní aspergilózy (IA) a obecně i IMI, je průkaz mykotických elementů v postižené tkáni nebo pozitivní kultivace z primárně sterilních lokalit (28). Bohužel u pacientů s hematologickou malignitou jsou tyto dvě metody jen velmi málo přínosné. Citlivost kultivace je často snížena z důvodu již zahájené antimykotické léčby, získání vzorků pro histologické vyšetření (nejčastěji pomocí biopsie) je nemožné, zejména pokud se jedná o pacienty s trombocytopenií.

Velkým pokrokem v diagnostice IMI bylo zavedení sérologických testů pro detekci komponent buněčných stěn kvasinek a plísní. Pro diagnostiku IA je velmi přínosná detekce galaktomannanu (GM) v séru, případně likvoru nebo v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAT) (29-31). Dalším sérologickým markerem je 1,3-beta-D-glukan (BG). Tento polysacharid je přítomen v buněčné stěně většiny kvasinek a plísní a jedná se tedy o tzv. panfungální marker (32-34).

Detekce obou těchto markerů je (v kombinaci s přítomností hostitelských rizikových faktorů a klinických příznaků) v současné době zahrnuta do kritérií Evropské organizace pro výzkum a léčbu rakoviny (EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer) pro stanovení diagnózy IA (35).

### **3.1 Molekulárně biologická diagnostika mykotických infekcí**

Molekulárně biologické metody jsou založené na detekci nukleových kyselin mykotických patogenů v klinických vzorcích. Nejčastěji je využívána polymerázová řetězová reakce (PCR) a její varianty – nested PCR a (kvantitativní) real-time PCR (36-38). V současné době se jako cílové sekvence pro detekci využívají nejčastěji mitochondriální nebo ribozomální geny (jedná se o vícekopiové geny a je tak dosaženo nižšího detekčního limitu). Tyto geny jsou obecně evolučně velmi konzervativní a obsahují oblasti, které jsou homologní u téměř všech druhů hub (tzv. „panfungální“) a úseky, které jsou rodově specifické.

Pro vyšetření je teoreticky možné použít jakýkoliv biologický materiál – krev (plnou krev, plazmu nebo sérum), BAT, sputum, likvor, biopsie tkání a další.

### 3.1.1 Diagnostika invazivní aspergilózy

Zavedení PCR diagnostiky IMI do rutinní diagnostické praxe se ukázalo jako nesnadný úkol. Na našem pracovišti jsme se začali zabývat PCR detekcí mykotických patogenů v roce 2005. Zaměřili jsme se na výběr vhodné metody pro izolaci DNA z klinických vzorků a návrh PCR metody pro diagnostiku IMI, zejména detekci aspergilové DNA pro diagnostiku IA ve vzorcích krve a tekutiny z BAT. Literární data a naše vlastní zkušenosti jsme shrnuli do článku „Detekce invazivní aspergilózy pomocí PCR a real-time PCR - přednosti a úskalí“, publikovaného v roce 2007 v časopise *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství* (Příloha 1).

Na základě našich prvních zkušeností, a zejména vzhledem k obtížné interpretaci výsledků získaných při použití různých dříve publikovaných metod, jsme se rozhodli primárně zacílit na metodu, která umožní citlivou a specifickou detekci několika druhů *Aspergillus* sp., které jsou nejčastějšími původci IA. Námi navržený postup byl založen na kvantitativní real-time PCR, protože pro hodnocení výsledků při detekci v nesterilních klinických vzorcích (zejména BAT) je zásadní nejen průkaz DNA patogenů, ale také jejich nálož. Námi vyvinutou metodu pro specifickou detekci a kvantifikaci DNA *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus* a *A. niger* v klinických vzorcích jsme patentovali v roce 2011 (Příloha 2).

Pro zhodnocení přínosu této naší nové metody v rutinní diagnostice ji bylo třeba otestovat na vzorcích získaných od pacientů s prokázanou IA (kromě hostitelských faktorů a klinických příznaků je v tomto případě vyžadován průkaz mykotických elementů v postižených tkáních nebo pozitivní kultivace z primárně sterilních vzorků). Vzhledem k nízké incidenci IA u pacientů léčených na IHOK (incidence je v současné době do 5 %), jsme se rozhodli použít pro validaci metody a zhodnocení korelace jejích výsledků s dalšími metodami (kultivace, detekce galaktomannanu a detekce 1,3-beta-D-glukanu) vzorky získané ze zvířecího modelu IA. Jako experimentální zvířata byla použita morčata, která byla infikována inhalační cestou druhem *A. fumigatus* na pracovišti The University of Texas Health Science Center v San Antonio ve Spojených státech amerických. Popis této studie a získané výsledky byly publikovány v roce 2012 v časopise *Journal of Clinical Microbiology* (Příloha 3). Zjistili jsme, že naše kvantitativní nested real-time PCR umožňuje časnou detekci IA, přičemž výsledky PCR korelovaly s výsledky sérologických

metod (detekce GM a BG). Nejlepší výsledky byly získány u vzorků BAT a tkání, které vykazovaly výraznou pozitivitu už v časných stádiích infekce. Naopak některé vzorky plné krve a séra zůstaly negativní na všechny markery i v pokročilých stádiích infekce. Tyto inter-individuální rozdíly mohou být podobné i u imunokompromitovaných pacientů a mohou tak komplikovat diagnostiku IA.

### 3.1.2 Diagnostika invazivní mukormykózy

Paralelně jsme se také zaměřili na zavedení metody pro detekci nejčastějších původců invazivní mukormykózy (IM). Do rizikové skupiny pro vznik tohoto onemocnění patří kromě pacientů s hematologickými a jinými malignitami (24, 39, 40) a po orgánových transplantacích také pacienti s diabetem. Více než 90 % případů infekcí je způsobeno *Rhizopus* sp. (nejčastěji *R. oryzae*), dále následují rod *Mucor*, *Lichtheimia* (dříve *Absidia*) *corymbifera* a *Rhizomucor pusillus*, vzácněji pak další (41). Invazivní mukormykóza (IM) se vyznačuje rychlou progresí a vysokou letalitou. Mezi nejčastěji postižené orgány patří plíce, výstelka paranasálních dutin a mozek. Definitivní diagnóza IM je nejčastěji stanovena na základě histologického průkazu houbových vláken v postižené tkáni nebo pozitivní kultivace z klinického materiálu (pro mukormycety jsou typické široké, tenkostěnné, neseptované nebo řídce septované hyfy větvcí se v úhlu 90°) (42, 43). Sérologické metody nejsou k dispozici.

Jako základ pro naši metodiku jsme použili dříve publikovanou seminested PCR metodu s primery specifickými pro rod *Mucorales*, která je zacílena do oblasti 18S rDNA (44). V originální metodice byly jednotlivé druhy dále identifikovány metodou sekvenace, což je velmi časově a finančně náročné. Proto jsme původní protokol modifikovali tak, že k rozlišení jednotlivých druhů byla využita metoda analýzy křivek tání s vysokým rozlišením (HRM, z angl. High Resolution Melt analysis). Naše metoda je založena na PCR amplifikaci konzervativního úseku genomu mukormycet pomocí specifických primerů za přítomnosti interkalačního barviva. Po provedení PCR jsou získané PCR produkty podrobeny kontrolovanému tání, přičemž při rozvolnění dvoušroubovice DNA dochází k uvolnění navázaného fluorescenčního barviva a tím ke změně fluorescence ve vzorku. Tato změna je zaznamenána příslušným softwarem a znázorněna jako křivka tání, která má jedinečný tvar pro každý druh mukormycety. Metoda byla nejprve validována na DNA izolované z kultur kvasinek a plísní a publikovali jsme její použití pro detekci

mukormycet ve vzorcích tkáně (publikováno v časopise *Journal of Clinical Microbiology* v roce 2010, Příloha 4). Následně jsme validovali také její použití pro testování vzorků BAT. Součástí této druhé publikace, vydané v roce 2014 v časopise *Journal of Clinical Microbiology*, jsou také nově navržené metody pro kvantitativní real-time PCR, která umožňuje stanovení fungální nálože jednotlivých rodů/druhů mukormycet ve vzorku a tím zvyšuje šanci na odlišení kolonizace od aktivně probíhající infekce (Příloha 5).

### 3.1.3 Panfungální PCR

I přes tento široký diagnostický záběr stále zbývá malé procento infekcí, které mohou být způsobeny jinými druhy, než byly doposud zmíněny. Pro jejich diagnostiku je velmi vhodná panfungální PCR, jejíž hlavní nevýhodou je však častá falešná pozitivita (zejména při testování nesterilních vzorků – jako je např. BAT). Panfungální PCR je většinou prováděna jako kvalitativní PCR reakce s následnou sekvenací získaných PCR produktů. Nevýhodou tohoto tradičního postupu je dlouhá doba do získání výsledku (až 2-3 dny) a poměrně velké náklady na vyšetření (nákladná sekvenační reakce), přičemž výsledky jsou často obtížně interpretovatelné (např. pokud získáme sekvence náležející kolonizujícím, případně kontaminujícím mikroorganismům).

Vzhledem k našim dobrým zkušenostem s využitím HRM analýzy pro identifikaci mukormycet, jsme navrhli panfungální PCR metodu, ve které je sekvenace opět nahrazena analýzou křivek tání. Jedná se o uzavřený systém s jednokolovou PCR a výsledky je možné získat cca za 2 hodiny. Nově navržené primery jsou umístěny do konzervativních úseků ohraničujících variabilní úseky genomu kvasinek a plísní a to po analýze křivek tání umožňuje přímou identifikaci etiologického agens. Ukázalo se, že výsledky vyšetření jednoznačně odliší původce infekce (zejména *Aspergillus* sp.) od kolonizující/kontaminující flóry (zejména *Candida* sp.) a mají velký přínos zejména v případech infekcí způsobených vzácnými mykotickými patogeny (*Fusarium* sp., *Scedosporium* sp., a další), které vyžadují specifickou antimykotickou terapii (zejména kvůli známým primárním rezistencím na některá antimykotika). Validace této metody na vzorcích z BAL byla v roce 2016 publikována v časopise *Medical Mycology* (Příloha 6) a vzhledem ke svému komerčnímu potenciálu také přihlášena na Ústavu průmyslového vlastnictví ČR jako užitný vzor (Příloha 7).

### 3.1.4 Molekulární detekce mykotických patogenů ve Fakultní nemocnici Brno

V současné době na našem pracovišti rutinně testujeme všechny vzorky z bronchoalveolární laváže od pacientů s podezřením na IMI na přítomnost nejčastějších zástupců rodu *Aspergillus* a současně metodou pro detekci mukormycet. Tento postup umožňuje rychlou diferenciální diagnostiku invazivní aspergilózy a invazivní mukormykózy a zahájení účinné léčby, která je v případech těchto dvou infekcí zcela odlišná. Pokud podezření na IMI trvá i přes negativní výsledek obou jmenovaných vyšetření, provádí se panfungální PCR s HRM analýzou. Pro pacienta má velký význam i negativní výsledek všech těchto vyšetření, který v kombinaci s negativními výsledky sérologických testů může IMI v podstatě vyloučit.

Kromě výše uvedených je nyní mezi mykotické oportunní patogeny řazena také *Pneumocystis jiroveci*, původce závažné intersticiální pneumonie. Onemocnění se vyskytuje zejména u HIV pozitivních nemocných, ale i u jiných imunokompromitovaných pacientů. Specifickou skupinu tvoří pacienti s hematologickými malignitami, u kterých bylo zjištěno, že konvenčně používané mikroskopické metody nejsou dostatečně citlivé. U těchto pacientů se stala metodou volby PCR (kvantitativní real-time PCR) detekce DNA *P. jiroveci* ve vzorcích sputa nebo tekutiny z bronchoalveolární laváže. Na našem pracovišti používáme pro detekci *P. jiroveci* in-house kvantitativní real-time PCR metodu a naše i literární poznatky o PCR diagnostice pneumocystové pneumonie jsme publikovali v přehledovém článku v časopise Postgraduální medicína v roce 2013 (Příloha 8).



## 4 Virové infekce

Virové infekce jsou častou komplikací léčby nemocných s hematologickou malignitou. I když u zdravých lidí má většina virových infekcí pouze mírné symptomy, u osob s oslabenou imunitou mohou představovat život ohrožující komplikace (45, 46). Původce virových infekcí u imunokompromitovaných nemocných lze rozdělit na dvě velké skupiny: infekce způsobené reaktivací latentních virů v organismu (nejčastěji herpetické viry, případně polyomaviry) a infekce způsobené viry získanými z komunity (nejčastěji respirační viry, případně viry způsobující gastrointestinální potíže) (45, 47).

Obecně je diagnostika virových infekcí u imunokompromitovaných pacientů založena na klinické manifestaci (která však může být u IS odlišná než u zdravé populace) a výsledcích laboratorních vyšetření. Přehled dostupných laboratorních metod a jejich výhod a nevýhod uvádí Tabulka 3.

| Metoda                              | Senzitivita | Specifická | Čas  | Virus   | Poznámka                                  |
|-------------------------------------|-------------|------------|------|---|---|
| Kultivace                           | +++         | ++++       | +    | HSV, CMV, VZV, influenza, RSV, PIV, adenoviry | Zlatý standard, ale zdlouhavá             |
| Shell-vial kultivace                | ++          | +++        | ++   | HSV, CMV, VZV, influenza, RSV, PIV, adenoviry | Kratší než kultivace, ale i tak zdlouhavá |
| Detekce antigenů                    | ++          | ++++       | ++++ | Většina                                       | Rychlá, ale nízká senzitivita             |
| PCR                                 | ++++        | +++        | +++  | Všechny                                       | Rychlá, vysoká senzitivita                |
| Histopatologie/<br>imunohistochemie | NA          | NA         | NA   | Všechny                                       | Přímá detekce virů v tkáni                |
| Elektronová<br>mikroskopie          | ++          | NA         | ++++ | Všechny                                       | Nákladné vybavení a technicky náročná     |
| Sérologie                           | NA          | NA         | NA   | NA  | Nelze použít                              |

**Tabulka 3. Senzitivita - (+) – nejnižší, (++++) – nejvyšší; specifická - (+) – nejnižší, (++++) – nejvyšší; rychlost - (+) – nejpomalejší, (++++) – nejrychlejší, NA – nelze aplikovat, HSV – herpes simplex virus, CMV - cytomegalovirus, VZV – varicella zoster virus, RSV – respiračně syncytiální virus, PIV – parainfluenza virus. Upraveno podle Lin *et al.* (46)**

Stejně jako u ostatních typů infekcí, má i laboratorní diagnostika virových infekcí u imunokompromitovaných pacientů svá úskalí. Při orgánovém postižení (pneumonie, encefalitida, kolitida atd.) je pro definitivní stanovení diagnózy zásadní specifická detekce viru v postižených tkáních, která často není možná z důvodu komplikací spojených se získáním vzorků při invazivním výkonu. Kultivace viru je zase pro rutinní použití příliš zdlouhavá. Sérologické metody nejsou vhodné pro rychlou diagnostiku, neboť je nutné porovnání akutního a rekonvalescentního séra získaného alespoň 2 týdny po iniciální infekci (ale lépe 3-4 týdny poté). Navíc u imunokompromitovaných pacientů je protilátková odpověď obvykle opožděná nebo snižená a je běžné podávání imunoglobulinů nebo krevních produktů, které mohou obsahovat specifické protilátky. Detekce antigenů patří mezi velmi rychlé metody, bohužel u IS pacientů nemá dostatečnou senzitivitu (46).

V současné době je diagnostika virových infekcí u imunokompromitovaných nemocných založena převážně na použití molekulárně biologických metod, dominantně na kvantitativní real-time PCR (12, 48, 49). Tato metoda umožňuje nejen velmi citlivou a specifickou detekci viru, ale také přesné stanovení virové nálože. U infekcí způsobených viry, které jsou v organismu přítomny v latentním stavu, je třeba stanovit hladinu virové nálože, která odliší bezvýznamnou reaktivaci viru, ke které dochází v průběhu léčby nebo např. během jiných probíhajících infekcí (často bakteriálních) od začínající infekce, která bez včasného zahájení terapie povede k dalšímu rozvoji klinických příznaků a následně k možnému orgánovému postižení.

Protože antivirotika jsou dostupná pouze pro omezené množství agens, hraje v managementu virových infekcí zásadní roli prevence vzniku těchto infekcí a případně rychlá rekonstituce imunitní odpovědi u pacientů. V prevenci vzniku infekcí se uplatňuje výběr séronegativního dárce pro transplantaci, volba intenzity předtransplantační přípravy a prevence vzniku reakce štěpu proti hostiteli. Po transplantaci pak vakcinace neživými vakcínami (chřipka, Salkova polio vakcína) a profylaktické podání antivirotik (acyklovir pro prevenci HSV a VZV, nepřímo i CMV). Ke zvládnutí infekcí napomáhá také snížení imunoprese (pokud je možné), podání infuze dárcovských leukocytů (DLI) nebo nově ex vivo kultivace virus-specifických cytotoxických T-lymfocytů.

## 4.1 Molekulárně biologická diagnostika virových infekcí

Doporučení pro management většiny virových infekcí u pacientů s hematologickými malignitami jsou pravidelně zpracovávána Evropskou skupinou pro transplantace krvetvorných buněk (European Bone Marrow Transplantation, [www.ebmt.org](http://www.ebmt.org)), která zastřešuje Evropskou konferenci o infekcích u pacientů s leukémií (European Conference on Infections in Leukemia) (50-54). U řady virových infekcí má zásadní význam tzv. preemptivní přístup k léčbě. To znamená, že je u rizikových pacientů prováděn screening klinických vzorků na přítomnost virů (zejména CMV a EBV) pomocí molekulárně biologických metod (55) a léčeni jsou pacienti, u kterých byl virus detekován (a jeho nálož překročila stanovenou hranici), i když ještě nedošlo k rozvoji klinických příznaků.

Kvůli velké variabilitě testovaných klinických materiálů (plná krev, sérum, plazma) a metod detekce (in-house i komerčních) doposud nebyly u screeningových vyšetření jasně stanoveny hladiny virové nálože, při kterých by měla být zahájena léčba. U pacientů s klinickými příznaky (horečka, pneumonie) pak hladiny, která by jednoznačně určily daný virus jako etiologické agens. Stanovení kritické virové nálože je tedy nutné provést na základě korelace získaných laboratorních výsledků a klinických údajů na každém pracovišti zvlášť. Řešením tohoto problému může být standardizace kvantifikace za použití WHO Standardu pro CMV i EBV. Ten mohou laboratoře použít pro stanovení konverzního faktoru pro jejich metody izolace DNA a real-time PCR (56). Použití konverzního faktoru pak umožňuje uvádět výsledky v mezinárodních jednotkách na mililitr plné krve (IU/ml) a to by mělo usnadnit mezilaboratorní srovnání získaných výsledků a stanovení hladiny virové nálože pro jednotlivé rizikové skupiny pacientů (57-59).

Dalším faktorem, který je nutno v diagnostice vzít v úvahu, je přirozená biologická variabilita v sekvencích DNA jednotlivých kmenů virů, která může způsobit selhání PCR metod v důsledku nenasednutí primerů na cílovou sekvenci. Příklad selhání kvantitativní real-time PCR detekce CMV jsme publikovali v roce 2007 v časopise *Journal of Clinical Microbiology* (Příloha 9). Článek popisuje naše zkušenosti s použitím real-time PCR metody detekující část exonu 4 genu UL123, která byla převzata z literatury. Před zavedením této metody do rutinní praxe a kompletním nahrazení dříve používané kvalitativní metody (detekující jinou část stejného genu) jsme cca 1 rok testovali klinické vzorky paralelně oběma metodami. Během testování oběma metodami jsme zjistili, že asi u 5 % pacientů (18/363) jsou výsledky real-time PCR falešně negativní. Provedli jsme tedy

sekvenační analýzu cílového úseku DNA, která ukázala, že v těchto klinických vzorcích jsou v místě nasedání primerů a TaqMan sondy přítomné četné záměny v sekvenci DNA, které neumožňovaly účinné nasednutí primerů a značně snižovaly citlivost PCR reakce. Získané výsledky tak byly falešně negativní nebo byla zjištěná nálož 100 – 1000 × nižší než nálož skutečná.

#### 4.1.1 Herpesviróvé infekce

Společným charakteristickým znakem všech herpetických virů je, že po proběhlé primární infekci přechází do stavu tzv. latence (60). Pokud dojde k oslabení imunitního systému (v důsledku transplantace nebo protinádorové terapie), ztrácí organismus kontrolu nad tímto stavem a dochází k aktivní replikaci viru a následně rozvoji klinických příznaků.

Herpetické viry se na základě délky replikačního cyklu, míst latence a vlastností virových částic rozdělují do třech skupin (Tabulka 4):

|                |                          |         |
|----------------|--------------------------|---------|
| α – herpesviry | Herpes simplex virus – 1 | HSV – 1 |
|                | Herpes simplex virus – 2 | HSV – 2 |
|                | Varicella zoster virus   | VZV     |
| β – herpesviry | Lidský cytomegalovirus   | CMV     |
|                | Lidský herpes virus 6    | HHV-6   |
|                | Lidský herpes virus 7    | HHV-7   |
| γ – herpesviry | Virus Epstein-Baarové    | EBV     |
|                | Lidský herpesvirus 8     | HHV-8   |

**Tabulka 4. Rozdělení herpesvirů**

##### 4.1.1.1 CMV

Nejzávažnějším oportunním herpetickým virem je CMV, který je v populaci velmi rozšířen – v dospělosti je séropozitivní až 90 % populace (61). Primární infekce probíhá

většinou v dětství asymptomaticky, méně často u adolescentů pod obrazem infekční mononukleózy. Infekce způsobená lidským cytomegalovirem (CMV) je jednou z nejčastějších infekčních komplikací u pacientů s hematologickou malignitou a pacientů po transplantaci krvetvorných buněk (TKB). U transplantovaných pacientů dochází k reaktivaci viru až u 80 % séropozitivních příjemců, u cca 30 % séronegativních příjemců se séropozitivním dárcem dojde k rozvoji primární CMV onemocnění (62). Méně často je pak příčinou komplikací tzv. primoinfekce CMV, tj. stav, kdy se organismus s virem setkává poprvé. V tomto případě je u imunokompromitovaných pacientů průběh infekce obvykle velice vážný, s vysokým rizikem vzniku orgánového poškození (tzv. CMV onemocnění), které je spojeno s vysokou morbiditou. Klinickými projevy CMV infekce jsou horečka, leukopenie, multiorgánová poškození včetně pneumonie, hepatitidy, gastroenteritidy, kolitidy, retinitidy a encefalitidy (53, 61). Může také dojít k poškození transplantačního štěpu, které může vést k jeho odvržení.

Lékem volby při CMV infekci je ganciklovir (GCV) nebo jeho perorální forma valganciclovir a po zahájení terapie většinou dochází v krvi k rychlému poklesu virové nálože. Pokud by virová nálož neklesla (nebo dokonce narůstala) i přes zahájenou léčbu je třeba zvažovat možnost rezistence CMV na léčbu. CMV rezistence na GCV je nejčastěji popisována u HIV pozitivních nemocných, kteří jsou v důsledku opakovaných reaktivací CMV dlouhodobě a opakovaně léčeni (63-65). Bylo ale prokázáno, že rezistence na léčbu se může rozvinout i u pacientů s hematologickou malignitou a to už po několika týdnech léčby (66, 67). Rezistence je způsobena bodovými mutacemi v genech pro virovou fosfotransferázu (UL97, > 90% všech mutací) a virovou DNA polymerázu (UL54, často spojeno se zkříženou rezistencí na další antivirotika) a detekce těchto mutací je nejčastěji prováděna PCR amplifikací a následnou sekvenací úseků DNA obou genů (68-70). Jedná se o poměrně časově i finančně náročnou analýzu, kterou je třeba často provádět opakovaně. Rozhodli jsme se proto navrhnout pro 3 nejčastější mutace real-time PCR metody, které umožňují cílenou detekci a kvantifikaci ganciklovir citlivých a ganciklovir rezistentních klonů CMV v krvi pacienta. Výsledky této studie byly publikovány (viz Příloha 10) a na příkladu 3 pacientů bylo prokázáno, že zastoupení rezistentního a citlivého klonu CMV se u pacientů mění. Zjistili jsme také, že po odstranění selekčního tlaku antivirotika dojde k eliminaci rezistentního klonu a při další reaktivaci u téhož pacienta již může být terapie ganciklovirem úspěšná.

Shrnutí současných literárních dat a našich vlastní zkušeností s diagnostikou CMV infekcí jsme publikovali v roce 2013 pod hlavičkou České leukemické skupiny – pro život (The CzEch Leukemia Study Group – for Life, CELL, [www.leukemia-cell.org](http://www.leukemia-cell.org)), jejímž cílem je zlepšení péče o nemocné s leukemiemi v ČR a akcelerace výzkumu v této oblasti (Příloha 11).

#### **4.1.1.2 EBV**

Druhým obávaným zástupcem herpesvirů je EBV (71, 72). Stejně jako CMV je i EBV široce rozšířený virus přítomný až u 90 % populace. Primární infekce probíhá bezpříznakově nebo je virus příčinou infekční mononukleózy. Reaktivace viru je spojena s širokým spektrem klinických příznaků - je asociován se vznikem Burkittova lymfomu, Hodgkinova lymfomu, T a NK (natural killer) lymfomů atd. Jednou z nejzávažnějších, EBV-asociovaných komplikací léčby pacientů po transplantaci krvetvorné tkáně i solidních orgánů, je vznik posttransplantační lymfoproliferativní nemoci (PTLD), která je spojena letalitou 50-80 % (73, 74).

Stejně jako u CMV je i management EBV infekcí založen na preemptivní terapii. V naší studii z roku 2012 (Příloha 12) jsme na základě zhodnocení výsledků testování z let 2007-2011 zjistili, že incidence EBV asociovaných komplikací byla u pacientů Interní hematologické a onkologické kliniky Fakultní nemocnice Brno asi 9 %, potvrdili jsme nutnost sledování pacientů po HSCT na přítomnost EBV alespoň 3 měsíce po transplantaci a stanovili virovou nálož pro zahájení léčby na 1000 kopií EBV/ $\mu$ g DNA.

#### **4.1.1.3 Detekce herpesvirů v tekutině z bronchoalveolární laváže**

Herpesviry mohou být vzácně původci intersticiálních plicních pneumonií. Diagnostika herpesvirové pneumonie je velmi náročná a zahrnuje kromě nespecifických klinických příznaků, jako jsou dušnost, kašel, horečka a radiologický nález pulmonálních infiltrátů, také detekci viru v biologickém materiálu z dolních cest dýchacích. Protože invazivní odběr vzorku pro histologické vyšetření není často možný, je často vyšetřovaným materiálem vzorek tekutiny z bronchoalveolární laváže a metodou volby pak kvantitativní real-time PCR. Současné poznatky o významu detekce a kvantifikace jednotlivých herpesvirů v BAL jsme shrnuli v článku publikovaném v časopise Klinická mikrobiologie a infekční lékařství (Příloha 13).

#### 4.1.2 Infekce způsobené neherpetickými viry

K těmto infekcím se řadí zejména infekce způsobené komunitními respiračními viry a adenoviry, dále pak infekce způsobené reaktivací latentních polyomavirů.

Mezi komunitní respirační viry patří virus influenzy, respiračně-syncytiální virus, virus parainfluenzy, lidský metapneumovirus, rhinovirus, respirační adenoviry, koronaviry a bokaviry. Metody jejich detekce, incidence u pacientů po HSCT, frekvence progresu do dolních cest dýchacích a následná letalita jsou uvedeny v Tabulce 5.

| Virus                        | Diagnostická metoda                            | Incidence infekce | Progrese infekce do DCD | Letalita u infekcí DCD |
|------------------------------|--|-------------------|-------------------------|------------------------|
| Respiračně-syncytiální virus | PCR (preferována), detekce antigenu, kultivace | 2,2-5,8 %         | 17-84 %                 | 7-83 %                 |
| Virus parainfluenzy          | PCR (preferována), detekce antigenu, kultivace | Až 17,9 %         | 50 %                    | Až 75 %                |
| Virus influenzy              | PCR (preferována), detekce antigenu, kultivace | 1,7-9,0 %         | 18-44 %                 | 5-37 %                 |
| Lidský metapneumovirus       | PCR (preferována), detekce antigenu,           | 2,5-9 %           | 21-40 %                 | 33-40 %                |
| Rhinovirus                   | PCR (preferována), kultivace                   | 22,3 %            | <10 %                   | ?                      |
| Koronaviry                   | PCR  | 11 %              | ?                       | ?                      |
| Bokaviry                     | PCR  | 2,1 %             | ?                       | ?                      |

**Tabulka 5. Infekce způsobené komunitními respiračními viry u pacientů po HSCT. DCD – dolní cesty dýchací, ? – nejsou dostupné studie. Upraveno podle Lin *et al.* (46)**

Hlavní metodou managementu infekcí způsobených komunitními respiračními viry je prevence nákazy od ošetřujícího personálu a dalších kontaktů. V období výskytu respiračních infekcí je doporučena izolace těchto nemocných a zvýšená hygiena. Proti viru

influenzy je nutné pacienty každoročně očkovat. Jak vyplývá z Tabulky 5, metodou volby pro detekci respiračních virů je PCR (18, 75-77).

Adenoviry představují širokou skupinu virů, s více než 50 známými sérotypy, jednotlivé sérotypy se dělí do skupin A – G. Diseminované infekce a orgánové postižení jsou u imunokompromitovaných nemocných velmi vzácné, ale jejich průběh je velmi závažný s vysokou letalitou. Častější jsou u dětí než u dospělých (78-80). Metodou volby pro diagnostiku adenovirových infekcí je nyní vhodně zvolená PCR (kvantitativní real-time PCR), která musí být navržena do konzervativních oblastí genomu, aby umožnila detekci všech sérotypů (80-82).

Mezi polyomaviry patří JC virus zodpovědný za progresivní multifokální leukoencefalopatii (PML) a BK virus, který je nejčastěji asociován s těžkou hemoragickou cystitidou (HC). PML se vyskytuje nejčastěji u HIV pozitivních pacientů (83, 84). HC často komplikuje postransplantační průběh. Prevence vzniku těchto infekcí není známá, pro jejich diagnostiku je používána zejména detekce viru pomocí real-time PCR v likvoru (u JC viru) nebo moči (u BK viru) (45, 84-86).



## 5 Závěr

Oportunní infekce často komplikují průběh léčby u pacientů s hematologickou malignitou a jsou po nezvládnutí základní choroby druhou nejčastější příčinou jejich úmrtí. Jejich časná diagnostika pomocí vhodně zvolených molekulárně biologických metod je zcela zásadní pro prognózu pacienta. Podrobné znalosti incidence jednotlivých infekcí u různých skupin pacientů umožňují důležitou diferenciatně diagnostickou rozvahu s následným zacílením diagnostických metod na nejvíce pravděpodobné původce infekcí a tím jejich racionální využití.

Jedině dobrá znalost předností a úskalí molekulárně biologických metod zajistí správnou interpretaci výsledků získaných těmito metodami a umožní další rozvoj tohoto odvětví lékařské mikrobiologie.

## 6 Literatura

1. Maddur MS, Vani J, Lacroix-Desmazes S, Kaveri S, Bayry J. Autoimmunity as a predisposition for infectious diseases. *PLoS Pathog.* 2010;6(11):e1001077.
2. Sahin U, Toprak SK, Atilla PA, Atilla E, Demirer T. An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Chemother.* 2016;22(8):505-14.
3. Manzardo C, Guardo AC, Letang E, Plana M, Gatell JM, Miro JM. Opportunistic infections and immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-1-infected adults in the combined antiretroviral therapy era: a comprehensive review. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(6):751-67.
4. Fishman JA. Infections in immunocompromised hosts and organ transplant recipients: essentials. *Liver Transpl.* 2011;17:34-7.
5. Adam Z, Krejčí M, Jiří V. Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí 2ed. Praha: Grada Publishing; 2008.
6. Khayr W, Haddad RY, Noor SA. Infections in hematological malignancies. *Dis Mon.* 2012;58(4):239-49.
7. Henry M. Critically Ill Immunosuppressed Host. In: E. PJ, R. DP, editors. *Critical Care Medicine: Principles of Diagnosis and Management in the Adult: Critical Care Medicine: Principles of Diagnosis and Management in the Adult*; 2013. p. 901-35.

8. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Preface. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44(8):453-5.
9. Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA, Boeckh MJ, Ito JI, Mullen CA, et al. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2011;52(4):427-31.
10. Sharma A, Lokeshwar N. Febrile neutropenia in haematological malignancies. *J Postgrad Med*. 2005;51 Suppl 1:S42-8.
11. Drgoňa L, Haber J, Ráčil Z, Cetkovský P, Kouba M, Sedláček P, et al. Empirická liečba febrilnej neutropénie u onkohematologických pacientov - odporúčanie odborníkov s podporou CELL, ČHS a ČOS ČLS JEP, S.CH.S. SLS. *Postgraduální medicína: Mladá fronta*; 2011. p. 47 - 50.
12. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)(a). *Clin Infect Dis*. 2013;57(4):e22-e121.
13. Mancini N, Clerici D, Diotti R, Perotti M, Ghidoli N, De Marco D, et al. Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Med Microbiol*. 2008;57(Pt 5):601-4.
14. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoefl A, et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and

- fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol*. 2008;197(3):313-24.
15. Murdoch DR. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2003;36(9):1162-70.
  16. Nieman AE, Savelkoul PH, Beishuizen A, Henrich B, Lamik B, MacKenzie CR, et al. A prospective multicenter evaluation of direct molecular detection of blood stream infection from a clinical perspective. *BMC Infect Dis*. 2016;16:314.
  17. Mwaigwisya S, Assiri RA, O'Grady J. Emerging commercial molecular tests for the diagnosis of bloodstream infection. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(5):681-92.
  18. Murdoch DR. How recent advances in molecular tests could impact the diagnosis of pneumonia. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(5):533-40.
  19. Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*. 2009;52(3):197-205.
  20. Pagano L, Akova M, Dimopoulos G, Herbrecht R, Drgona L, Blijlevens N. Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66 Suppl 1:i5-14.
  21. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis*. 2010;50(8):1091-100.

22. Girmenia C, Ferretti A, Barberi W. Epidemiology and risk factors for invasive fungal diseases in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol.* 2014;21(6):459-65.
23. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002;34(7):909-17.
24. Kara IO, Tasova Y, Uguz A, Sahin B. Mucormycosis-associated fungal infections in patients with haematologic malignancies. *International Journal of Clinical Practice.* 2009;63:134-9.
25. Ricna D, Lengerova M, Palackova M, Hadrabova M, Kocmanova I, Weinbergerova B, et al. Disseminated fusariosis by *Fusarium proliferatum* in a patient with aplastic anaemia receiving primary posaconazole prophylaxis - case report and review of the literature. *Mycoses.* 2016;59(1):48-55.
26. Richardson M, Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 4:5-24.
27. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 2005;5(10):609-22.
28. Kocmanová I, Ráčil Z. Invazivní infekce způsobené vláknitými houbami a jejich mikrobiologická diagnostika. *Postgraduální medicína.* 2010;12(příloha 5):59-63.
29. Ráčil Z, Kocmanova I, Toskova M, Buresova L, Weinbergerova B, Lengerova M, et al. Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases-the role of factors affecting assay performance. *Int J Infect Dis.* 2011;15(12):e874-81.

30. Hoenigl M, Prattes J, Spiess B, Wagner J, Pruellner F, Raggam RB, et al. Performance of galactomannan, beta-d-glucan, Aspergillus lateral-flow device, conventional culture, and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 52. United States: American Society for Microbiology. All Rights Reserved.; 2014. p. 2039-45.
31. Hsu LY, Ding Y, Phua J, Koh LP, Chan DS, Khoo KL, et al. Galactomannan testing of bronchoalveolar lavage fluid is useful for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in hematology patients. *BMC Infect Dis.* 2010;10:44.
32. Racil Z, Kocmanova I, Toskova M, Winterova J, Lengerova M, Timilsina S, et al. Reactivity of the 1,3- $\beta$ -D-glucan assay during bacteraemia: limited evidence from a prospective study. *Mycoses.* 2012.
33. Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, Weinbergerova B, Buresova L, Toskova M, et al. Difficulties in using 1,3- $\beta$ -D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies--high frequency of false-positive results and their analysis. *J Med Microbiol.* 2010;59(Pt 9):1016-22.
34. Mennink-Kersten MASH, Ruegebrink D, Wasei N, Melchers WJG, Verweij PE. In Vitro Release by *Aspergillus fumigatus* of Galactofuranose Antigens, 1,3- $\beta$ -D-Glucan, and DNA, Surrogate Markers Used for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2006;44(5):1711-8.
35. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JÂP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical Infectious Diseases.* 2008;46(12):1813-21.

36. Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, Caliendo AM, Mylonakis E. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(3):490-526.
37. Lackner M, Lass-Flörl C. Up-date on diagnostic strategies of invasive aspergillosis. *Curr Pharm Des.* 2013;19(20):3595-614.
38. Alanio A, Bretagne S. Difficulties with molecular diagnostic tests for mould and yeast infections: where do we stand? *Clin Microbiol Infect.* 20 Suppl 6. France: 2014 The Authors *Clinical Microbiology and Infection* 2014 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.; 2014. p. 36-41.
39. Pagano L, Offidani M, Fianchi L, Nosari A, Candoni A, Piccardi M, et al. Mucormycosis in hematologic patients. *Haematologica.* 2004;89(2):207-14.
40. Gomes MZ, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Mucormycosis caused by unusual mucormycetes, non-Rhizopus, -Mucor, and -Lichtheimia species. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(2):411-45.
41. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive Fungal Pathogens: Current Epidemiological Trends. *Clinical Infectious Diseases.* 2006;43:S3-A14.
42. Walsh TJ, Gamaletsou MN, McGinnis MR, Hayden RT, Kontoyiannis DP. Early clinical and laboratory diagnosis of invasive pulmonary, extrapulmonary, and disseminated mucormycosis (zygomycosis). *Clin Infect Dis.* 2012;54 Suppl 1:S55-60.
43. Lass-Flörl C. Zygomycosis: conventional laboratory diagnosis. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15 Suppl 5:60-5.

44. Bialek R, Konrad F, Kern J, Aepinus C, Cecenas L, Gonzalez GM, et al. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol*. 2005;58(11):1180-4.
45. Ohrmalm L, Wong M, Aust C, Ljungman P, Norbeck O, Broliden K, et al. Viral findings in adult hematological patients with neutropenia. *PLoS One*. 2012;7(5):e36543.
46. Lin R, Liu Q. Diagnosis and treatment of viral diseases in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol*. 2013;6:94.
47. Englund J, Feuchtinger T, Ljungman P. Viral infections in immunocompromised patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(1 Suppl):S2-5.
48. Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11):5189-98.
49. Breuer S, Rauch M, Matthes-Martin S, Lion T. Molecular diagnosis and management of viral infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Mol Diagn Ther*. 2012;16(2):63-77.
50. Engelhard D, Mohty B, de la Camara R, Cordonnier C, Ljungman P. European guidelines for prevention and management of influenza in hematopoietic stem cell transplantation and leukemia patients: summary of ECIL-4 (2011), on behalf of ECIL, a joint venture of EBMT, EORTC, ICHS, and ELN. *Transpl Infect Dis*. 2013;15(3):219-32.
51. Hirsch HH, Martino R, Ward KN, Boeckh M, Einsele H, Ljungman P. Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis and treatment of human respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, metapneumovirus, rhinovirus, and coronavirus. *Clin Infect Dis*. 2013;56(2):258-66.



52. Styczynski J, Reusser P, Einsele H, de la Camara R, Cordonnier C, Ward KN, et al. Management of HSV, VZV and EBV infections in patients with hematological malignancies and after SCT: guidelines from the Second European Conference on Infections in Leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43(10):757-70.
53. Ljungman P, de la Camara R, Cordonnier C, Einsele H, Engelhard D, Reusser P, et al. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42(4):227-40.
54. Ljungman P. Treatment of adenovirus infections in the immunocompromised host. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23(8):583-8.
55. Ljungman P. Molecular monitoring of viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2010;91(4):596-601.
56. Madej RM, Davis J, Holden MJ, Kwang S, Labourier E, Schneider GJ. International standards and reference materials for quantitative molecular infectious disease testing. *J Mol Diagn.* 2010;12(2):133-43.
57. Fryer JF, Heath AB, Wilkinson DE, Minor PD, Group the CS. A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for Epstein-Barr virus for nucleic acid amplification techniques. *Biologicals.* 2016.
58. Fryer JF, Heath AB, Minor PD, Group CS. A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus for nucleic acid amplification technology. *Biologicals.* 2016;44(4):242-51.
59. Rychert J, Danziger-Isakov L, Yen-Lieberman B, Storch G, Buller R, Sweet SC, et al. Multicenter comparison of laboratory performance in cytomegalovirus and Epstein-Barr

- virus viral load testing using international standards. *Clin Transplant*. 2014;28(12):1416-23.
60. Roubalová K. Laboratorní diagnostika herpetických virů. *MedPro Praxi*. 2010;7(5):241-4.
61. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2002;34(8):1094-7.
62. Ljungman P, Perez-Bercoff L, Jonsson J, Avetisyan G, Sparrelid E, Aschan J, et al. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2006;91(1):78-83.
63. Hakki M, Chou S. The biology of cytomegalovirus drug resistance. *Curr Opin Infect Dis*. 2011;24(6):605-11.
64. Chou S, Marousek G, Guentzel S, Follansbee SE, Poscher ME, Lalezari JP, et al. Evolution of mutations conferring multidrug resistance during prophylaxis and therapy for cytomegalovirus disease. *J Infect Dis*. 1997;176(3):786-9.
65. Chou S, Lurain NS, Thompson KD, Miner RC, Drew WL. Viral DNA polymerase mutations associated with drug resistance in human cytomegalovirus. *J Infect Dis*. 2003;188(1):32-9.
66. Göhring K, Feuchtinger T, Mikeler E, Lang P, Jahn G, Handgretinger R, et al. Dynamics of the emergence of a human cytomegalovirus UL97 mutant strain conferring ganciclovir resistance in a pediatric stem-cell transplant recipient. *J Mol Diagn*. 2009;11(4):364-8.

67. Boutolleau D, Deback C, Bressollette-Bodin C, Varnous S, Dhedin N, Barrou B, et al. Resistance pattern of cytomegalovirus (CMV) after oral valganciclovir therapy in transplant recipients at high-risk for CMV infection. *Antiviral Res.* 2009;81(2):174-9.
68. Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(4):689-712.
69. Boivin G, Goyette N, Gilbert C, Covington E. Analysis of cytomegalovirus DNA polymerase (UL54) mutations in solid organ transplant patients receiving valganciclovir or ganciclovir prophylaxis. *J Med Virol.* 2005;77(3):425-9.
70. Chou S, Erice A, Jordan MC, Vercellotti GM, Michels KR, Talarico CL, et al. Analysis of the UL97 phosphotransferase coding sequence in clinical cytomegalovirus isolates and identification of mutations conferring ganciclovir resistance. *J Infect Dis.* 1995;171(3):576-83.
71. Haber J, Fosterová K. EBV infekce/reaktivace; EBV asociované klinické syndromy, epidemiologie a rizikové faktory vzniku PTLD. *Postgraduální medicína.* 2013;15(4):58-62.
72. Horáková J. Liečba a profylaxia EBV infekcie/reaktivácie/ asociovanej lymfoproliferácie u hematologických pacientov. *Postgraduální medicína.* 2013;4:69-72.
73. Heslop HE. How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood.* 2009;114(19):4002-8.
74. Styczynski J, Einsele H, Gil L, Ljungman P. Outcome of treatment of Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in hematopoietic stem cell recipients: a comprehensive review of reported cases. *Transpl Infect Dis.* 2009;11(5):383-92.

75. Weigt SS, Gregson AL, Deng JC, Lynch JP, Belperio JA. Respiratory viral infections in hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients. *Semin Respir Crit Care Med.* 2011;32(4):471-93.
76. Campbell AP, Chien JW, Kuypers J, Englund JA, Wald A, Guthrie KA, et al. Respiratory virus pneumonia after hematopoietic cell transplantation (HCT): associations between viral load in bronchoalveolar lavage samples, viral RNA detection in serum samples, and clinical outcomes of HCT. *J Infect Dis.* 2010;201(9):1404-13.
77. Boeckh M. The challenge of respiratory virus infections in hematopoietic cell transplant recipients. *Br J Haematol.* 2008;143(4):455-67.
78. Ebner K, Suda M, Watzinger F, Lion T. Molecular detection and quantitative analysis of the entire spectrum of human adenoviruses by a two-reaction real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3049-53.
79. Echavarria M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(4):704-15.
80. Öhrmalm L, Lindblom A, Omar H, Norbeck O, Gustafson I, Lewensohn-Fuchs I, et al. Evaluation of a surveillance strategy for early detection of adenovirus by PCR of peripheral blood in hematopoietic SCT recipients: incidence and outcome. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46(2):267-72.
81. Lindemans CA, Leen AM, Boelens JJ. How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood.* 2010;116(25):5476-85.
82. Damen M, Minnaar R, Glasius P, van der Ham A, Koen G, Wertheim P, et al. Real-time PCR with an internal control for detection of all known human adenovirus serotypes. *J Clin Microbiol.* 2008;46(12):3997-4003.

83. Garcia De Viedma D, Diaz Infantes M, Miralles P, Berenguer J, Marin M, Munoz L, et al. JC virus load in progressive multifocal leukoencephalopathy: analysis of the correlation between the viral burden in cerebrospinal fluid, patient survival, and the volume of neurological lesions. *Clin Infect Dis*. 2002;34(12):1568-75.
84. Schmidt-Hieber M, Schwender J, Heinz WJ, Zabelina T, Kühl JS, Mousset S, et al. Viral encephalitis after allogeneic stem cell transplantation: a rare complication with distinct characteristics of different causative agents. *Haematologica*. 2011;96(1):142-9.
85. Davies NW, Brown LJ, Gonde J, Irish D, Robinson RO, Swan AV, et al. Factors influencing PCR detection of viruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected CNS infections. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(1):82-7.
86. Reploeg MD, Storch GA, Clifford DB. Bk virus: a clinical review. *Clin Infect Dis*. 2001;33(2):191-202.

## 7 Kompletní bibliografie předkladatelky habilitační práce

Patent:

Lengerová M., Hrnčířová K., Ráčil Z., Mayer J., Kocmanová I., Pospíšilová Š., Dvořáková D. Způsob diagnostiky invazivní aspergilózy a oligonukleotidy pro použití při tomto způsobu. 2011. Patent. Číslo: 302670. Vydavatel: Úřad průmyslového vlastnictví. Místo vydání: Praha. Název vlastníka: Masarykova univerzita Brno. Datum registrace: 21. 4. 2009. Datum přijetí: 13. 7. 2011.

Užitný vzor:

Lengerová M., Bezdíček M., Ráčil Z., Mayer J., Kocmanová I. Sada pro detekci a identifikaci mykotických patogenů. 2016, PUV 2015-31689, Vydavatel: Úřad průmyslového vlastnictví. Místo vydání: Praha. Název vlastníka: Fakultní nemocnice Brno a Masarykova univerzita Brno. Datum přihlášení: 26. 10. 2015. Datum zapsání: 15. 3. 2016.

Články v časopisech s impakt factorem:

Brhelova E., Kocmanova I., Racil Z., Hanslianova M., Antonova M., Mayer J., Lengerova M. Validation of Minim typing for fast and accurate discrimination of extended-spectrum, beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in tertiary care hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*, Elsevier Science Inc, 2016 Mar 8. [Epub ahead of print]. Impact factor: 2.450 v roce 2015

Bezdicek M., Lengerova M., Ricna D., Weinbergerova B., Kocmanova I., Volfova P., Drgona L., Poczova M., Mayer J., Racil Z. Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with high resolution

melting analysis. *Medical Mycology*. Oxford University Press, 2016 May 9. [Epub ahead of print]. Impact Factor: 2.644 v roce 2015

Ricna D., Lengerova M., Palackova M., Hadrabova M., Kocmanova I., Weinbergerova B., Pavlovsky Z., Volfova P., Bouchnerova J., Mayer J., Racil Z. Disseminated fusariosis by *Fusarium proliferatum* in a patient with aplastic anaemia receiving primary posaconazole prophylaxis - case report and review of the literature. *Mycoses*, Hoboken, Wiley-Blackwell, 2016; roc. 59, c. 1, s. 48-55. Impact Factor: 2.332 v roce 2015

Volfova P., Lengerova M., Lochmanova J., Dvorakova D., Ricna D., Palackova M., Weinbergerova B., Mayer J., Racil Z. Detecting human cytomegalovirus drug resistant mutations and monitoring the emergence of resistant strains using real-time PCR. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam: Elsevier Science Inc, 2014, roc. 61, c. 2, s. 270-274. Impact factor: 3.016

Lengerova M., Racil Z., Hrnčirova K., Kocmanova I., Volfova P., Ricna D., Bejda P., Moulis M., Pavlovsky Z., Weinbergerova B., Toskova M., Mayer J. Rapid detection and identification of mucormycetes in bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients with pulmonary infiltrates by use of high-resolution melt analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington: American Society for Microbiology, 2014, roc. 52, c. 8, s. 2824-2828. Impact factor: 3.993

Lengerova M., Kocmanova I., Racil Z., Hrnčirova K., Pospisilova S., Mayer J., Najvar L.K., Wiederhold N.P., Kirkpatrick W.R., Patterson T.F. Detection and measurement of fungal burden in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis by novel quantitative nested real-time PCR compared with galactomannan and (1,3)-beta-D-glucan detection. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington: American Society for

Microbiology, 2012, roc. 50, c. 3, s. 602-608. ISSN 0095-1137. doi:10.1128/JCM.05356-

11. Impact factor: 4.068

Racil Z., Kocmanova I., Toskova M., Winterova J., Lengerova M., Timilsina S., Mayer J.

Reactivity of the 1,3-beta-D-glucan assay during bacteraemia: limited evidence from a prospective study. *Mycoses*, Chichester: Blackwell Verlag GmbH, 2013, roc. 56, c. 2, s.

101-104. Impact factor: 1.805

Dvorakova D., Racil Z., Borsky M., Robesova B., Jeziskova I., Razga F., Lengerova M.,

Mayer J. Clonal heterogeneity in patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutations. *Leukemia & Lymphoma*, London: Informa Healthcare,

2013, roc. 54, c. 5, s. 1056-1060. Impact factor: 2.605

Palackova M., Palousova D., Kocmanova I., Pavlovsky Z., Timilsina S., Lengerova M.,

Mayer J., Racil Z. Invasive mould disease involving the gastrointestinal tract caused by *Neosartorya pseudofischeri* in a haematological patient. *Mycoses*, Chichester: Blackwell

Verlag GmbH, 2013, roc. 56, c. 3, s. 385-388. ISSN 0933-7407. doi:10.1111/myc.12038. Impact factor: 1.805

Racil Z., Winterova J., Kouba M., Zak P., Malaskova L., Buresova L., Toskova M.,

Lengerova M., Kocmanova I., Weinbergerova B., Timilsina S., Rolencova M., Cetkovsky P., Mayer J. Monitoring through voriconazole plasma concentrations in haematological

patients: real life multicentre experience. *Mycoses*, Chichester: Blackwell Verlag GmbH, 2012, roc. 55, c. 6, s. 483-492. ISSN 0933-7407. doi:10.1111/j.1439-

0507.2012.02186.x. Impact factor: 1.278

Volfova P., Lengerova M., Winterova J., Racil Z., Dvorakova D., Mayer J. Monitoring of

Epstein - Barr virus load in patients after allogeneic hematopoietic stem cell



transplantation. *Infection*, Mnichov: Springer-Verlag, 2012, roc. 40, c. 5, s. 583-587. ISSN 0300-8126. doi:10.1007/s15010-012-0262-5. Impact factor: 2.440

Racil Z., Kocmanova I., Toskova M., Buresova L., Weinbergerova B., Lengerova M., Rolencova M., Winterova J., Hrcirova K., Volfova P., Skrickova J., Mayer J. Galactomannan detection in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological diseases-the role of factors affecting assay performance. *International Journal of Infectious Diseases*, Oxford: Elsevier, 2011, roc. 15, c. 12, s. "e874"- "e881". ISSN 1201-9712. doi:10.1016/j.ijid.2011.09.011. Impact factor: 1.938

Krejci M., Brychtova Y., Doubek M., Tomiska M., Navratil M., Racil Z., Dvorakova D., Horky O., Lengerova M., Pospisilova S., Mayer J. Long-term results of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning with busulfan, fludarabine, and antithymocyte globulin. *Neoplasma*, 2011, roc. 58, c. 5, s. 406-414. ISSN 0028-2685. doi:10.4149/neo\_2011\_05\_406. Impact factor: 1.440

Racil Z., Kocmanova I., Weinbergerova B., Toskova M., Winterova J., Lengerova M., Buresova L., Timilsina S., Mayer J. Mucositis does not lead to false-positivity of the Platelia Aspergillus enzyme-linked immunosorbent assay. *European Journal of Clinical Microbiology and infectious Diseases*, New York: Springer, 2010, roc. 29, c. 7, s. 851-855. ISSN 0934-9723. doi:10.1007/s10096-010-0938-7. Impact factor: 2.631

Hrcirova K., Lengerova M., Kocmanova I., Racil Z., Volfova P., Palousova D., Moulis M., Weinbergerova B., Winterova J., Toskova M., Pospisilova S., Mayer J. Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington: American

Society for Microbiology, 2010, roc. 48, c. 9, s. 3392-3394. ISSN 0095-1137.  
doi:10.1128/JCM.01109-10.Impact factor: 4.220

Racil Z., Kocmanova I., Lengerova M., Weinbergerova B., Buresova L., Toskova M., Winterova J., Timilsina S., Rodriguez I., Mayer J. Difficulties in using 1,3-ss-D glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal diseases in patients with hematological malignancies - high frequency of false positive results and their analysis. Journal of Medical Microbiology, Great Britain: 2010 SGM, 2010, roc. 59, c. 9, s. 1016-1022. ISSN 0022-2615. doi:10.1099/jmm.0.019299-0.Impact factor: 2.380

Dvorakova D., Racil Z., Jeziskova I., Palasek I., Protivankova M., Lengerova M., Razga F., Mayer J. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with frequent and rare patient-specific NPM1 mutations. American Journal of Hematology, Hoboken: Wiley-Liss, Inc., 2010, roc. 85, c. 12, s. 926-929. ISSN 0361-8609.Impact factor: 3.576

Dvorakova D., Lengerova M., Pospisilova J., Palasek I., Mayer J. A novel quantitative assessment of minimal residual disease in patients with acute myeloid leukemia carrying NPM1 (nucleophosmin) exon 12 mutations. Leukemia, 2009, roc. 4, c. 23, s. 793-796. ISSN 0887-6924.Impact factor: 8.296

Toskova M., Winterova J., Racil Z., Malaskova L., Kocmanova I., Lengerova M., Weinbergerova B., Mayer J.,Hrncirova K. Voriconazole plasma levels monitoring in haematooncological patients. Clinical Microbiology and Infection, 2009, roc. 15, c. 4, s. 502-503. ISSN 1198-743X.Impact factor: 4.014

Dvorakova D., Racil Z., Palasek I., Protivankova M., Jeziskova I., Lengerova M., Mayer J. Monitoring of minimal residual disease in NPM1 mutated acute myeloid leukemia (AML)

O a single center experience in 27 patients. *Blood*, 2009, roc. 114, s. 4672. ISSN 0006-4971. Impact factor: 10.555

Racil Z., Kocmanova I., Weinbergerova B., Lengerova M., Winterova J., Mayer J. Monitoring of mannan antigenemia (Mn) and antimannan antibodies (anti-Mn) for screening of invasive candidiasis in high risk hematooncological patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 2008, roc. 12, c. 2, s. 30. ISSN 1201-9712. Impact factor: 2.210

Lengerova M., Racil Z., Volfova P., Lochmanova J., Berkovcova J., Dvorakova D., Vorlicek J., Mayer J. Real-time PCR diagnostics failure caused by nucleotide variability withing exos 4 of human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, roc. 45, c. 3, s. 1042-1044. ISSN 0095-1137. Impact factor: 3.708

Racil Z., Kocmanova I., Lengerova M., Winterova J., Mayer J. Intravenose PLASMA-LYTE as a major cause of false-positive results of platelia *Aspergillus* test for galactomannan detection in serum. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, roc. 45, c. 9, s. 3141-3142. ISSN 0095-1137. Impact factor: 3.708

Krejci M., Mayer J., Doubek M., Brychtova Y., Pospisil Z., Racil Z., Dvorakova D., Lengerova M., Horky O., Koristek Z., Dolezal T., Vorlicek J. Clinical outcomes and direct hospital costs of reduced-intensity allogeneic transplantation in chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplantation*, London: Nature Publishing Group, 2006, roc. 38, c. 7, s. 483-491. ISSN 0268-3369. Impact factor: 2.621

Články v českých časopisech (žadatelka jako první autor):

Lengerová M., Volfová P., Ráčil Z. Laboratorní diagnostika CMV infekce u nemocných s hematologickou malignitou. Postgraduální medicína, Mladá fronta a.s., 2013, roč. 15, příl. 4, s. 45-50. ISSN 1212-4184.

Lengerová M., Volfová P., Říčná D., Palacková M., Ráčil Z. Diagnostika pneumocystové pneumonie molekulárněbiologickými metodami. Postgraduální medicína, Mladá fronta a.s., 2013, roč. 15, příl. 4, s. 24-27. ISSN 1212-4184.

Lengerová M., Bolehovská R., Hrnčířová K., Žák P., Ráčil Z., Kocmanová I., Mayer J. Úloha PCR v diagnostice invazivní aspergilózy. Postgraduální medicína, 2009, roč. 15, č. 4, s. 43-47. ISSN 1212-4184.

Lengerová M., Hrnčířová K., Kocmanová I., Ráčil Z., Mayer J. PCR diagnostika invazivní aspergilózy (IA) z bronchoalveolární laváže. Transfúze a hematologie dnes, 2008, roč. 14, Supl. 2, s. 105 - 106. ISSN 1213-5763.

Lengerová M., Ráčil Z., Hrnčířová K., Volfová P., Lochmanová J., Dvořáková D., Mayer J. Detekce invazivní aspergilózy pomocí PCR a real-time PCR - přednosti a úskalí. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, Praha: Trios spol- s r. o., 2007, roč. 13, č. 5, s. 184-190. ISSN 1211-264X.

Lengerová M., Volfová P., Lochmanová J., Ráčil Z., Minaříková D., Dvořáková D., Vorlíček J., Mayer J. Úskalí diagnostiky cytomegaloviru polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 2005, roč. 11, č. 6, s. 204-210.

## 8 Seznam příloh

Příloha 1: Lengerová M., Ráčil Z., Hrnčířová K., Volfová P., Lochmanová J., Dvořáková D., Mayer J. Detekce invazivní aspergilózy pomocí PCR a real-time PCR - přednosti a úskalí. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 2007, roč. 13, č. 5, s. 184-190.

Příloha 2: Lengerova M., Kocmanova I., Racil Z., Hrnčirova K., Pospisilova S., Mayer J., Najvar L.K., Wiederhold N.P., Kirkpatrick W.R., Patterson T.F. Detection and measurement of fungal burden in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis by novel quantitative nested real-time PCR compared with galactomannan and (1,3)-beta-D-glucan detection. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, roc. 50, c. 3, s. 602-608.

Příloha 3: Lengerová M., Hrnčířová K., Ráčil Z., Mayer J., Kocmanová I., Pospíšilová Š., Dvořáková D. Způsob diagnostiky invazivní aspergilózy a oligonukleotidy pro použití při tomto způsobu. 2011. Patent. Číslo: 302670. Vydavatel: Úřad průmyslového vlastnictví. Místo vydání: Praha. Název vlastníka: Masarykova univerzita Brno. Datum registrace: 21. 4. 2009. Datum přijetí: 13. 7. 2011.

Příloha 4: Hrnčirova K., Lengerova M., Kocmanova I., Racil Z., Volfova P., Palousova D., Moulis M., Weinbergerova B., Winterova J., Toskova M., Pospisilova S., Mayer J. Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, roc. 48, c. 9, s. 3392-3394.

Příloha 5: Lengerova M., Racil Z., Hrnčirova K., Kocmanova I., Volfova P., Ricna D., Bejdak P., Moulis M., Pavlovsky Z., Weinbergerova B., Toskova M., Mayer J. Rapid detection and identification of mucormycetes in bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients with pulmonary infiltrates by use of high-resolution melt analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, roc. 52, c. 8, s. 2824-2828.

Příloha 6: Bezdicek M., Lengerova M., Ricna D., Weinbergerova B., Kocmanova I., Volfova P., Drgona L., Poczova M., Mayer J., Racil Z. Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis. *Medical Mycology*. Oxford University Press, 2016 May 9. [Epub ahead of print]

Příloha 7: Lengerová M., Bezdíček M., Ráčil Z., Mayer J., Kocmanová I. Sada pro detekci a identifikaci mykotických patogenů. 2016, PUV 2015-31689, Vydavatel: Úřad průmyslového vlastnictví. Místo vydání: Praha. Název vlastníka: Fakultní nemocnice Brno a Masarykova univerzita Brno. Datum přihlášení: 26. 10. 2015. Datum zapsání: 15. 3. 2016.

Příloha 8: Lengerová M., Volfová P., Řičná D., Palacková M., Ráčil Z. Diagnostika pneumocystové pneumonie molekulárněbiologickými metodami. *Postgraduální medicína, Mladá fronta a.s.*, 2013, roč. 15, Příl. 4, s. 24-27. ISSN 1212-4184.

Příloha 9: Lengerova M., Racil Z., Volfova P., Lochmanova J., Berkovcova J., Dvorakova D., Vorlicek J., Mayer J. Real-time PCR diagnostics failure caused by nucleotide variability withing exos 4 of human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, roc. 45, c. 3, s. 1042-1044.

Příloha 10: Volfova P., Lengerova M., Lochmanova J., Dvorakova D., Ricna D., Palackova M., Weinbergerova B., Mayer J., Racil Z. Detecting human cytomegalovirus drug resistant mutations and monitoring the emergence of resistant strains using real-time PCR. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam: Elsevier Science Inc, 2014, roc. 61, c. 2, s. 270-274.

Příloha 11: Volfova P., Lengerova M., Winterova J., Racil Z., Dvorakova D., Mayer J. Monitoring of Epstein - Barr virus load in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Infection*, Mnichov: Springer-Verlag, 2012, roc. 40, c. 5, s. 583-587.

Příloha 12: Lengerová M., Volfová P., Ráčil Z. Laboratorní diagnostika CMV infekce u nemocných s hematologickou malignitou. Postgraduální medicína, Mladá fronta a.s., 2013, roč. 15, Příl. 4, s. 45-50.

Příloha 13: Volfová P., Lengerová M., Dvořáková D., Paloušová D., Hrnčířová K., Ráčil Z., Mayer J., Pospíšilová Š. Význam PCR detekce a kvantifikace herpetických virů v bronchoalveolární laváži imunokompromitovaných pacientů. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, Praha: TRIOS, spol. s r. o., 2011, roč. 17, č. 6, s. 194-200.

Příloha 1: Lengerová M., Ráčil Z., Hrnčířová K., Volfová P., Lochmanová J., Dvořáková D., Mayer J. Detekce invazivní aspergilózy pomocí PCR a real-time PCR - přednosti a úskalí. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 2007, roč. 13, č. 5, s. 184-190.



## Detekce invazivní aspergilózy pomocí PCR a real-time PCR – přednosti a úskalí

M. LENGEROVÁ<sup>1</sup>, Z. RÁČIL<sup>2</sup>, K. HRNČÍŘOVÁ<sup>1</sup>, J. LOCHMANOVÁ<sup>1</sup>, D. DVOŘÁKOVÁ<sup>1</sup>, J. MAYER<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, FN Brno

<sup>2</sup>Interní hematologická klinika, FN Brno

### SOUHRN

Lengerová M., Ráčil Z., Hrnčířová K., Lochmanová J., Dvořáková D., Mayer J.: **Detekce invazivní aspergilózy pomocí PCR a real-time PCR – přednosti a úskalí**

Přestože PCR detekce mykotických patogenů v klinických vzorcích se na stránkách odborných časopisů objevuje již více než dvacet let, je použití této metody pro rutinní diagnostiku invazivní aspergilózy stále diskutabilní. A to i přesto, že metody molekulární biologie již našly své stálé místo v mnoha odvětvích moderní mikrobiologie. Genotypizace bakteriálních kmenů rezistentních na antibiotika, molekulární epidemiologie, ale i rutinní detekce, např. virových infekcí z nejrůznějších klinických materiálů je v dnešní době zcela běžnou praxí. Ve všech těchto oblastech znamenalo zavedení metody PCR diagnostiky zrychlení, zpřesnění a zjednodušení celého procesu. Tento přehledový článek má za cíl ukázat, v čem je detekce původců mykotických infekcí jiná a proč se jí dosud nepodařilo zavést do rutinní praxe.

**Klíčová slova:** PCR, real-time PCR, *Aspergillus* sp., invazivní aspergilóza

### SUMMARY

Lengerová M., Ráčil Z., Hrnčířová K., Lochmanová J., Dvořáková D., Mayer J.: **Detection of invasive aspergillosis by PCR and real-time PCR – benefits and drawbacks**

PCR detection of fungal pathogens in clinical samples has been discussed in journals for more than two decades. However, its use for diagnosing invasive aspergillosis is still controversial, despite the fact that molecular methods are routinely used in various fields of modern microbiology. These are e. g. genotyping of bacterial strains resistant to antibiotics, molecular epidemiology or routine detection of viral infections in clinical material. PCR methods have made the diagnostic applications faster, simpler and more accurate. This review deals with issues related to molecular methods for diagnosing invasive fungal infections and the main factors limiting their use in everyday clinical practice.

**Keywords:** PCR, real-time PCR, *Aspergillus* sp., invasive aspergillosis

*Klin mikrobiol inf lek* 2007;13(5):184–190

**Adresa:** Mgr. Martina Lengerová, PhD., Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika FN Brno, Černopolní 9, 625 00 Brno, e-mail: mlengerova@fnbrno.cz

Došlo do redakce: 23. 8. 2007

Přijato k tisku: 2. 10. 2007

### Úvod

*Aspergillus* sp. je saprofytická plíseň, která má v životním prostředí důležitou roli v metabolismu uhlíku a dusíku. Její přirozenou níkou je půda, kde roste se podílí na rozkladu organického substrátu. V rámci svého reprodukčního cyklu produkuje každý organizmus tisíce konidií, které se uvolňují do prostředí. Konidie řady druhů, včetně patogenních pro člověka, jsou velmi malé (2–3 μm), takže se mohou při vdechnutí dostat až do plicních alveolů. Inhalace konidií imunokompetentními jedinci nevede obvykle k žádnému klinickému projevu, k jejich eradikaci z dýchacích cest stačí běžné tkáňové obranné mechanismy a mechanismy vrozené buněčné imunity. Ještě v nedávné době byl rod *Aspergillus* považován za poměrně slabého patogena způsobujícího převážně alergické projevy u osob dlouhodobě vystavených prostředí s velkým výskytem plísní (např. pracující v zemědělství). Spolu s tím, jak se imunosupresivní léčba stává agresivnější a imunokompromitovaných pacientů přibývá,

se však situace dramaticky změnila [1,2,3].

U těchto pacientů *Aspergillus* sp. způsobuje především infekce dolních a významně méně častěji horních dýchacích cest (neinvazivní – aspergilom, invazivní – pneumonie, sinusitida). Přibližně u 20 % nemocných pak dochází k diseminaci procesu z plic hematogenní cestou s následným postižením především centrální nervové soustavy a parenchymatózních orgánů (játra, slezina). Postižen může být ale teoreticky jakýkoliv orgán.

Za více než 90 % aspergilových infekcí je zodpovědný druh *A. fumigatus*. K tomuto prvenství přispívá několik faktorů – zejména malé spory tohoto druhu, rychlý růst mycelia při teplotě 37 °C a skromné nutriční požadavky [4]. Infekce u lidí mohou způsobovat také další druhy – *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* a *A. nidulans*.

Pro prognózu nemocných má zásadní význam časné zahájení antimykotické léčby, a tedy i časné stanovení diagnózy. Vzhledem k tomu, že konvenční diagnostické metody

(kultivace, cytologie, zobrazovací metody) často ve své senzitivitě a časnosti selhávají, došlo v posledních letech k rozvoji nekultivačních diagnostických metod. Mezi tyto, vedle metod imunologických (detekující antigeny mykotických patogenů), patří právě i PCR (z angl. polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce) diagnostika. Úspěšná detekce mykotických patogenů pomocí PCR má několik základních kamenů – výběr vhodného klinického materiálu pro testování, izolaci DNA, výběr vhodné PCR metody a v neposlední řadě správná interpretace výsledků. Bohužel každý jednotlivý z nich skrývá mnohá úskalí.

### Výběr vhodného klinického materiálu pro detekci

Mikroskopická detekce fungálních hýf a pozitivní kultivace jinak sterilní tkáně jsou samozřejmě nejpřesnější diagnostické metody, bohužel u většiny pacientů je toto možné až při velkém a nevratném poškození vnitřních orgánů popř. post mortem. Získání materiálu (nejčastěji plicního parenchymu) navíc vyžaduje biopsii, která je jen velmi obtížně proveditelná u kritických nemocných s trombocytopenií a koagulopatií.

V případě plicního postižení je u imunokompromitovaných pacientů často prováděna bronchoalveolární laváž (BAL) za účelem získání materiálu z dolních cest dýchacích.

Senzitivita a negativní prediktivní hodnota PCR detekce *Aspergillus* sp. v BAL dosahuje 90–100 %, ale pozitivní prediktivní hodnota jen 32–52 % – falešně pozitivní výsledky jsou tedy poměrně časté. Detekce *Aspergillus* sp. v tomto materiálu totiž může odrážet nejen infekci, ale i kolonizaci, popř. kontaminaci. Jestliže předpokládáme, že množství patogena je při kolonizaci nižší než při aktivní infekci mohlo by pokrok v tomto směru znamenat zavedení kvantitativní PCR [6]. Nastavení vhodné hranice pozitivity, např. na základě počtu kopií v 1 ml BAL, by potom umožnilo rozdělit pacienty do skupin s větším či menším rizikem rozvoje invazivní mykotické infekce (IFI, z angl. invasive fungal infections).

BAL je však také invazivní procedurou a její provedení může být u části nemocných spojeno s komplikacemi (krvácení, zhoršení ventilačních parametrů). Navíc je laváž prováděna až na základě abnormality na zobrazovacích metodách, tedy při již většinou plně rozvinuté plicní patologii.

Bioptované tkáně ani tekutina z BAL tedy nejsou vždy optimálním materiálem pro screening nemocných s rizikem invazivní aspergilózy.

V klinické praxi je vzorkem, který lze získat relativně snadno a opakovaně, periferní krev. Detekce fungální DNA v periferní krvi je nejčastější screeningovou metodou používanou u pacientů s rizikem rozvoje IFI.

### Co vlastně v krvi detekujeme?

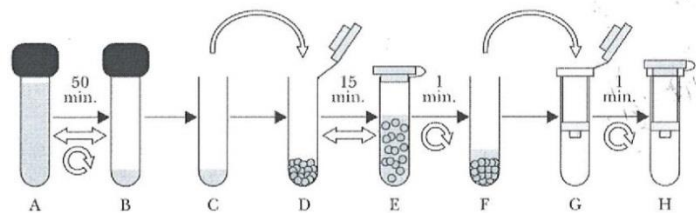
Základní otázkou, kterou je potřeba zodpovědět, je, jakou část nebo formu plísňové buňky obsahující DNA v krvi vlastně detekujeme. Jde o uvolněné konidie, neviabilní fragmenty plísňových hýf, fagocytované části nebo volnou DNA? Přítomnost konidií je velmi nepravděpodobná, protože pro jejich tvorbu nemají plísně v krevním řečišti vhodné prostředí (není přítomno rozhraní se vzduchem). Přítomnost volné DNA, jako možného cíle izolace, nelze vyloučit, protože bylo publikováno několik prací detekujících DNA v plazmě [7] a séru [8]. Mennink-Kersten a kol. [9] publikovali, že fungální DNA je do krve uvolňována pouze po narušení hýf např. v důsledku obranných mechanismů hostitele nebo autolýzy při nedostatku živin. Problémy s detekcí fungální DNA v krvi však naznačují, že volná DNA patrně nebude dominantní složkou.

Použití různých technik izolace DNA z různých krevních frakcí přináší často velmi rozporuplné výsledky. Costa a kol. [10] publikovali, že množství DNA získané po izolaci ze séra, plazmy a leukocytů je srovnatelné. Loeffler a kol. [11] uvádějí, že pro detekci *Aspergillus* sp. je vhodnější provádět izolaci z plné krve než z plazmy. White a kol. [12] zjistili, že po inokulaci DNA izolované ze známého množství *A. fumigatus* a následné izolaci pomocí přístroje pro automatickou izolaci nebyl ani jeden ze vzorků pozitivní (v diskuzi uvádějí, že zvolená metoda nebyla pravděpodobně vhodná pro izolaci volné DNA nebo došlo k degradaci DNA působením DNáz).

Je tedy velmi pravděpodobné, že DNA je v krvi přítomna v různých formách, např. podle stadia infekce nebo zaháje-

Obrázek 1

Schéma izolace DNA pomocí rozbíjecích skleněných kuliček a kolonky. Východím materiálem je zpravidla 5 ml periferní krve (A). V prvním kroku dochází k lýzi erytrocytů pomocí hypotonického roztoku (B). Tento krok je nutný k odstranění krevního barviva hemoglobinu, který je známým inhibítoem PCR. Zbytek buněk je poté sedimentován centrifugací (C) a peletka přenesena do zkumavky s lyzačním roztokem a skleněnými rozbíjecími kuličkami (D). Poté je zkumavka intenzivně třepána na vortexu, asi 5–15 minut (E). Zbytky buněčné debrisu spolu s kuličkami jsou opět sedimentovány centrifugací (F) a supernatant nanesen na kolonku (G). Na té je selektivně zachycena uvolněná DNA, promyta od zbytků proteinů a poté pomocí roztoku se specifickým pH odmyta do sběrné zkumavky (H).



Obrázek 2

Schéma uspořádání podjednotek rDNA a ITS oblastí v genomu *A. fumigatus*







chanicky, chemicky nebo enzymaticky. Srovnáním účinnosti izolace fungální DNA pomocí různých komerčních kitů [13] a in-house metod [14,15,16] se v poslední době zabývalo několik prací. Pro mechanické rozbíjení se jako neúčinnější ukázalo rozdrcení mycelií v tekutém dusíku za použití třecí misky a tloučku. Tento postup lze však s úspěchem použít jen pro izolaci DNA z kultur, kdy se DNA následně používá např. pro genotypizaci plísní. Její použití v rutinní diagnostické praxi není možné vzhledem tomu, že se nejedná o jednorázový materiál a hrozila by cross-kontaminace vzorků. Další metodou mechanického rozrušení buněčných stěn je použití inertních skleněných kuliček a vortexu. Tento postup byl použit jednak v několika in-house metodách izolace a je také základem izolace v několika komerčních kitech. Další způsoby, jako např. sonikace, byly používány méně často. Chemická metoda rozložení houbových stěn spočívá v inkubaci vzorku s různými chemickými činidly – kyselými (různé koncentrované HCl) nebo zásaditými (5M NaOH), a je opět víceméně na úrovni experimentu.

Nejčastěji používané je enzymatické působení, které spočívá v inkubaci vzorku s roztokem proteolytických a celulozických enzymů (nejčastěji se jedná o proteázu nebo proteinázu K a roztok zymolázy nebo lytikázy). Hlavní nevýhodou tohoto postupu je poměrně dlouhá doba inku-

bace vzorku s enzymy (1h – přes noc). Celková doba izolace DNA z plné krve pak trvá nejméně 6 hodin. Tím se snižuje možnost použití této metody pro rutinní screeningová vyšetření.

Zdá se, že nevhodnější metodou je kombinace více různých pretreatmentů (ošetření vzorku mechanicky, chemicky nebo enzymaticky) a následně izolace DNA na kolonce pomocí komerčního kitu. Např. použití skleněných kuliček a vortexu zajistí rozbíjení odolných buněčných stěn, následná aplikace proteinázy K zlyže nadbytečné lidské buňky a fungální DNA pak izolujeme na kolonce. Na *obrázku 1* je znázorněno schéma izolace DNA z plné krve s využitím skleněných kuliček a kolonek s přibližnou dobou trvání jednotlivých kroků.

Po izolaci je velmi vhodné změřit koncentraci získané DNA, protože v případě izolace z plné krve je fungální DNA získána spolu s velkým nadbytkem lidské DNA. Je nutné mít stále na paměti, že zejména při detekci rDNA genů existuje značná homologie mezi sekvencemi lidské a fungální rDNA. V přítomnosti velkého nadbytku lidské DNA v PCR reakci primery mohou nespecificky nasedat na lidskou DNA a tímto je inhibována specifická amplifikace.

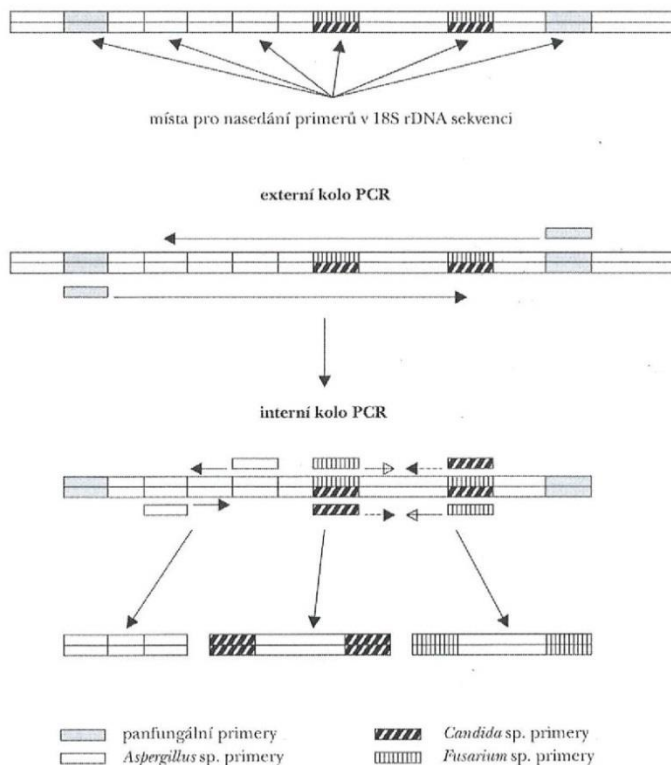
Další možností jak izolovat fungální DNA je použití automatického izolátoru (s nebo bez pretreatmentu vzorku) a příslušného kitu. Hlavními nevýhodami použití je vysoká pořizovací cena přístrojů, vysoké náklady na jednotlivou analýzu (několik tis. Kč), omezené množství zpracovaného vzorku a omezené spektrum detekovaných mykotických patogenů.

#### Výběr cílové sekvence pro PCR

Množství fungální DNA přítomné v krvi je na samé hranici citlivosti PCR metod. Proto jsou jako cílové sekvence pro amplifikaci metodou PCR nejčastěji používány tzv. multikopiové geny (jsou v genomu přítomny v desítkách až stovkách kopií). Nejčastějšími cílovými geny pro PCR detekci jsou geny pro jadernou ribozomální DNA (rDNA) a mitochondriální DNA

V genomu *A. fumigatus* je přítomno asi 120 kopií rDNA genů a skládají se ze tří podjednotek: 18S rRNA, 5,8S rRNA a 28S rRNA. Mezi jednotlivými podjednotkami se pak nacházejí oblasti ITS1 (internal transcribed spacer 1) a ITS2 (internal transcribed spacer 2) – schéma viz *obrázek 2*. Kromě toho, že jsou přítomny ve více kopiích jsou geny pro rDNA mezidruhově hodně konzervované. Proto jsou často používány k navržení primerů pro tzv. panfungální PCR (bude vysvětleno níže). Použití konzervovaných úseků genomu může být velkou výhodou, ale může také značně zkomplikovat situaci. Oblasti totiž nejsou

Obrázek 5  
Schématické znázornění provedení panfungální nested PCR



konzervované jen mezi jednotlivými druhy rodu *Aspergillus*, ale často také s ostatními plísněmi, např. takovými, které často nazýváme „air-borne fungi“, tj. plísněmi běžně přítomnými v prostředí (obr. 3). Např. homologie oblastí ITS1-5,8S-ITS2 (které patří mezi nejvíce variabilní části genu pro rDNA) mezi *A. fumigatus* a *Penicillium* sp. dosahuje téměř 90 % [17]. To vše je nutné mít na paměti při navrhování primerů. Porovnání sekvencí zvolených primerů oproti databázi sekvencí je naprostou nutností. Naše zkušenosti však ukazují, že ani toto není zárukou 100% specifity PCR reakce. Proto je nutné, zejména při zavádění nové metody, ověřit specifitu vznikajících PCR produktů sekvencí. Suboptimální podmínky při PCR reakci mohou umocnit amplifikaci sekvencí třeba i s několika bázovou neshodou (mismatch) proti cílové sekvenci.

Dalším úskalím zvolených primerů může být homologie zvolené sekvence s lidskou rDNA (obr. 4). Přestože se jedná o fylogeneticky velmi vzdálené druhy existuje jistý stupeň homologie. Po podrobnější analýze jsme zjistili, některé dosud publikované primery už z principu nemohou specificky detekovat fungální DNA (např. primery N5 a N6 v práci Gutzmer a kol. [18]). Takové primery byly např. publikovány ve studiích, které byly často prováděny na laboratorních kulturách, kde nebyla lidská DNA přítomna. Pro detekci fungální DNA přímo v klinických vzorcích jsou ale nepoužitelné.

#### PCR a real-time PCR

V podstatě lze používané metody rozdělit na dvě základní skupiny – metody panfungální a metody specifické.

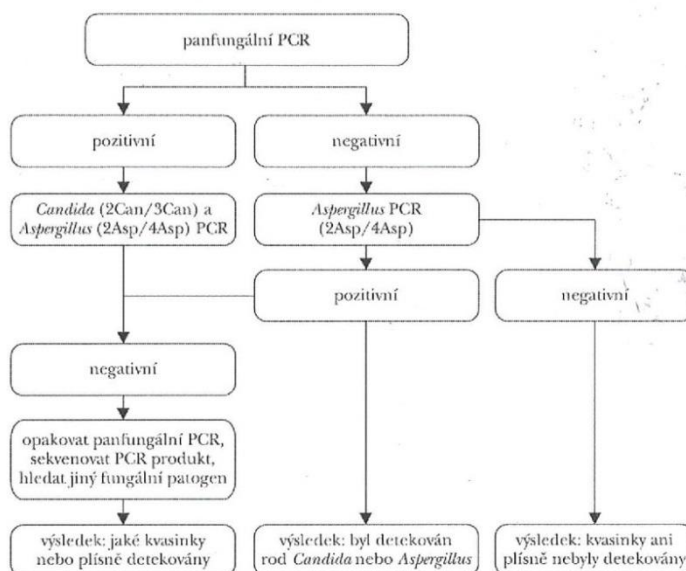
Panfungální mají za úkol amplifikovat DNA z homologních oblastí genu několika druhů buď v rámci jednoho rodu [19] nebo i několika rodů současně [20,21]. Jedná se většinou o metody kvalitativní (tzn. výsledek je pouze pozitivní/negativní) – často nested („uhnížděné“) PCR ke zvýšení citlivosti. Příklad použití nested panfungální PCR je uveden v obrázku 6. V prvním (externím) kole jsou do reakce použity primery, které nasedají na úsek DNA homologní pro všechny detekované druhy. V druhém (interním) kole jsou potom v jedné nebo více nezávislých reakcích použity primery specifické např. pro jednotlivé rody nebo druhy. Primery dokážou na cílovou sekvenci nasednout i přes jedno- nebo dvoubázové neshody v párování (neměly by být přítomny v posledních třech bázích na 3' – konci primeru). Použití nested PCR je obecně spojováno s vyšším rizikem kontaminace v důsledku větší manipulace s PCR produkty z externího kola. Naopak velkou výhodou je zvýšená citlivost reakce, která je cca 10x citlivější než real-time PCR.

Jistým mezikrokem mezi kvalitativ-

ní a kvantitativní panfungální PCR je použití real-time PCR s fluorescenčním barvivem SYBR Green. V této reakci vznikají PCR produkty jako při kvalitativní PCR, ale při reakci jsou ještě do vznikající dvouřetězcové DNA nespecificky inkorporovány molekuly SYBR Greenu. Specifické produkty lze od nespecifických po PCR reakci odlišit provedením tzv. analýzy tání PCR produktů (melting analysis). Spočívá v postupném zahřívání reakční směsi v rozmezí teplot 50–99 °C. Při vzrůstající teplotě dochází k denaturaci dvouřetězcové DNA, uvolnění molekul SYBR Greenu a tím vymizení fluorescence. Specifické a nespecifické produkty budou v důsledku různé délky (ale i obsahu GC párů atd.) denarovat při různé teplotě, a tím je lze odlišit. Použití SYBR Green real-time PCR je tedy možné a bylo popsáno [22], ale jeho optimalizace je složitá. Navíc k jednoznačnému určení druhu mykotického patogena je často nutné vyšetření doplnit o další kroky, např. o sekvenční analýzu.

Nejrychlejší a nespecifičtější metodou detekce je použití real-time PCR se specifickými sondami. Do současné doby bylo publikováno několik desítek prací, které k detekci fungálních infekcí používají real-time PCR. Nejčastěji se jedná o reakce specifické pro jeden rod či druh. V podstatě jsou použity všechny 3 základní přístupy, které můžeme u real-time PCR nalézt – hybridizační sondy [10,23,24,25,26], hydrolyzační sondy [8,27,28] i molecular beacons [29]. Lewis White a kol. [30] publikovali (mezi)národní multicentrickou studii srovnání PCR metod pro detekci *Aspergillus* sp. a *Candida* sp. Zatímco metody pro detekci *Candida* sp. byly mezilaboratorně dobře srovnatelné a dosahovaly dosta-

Obrázek 6  
Schéma vyšetřování klinických vzorků na přítomnost mykotických patogenů jak bylo navrženo v práci Lewis-White a kol. [30]



čující citlivosti (10 CFU), testované metody pro detekci *Aspergillus* sp. byly mnohem variabilnější. Po podrobných analýzách bylo doporučeno schéma testování klinických vzorků, které je prezentováno na obrázku 6.

Prvním krokem je testování pomocí panfungální PCR publikované Loefflerem a kol. [26]. Na tuto navazuje použití dvou specifických metod pro detekci *Candida* sp. a dvou metod pro detekci *Aspergillus* sp. Pro detekci rodu *Aspergillus* sp. byly vybrány dvě real-time metody využívající hydrolyzační sondy, které vznikly kombinací dříve publikovaných metod [7,12]. Bohužel u obou metod jsou v článku zmíněny problémy se specificitou – dochází k amplifikaci lidské DNA při použití přístrojů Rotorgene 3000 (Corbet Research) a 7300 Real-time PCR System (Applied Biosystems). Reakce tedy zřejmě nejsou dostatečně robustní na to, aby mohly být používány rutinně jako screeningová metoda.

### Závěr

Závěrem je možno říci, že PCR a real-time PCR mají své místo vedle ostatních moderních metod pro diagnostiku invazivní aspergilózy. Technické zvládnutí metod izolace se již nyní stává snadnějším díky vývoji nových komerčních kitů. V současné době je také již k dispozici první komerční kit pro detekci *Aspergillus* sp. – *Aspergillus* Tracer (Affigene, Francie). Klíčovým problémem zůstává objasnění biologických procesů při invazivní mykotické infekci, reakci imunitního systému a odpověď na antimykotickou léčbu. Ve světle těchto poznatků pak bude možné pochopit a správně interpretovat výsledky molekulárně-biologické detekce mykotických patogenů v klinických vzorcích.

Tato práce byla podporována grantem IGA MZ ČR NR8452-3/2005.

### Literatura:

- Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood*. 2002;100(13):4358–4366.
- Jordanides NE, Allan EK, McLintock LA, et al. A prospective study of real-time panfungal PCR for the early diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *Bone Marrow Transplant*. 2005;35(4):389–395.
- Ráčil Z, Kocmanová I, Wagnerová B, et al. Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v epidemiologii a diagnostice. *Postgrad Med*. 2007;9(3):240–252.
- Latge JP. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol*. 2001; 9(8):382–389.
- Raad I, Hanna H, Huaranga A, et al. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis using polymerase chain reaction-based detection of *Aspergillus* in BAL. *Chest*. 2002;121(4):1171–1176.
- Rantakokko-Jalava K, Laukkonen S, Issakainen J, et al. Semiquantitative detection by real-time PCR of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluids and tissue biopsy specimens from patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(9):4304–4311.
- Kami M, Fukui T, Ogawa S, et al. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 2001;33(9):1504–1512.
- Challier S, Boyer S, Abachin E, Berche P. Development of a serum-based Taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2004;42(2):844–846.
- Mennink-Kersten MASH, Ruegebrink D, Wasei N, Melchers WJG, Verweij PE. In vitro release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens, 1,3-[beta]-D-glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2006;44(5):1711–1718.
- Costa C, Costa JM, Desterke C, et al. Real-time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2002;40(6):2224–2227.
- Loeffler J, Hebart H, Brauchle U, Schumacher U, Einsele H. Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. *J Clin Microbiol*. 2000;38(10):3830–3833.
- White PL, Linton CJ, Perry MD, Johnson EM, Barnes RA. The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. *Clin Infect Dis*. 2006;42(4):479–486.
- Fredricks DN, Smith C, Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):5122–5128.
- Griffiths LJ, Anyim M, Doffman SR, et al. Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. *J Med Microbiol*. 2006;55(Pt 9):1187–1191.
- Karakousis A, Tan L, Ellis D, Alexiou H, Wormald PJ. An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *J Microbiol Methods*. 2006;65(1):38–48.
- Lugert R, Schettler C, Gross U. Comparison of different protocols for DNA preparation and PCR for the detection of fungal pathogens in vitro. *Mycoses*. 2006;49(4):298–304.
- Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol*. 2000;38(4):1510–1515.
- Gutzmer R, Mommert S, Kuttler U, Werfel T, Kapp A. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. *J Med Microbiol*. 2004;53(Pt 12):1207–1214.
- Sklady H, Buchheidt D, Baust C, et al. Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. *J Clin Microbiol*. 1999;37(12):3865–3871.
- Jaeger EE, Carroll NM, Choudhury S, et al. Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. *J Clin Microbiol*. 2000;38(8):2902–2908.
- Gaudio PA, Gopinathan U, Sangwan V, Hughes TE. Polymerase chain reaction based detection of fungi in infected corneas. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(7):755–760.
- Bu R, Sathiapalan RK, Ibrahim MM, et al. Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *J Med Microbiol*. 2005;54(Pt 3):243–248.
- Pryce TM, Kay ID, Palladino S, Heath CH. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;47(3): 487–496.
- Spieß B, Buchheidt D, Baust C, et al. Development of a LightCycler PCR assay for detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* DNA in clinical samples from neutropenic patients. *J Clin Microbiol*. 2003;41(5):1811–1818.
- Klingspor L, Jalal S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(8):745–753.
- Loeffler J, Henke N, Hebart H, et al. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *J Clin Microbiol*. 2000;38(2):586–590.
- Costa C, Vidaud D, Olivi M, et al. Development of two real-time quantitative TaqMan PCR assays to detect circulating *Aspergillus fumigatus* DNA in serum. *J Microbiol Methods*. 2001;44(3):263–269.
- Sanguineti M, Posteraro B, Pagano L, et al. Comparison of real-time PCR, conventional PCR, and galactomannan antigen detection by enzyme-linked immunosorbent assay using bronchoalveolar lavage fluid samples from hematology patients for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(8):3922–3925.
- Musher B, Fredricks D, Leisenring W, et al. *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5517–5522.
- White PL, Barton R, Guiver M, et al. A consensus on fungal polymerase chain reaction diagnosis?: a United Kingdom-Ireland evaluation of polymerase chain reaction methods for detection of systemic fungal infections. *J Mol Diagn*. 2006; 8(3):376–384.

Příloha 2: Lengerová M., Hrnčířová K., Ráčil Z., Mayer J., Kocmanová I., Pospíšilová Š., Dvořáková D. Způsob diagnostiky invazivní aspergilózy a oligonukleotidy pro použití při tomto způsobu. 2011. Patent. Číslo: 302670. Vydavatel: Úřad průmyslového vlastnictví. Místo vydání: Praha. Název vlastníka: Masarykova univerzita Brno. Datum registrace: 21. 4. 2009. Datum přijetí: 13. 7. 2011.



# PATENTOVÝ SPIS

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLUVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2009-253**  
(22) Přihlášeno: **21.04.2009**  
(40) Zveřejněno: **03.11.2010**  
(Věstník č. 44/2010)  
(47) Uděleno: **13.07.2011**  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **24.08.2011**  
(Věstník č. 34/2011)

(11) Číslo dokumentu:

**302 670**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/52** (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 02/079512.

Lengerová a kol. (2007) Klin. Mikrobiol. Inf. Lék 13 (5), 184-189; Lengerová a kol. (2008) Trans. Hemat. Dnes 14, 105-106, abstrakt I1-P-084;  
Buzina a kol., databáze EMBL, Ac. No. AF455542, 2.7.2002; Schabereiter a kol. (2007) J. Clin. Microbiol. 45 (3), 906-914, viz tabulka 1 a Obr. 1 na str. 908; Hinrikson a kol. (2005) Med. Mycol. 43, Suppl. 1, S129-S137, viz Obr. 2 na str. S132; Landlinger a kol. (2009) J. Clin. Microbiol. 47 (4), 1063-73, viz tabulka 1 na str. 1064; Hendolin a kol. (2000) J. Clin. Microbiol. 38 (11), 4186-92, viz tabulka 1 na str. 4187.

(73) Majitel patentu:

Masarykova univerzita, Brno, CZ

(72) Původce:

Lengerová Martina Mgr. Ph.D., Brno, CZ  
Hrnčítová Kristýna Mgr., Brno, CZ  
Ráčil Zdeněk MUDr. Ph.D., Boskovice, CZ  
Mayer Jiří Prof. MUDr. CSc., Brno, CZ  
Kocmanová Iva Mgr., Brno, CZ  
Pospíšilová Šárka RNDr. Ph.D., Brno, CZ  
Dvořáková Dana Ing. CSc., Řícmanice, CZ

(74) Zástupce:

RNDr. Kateřina Hartvichová, Na Bělidle 3, Praha 5,  
15000

(54) Název vynálezu:

**Způsob diagnostiky invazivní aspergilózy a  
oligonukleotidy pro použití při tomto způsobu**

(57) Anotace:

Způsob diagnostiky invazivní aspergilózy pomocí izolace a detekce DNA *Aspergillus fumigatus* v biologických vzorcích odebraných z těla pacienta spočívající v tom, že se z biologického vzorku izoluje DNA a poté se provede detekce množství genu ITS2 (internal transcribed spacer 2) pro ribozomální DNA *Aspergillus fumigatus* metodou kvantitativní PCR, přičemž se jako primery pro kvantitativní PCR použijí oligonukleotidy mající alespoň 85% identitu nukleotidové sekvence se sekvencemi GGCTTTGTACCTGCTCTGTAG (SEQ ID NO. 2) a CTGATCCGAGGTCAACCTTAGAAA (SEQ ID NO. 3), a jako sonda se použije TaqMan MGB sonda, která má alespoň 85% identitu nukleotidové sekvence se sekvencí CCGACACCCCACTTT - MGB (SEQ ID NO. 4), přičemž snížení identity až na 85 % je dosaženo prodloužením nebo zkrácením primeru a/nebo sondy. Předmětem řešení jsou i nové oligonukleotidy pro použití v diagnostice invazivní aspergilózy.

**CZ 302670 B6**

**Způsob diagnostiky invazivní aspergilózy a oligonukleotidy pro použití při tomto způsobu**Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu diagnostiky invazivní aspergilózy pomocí kvantitativní PCR z biologických vzorků odebraných z těla imunokompromitovaných pacientů, zejména ze vzorků bronchoalveolární laváže. Dále se týká nových oligonukleotidů, vhodných pro použití při tomto způsobu.

Dosavadní stav techniky

*Aspergillus* sp. je saprofytická plíseň, jejíž přirozenou nikou je půda, kde roste na organickém debrisu. V rámci svého reprodukčního cyklu produkuje každý organismus tisíce konidií, které se uvolňují do prostředí. Inhalace konidií jedinci se zdravým imunitním systémem nevede k žádnému klinickému projevu, k jejich vyloučení z dýchacích cest stačí běžné tkáňové obranné mechanismy a mechanismy vrozené buněčné imunity. Ještě v nedávné době byly infekce způsobené vláknitými plísněmi spojovány spíše s alergickými projevy u osob dlouhodobě vystavených prostředí s velkým výskytem plísní (např. pracující v zemědělství). Spolu s tím, jak přibývá onkologických nemocných a imunosupresivní léčba se stává agresivnější, se však situace dramaticky změnila a iniciace invazivních mykotických infekcí (IFI, z angl. invasive fungal infections) vzrůstá (Marr, K. A., et al., *Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors*. Blood, 2002. 100(13): p. 4358 až 4366.; Jordanides, N. E., et al., *A prospective study of real-time panfungal PCR for the early diagnosis of invasive fungal infection in haematooncology patients*. Bone Marrow Transplant, 2005. 35(4): p. 389 až 95.; Ráčil, Z., et al., *Invazivní mykotické infekce u onkologických nemocných: změny v epidemiologii a diagnostice*. Postgrad Med, 2007. 9(3): p. 240 až 252).

Za více než 90 % aspergilových infekcí je zodpovědný druh *A. fumigatus*. Pro prognózu nemocných má zásadní význam časně zahájení antimykotické léčby a tedy i časně stanovení diagnózy. Vzhledem k tomu, že konvenční diagnostické metody (kultivace, cytologie, zobrazovací metody) často ve své senzitivitě a časnosti selhávají, došlo v posledních letech k rozvoji nekultivačních diagnostických metod. Mezi tyto, vedle metod sérologických (detekujících antigeny mykotických patogenů), patří právě i PCR diagnostika. V současné době pro detekci DNA *Aspergillus* spp. v tělních tekutinách stále neexistuje žádný standardizovaný postup. Bylo zveřejněno několik kombinací primerů a sond (WO 02/079 512; Hinrikson a kol. (2005) Med. Mycol. 43, Suppl. 1, S129 až S137), ale žádná z nich nedosahuje dostatečné citlivosti a přesnosti stanovení pro klinickou praxi.

Výzkumu detekce nukleových kyselin *Aspergillus* spp. v tělních tekutinách, zvláště pak v periferní krvi a tekutině získané bronchoalveolární laváží (výplachem dolních cest dýchacích fyziologickým roztokem, dále zkracováno jako BAL), je v současnosti věnována velká pozornost. Senzitivita a negativní prediktivní hodnota PCR *Aspergillus* sp. v BAL, tedy podíl „zdravých“ pacientů ze všech pacientů s negativním výsledkem testu, dosahuje 90 až 100 %, ale pozitivní prediktivní hodnota, tj. podíl pacientů, u nichž skutečně jde o aspergilovou infekci, z celkového počtu pacientů s pozitivním výsledkem testu, je jen 32 až 52 % (Raad, I., et al., *Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis using polymerase chain reaction-based detection of aspergillus in BAL*. Chest, 2002. 121(4): p. 1171 až 1176). Falešně pozitivní výsledky jsou tedy poměrně časté. Detekce *Aspergillus* sp. v BAL totiž může odrážet nejen probíhající infekci, ale i kolonizaci dýchacích cest. Jestliže však předpokládáme, že množství patogena je při kolonizaci nižší než při aktivní infekci, mohlo by pokrok v tomto směru znamenat zavedení kvantitativní PCR, která umožňuje stanovit množství aspergilové DNA např. na 1 ml BAL (Rantakokko-Jalava, K., et al., *Semiquantitative detection by real-time PCR of Aspergillus fumigatus in bronchoalveolar lavage fluids and tissue biopsy specimens from patients with invasive aspergillosis*. J Clin Microbiol,

2003. 41(9): p. 4304 až 4311). Nastavení vhodné hranice positivity (x kopií v ml BAL) by umožnilo rozdělit pacienty do skupin s větším či menším rizikem rozvojem IFI.

5 Podstata vynálezu

Předmětem předloženého řešení je způsob diagnostiky invazivní aspergilózy pomocí izolace a detekce DNA *Aspergillus fumigatus* v biologických vzorcích odebraných z těla pacienta, zejména ve vzorcích bronchoalveolární laváže nebo periferní krve. Podstata způsobu spočívá v tom, že se izoluje DNA z biologického vzorku a poté se provede detekce množství genu ITS2 (internal transcribed spacer 2) pro ribozomální DNA *Aspergillus fumigatus* pomocí metody kvantitativní PCR, přičemž se jako primery pro kvantitativní PCR použijí oligonukleotidy mající alespoň 85% identitu nukleotidové sekvence se sekvencemi GGCTTTGTCACCTGCTCTGTAG (SEQ ID NO. 2) a CTGATCCGAGGTCAACCTTAGAAA (SEQ ID NO. 3), a jako sonda se použije TaqMan MGB sonda, která má alespoň 85% identitu nukleotidové sekvence se sekvencí CCGACACCCAACCTT – MGB (SEQ ID NO. 4), přičemž snížení identity až na 85 % je dosaženo prodloužením nebo zkrácením primerů a/nebo sondy. Před prováděním detekce množství genu ITS2 lze ještě provést předamplifikaci plisňové DNA metodou PCR.

20 Výchozím materiálem pro provádění způsobu podle vynálezu je biologický vzorek odebraný z těla pacienta, zejména vzorek bronchoalveolární laváže nebo periferní krve, s výhodou vzorek bronchoalveolární laváže. Jestliže není vzorek ihned zpracován, je možné ho skladovat v zamraženém stavu.

25 Prvním krokem způsobu podle vynálezu je izolace DNA z klinického vzorku. Tu lze provést např. metodou mechanické disrupce s použitím komerčně dostupného kitu.

Poté se případně provede předamplifikace DNA plisní s pomocí páru primerů, které ohraničují sekvenci ITS2 pro kvantitativní PCR a jsou specifické pro genom plisně. Úsek amplifikovaný primery pro externí kolo (předamplifikaci) s vyznačením forward a reverse primeru (SEQ ID NO. 1):

```
ctgtccgagcgtcattgctgccctcaagcaecggcttgtgtggtgggcccccgctccccctctc
ccgggggaecgggcccgaaggcagcggcgccaccgcgctccggtcctcgagcgtatggggctt
tgtcacctgctctgtaggccccggccggcgccagccgacacccaactttatTTTTCTAAGGTT
gacctcggatcaggtagggataccccgctgaacttaagcatatcaataagcggagga
```

35 V dalším kroku způsobu podle vynálezu se detekuje množství genu ITS2 pomocí amplifikace jeho části metodou kvantitativní PCR, s výhodou real-time PCR s využitím TaqMan MGB (minor groove binder – modifikace zaručující silnější vazbu do malého žlábků DNA šroubovice než běžné sondy) sondy, přičemž jako primery a sonda pro PCR se použijí oligonukleotidy vybrané ze skupiny zahrnující sekvence mající alespoň 85% identitu nukleotidové sekvence se sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující:

|                            |                          |
|----------------------------|--------------------------|
| Cust-fum-F (SEQ ID NO.2)   | GGCTTTGTCACCTGCTCTGTAG   |
| Cust-fum-R (SEQ ID NO.3)   | CTGATCCGAGGTCAACCTTAGAAA |
| Cust-fum-son (SEQ ID NO.4) | CCGACACCCAACCTT          |

45 Úsek amplifikovaný primery pro interní kolo s vyznačením forward primeru, reverse primeru a sondy (SEQ ID NO. 5):

**ggctttgtcacctgctctgtaggcccgggccggcgccagccgacacccaactttatttttata**  
**aggttgacctcggatcag**

V genomu *A. fumigatus* je přítomno asi 40 kopií rDNA genů a skládají se ze tří podjednotek: 18S rRNA, 5,8S rRNA a 28S rRNA. Mezi jednotlivými podjednotkami se pak nacházejí oblasti ITS1 (internal transcribed spacer 1) a ITS2 (internal transcribed spacer 2). Úsek tohoto genu je používán proto, že je tento gen v genomu *Aspergillus fumigatus* přítomen v několika desítkách kopií, což zvyšuje senzitivitu reakce. Zároveň je tento úsek genu specifický pouze pro *Aspergillus fumigatus*, což zajišťuje vysokou specifitu reakce (nebyla zjištěna zkřížená reakce s jinými druhy plísní) (Schabereiter-Gurtner, C., et al., *Development of novel real-time PCT assays for detection and differentiation of eleven medically important Aspergillus and Candida species in clinical specimens*. J. Clin Microbiol, 2007. 45(3): p. 906 až 14).

Postup podle vynálezu je kombinací izolace DNA pomocí komerčního kitu, s výhodou s mírně optimalizovaným protokolem, jak je dále ukázáno v příkladech, které však mají za úkol pouze ilustrovat provedení vynálezu a nijak neomezují jeho rozsah, a originálně navržené kombinace oligonukleotidů pro PCR amplifikaci a reakčních podmínek PCR amplifikace. Na rozdíl od dosud dostupných komerčních řešení nevyžaduje řešení dle vynálezu žádné investice do přístrojového vybavení nad rámec vybavení pro běžnou real-time PCR s použitím TaqMan sond.

Předmětem vynálezu jsou dále oligonukleotidy vybrané ze skupiny zahrnující sekvence mající alespoň 85% identitu nukleotidové sekvence se sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující GGCT-TTGTCACCTGCTCTGTAG (SEQ ID NO. 2) a CTGATCCGAGGTCAACCTTAGAAA (SEQ ID NO. 3) pro použití v diagnostice invazivní aspergilózy metodou kvantitativní PCR. Dále je předmětem vynálezu TaqMan MGB sonda mající alespoň 85% identitu nukleotidové sekvence se sekvencí CCGACACCCAACCTT – MGB (SEQ ID NO. 4) pro použití v diagnostice invazivní aspergilózy metodou kvantitativní PCR. Snížení homologie na 85 % ve srovnání s originální sekvencí nukleotidů je dosaženo zejména prodloužením nebo zkrácením primerů a/nebo sondy o několik nukleotidů na 5' a/nebo 3' konci. Předmětem vynálezu jsou také tyto oligonukleotidy pro použití v diagnostice invazivní aspergilózy.

#### Seznam sekvencí

SEQ ID NO. 1: Úsek DNA amplifikovaný pro externí kolo.

SEQ ID NO. 2: Forward primer pro amplifikaci v interním kole.

SEQ ID NO. 3: Reverse primer pro amplifikaci v interním kole.

SEQ ID NO. 4: Sonda pro kvantitativní PCR.

SEQ ID NO. 5: Úsek DNA amplifikovaný pro interní kolo.

#### 40 Příklady provedení vynálezu

##### Příklad I

45 U pacienta s diagnózou akutní myeloidní leukémie (AML) byla provedena bronchoalveolární laváž pro podezření na invazivní aspergilózu 2 ml tekutiny získané ABL byly odebrány do sterilní zkumavky a centrifugovány 10 minut při otáčkách 4000 až 6000xg, při laboratorní teplotě. Po této centrifugaci byl veškerý supernatant odebrán mikropipetou. Pomocí mikropipety byl k peletu přidán lyzační roztok, který je součástí ZR Fungal Bacterial Kitu od firmy Zymo Research, a směs byla promíchána. Lyzát byl poté přenesen do zkumavky se skleněnými kuličkami. V následujících krocích byl vzorek se skleněnými kuličkami vortexován 15 minut při labora-

torní teplotě. Následovalo promytí a izolace DNA na kolonce podle pokynů výrobce. DNA byla poté eluována do 50 mikrolitrů elučního pufru.

5 5 mikrolitrů odizolované DNA bylo přidáno do reakční směsi s párem primerů, které ohraničují cílovou sekvenci pro real-time PCR a jsou specifické pro genom plísní a reakční směs byla podrobena PCR amplifikaci.

PCR amplifikace:

10 5 mikrolitrů izolované DNA bylo amplifikováno v následující reakční směsi:

|                               |                     |         |
|-------------------------------|---------------------|---------|
| Absolute™ QPCR Mix (2x konc.) | (Thermo Scientific) | 12,5 µl |
| Primer Asp-F (25 µM)*         | (Generi Biotech)    | 0,4 µl  |
| Primer ITS-R (25 µM)**        | (Generi Biotech)    | 0,4 µl  |
| MilliQ voda                   |                     | 6,7 µl  |
| DNA                           |                     | 5 µl    |
| Celkový objem                 |                     | 25 µl   |

Při tomto reakčním profilu:

15

1: 95 °C/15min

2: 95 °C/15s

3: 60 °C/1min

4: jdi na krok 2, 19x

20

\*,\*\* – podle Schabereiter-Gurtner, C., et al., *Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important Aspergillus and Candida species in clinical specimens*. J Clin Microbiol, 2007. 45(3): p. 906 až 14.

25

V této reakční směsi byla tedy po 20 cyklech PCR předamplifikována plíšňová DNA, která je ve vzorku přítomna. Jeden mikrolitr PCR produktu z této reakce byl použit pro další amplifikaci v real-time PCR reakci, ve které byly použity primery a TaqMan MGB sonda specifická pro *Aspergillus fumigatus*. Při této real-time PCR reakci byla amplifikována část genu pro ribozomální DNA – internal transcribed spacer 2 (ITS2).

30

PCR amplifikace:

1 mikrolitr PCR produktu z předchozí amplifikace byl amplifikován v následující reakční směsi:

|                               |                   |         |
|-------------------------------|-------------------|---------|
| Absolute™ QPCR Mix (2x konc.) | Thermo Scientific | 12,5 µl |
| Primer Cust-fum-F (25 µM)     |                   | 0,4 µl  |
| Primer Cust-fum-R (25 µM)     |                   | 0,4 µl  |
| Sonda Cust-fum-son (25 µM)    |                   | 0,2 µl  |
| MilliQ voda                   |                   | 10,5 µl |
| DNA                           |                   | 1 µl    |
| Celkový objem                 |                   | 25 µl   |

35

Při tomto reakčním profilu:

- 1: 95 °C/15min
- 5 2: 95 °C/15s
- 3: 60 °C/1min
- 4: jdi na krok 2, 45x

10 Současné kromě klinického vzorku byly také paralelně amplifikovány vzorky tzv. standardní DNA – tedy vzorky plazmidové DNA o známém počtu kopií naší cílové sekvence. Pomocí kalibrační přímky, která byla automaticky sestrojena pomocí Softwaru Rotorgene 6 z amplifikované standardní řady, byl určen počet kopií aspergilové DNA v PCR reakci a následně přepočtem počet kopií aspergilové DNA na 1 ml tekutiny získané bronchoalveolární laváží.

15 Po provedení PCR detekce bylo ve vzorku uvedeného pacienta zjištěno 46 576 259 kopií *Aspergillus fumigatus* v reakci. Toto číslo odpovídá 8,72 log kopií/ml (tj. 10 (exp 8,72) kopií/ml) tekutiny získané z BAL a jedná se tedy o vzorek velmi pozitivní. Další markery pro invazivní aspergilózu – detekce galaktomannanu (GM) v BAL a periferní krvi – byly také velmi pozitivní. Výsledek testování GM je uváděn jako bezrozměrné číslo – tzv. index positivity (IP). GM v BAL – IP = 6,32 a GM v séru IP = 0,66 – přičemž hranice positivity je IP = 0,5. Pacient uváděný  
20 v tomto příkladu je shodný s pacientem č. 1 v Tabulce 1.

#### 25 Příklad 2

Stejným postupem, jaký byl uveden v Příkladu 1, bylo zpracováno 74 vzorků BAL od 74 pacientů v riziku invazivní aspergilózy (IA). 12 vzorků (16,2 %) bylo pozitivních na *A. fumigatus* výše uvedenou PCR reakcí. Základní charakteristiky tohoto souboru pozitivních pacientů jsou uvedeny v Tabulce 1. V tabulce jsou uvedeny základní diagnózy pacientů a výsledky testování  
30 v BAL a periferní krvi jako markeru invazivní aspergilózy. Je patrné, že vysoký počet detekovaných kopií DNA *A. fumigatus* koreluje s vysokou pozitivitou GM (IP >>0.5). U pacientů č. 1 a 2 jsou vysoce pozitivní všechny nálezy – GM v BAL i séru. PCR v BAL – v periferní krvi byla DNA *A. fumigatus* detekována pouze u pacienta č. 1. U pacienta č. 3, který má jen nízkou hladinu positivity DNA *A. fumigatus* a negativní GM v séru došlo k rozvoji klinických příznaků a nárůstu  
35 positivity GM až během týdne od provedení BAL – zachycená pozitivita tedy odpovídá velmi ranému stadiu infekce. U pacientů 4 až 12 je velmi nízká úroveň positivity DNA *A. fumigatus* v BAL a GM v BAL i v séru je zcela negativní – tito pacienti také nebyli klinicky zhodnoceni jako invazivní aspergilóza.

#### 40 Příklad 3

##### Stanovení hodnoty positivity

45 Z tabulky 1 a z námi získaných dat vyplývá, že po detekci tohoto markeru – DNA specifické pro *A. fumigatus*, lze v klinických vzorcích vyzorovat 3 skupiny nemocných. Pacienti, u nichž nejsou detekovány žádné kopie *A. fumigatus* – toto jsou pacienti zcela negativní. Pacienti, u nichž se množství detekovaných kopií pohybuje do 5 log kopií/ml BAL – u těchto pacientů patrně není *A. fumigatus* primární příčinou infekce a jeho záchyt ve vzorku odpovídá spíše kolonizaci nebo  
50 časné fázi infekce. A poslední skupinou jsou pacienti, u nichž je detekováno více než 7 log kopií/ml BAL a u nichž je tedy diagnóza invazivní aspergilózy jednoznačně potvrzena.

Tabulka 1.

| Číslo pacienta | Datum odběru | Základní diagnóza* | BAL  |              | Periferní krev |              | IFI dle EORTC hodnocení | Klinické hodnocení |
|----------------|--------------|--------------------|------|--------------|----------------|--------------|-------------------------|--------------------|
|                |              |                    | GM   | log kopii/ml | GM             | log kopii/ml |                         |                    |
| 1              | 19.3.2008    | AML                | 6,32 | 8,72         | 0,66           | 64533        | IFI 2                   | IFI 3              |
| 2              | 10.6.2004    | AML, HL            | 8,58 | 8,16         | 1,16           | ND           | IFI 3                   | IFI 3              |
| 3              | 26.9.2007    | AML                | 0,98 | 4,30         | 0,1            | 0            | IFI 2                   | IFI 3              |
| 4              | 19.10.2007   | TTP                | 0,13 | 5,29         | 0,08           | 0            | IFI 0                   | IFI 0              |
| 5              | 4.4.2008     | AML                | 0,12 | 4,34         | 0,14           | ND           | IFI 2                   | IFI 0              |
| 6              | 11.3.2008    | AML                | 0,26 | 4,39         | 0,17           | 0            | IFI 1                   | IFI 0              |
| 7              | 2.10.2007    | MCL                | 0,23 | 4,92         | 0,16           | 0            | IFI 0                   | IFI 0              |
| 8              | 13.6.2007    | AiHA               | 0,42 | 4,97         | 0,19           | ND           | IFI 1                   | IFI 0              |
| 9              | 7.5.2007     | CLL                | 0,19 | 5,42         | 0,18           | ND           | IFI 1                   | IFI 0              |
| 10             | 28.2.2007    | AML/CLL            | 0,19 | 4,14         | 0,16           | ND           | IFI 1                   | IFI 0              |
| 11             | 15.12.2006   | CLL                | 0,36 | 3,72         | 0,06           | ND           | IFI 1                   | IFI 0              |
| 12             | 24.6.2004    | MM                 | 0,16 | 3,67         | 0,19           | ND           | IFI 0                   | IFI 0              |

\* - AML = akutní myeloidní leukémie, HL = Hodgkinův lymfom, TTP = trombocytopenická purpura, MCL = mantle-cell lymfom, AiHA = Autoimunní hemolytická anémie, CLL = chronická lymfoblastická leukémie, MM = mnohočetný myelom, GM = galaktomanan, EORTC = European Organisation for Research and Treatment of Cancer, IFI - invasive fungal infection (invasivní mykotické infekce). IFI 3 - prokázaná mykotická infekce, IFI 2 - pravděpodobná mykotická infekce, IFI 1 = možná mykotická infekce, IFI 0 = nejedná se o mykotickou infekci.

Untitled.ST25

## SEQUENCE LISTING

5 <110> Masarykova univerzita

<120> Způsob diagnostiky invazivní aspergilózy a oligonukleotidy pro použití při tomto způsobu

10 <130> p1121CZ00

<160> 5

15 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 242

<212> DNA

20 <213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 1

ctgtccgagc gtcattgctg cctcaagca cggcttggtg gttgggccc cgteccctc 60

tcccggggga cgggcccgaa aggcagcggc ggcaccgct cgggtcctcg agcgtatggg 120

gctttgtcac ctgctctgta ggcccggccg gcgccagccg acaccaact ttatttttct 180

aaggttgacc tcggatcagg tagggatacc cgctgaactt aagcatatca ataagcggag 240

ga 242

25 <210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial

30 <220>

<223> forward primer

<400> 2

35 ggctttgtca cctgctctgt ag 22

<210> 3

<211> 24

40 <212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> reverse primer

45 <400> 3

ctgatccgag gtcaacctta gaaa 24



## Untitled.ST25

<210> 4  
 <211> 15  
 5 <212> DNA  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> probe  
 10  
 <400> 4  
 ccgacaccca acttt 15  
  
 <210> 5  
 15 <211> 80  
 <212> DNA  
 <213> *Aspergillus fumigatus*  
  
 <400> 5  
 20  
 ggctttgtca cctgctctgt aggcccggcc ggcgccagcc gacacccaac tttatttttc 60  
 taaggttgac ctcggatcag 80

25

## PATENTOVÉ NÁROKY

- 30 1. Způsob diagnostiky invazivní aspergilózy pomocí izolace a detekce DNA *Aspergillus fumigatus* v biologických vzorech odebraných z těla pacienta, **v y z n a ě n ý t í m**, že se z biologického vzorku odebraného z těla pacienta izoluje DNA a poté se provede detekce množství genu ITS2 pro ribozomální DNA *Aspergillus fumigatus* metodou kvantitativní PCR, přičemž se jako primery pro kvantitativní PCR použijí oligonukleotidy mající alespoň 85% identitu nukleotidové sekvence se sekvencemi GGCTTTGTACCTGCTCTGTAG (SEQ ID NO. 2) a CTGATCCGAGGTCAACCTTAGAAA (SEQ ID NO. 3), a jako sonda se použije TaqMan MGB sonda, která má alespoň 85% identitu nukleotidové sekvence se sekvencí CCGACACCCCACTTT – MGB (SEQ ID NO. 4), přičemž snížení identity až na 85 % je dosaženo prodloužením nebo zkrácením primerů a/nebo sondy.
- 40 2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se před krokem detekce množství genu ITS2 provede předamplifikace plísňové DNA metodou PCR.
- 45 3. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se jako biologický vzorek odebraný z těla pacienta použije vzorek bronchoalveolární laváže nebo vzorek periferní krve.
- 50 4. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se krok izolace DNA z biologického vzorku odebraného z těla pacienta provede metodou mechanické disrupce.
5. Způsob podle nároku 2, **v y z n a ě n ý t í m**, že se krok předamplifikace plísňové DNA provede s použitím páru primerů, které ohraničují cílovou sekvenci pro kvantitativní PCR a jsou specifické pro genom plísní.

5 6. Oligonukleotidy vybrané ze skupiny zahrnující sekvence mající alespoň 85% identitu nukleotidové sekvence se sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující GGCTTTGTACCTGCTC-TGTAG (SEQ ID NO. 2) a CTGATCCGAGGTCAACCTTAGAAA (SEQ ID NO. 3), přičemž snížení identity až na 85 % je dosaženo prodloužením nebo zkrácením oligonukleotidů, pro použití v diagnostice invazivní aspergilózy metodou kvantitativní PCR.

10 7. TaqMan MGB sonda mající alespoň 85% identitu nukleotidové sekvence se sekvencí CCGACACCCAACCTTT – MGB (SEQ ID NO. 4), přičemž snížení identity až na 85 % je dosaženo prodloužením nebo zkrácením sondy, pro použití v diagnostice invazivní aspergilózy metodou kvantitativní PCR.

15

---

Konec dokumentu

---

Příloha 3: Lengerova M., Kocmanova I., Racil Z., Hrnčirova K., Pospisilova S., Mayer J., Najvar L.K., Wiederhold N.P., Kirkpatrick W.R., Patterson T.F. Detection and measurement of fungal burden in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis by novel quantitative nested real-time PCR compared with galactomannan and (1,3)-beta-D-glucan detection. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, roč. 50, č. 3, s. 602-608.

# Detection and Measurement of Fungal Burden in a Guinea Pig Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis by Novel Quantitative Nested Real-Time PCR Compared with Galactomannan and (1,3)- $\beta$ -D-Glucan Detection

Martina Lengerova,<sup>a,b</sup> Iva Kocmanova,<sup>a</sup> Zdenek Racil,<sup>a</sup> Kristyna Hrcirova,<sup>a</sup> Sarka Pospisilova,<sup>a,b</sup> Jiri Mayer,<sup>a,b</sup> Laura K. Najvar,<sup>c,d</sup> Nathan P. Wiederhold,<sup>c,e</sup> William R. Kirkpatrick,<sup>c,d</sup> and Thomas F. Patterson<sup>c,d</sup>

Department of Internal Medicine—Hematology, Faculty of Medicine of Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic<sup>a</sup>; CEITEC—Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic<sup>b</sup>; The University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas, USA<sup>c</sup>; South Texas Veterans Health Care System, San Antonio, Texas, USA<sup>d</sup>; and University of Texas at Austin College of Pharmacy, Austin, Texas, USA<sup>e</sup>

We developed and assessed the diagnostic value of a novel quantitative nested real-time (QNRT) PCR assay targeting the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA (rDNA) in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis. Groups of 5 immunosuppressed animals that were infected using an aerosol chamber with *Aspergillus fumigatus* conidia were humanely terminated 1 h postinoculation and at days 3, 5, 7, and 11 postchallenge, and lung tissue, bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, whole blood, and serum samples were collected. The QNRT PCR results obtained with the serum and BAL fluid were compared to those achieved with galactomannan and (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan assays. High fungal burden levels were detected by QNRT PCR in both lung tissue and BAL fluid in all infected animals at each time point, and the sensitivity of each assay in BAL fluid was 100% by day 3 and remained so through the remainder of the study. The sensitivity of detection of fungi in whole blood and serum samples was significantly lower, and some samples remained negative by all three assays despite the advanced stage of the infection. From these data, we can conclude that this novel QNRT PCR method was highly sensitive for the detection of *A. fumigatus* from different types of samples in this model. In addition, BAL fluid samples appeared to be the most suitable for the early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. When testing serum, the use of a combination of available assays may increase the possibility of early detection of this opportunistic mycosis.

Invasive aspergillosis represents the most frequent invasive fungal disease in patients with hematological malignancy (20). Conventional diagnostic methods, e.g., culture and cytology/histology, have limited use in this group of immunocompromised patients, where disease progression is rapid and mortality is very high. Moreover, their usefulness depends on the possibility of obtaining deep-tissue samples, which is often impossible in patients with hematologic malignancies (6). Novel non-culture-based approaches focus on the detection of surrogate markers released by the fungus such as surface antigens or DNA. These methods have been developed to hasten the diagnosis and to enable diagnostic driven rather than empirical antifungal treatment strategies. Detection of galactomannan (GM), a cell wall antigen released by *Aspergillus* spp. and some other fungi in serum, bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, or other body fluids, has proven to be an important advance in the detection of invasive pulmonary aspergillosis (1, 10, 11) and has become one of the EORTC/MSG (European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group) criteria for the diagnosis of this invasive mycosis (3). Evidence for its use as a screening method for early detection of invasive aspergillosis is supported by several studies (14). Another cell wall component, (1,3)- $\beta$ -D-glucan (BG) is released by several clinically important fungal species, including *Aspergillus* spp., and despite limited evidence compared to GM, it is included in the 2008 update of EORTC/MSG criteria for diagnosis of invasive fungal disease.

Real-time PCR is a powerful technique routinely applied as a diagnostic tool in many different fields, including clinical micro-

biology (4). However, several limitations of fungal PCR diagnostics exist, including resistance of fungal cells to common DNA isolation protocols; unknown timing of DNA release; the small amount of the fungal target in clinical samples, which reaches the detection limit of real-time PCR assays; and the potential for contamination and colonization to complicate the detection of true disease (2, 9). In the last decade dozens of different PCR assays have been evaluated for the early diagnostics of invasive aspergillosis, but none of them have become generally accepted (5, 12, 25). Proper validation of any novel diagnostic method requires extensive testing of clinical samples, correlation of the results with other well-established laboratory tests, and agreement of the results with clinical data indicating active disease. However, meeting these criteria for novel methods for the diagnosis of invasive aspergillosis is very difficult. The quantity of clinical samples obtained from patients with proven aspergillosis is limited due to the relatively low incidence of the infection, difficulties in obtaining sterile deep tissue samples in patients with hematological disease, and finally, due to the preemptive initiation of antifungal therapy, which may

Received 4 August 2011. Returned for modification 10 October 2011.

Accepted 9 December 2011.

Published ahead of print 21 December 2011.

Address correspondence to Martina Lengerova, mlengerova@fnbrno.cz.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.05356-11

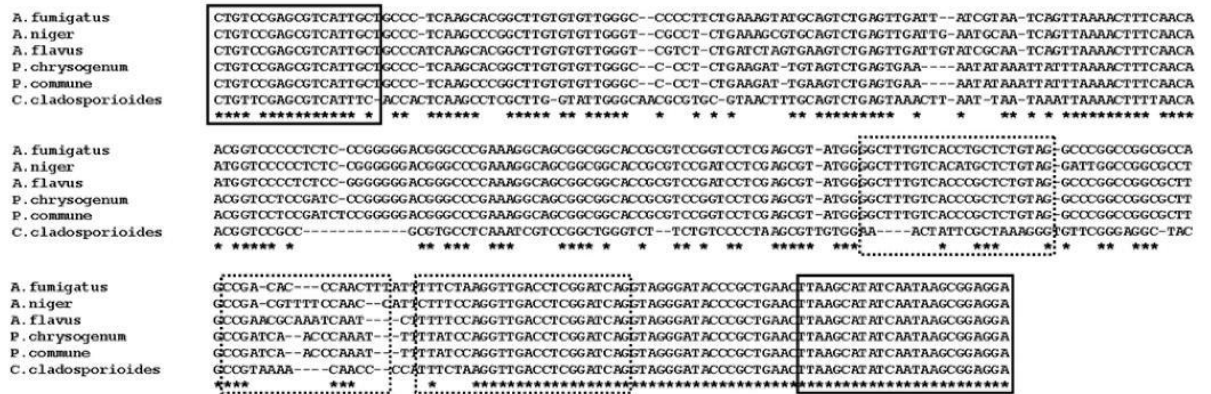


FIG 1 ClustalW multiple-sequence alignment of the region detected by tested QNRT PCR. The primers for the external round (solid lines) and the primers and TaqMan-MGB probe (dashed-lines) are boxed. The GenBank accession numbers for the sequences shown are as follows: *A. fumigatus*, AY214446; *A. flavus*, AY214444; *A. niger*, AY213632; *P. chrysogenum*, AY213669; *P. commune*, AY213672; *C. cladosporioides*, AY213640. The asterisks indicate 100% sequence similarity among all presented species.

influence the sensitivity of clinically available assays. Contrary to the limited availability of clinical samples, animal models provide a unique source of samples that can be taken at different stages of infection. This makes the use of animal models ideal for the initial evaluation of novel diagnostic methods (21). Animal models in which infection is established via inhalation most closely mimic the clinical pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis in many ways (24, 26), and therefore, samples taken from these models may supplement the clinical samples necessary for the validation of novel laboratory tests.

The aim of this study was to validate a novel, fast, and robust quantitative nested real-time (QNRT) PCR assay designed for the sensitive and specific quantification of *Aspergillus fumigatus*, as this species is the most common cause of invasive aspergillosis (17), and assess its performance with samples from a guinea pig model of pulmonary disease. The technology uses a short DNA preamplification with a pair of panfungal primers and subsequent quantification with a pair of primers and a TaqMan MGB probe specific exclusively to *A. fumigatus* (Fig. 1). We tested lung tissue, BAL fluid, whole blood, and serum using this quantitative assay. The results obtained with BAL fluid and serum samples were compared with those achieved using clinically available assays for the detection of GM and BG.

**MATERIALS AND METHODS**

**Fungal isolate.** *A. fumigatus* clinical isolate 293 (AF293), the isolate used in the *A. fumigatus* genome sequencing project, was grown on potato dextrose agar at 37°C for 7 days (18, 26). Conidia were harvested by washing and scraping of agar surfaces with 0.1% Tween 80 in sterile physiological saline and subsequent filtration for the removal of hyphal fragments. Conidia were concentrated by centrifugation and then resuspended to a target inoculum of ~1 × 10<sup>8</sup> conidia/ml by hemocytometer. The number of viable conidia was confirmed by plating dilutions of the inoculum and quantifying CFU.

**Animals and immunosuppression.** Two days prior to infection, male Hartley guinea pigs (0.5 kg; Charles River Laboratory, Wilmington, MA) received cyclophosphamide (Cytosan, 250 mg/kg; Mead Johnson, Princeton, NJ) intraperitoneally and cortisone acetate (250 mg/kg; Sigma, St. Louis, MO) subcutaneously to induce neutropenia. Cefazidime (100 mg/kg; Glaxo SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Philadelphia, PA) was

administered daily for prevention of bacterial infections during the study. Additional doses of cyclophosphamide (200 mg/kg) and cortisone acetate (250 mg/kg day) were administered on day 3 postinfection (26). All animal research procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of Texas Health Science Center at San Antonio, and all animals were maintained in accordance with the American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care (16).

**Inhalational challenge and sample collection.** As previously described, an inexpensive acrylic chamber was used to infect guinea pigs with a nebulized inoculum of 10<sup>8</sup> *A. fumigatus* conidia. Twenty-five guinea pigs were exposed to the aerosol mist for 1 h. Confirmation of the conidial delivery of each exposure run was accomplished with the sacrifice of randomly chosen guinea pigs (total *n* = 5) from each run of the aerosol chamber and determination of lung conidial loads by enumeration of CFU. On days 3, 5, 7, and 11 postinoculation, five guinea pigs were humanely euthanized via anesthesia and exsanguination by cardiac puncture. Blood samples were collected from each animal, and the serum was separated. BAL fluid samples were also collected from each animal, and fungal burdens in the lungs were also determined postmortem using CFU analysis (7). Throughout the course of the study, all animals were monitored daily for any obvious signs of illness or other signs of distress. Any animal that was found to be moribund prior to the study endpoint was humanely euthanized using approved methods. Four uninfected, immunosuppressed controls were also included, and samples (lung tissue, BAL fluid, serum, and whole blood) were collected on day 11 or when they appeared moribund.

**DNA isolation.** Samples were stored at -70°C and thawed for 30 min at room temperature before isolation. DNA isolation was performed within a laminar-flow box in a separate laboratory to avoid PCR mixture contamination. Other measures used to avoid external contamination included the use of filtered pipet tips, frequent glove changing, and the use of a UV light in the laminar-flow box when it was not in use. One blank sample (equivalent amount of sterile water (B. Braun, Melsungen, Germany) was isolated with each set of 11 samples in order to exclude the influence of possible external contamination (chemicals, test tubes, etc.). DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

**DNA isolation from whole blood samples.** Twenty-two milliliters of erythrocyte lysis buffer (ELB; 10 mM Tris-Cl [pH 7.6], 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM NaCl) was added to 3 ml of whole blood. Samples were gently shaken for 10 min at room temperature and then centrifuged for 10 min at 1,500 × *g* and 10°C. The supernatant was discarded, and the pellet was

washed with 25 ml of ELB. The samples were then gently shaken and centrifuged again, and the washing step was repeated once. Each pellet was resuspended in 1 ml of ELB, transferred to a microcentrifugation tube (Eppendorf), and centrifuged for 10 min at  $4,000 \times g$  at room temperature, after which the supernatant was discarded. DNA was extracted from the pellet using a ZR Fungal/Bacterial DNA kit (Zymo Research, Irvine, CA) according to the manufacturer's protocol. The time of sample vortexing with glass beads was extended from 5 to 15 min, and DNA was eluted with 50  $\mu$ l of elution buffer.

**DNA isolation from BAL fluid samples.** BAL fluid (0.8 to 2 ml, depending on the available volume) was centrifuged for 10 min at  $5,000 \times g$  at room temperature. The supernatant was discarded, and DNA was extracted from the pellet using a ZR Fungal/Bacterial DNA kit as described above.

**DNA isolation from lung tissue and serum samples.** Lung tissue samples were homogenized in sterile saline for 20 s with an IKA T8 Ultra Turrax disperser (IKA Labortechnik, Staufen, Germany). Two hundred microliters of homogenate was added to the ZR BashingBead lysis tubes with 750  $\mu$ l of the lysis solution (both from the ZR Fungal/Bacterial DNA kit) and incubated at room temperature overnight. The next day, the tubes were vortexed for 15 min and DNA was isolated according to the manufacturer's protocol using 50  $\mu$ l of elution buffer. DNA was isolated from 400  $\mu$ l of serum with the QIAamp DNA Blood mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol.

**PCR amplification.** Five microliters of DNA from each sample was amplified in a 25- $\mu$ l reaction mixture containing 1 $\times$  AbsoluteQPCR Mix (Thermo Scientific) and 400 nM each primer (ASP-F, 5'-CTGTCCGAGCGTCATTGCT-3'; ITS-R, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAA-3') (22) using an amplification profile of 95°C for 15 min, followed by 20 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. One microliter of the initial PCR product was used as a template in the second round of amplification in a 25- $\mu$ l reaction mixture containing 1 $\times$  AbsoluteQPCR Mix, 400 nM each primer (forward primer, 5'-GGCTTTGTCACCTGCTCTGTAG-3'; reverse primer, 5'-CTGATCCGAGGTCAACCTTAGAAA-3'), and 200 nM TaqMan-MGB probe (5'-6-carboxyfluorescein-CCGACACCCAAC TTT-MGBNFQ-3') (sequences of the all oligonucleotides: international patent application PCT/CZ2010/000052, published under no. WO 2010/121578, granted Czech patent no. CZ 302670). The amplification profile of the second PCR was 95°C for 15 min, followed by 45 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min using a Rotorgene 6000 (Corbett Research, Mortlake, New South Wales, Australia). Each sample was run in duplicate. Sterile water (B. Braun) was used as the no-template control in each run. Results were analyzed using Rotorgene 6000 software version 1.7. Quantification was made using a standard curve with 5  $\mu$ l of the PCR product cloned into plasmid pCR 2.1 (Invitrogen, Grand Island, NY) in 10-fold dilutions ranging from  $2 \times 10^6$  to 2 copies of plasmid DNA/5  $\mu$ l. In order to reduce artificial differences in fungal loads caused by dissimilar efficiencies of DNA isolation from the individual samples, all PCR results are presented as numbers of copies per microgram of DNA used for PCR amplification (number of copies detected by QNRT PCR  $\times$  (1,000/DNA concentration [in ng/ $\mu$ l]  $\times$  5). The amount of free DNA in serum is very low and almost unmeasurable. Therefore, real-time PCR results obtained with this fluid are presented as numbers of copies per milliliter of serum. Any sample in which a PCR product was detected following QNRT PCR was considered positive.

**Test of cross-reactivity with other fungal species.** Cross-reactivity of the *A. fumigatus*-specific assay was tested by amplification of DNA isolated directly from fungal strains obtained from the Czech Collection of Microorganisms or clinical isolates. DNA was isolated from 100  $\mu$ l of a fungal suspension using a protocol for the isolation of DNA from BAL fluid samples as described above. Five microliters of isolated DNA was used as the template for the second round of PCR as described above.

**GM detection.** Both serum and BAL fluid GM concentrations were determined by the Platelia Aspergillus kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's instructions. BAL fluid samples were centrifuged at 1,000 rpm for 10 min, and 300  $\mu$ l of the supernatant of

TABLE 1 Species used to test assay specificity

| Species                             | Source or strain      |
|-------------------------------------|-----------------------|
| <i>Aspergillus flavus</i>           | Clinical isolate      |
| <i>Aspergillus niger</i>            | Clinical isolate      |
| <i>Aspergillus nidulans</i>         | CCMF-266              |
| <i>Aspergillus vitricola</i>        | Environmental isolate |
| <i>Aspergillus versicolor</i>       | Environmental isolate |
| <i>Aspergillus sydowii</i>          | Environmental isolate |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | CCMF-348              |
| <i>Penicillium commune</i>          | CCMF-327              |
| <i>Penicillium brevicompactum</i>   | CCM8040               |
| <i>Penicillium olsonii</i>          | Environmental isolate |
| <i>Penicillium chrysogenum</i>      | CCM 8034              |
| <i>Fusarium oxysporum</i>           | Clinical isolate      |
| <i>Fusarium proliferatum</i>        | Clinical isolate      |
| <i>Fusarium solani</i>              | CCM8014               |
| <i>Rhizopus microsporus</i>         | Clinical isolate      |
| <i>Rhizopus oryzae</i>              | Clinical isolate      |
| <i>Mucor racemosus</i>              | CCM8190               |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>          | Clinical isolate      |
| <i>Absidia corymbifera</i>          | CCM8077               |
| <i>Candida albicans</i>             | Clinical isolate      |
| <i>Candida glabrata</i>             | Clinical isolate      |
| <i>Candida tropicalis</i>           | Clinical isolate      |
| <i>Candida parapsilosis</i>         | Clinical isolate      |
| <i>Candida krusei</i>               | Clinical isolate      |

each sample was used for GM detection. A sample with a GM index of  $\geq 0.5$  was considered positive.

**BG detection.** Both serum and BAL fluid BG concentrations were measured with the Fungitell test kit (Associates of Cape Cod, East Falmouth, MA) as recommended by the manufacturer. BAL fluid specimens were centrifuged at 1,000 rpm for 10 min, and 5  $\mu$ l of the supernatant of each sample was used for BG detection. All specimens were tested in duplicate. A BG level of  $\geq 80$  pg/ml was considered positive.

**Statistical analysis.** The Mann-Whitney test was used to determine if differences in fungal burdens detected in samples and on different collection days were significant (<http://faculty.vassar.edu/lowry/utest.html>). Spearman's rank correlation coefficient was calculated to confirm the correlation between the different assays (<http://www.wessa.net/>) (27). Fisher's exact test was used to determine if significant differences existed between the numbers of samples positive by each assay with different sample types.

## RESULTS

**Sensitivity and specificity of QNRT PCR assay.** The primers and TaqMan-MGB probe used in the second round of PCR were designed to selectively amplify *A. fumigatus*, not other *Aspergillus* species or related airborne fungi. Cross-reactivity with wild-type strains was not found with any of the species listed in Table 1. All clinical and environmental isolates were verified by DNA sequencing.

The analytical sensitivity of the assay is presented in Table 2. Both single-round and nested reverse transcription PCRs reproducibly detected 0.01 fg of DNA, corresponding to 2 plasmid copies per PCR. The use of nested PCR did not increase sensitivity but did result in lower cycle threshold ( $C_T$ ) values and better performance and reproducibility of the assay. The delta  $C_T$  between the two reactions remained stable, reflecting linear amplification of all dilutions. We used BAL fluid samples to test the difference between the fungal loads detected after single-round PCR (45 cycles with *A. fumigatus*-specific oligonucleotides) and nested PCR (20

TABLE 2 Representative amplification of serial dilutions of plasmid DNA with cloned internal transcribed spacer region detected in second round of PCR<sup>a</sup>

| Amt of DNA | Mean $C_T \pm$ SD (log no. of copies/reaction) |                       | $\Delta C_T$ |
|------------|--|-----------------------|--------------|
|            | Single-round PCR                               | Nested real-time PCR  |              |
| 10 pg      | 16.6 $\pm$ 0.49 (6.3)                          | 3.09 $\pm$ 0.2 (10.8) | 13.5         |
| 1 pg       | 19.9 $\pm$ 0.74 (5.3)                          | 7.12 $\pm$ 0.3 (9.5)  | 12.8         |
| 0.1 pg     | 23.4 $\pm$ 0.61 (4.3)                          | 9.8 $\pm$ 0.3 (8.7)   | 13.6         |
| 10 fg      | 27.5 $\pm$ 1.13 (3.3)                          | 12.6 $\pm$ 0.4 (7.8)  | 14.9         |
| 1 fg       | 30.5 $\pm$ 1.46 (2.3)                          | 15.5 $\pm$ 0.2 (6.9)  | 15.0         |
| 0.1 fg     | 33.9 $\pm$ 1.88 (1.3)                          | 18.3 $\pm$ 0.3 (6.0)  | 15.6         |
| 0.01 fg    | 35.8 $\pm$ 1.86 (0.3)                          | 20.3 $\pm$ 0.8 (5.4)  | 15.5         |

<sup>a</sup> Both single-round and nested PCRs detected 0.01 fg of DNA, corresponding to 2 copies of plasmid DNA per reaction.

cycles of amplification with panfungal primers plus 45 cycles with *A. fumigatus*-specific oligonucleotides) (Fig. 2). Use of fungal DNA preamplification increased the detected copy numbers without affecting assay performance and efficiency. As inhibition of amplification due to a large amount of template was not observed, we can conclude that this ultrasensitive approach might be useful for sample testing.

**Detection of *A. fumigatus* in lung tissue.** The results from individual guinea pigs, as well as the mean and standard deviations for each assay at each time point, are reported in Table 3. QNRT PCR detected high fungal burdens in 25 (100%) of 25 tissue samples from infected animals, while all uninfected controls were PCR negative. Initially, the high load of DNA measured 1 h postinfection (mean,  $\log_{10}$  33.55  $\pm$  18.80 copies/ $\mu$ g of DNA) was decreased at day 3 (13.56  $\pm$  8.56 copies/ $\mu$ g of DNA) but was then increased on days 5 and 7. Two of five animals originally assigned to the day 11 group died prematurely on day 5, and the variability in the remaining 3 at this later time point was too large to determine if the fungal burdens were increasing further. Semiquantitative cultures (CFU) were able to detect *Aspergillus* conidia as early as 1 h postinfection, and as observed with QNRT PCR, fungal burdens measured by this assay decreased until day 3 and remained stable at the other time points. These results are consistent with previously reported data in this model (26).

**Detection of *A. fumigatus* in BAL fluid.** The QNRT PCR assay detected a high fungal burden in BAL fluid samples beginning at 1 h postinfection (mean,  $\log_{10}$  88.51  $\pm$  10.22 copies/ $\mu$ g of DNA). Detection at this early time point most likely represents inhaled conidia. However, the values measured at the later time points following germination of the conidia into hyphae (mean range for days 3, 5, 7, and 11,  $\log_{10}$  70.27 to 121.32 copies/ $\mu$ g of DNA) remained elevated. One sample from an uninfected control animal was positive. Although the fungal burden was much lower than in other samples, the serum from this animal was positive for GM and BG.

BAL fluid was negative for GM and BG at 1 h postinfection, but all samples became positive on day 3 and levels steadily increased throughout the study (Fig. 3). None of the BAL fluid samples on days 3 to 11 of the study were negative by either of these assays, which were also 100% specific, as none of the uninfected controls were positive (Table 3).

**Detection of *A. fumigatus* in serum and whole blood.** By QNRT PCR, fungal loads were detected in 10 (43.5%) of 23 serum samples from infected animals throughout the course of infection and in 9 (50%) of 18 samples collected on days 3 to 11. All samples collected on day 5 were negative. Two animals from the uninfected control group were also positive.

GM was positive in 7 (30.4%) of 23 samples from all infected animals (7 [38.8%] of 18 on days 3 to 11). Except for one sample collected on day 3, all positive results occurred on either day 7 or day 11. One sample from the uninfected control group was also positive for GM. Only 4 (17.4%) of 23 serum samples from infected animals were positive for BG (4 [22.2%] of 18 on days 3 to 11). Similar to GM, BG was detected beginning on the seventh day of infection. In whole blood, QNRT PCR detected fungal DNA in (60.9%) 14 of 23 samples from infected animals throughout the course of the study and in 11 (61.1%) of 18 samples on days 3 to 11. As shown in Table 3 and Fig. 3, detection of fungal DNA within this fluid was highly variable. However, no samples from the uninfected control group were positive.

Compared to serum, the number of samples of BAL fluid from infected guinea pigs that were positive, either throughout the course of infection or on days 3 to 11, was significantly higher for

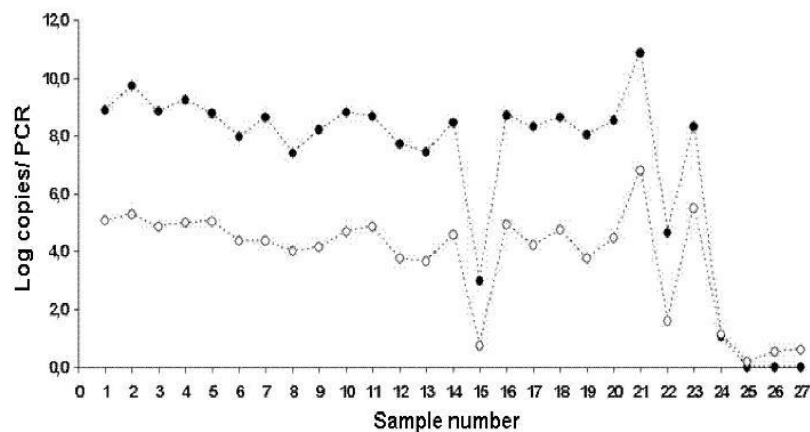


FIG 2 Comparison of fungal loads detected in BAL fluid samples with single-round and nested PCRs. Filled circles denote nested PCR data. Empty circles denote single-round PCR data.

TABLE 3 Comparison of PCR, GM enzyme immunoassay, and BG results obtained with samples from *A. fumigatus*-infected guinea pigs<sup>a</sup>

| Day p.i. <sup>b</sup> or parameter | Fungal burden |               |                 |              |             |             |              |             |                  |
|------------------------------------|---------------|---------------|-----------------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|------------------|
|                                    | Lung tissue   |               | BAL fluid       |              |             | Serum       |              |             | Whole blood, PCR |
|                                    | Culture       | PCR           | PCR             | GM           | BG          | PCR         | GM           | BG          |                  |
| 0                                  | <b>4.50</b>   | <b>31.04</b>  | <b>72.52</b>    | 0.14         | 79          | 0           | 0.11         | 15          | <b>37.69</b>     |
| 0                                  | <b>4.47</b>   | <b>60.22</b>  | <b>98.20</b>    | 0.17         | 20          | 0           | 0.09         | 18          | 0.00             |
| 0                                  | <b>4.47</b>   | <b>41.17</b>  | <b>85.61</b>    | 0.23         | 61          | 0.1         | 0.09         | 29          | 0.00             |
| 0                                  | <b>4.43</b>   | <b>25.78</b>  | <b>96.07</b>    | 0.17         | 35          | 0.1         | 0.05         | 8           | <b>7.44</b>      |
| 0                                  | <b>4.28</b>   | <b>9.52</b>   | <b>90.15</b>    | 0.2          | 70          | <b>3.99</b> | 0.32         | 15          | <b>18.54</b>     |
| Mean (SD)                          | 4.43 (0.09)   | 33.5 (18.8)   | 88.5 (10.2)     | 0.18 (0.03)  | 53.0 (24.7) | 0.84 (1.76) | 0.13 (0.11)  | 17.0 (7.65) | 12.7 (15.9)      |
| 3                                  | <b>3.43</b>   | <b>6.52</b>   | <b>115.51</b>   | <b>3.3</b>   | <b>570</b>  | 0           | 0.11         | 13          | <b>60.72</b>     |
| 3                                  | <b>3.62</b>   | <b>8.42</b>   | <b>148.74</b>   | <b>1.32</b>  | <b>160</b>  | <b>1.64</b> | <b>1.08</b>  | 20          | 0.00             |
| 3                                  | <b>3.25</b>   | <b>7.70</b>   | <b>137.81</b>   | <b>1.07</b>  | <b>125</b>  | <b>4.1</b>  | 0.11         | 20          | <b>47.81</b>     |
| 3                                  | <b>3.53</b>   | <b>19.43</b>  | <b>108.90</b>   | <b>1.62</b>  | <b>273</b>  | <b>0.75</b> | 0.42         | 2           | <b>42.82</b>     |
| 3                                  | <b>3.58</b>   | <b>25.75</b>  | <b>95.65</b>    | <b>1.96</b>  | <b>622</b>  | 0           | 0.11         | 10          | <b>96.63</b>     |
| Mean (SD)                          | 3.48 (0.15)   | 13.6 (8.56)   | 121.3 (21.6)    | 1.85 (0.87)  | 350 (232)   | 1.30 (1.71) | 0.37 (0.42)  | 13.0 (7.55) | 49.6 (34.8)      |
| 5                                  | <b>3.23</b>   | <b>47.62</b>  | <b>118.66</b>   | <b>6.44</b>  | <b>1243</b> | 0           | 0.45         | 0           | 0.00             |
| 5                                  | <b>2.96</b>   | <b>25.66</b>  | <b>103.40</b>   | <b>1.69</b>  | <b>1295</b> | 0           | 0.23         | 7           | <b>42.40</b>     |
| 5                                  | <b>3.41</b>   | <b>69.32</b>  | <b>81.10</b>    | <b>1.6</b>   | <b>420</b>  | 0           | 0.24         | 62          | <b>36.77</b>     |
| 5                                  | <b>3.48</b>   | <b>78.44</b>  | <b>109.30</b>   | <b>7.45</b>  | <b>1352</b> | 0           | 0.38         | 25          | 0.00             |
| 5                                  | <b>2.79</b>   | <b>40.35</b>  | <b>22.06</b>    | <b>4.04</b>  | <b>1100</b> | 0           | 0.43         | 0           | 0.00             |
| Mean (SD)                          | 3.17 (0.29)   | 43.4 (24.6)   | 86.9 (38.8)     | 4.24 (2.68)  | 1082 (382)  | 0 (0)       | 0.35 (0.10)  | 18.8 (26.2) | 15.8 (21.8)      |
| 7                                  | <b>3.51</b>   | <b>73.00</b>  | <b>78.02</b>    | <b>12.6</b>  | <b>1356</b> | <b>4.35</b> | <b>3.49</b>  | 30          | <b>63.54</b>     |
| 7                                  | <b>3.66</b>   | <b>44.02</b>  | <b>91.32</b>    | <b>12.26</b> | <b>1588</b> | <b>4.28</b> | <b>10.97</b> | <b>220</b>  | 0.00             |
| 7                                  | <b>2.62</b>   | <b>33.99</b>  | <b>99.46</b>    | <b>6.18</b>  | <b>1476</b> | 0           | 0.15         | 0           | <b>53.72</b>     |
| 7                                  | <b>3.99</b>   | <b>79.58</b>  | <b>92.03</b>    | <b>12.55</b> | <b>1530</b> | <b>4.13</b> | <b>12.49</b> | <b>1020</b> | 0.00             |
| 7                                  | <b>2.76</b>   | <b>78.35</b>  | <b>113.72</b>   | <b>4.95</b>  | <b>1510</b> | <b>0.4</b>  | 0.13         | 0           | 0.00             |
| Mean (SD)                          | 3.31 (0.59)   | 61.8 (21.2)   | 94.9 (13.0)     | 9.71 (3.81)  | 1492 (86.2) | 2.63 (2.23) | 5.45 (5.92)  | 254 (438)   | 23.4 (32.3)      |
| 11                                 | <b>3.60</b>   | <b>125.59</b> | <b>81.86</b>    | <b>12.13</b> | <b>1612</b> | <b>0.49</b> | <b>5.09</b>  | <b>126</b>  | <b>50.86</b>     |
| 11                                 | <b>2.68</b>   | <b>25.53</b>  | <b>56.86</b>    | <b>3.91</b>  | <b>1150</b> | <b>0.7</b>  | <b>0.62</b>  | 30          | <b>14.75</b>     |
| 11                                 | <b>3.53</b>   | <b>19.45</b>  | <b>72.10</b>    | <b>12.11</b> | <b>1530</b> | 0           | <b>8.16</b>  | <b>312</b>  | <b>17.72</b>     |
| 11 <sup>d</sup>                    | <b>3.38</b>   | <b>6.96</b>   | ND <sup>c</sup> | ND           | ND          | ND          | ND           | ND          | ND               |
| 11 <sup>d</sup>                    | <b>3.04</b>   | <b>35.29</b>  | ND              | ND           | ND          | ND          | ND           | ND          | ND               |
| Mean (SD)                          | 3.27 (0.51)   | 56.9 (59.6)   | 70.3 (12.6)     | 9.38 (4.74)  | 1431 (246)  | 0.40 (0.36) | 4.62 (3.79)  | 156 (143)   | 27.8 (20.0)      |
| 11 <sup>e</sup>                    | ND            | 0.00          | <b>10.62</b>    | 0.24         | 51          | <b>3.51</b> | <b>11.82</b> | 60          | 0.00             |
| 11 <sup>e</sup>                    | ND            | 0.00          | 0.00            | 0.14         | 35          | 0           | 0.12         | 0           | 0.00             |
| 11 <sup>e</sup>                    | ND            | 0.00          | 0.00            | 0.16         | 26          | <b>1.05</b> | 0.09         | 0           | 0.00             |
| 11 <sup>e</sup>                    | ND            | 0.00          | 0.00            | 0.11         | 75          | 0           | 0.11         | 0           | 0.00             |

<sup>a</sup> Units used: culture, log no. of CFU/g of tissue; PCR for lung tissue, BAL fluid, or whole blood, log<sub>10</sub> no. of copies/μg of DNA; PCR for serum, no. of copies/ml of serum; GM, index of positivity; BG, pg/ml of BAL fluid or whole blood. Positive results are in bold.

<sup>b</sup> p.i., postinfection.

<sup>c</sup> ND, not done.

<sup>d</sup> Dead on day 5.

<sup>e</sup> Uninfected.

the QNRT PCR, GM, and BG assays ( $P < 0.01$  for each comparison). The mean values within the BAL fluid samples for most time points for each assay were also significantly greater than those detected in the serum. Similarly, with BAL fluid, the number of samples positive by QNRT PCR and the mean value at each time point were significantly higher than with whole blood ( $P < 0.05$  for each comparison).

## DISCUSSION

In this study, our QNRT PCR assay proved to be highly sensitive and specific for the detection of *A. fumigatus* in various samples collected from guinea pigs. This approach combines the advan-

tages of nested PCR, which is highly sensitive, and real-time PCR, which may allow the monitoring of disease progression. Our system is highly adaptable, and we have designed primers and probes that specifically target other *Aspergillus* species (data not shown in this study). These assays use the same primers for the first round of PCR, and species-specific oligonucleotides are used in the second round. These primers and probes were not evaluated in the present study, where the causative agent of infection was known. Traditionally discussed problems with nested PCR, i.e., higher rates of false-positive results due to contamination, were solved by DNA isolation and PCR setup in laminar-flow boxes in separate rooms, isolation of water samples with each batch of samples, and use of



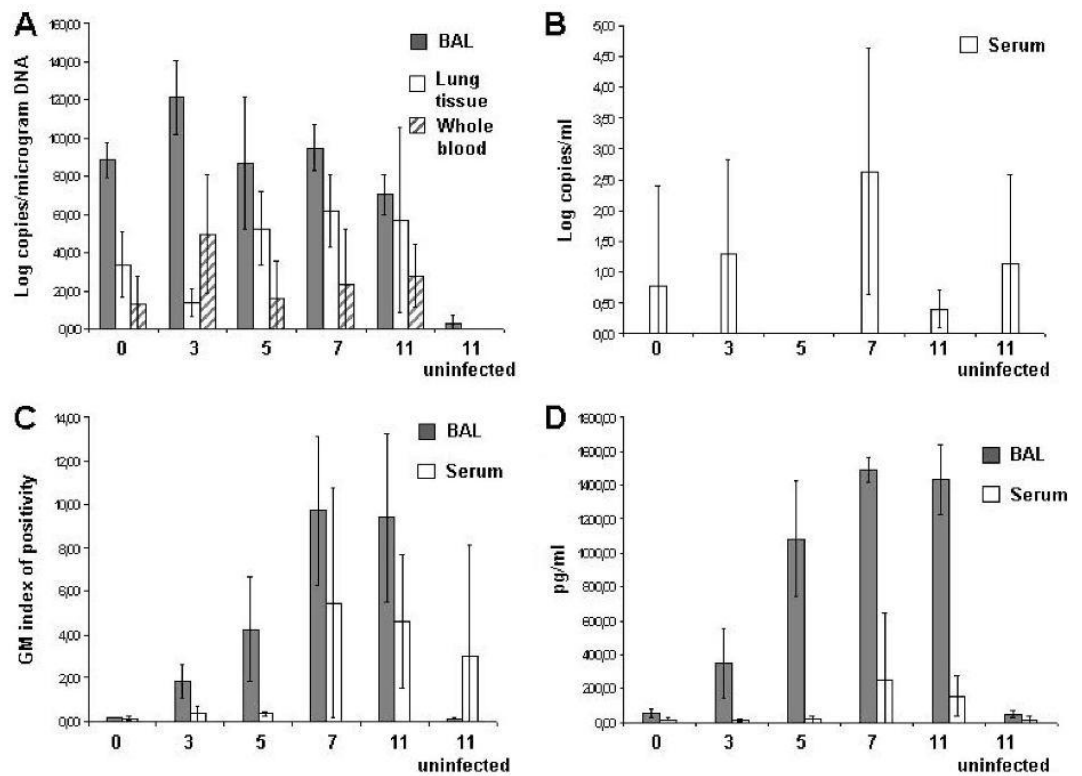


FIG 3 Time courses of fungal burdens as detected by all three methods. Results are presented as means  $\pm$  standard deviations. (A) QNRT PCR detection in BAL fluid (gray), lung tissue (white), and whole blood (dashed boxes). (B) QNTR-PCR detection in serum. (C) GM detection in BAL fluid (gray) and serum (white). (D) BG detection in BAL fluid (gray) and serum (white).

the undiluted PCR product as the template for the second round of PCR amplification. Moreover, the design of the highly *A. fumigatus*-specific oligonucleotides used in the internal round prevented cross-reactivity with airborne fungi.

Generally, the amount of fungal DNA present in clinical samples is very low. Even in patients with proven aspergillosis, DNA copy numbers may be low or PCR  $C_T$  values may be very high and can be at the detection limit of a real-time PCR. In addition, fungal DNA is amplified with a high background of host DNA, which may make the detection of fungal DNA difficult. With our nested PCR assay, the first round of amplification with panfungal primers enriches the fungal DNA fraction and improves the fungal versus nonfungal DNA ratio. Specific oligonucleotides used in the second round can therefore easily find their targets, allowing for more-efficient PCRs (19). The preamplification step enables the detection of very low copy numbers in blood samples. The lower  $C_T$ -values observed with this technique make the PCR assay more robust and reproducible, which is very important in routine diagnostics.

In this study, QNRT PCR detected fungal DNA in all lung tissue samples from infected animals as early as 1 h postinfection; therefore, we conclude that our DNA isolation method is applicable for isolation of fungal DNA from inhaled conidia. GM and BG were not detected at this time point, as the conidia had not yet begun to germinate and form hyphae at this early time point (13,

15). Due to this fact, data obtained from day 0 were excluded from analysis and were not used to calculate sensitivity. At day 3, there was a significant decrease in the fungal burden ( $P < 0.05$ ). Similar results were also observed in other studies where a drop of the fungal burden occurred between day 0 and day 3 when measured by semiquantitative culture (23, 26, 28). This may be due to partial removal of the infecting organism by a residual innate immune system response. At day 5, the fungal burden increased again and remained relatively stable until day 7. Because only 3 samples were taken on day 11 (two animals died prematurely on day 5) and there was high interindividual variability, we cannot assess if the fungal burden increased further or remained stable. However, the relative sensitivity and specificity of the QNRT PCR assay in lung tissue were both 100%.

The samples most suitable for early invasive aspergillosis diagnostics in this study proved to be BAL fluid samples, as they were positive in all infected animals with each assay (QNRT PCR, GM, and BG) beginning on day 3 (Table 3). The relative sensitivity of QNRT PCR, GM, and BG in BAL fluid was therefore 100%, and the specificities were 75%, 100%, and 100%, respectively. Beginning on day 3, the GM data correlated with the BG results (Fig. 3 C and D) (Spearman rank correlation,  $\rho = 0.93$ ;  $P < 0.0001$ ), which is in concordance with the results of other studies (8, 23). Although fungal burdens determined by QNRT PCR were highly

variable, among different animals they remained elevated throughout the duration of the study.

Results from serum and whole blood were more heterogeneous. The sensitivities of the QNRT PCR, GM, and BG in serum were 50%, 39% and 22%, respectively, while specificities ranged from 50% to 100%. PCR detected fungal burdens in all but one sample that were either GM or BG positive. The only serum sample that was negative by PCR but positive by serological methods was from one animal with a very low fungal burden in lung tissue. Two of four serum samples taken from uninfected animals at day 11 were positive by PCR but at very low levels compared to those observed in the infected animals. One of these samples was also positive by GM. Although the cause of this false positive is unknown, it may have been due to cross-contamination during sample collection. The measurement of fungal DNA in individual serum and whole blood samples was at the detection limit of real-time PCR, and there was no correlation between the fungal loads detected in serum and whole blood. Unfortunately, data concerning the health condition of the animals at the time of death were not collected; therefore, we cannot correlate the results of these assays with the physical state of the guinea pigs.

In conclusion, this novel QNRT PCR method is highly sensitive and specific for detection of *A. fumigatus* in different types of samples. With serum and whole blood, QNRT PCR was more sensitive than GM and BG. However, despite a high fungal burden in lung tissue and BAL fluid, serum and whole blood might be negative with the various assays even in advanced stages of disease. Therefore, we conclude that when testing serum, a combination of assays may increase the possibility of early detection of invasive pulmonary aspergillosis, and the results of all methods may not be positive at the same time due to potential differences in the kinetics of antigen and DNA release. With BAL fluid, all three methods were positive throughout the course of the infection, and therefore, BAL fluid samples seem to be the most suitable for early detection of invasive pulmonary aspergillosis. It is highly probable that similar interpatient variability may occur with clinical samples, and this may contribute to the ambiguous interpretation of PCR results and subsequently restrict standardization and use fungal PCR diagnostics in routine clinical practice.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported in part by grants from the Ministry of Health of the Czech Republic (NS10442-3/2009, NS10441-3/2009), the Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic (FR-TI2/254), and NIH/NIAID contract N01-AI-30041.

#### REFERENCES

1. Becker MJ, et al. 2003. Galactomannan detection in computerized tomography-based broncho-alveolar lavage fluid and serum in haematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br. J. Haematol.* 121:448–457.
2. Christie JD. 2003. Diagnosis of invasive mold infection. Is PCR the answer? *Am. J. Clin. Pathol.* 119:38–44.
3. De Pauw B, et al. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin. Infect. Dis.* 46:1813–1821.
4. Espy MJ, et al. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:165–256.
5. Ferns RB. 2006. Evaluation of the role of real-time PCR in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Leuk. Lymphoma* 47:15–20.
6. Francesconi A, et al. 2006. Characterization and comparison of galactomannan enzyme immunoassay and quantitative real-time PCR assay for detection of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluid from experimental invasive pulmonary aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 44:2475–2480.
7. Graybill JR, Kaster SR. 1984. Experimental murine aspergillosis. Comparison of amphotericin B and a new polyene antifungal drug, SCH 28191. *Am. Rev. Respir. Dis.* 129:292–295.
8. Khan ZU, Ahmad S, Theyyathel AM. 2008. Diagnostic value of DNA and (1→3)-D-glucan detection in serum and bronchoalveolar lavage of mice experimentally infected with *Fusarium oxysporum*. 47301-0. *J. Med. Microbiol.* 57:36–42.
9. Klingspor L, Loeffler J. 2009. *Aspergillus* PCR formidable challenges and progress. *Med. Mycol.* 47(Suppl. 1):S241–S247.
10. Maertens J, et al. 2009. Bronchoalveolar lavage fluid galactomannan for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic diseases. *Clin. Infect. Dis.* 49:1688–1693.
11. Meersseman W, et al. 2008. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177:27–34.
12. Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP. 2009. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 9:89–96.
13. Mennink-Kersten MASH, Ruegebrink D, Wasei N, Melchers WJG, Verweij PE. 2006. In vitro release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens, 1,3-[beta]-D-glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 44:1711–1718.
14. Miceli MH, et al. 2008. Strong correlation between serum aspergillus galactomannan index and outcome of aspergillosis in patients with hematological cancer: clinical and research implications. *Clin. Infect. Dis.* 46:1412–1422.
15. Morton CO, et al. 2010. Dynamics of extracellular release of *Aspergillus fumigatus* DNA and galactomannan during growth in blood and serum. *J. Med. Microbiol.* 59:408–413.
16. National Academy of Sciences. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington, DC.
17. Neofytos D, et al. 2009. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin. Infect. Dis.* 48:265–273.
18. Nierman WC, et al. 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438:1151–1156.
19. Nogva HK, Rudi K. 2004. Potential influence of the first PCR cycles in real-time comparative gene quantifications. *Biotechniques* 37:246–248, 250–253.
20. Pagano L, Caira M, Valentini CG, Posteraro B, Fianchi L. 2010. Current therapeutic approaches to fungal infections in immunocompromised hematological patients. *Blood Rev.* 24:51–61.
21. Patterson TF. 2005. The future of animal models of invasive aspergillosis. *Med. Mycol.* 43(Suppl. 1):S115–S119.
22. Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B, Rotter ML, Hirschl AM, Willinger B. 2007. Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 45:906–914.
23. Sheppard DC, et al. 2006. Comparison of three methodologies for the determination of pulmonary fungal burden in experimental murine aspergillosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 12:376–380.
24. Sheppard DC, et al. 2004. Novel inhalational murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1908–1911.
25. Tuon FF. 2007. A systematic literature review on the diagnosis of invasive aspergillosis using polymerase chain reaction (PCR) from bronchoalveolar lavage clinical samples. *Rev. Iberoam. Micol.* 24:89–94.
26. Vallor AC, et al. 2008. Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in pulmonary tissue of guinea pigs by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:2593–2598.
27. Wessa P. 2011. Free statistics software, Office for Research Development and Education, version 1.1.23-r7. <http://www.wessa.net/>.
28. Zhao Y, et al. 2010. Detection of *Aspergillus fumigatus* in a rat model of invasive pulmonary aspergillosis by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *J. Clin. Microbiol.* 48:1378–1383.

Příloha 4: Hrnčirova K., Lengerova M., Kocmanova I., Racil Z., Volfova P., Palousova D., Moulis M., Weinbergerova B., Winterova J., Toskova M., Pospisilova S., Mayer J. Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, roč. 48, č. 9, s. 3392-3394.

## Rapid Detection and Identification of Mucormycetes from Culture and Tissue Samples by Use of High-Resolution Melt Analysis<sup>∇</sup>

Kristyna Hrnčirova,<sup>1\*</sup> Martina Lengerova,<sup>1</sup> Iva Kocmanova,<sup>2</sup> Zdenek Racil,<sup>3</sup> Pavlina Volfova,<sup>1</sup>  
Dita Palousova,<sup>1</sup> Mojmir Moulis,<sup>4</sup> Barbora Weinbergerova,<sup>3</sup> Jana Winterova,<sup>3</sup>  
Martina Toskova,<sup>3</sup> Sarka Pospisilova,<sup>1</sup> and Jiri Mayer<sup>3</sup>

Centre of Molecular Biology and Gene Therapy, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic<sup>1</sup>;  
Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic<sup>2</sup>; Department of  
Internal Medicine—Hematology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno,  
Czech Republic<sup>3</sup>; and Department of Pathology, Masaryk University and  
University Hospital Brno, Brno, Czech Republic<sup>4</sup>

Received 2 June 2010/Accepted 21 June 2010

**We present a method for rapid and simple detection of clinically relevant mucormycetes of the *Mucorales* order in cultures and clinical samples. This seminested real-time PCR uses mucormycete-specific primers and is followed by species identification using high-resolution melt (HRM) analysis. The method is highly suitable for routine clinical diagnostics.**

Invasive infections caused by mucormycetes started to occur more frequently in the last decade and are connected with rapid progression and high mortality rates. Early diagnostics and targeted treatment are crucial. Most mucormycosis cases (over 90%) are caused by *Rhizopus* spp., followed by *Mucor* spp., *Lichtheimia* spp., *Rhizomucor pusillus*, and, rarely, some other species (2, 9, 11, 16).

Definitive diagnosis of mucormycosis is usually made after histopathological proof of mucormycete-like hyphae in involved tissue; the causative agent can be determined only by culture (13). So far, no serological test is available and radiological methods are nonspecific.

Molecular detection of mucormycetes is complicated by several factors, and we still do not have any standard protocol. Few methods for the detection of mucormycetes have been published, and only some have been evaluated using clinical samples (1, 5, 10, 14, 15, 17) or samples from animal models (6, 7).

The aim of this study was to develop a rapid and sensitive technique for the detection and identification of clinically important mucormycetes. We adopted primers from a qualitative method previously published by Bialek et al. (1) that is specific for members of the order *Mucorales* targeting 18S ribosomal DNA (rDNA). We modified it to seminested real-time PCR with EvaGreen dye, followed by species distinction by high-resolution melt (HRM) analysis. HRM analysis uses amplification of DNA in the presence of intercalation dye. Fluorescence is measured during a controlled melting of PCR product that results in a melt curve that depends mainly on GC content, length, and sequence of the PCR product. This simple method

can be used for genotyping or mutation scanning without the need for time-consuming sequencing (4, 12).

DNA was isolated from 50  $\mu$ l of fungal culture (inoculum was prepared by covering sporulating colonies with approximately 2 ml of sterile 0.85% saline) or a piece of fresh tissue (2 by 1 mm) using the ZR fungal/bacterial DNA kit (Zymo Research). Tissue samples were incubated in lysis buffer overnight, and cultures were immediately processed according to the manufacturer's protocol. Disruption was extended to 15 min (Disruptor Genie; Scientific Industries). DNA from formalin-fixed, paraffin wax-embedded (FFPE) tissue samples was isolated from 2 or 3 scrolls (5 to 10  $\mu$ m each) of paraffin block using a DNeasy blood and tissue kit (Qiagen). Paraffin was dissolved in 1 ml of xylene, and then the tissue was washed two times using 1 ml of 96% ethanol and incubated in 180  $\mu$ l of ATL buffer (Qiagen) and 20  $\mu$ l of proteinase K (600 mAU/ml solution, where one mAU represents the activity of proteinase K that releases folin-positive amino acids and peptides corresponding to 1  $\mu$ mol of tyrosine per min) at 55°C overnight and then at 90°C for 1 h. The next steps were done in accordance with the manufacturer's protocol. DNA isolation from clinical samples was done in a biological safety cabinet. An aliquot of sterile water was processed with each set of samples as a control of potential contamination during the isolation process.

Five microliters of DNA was amplified in 25  $\mu$ l of amplification mixture that contained a 0.2  $\mu$ M concentration each of primers ZM1 and ZM2 (1), 120  $\mu$ M deoxynucleoside triphosphates (dNTPs; Roche, Germany), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 $\times$  GeneAmp PCR Gold buffer, and 1.5 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems). The cycling conditions were 10 min at 95°C, 16 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 50°C, and 60 s at 72°C, and 7 min at 72°C. One microliter of PCR product from the external round was then amplified in duplicate using RotorGene 6000 (Corbett Research, Australia). Twenty-five microliters of the amplification mixture contained a 0.4  $\mu$ M concentration each of primers ZM1 and ZM3 (1), 12.5  $\mu$ l of SensiMix HRM, and 1  $\mu$ l of EvaGreen (both from a SensiMix HRM kit; Quantace, United Kingdom). The cycling conditions

\* Corresponding author. Mailing address: Centre of Molecular Biology and Gene Therapy, Department of Internal Medicine—Hematology, University Hospital Brno, Cernopolni 9, 613 00 Brno, Czech Republic. Phone: 420532234641. Fax: 420532234623. E-mail: khrncirova@fnbrno.cz.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 30 June 2010.

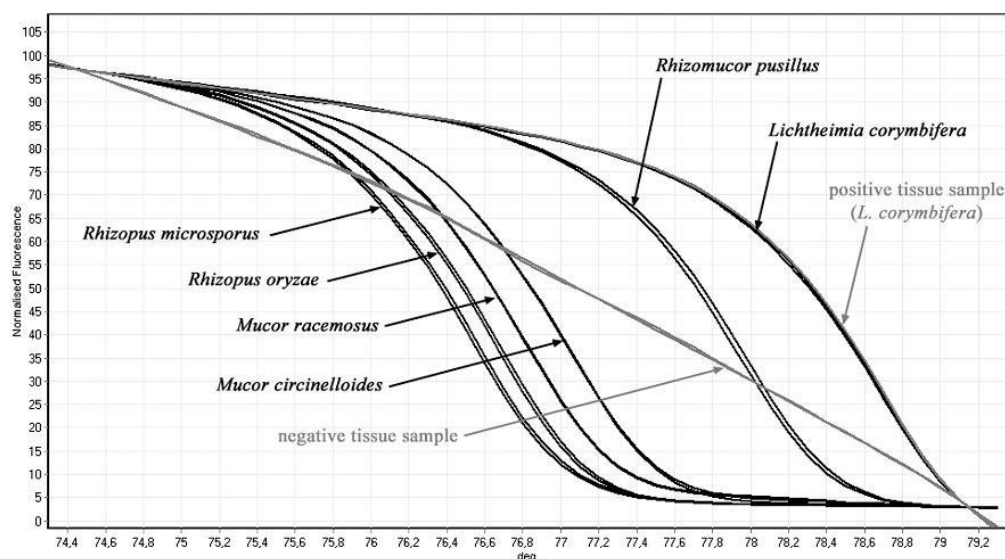


FIG. 1. Representative result of high-resolution melt (HRM) analysis. Shown are HRM curves for six mucormycete isolates (black curves) and one negative and one positive tissue sample (gray curves).

were 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, 20 s at 60°C, and 30 s at 72°C (acquired on the green channel), followed by HRM analysis (ramp from 74°C to 79.5°C, rising by 0.1°C each cycle, acquired on the HRM channel). Rotorgene 6000 series software (version 1.7) was used for analysis of the results. All positive results were confirmed by sequencing of the PCR product. DNA was purified using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany) and sequenced using a BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) on an ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems). Sequences were analyzed using the BLAST alignment program of the GenBank database.

We used DNA extracted from five mucormycete cultures diluted in Tris-EDTA (TE) buffer as positive controls in every run. A DNA isolation control (sterile water processed with clinical samples) and a negative control of PCR (sterile water) were added to each run as well.

In this study, we tested 31 fungal isolates, comprising 10 mucormycete isolates and 21 isolates from other filamentous fungal groups (Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno and Czech Collection of Microorganisms, Czech Republic). All mucormycete isolates were correctly identified. The melting temperatures ( $T_m$ ) for each species were as follows: for *Rhizopus microsporus*, 76.46°C; for *Rhizopus oryzae*, 76.59°C; for *Mucor racemosus*, 76.78°C; for *Mucor circinelloides*, 76.98°C; for *Rhizomucor pusillus*, 77.87°C; and for *Lichtheimia corymbifera*, 78.56°C. Representative HRM curves for six different mucormycetes are shown in Fig. 1. All HRM analysis results were confirmed by sequencing. None of the nonmucormycete fungi were positively tested. The results are summarized in Table 1.

We also tested 12 tissue samples, 7 (6 fresh and 1 FFPE) from patients with histopathologically or culture-proven mucormycosis and 5 (3 fresh and 2 FFPE) from patients without

TABLE 1. List of fungal isolates used in this study and results of HRM analysis<sup>a</sup>

| Organism   | Accession no. or source        | Result of zygomyce HRM analysis |
|--|--------------------------------|---------------------------------|
| <b>Mucormycetes</b>  |                                |                                 |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                                     | Clinical isolate; DCM CCM 8075 | <i>Rhizopus oryzae</i>          |
| <i>Rhizopus sp.</i>  | Clinical isolate; DCM          | <i>Rhizopus oryzae</i>          |
| <i>Rhizopus microsporus</i>                                | Clinical isolate; DCM          | <i>Rhizopus microsporus</i>     |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                                 | CCM F-211                      | <i>Rhizomucor pusillus</i>      |
| <i>Mucor racemosus</i>                                     | CCM 8190                       | <i>Mucor racemosus</i>          |
| <i>Mucor circinelloides</i>                                | Clinical isolate; DCM          | <i>Mucor circinelloides</i>     |
| <i>Lichtheimia corymbifera</i>                             | CCM 8077                       | <i>Lichtheimia corymbifera</i>  |
|  | Clinical isolate; DCM          | <i>Lichtheimia corymbifera</i>  |
|  | Clinical isolate; DCM          | <i>Lichtheimia corymbifera</i>  |
| <b>Other filamentous fungi</b>                             |                                |                                 |
| <i>Fusarium oxysporum</i>                                  | Clinical isolate; DCM          | Negative                        |
|  | Clinical isolate; DCM          | Negative                        |
| <i>Fusarium proliferatum</i>                               | Clinical isolate; DCM          | Negative                        |
| <i>Fusarium solani</i>                                     | CCM 8014                       | Negative                        |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>                               | Clinical isolate; DCM          | Negative                        |
|  | Clinical isolate; DCM          | Negative                        |
| <i>Aspergillus niger</i>                                   | Clinical isolate; DCM          | Negative                        |
|  | CCM 8155                       | Negative                        |
| <i>Aspergillus flavus</i>                                  | CCM 8363                       | Negative                        |
|  | CCM F-171                      | Negative                        |
| <i>Aspergillus terreus</i>                                 | CCM 8082                       | Negative                        |
| <i>Aspergillus ustus</i>                                   | CCM F-414                      | Negative                        |
| <i>Aspergillus nidulans</i> ( <i>nidulans</i> )            | CCM F-266                      | Negative                        |
| <i>Aspergillus sydowii</i>                                 | Environment; DCM               | Negative                        |
| <i>Scedosporium apiospermum</i>                            | Clinical isolate; DCM          | Negative                        |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i>                        | Environment; DCM               | Negative                        |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> f. sp. <i>pisicola</i> | CCM F-348                      | Negative                        |
| <i>Penicillium commune</i>                                 | CCM F-327                      | Negative                        |
| <i>Penicillium brevicompactum</i>                          | CCM 8040                       | Negative                        |
|  | Environment; DCM               | Negative                        |
| <i>Penicillium chrysogenum</i>                             | Environment; DCM               | Negative                        |

<sup>a</sup> CCM, Czech Collection of Microorganisms, Czech Republic; DCM, Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Czech Republic.

TABLE 2. List of tissue samples used in this study and results of HRM analysis

| Patient | Tissue sample | Histopathology result | Culture result                 | HRM analysis result               |
|---------|---------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 1       | Lung          | Positive              | Negative                       | <i>Rhizopus microsporus</i>       |
| 2       | Lung (FFPE)   | Positive              | Negative                       | <i>Rhizomucor pusillus/miehei</i> |
| 3       | Oral cavity   | Positive              | <i>Lichtheimia corymbifera</i> | <i>Lichtheimia corymbifera</i>    |
| 4       | Lung          | Positive              | <i>Rhizopus microsporus</i>    | <i>Rhizopus microsporus</i>       |
| 5       | Lung          | Positive              | <i>Lichtheimia corymbifera</i> | <i>Lichtheimia corymbifera</i>    |
| 6       | Oral cavity 1 | Positive              | <i>Rhizopus microsporus</i>    | <i>Rhizopus microsporus</i>       |
|         | Oral cavity 2 | Positive              | <i>Rhizopus microsporus</i>    | <i>Rhizopus microsporus</i>       |
| 7       | Lung          | Negative              | Negative                       | Negative                          |
| 8       | Lung          | Negative              | Negative                       | Negative                          |
| 9       | Lung (FFPE)   | Negative              | Negative                       | Negative                          |
| 10      | Lung          | Negative              | Negative                       | Negative                          |
| 11      | Lung (FFPE)   | Negative              | Negative                       | Negative                          |

mucormycosis (obtained from hemato-oncological patients from University Hospital Brno, Czech Republic). All seven tissue samples from patients with proven mucormycosis were PCR positive, and in all cases, we were able to directly determine the mucormycete species: *R. microsporus* ( $n = 4$ ), *L. corymbifera* ( $n = 2$ ), and *R. pusillus/miehei* (these two species have 100% sequence homology in the target region and therefore cannot be distinguished;  $n = 1$ ). All five tissue samples from patients without mucormycosis were negative. Results are summarized in Table 2, and representative HRM analysis curves are shown in Fig. 1. Amplification of fragmented DNA from FFPE samples can be problematic (8). In this study, we tested one FFPE tissue from a patient with proven mucormycosis, and the result was positive.

The sensitivity of the method was assessed by amplification of dilutions ( $2 \times 10^7$  to  $2 \times 10^0$  copies/5  $\mu$ l) of plasmid DNA (external PCR products of *R. pusillus* and *L. corymbifera* cloned into the pCR2.1 vector; Invitrogen). Reproducible melt curves were obtained for concentrations up to 0.1 fg of plasmid DNA, the detection limit corresponding to the original qualitative method (1), in both species.

To assess potential PCR inhibition, human albumin gene was detected by real-time PCR (3) in all tissue samples. No inhibition was observed.

In conclusion, the HRM assay presented is very simple and enables rapid and accurate detection and identification of mucormycetes in tissue samples and culture isolates. It is able to distinguish the main clinically relevant mucormycetes and shows no cross-reactivity with nonmucormycete filamentous fungi. It is highly sensitive and specific and is suitable for routine clinical diagnostics. Its potential for use in diagnostics with other clinical materials, such as bronchoalveolar lavage fluid, sputum, etc., needs further study but is evident.

**Nucleotide sequence accession numbers.** Sequences of products from the internal round of PCR were deposited in GenBank under the following accession numbers: for *Rhizopus microsporus*, HM234125; for *Rhizopus oryzae*, HM234126; for *Mucor racemosus*, HM234127; for *Rhizomucor pusillus*, HM234128; for *Lichtheimia corymbifera*, HM234129; and for *Mucor circinelloides*, HM234130.

This study was supported by grants from the Ministry of Health of the Czech Republic (NS10442-3/2009 and NS10441-3/2009).

#### REFERENCES

- Bialek, R., F. Konrad, J. Kern, C. Aepinus, L. Cecenas, G. M. Gonzalez, G. Just-Nubling, B. Willinger, E. Presterl, C. Lass-Flörl, and V. Rickerts. 2005.

- PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. *J. Clin. Pathol.* **58**:1180–1184.
- Chayakulkeeree, M., M. A. Ghannoum, and J. R. Perfect. 2006. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**:215–229.
- Chiu, R. W. K., M. F. Murphy, C. Fidler, B. C. Y. Zee, J. S. Waincoat, and Y. M. D. Lo. 2001. Determination of RhD zygosity: comparison of a double amplification refractory mutation system approach and a multiplex real-time quantitative PCR approach. *Clin. Chem.* **47**:667–672.
- Erali, M., K. V. Voelkerding, and C. T. Wittwer. 2008. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp. Mol. Pathol.* **85**:50–58.
- Hata, D. J., S. P. Buckwalter, B. S. Pritt, G. D. Roberts, and N. L. Wengenack. 2008. Real-time PCR method for detection of zygomycetes. *J. Clin. Microbiol.* **46**:2353–2358.
- Ibrahim, A. S., J. C. Bowman, V. Avanesian, K. Brown, B. Spellberg, J. E. Edwards, Jr., and C. M. Douglas. 2005. Caspofungin inhibits *Rhizopus oryzae* 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase, lowers burden in brain measured by quantitative PCR, and improves survival at a low but not a high dose during murine disseminated zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:721–727.
- Kasai, M., S. M. Harrington, A. Francesconi, V. Petraitis, R. Petraitiene, M. G. Beveridge, T. Knudsen, J. Milanovich, M. P. Cotton, J. Hughes, R. L. Schaufele, T. Sein, J. Bacher, P. R. Murray, D. P. Kontoyiannis, and T. J. Walsh. 2008. Detection of a molecular biomarker for zygomycetes by quantitative PCR assays of plasma, bronchoalveolar lavage, and lung tissue in a rabbit model of experimental pulmonary zygomycosis. *J. Clin. Microbiol.* **46**:3690–3702.
- Lehmann, U., and H. Kreipe. 2001. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods* **25**:409–418.
- Malani, A. N., and C. A. Kauffman. 2007. Changing epidemiology of rare mould infections: implications for therapy. *Drugs* **67**:1803–1812.
- Nagao, K., T. Ota, A. Tanikawa, Y. Takae, T. Mori, S. Udagawa, and T. Nishikawa. 2005. Genetic identification and detection of human pathogenic *Rhizopus* species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of rRNA gene. *J. Dermatol. Sci.* **39**:23–31.
- Pfaller, M. A., P. G. Pappas, and J. R. Wingard. 2006. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin. Infect. Dis.* **43**:S3–S14.
- Reed, G. H., J. O. Kent, and C. T. Wittwer. 2007. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* **8**:597–608.
- Ribes, J. A., C. L. Vanover-Sams, and D. J. Baker. 2000. Zygomycetes in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**:236–301.
- Rickerts, V., G. Just-Nubling, F. Konrad, J. Kern, E. Lambrecht, A. Bohme, V. Jacobi, and R. Bialek. 2006. Diagnosis of invasive aspergillosis and mucormycosis in immunocompromised patients by seminested PCR assay of tissue samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**:8–13.
- Rickerts, V., S. Mousset, E. Lambrecht, K. Tintelnot, R. Schwerdtfeger, E. Presterl, V. Jacobi, G. Just-Nubling, and R. Bialek. 2007. Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens. *Clin. Infect. Dis.* **44**:1078–1083.
- Roden, M. M., T. E. Zaoutis, W. L. Buchanan, T. A. Knudsen, T. A. Sarkisova, R. L. Schaufele, M. Sein, T. Sein, C. C. Chiou, J. H. Chu, D. P. Kontoyiannis, and T. J. Walsh. 2005. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin. Infect. Dis.* **41**:634–653.
- Spiess, B., W. Seifarth, M. Hummel, O. Frank, A. Fabarius, C. Zheng, H. Morz, R. Hehlmann, and D. Buchheidt. 2007. DNA microarray-based detection and identification of fungal pathogens in clinical samples from neutropenic patients. *J. Clin. Microbiol.* **45**:3743–3753.

Příloha 5: Lengerova M., Racil Z., Hrnčířová K., Kocmanová I., Volfová P., Říčná D., Bejda P., Moulis M., Pavlovský Z., Weinbergerová B., Tusková M., Mayer J. Rapid detection and identification of mucormycetes in bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients with pulmonary infiltrates by use of high-resolution melt analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, roč. 52, č. 8, s. 2824-2828.

## Rapid Detection and Identification of Mucormycetes in Bronchoalveolar Lavage Samples from Immunocompromised Patients with Pulmonary Infiltrates by Use of High-Resolution Melt Analysis

Martina Lengerova,<sup>a,b,c</sup> Zdenek Racil,<sup>a,b,c</sup> Kristyna Hrcirova,<sup>a</sup> Iva Kocmanova,<sup>d</sup> Pavlina Volfova,<sup>a</sup> Dita Ricna,<sup>a</sup> Petr Bejdak,<sup>a</sup> Mojmir Moulis,<sup>e</sup> Zdenek Pavlovsky,<sup>e</sup> Barbora Weinbergerova,<sup>a</sup> Martina Toskova,<sup>a</sup> Jiri Mayer<sup>a,b,c</sup>

Department of Internal Medicine—Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic<sup>a</sup>; Department of Internal Medicine—Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic<sup>b</sup>; CEITEC—Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic<sup>c</sup>; Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic<sup>d</sup>; Department of Pathology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic<sup>e</sup>

Rapid differential diagnostics of pulmonary infiltrates suspected of invasive fungal disease in an immunocompromised host and early initiation of effective antifungal therapy are crucial for patient outcomes. There are no serological tests available to detect mucormycetes; therefore, PCR-based methods are highly suitable. We validated our previously published PCR followed by high-resolution melt analysis (PCR/HRMA) to detect *Rhizopus* spp., *Rhizomucor pusillus*, *Lichtheimia corymbifera*, and *Mucor* spp. in bronchoalveolar lavage (BAL) samples from immunocompromised patients who were at risk of invasive fungal disease. All PCR/HRMA-positive samples were retested using novel real-time quantitative PCR (RQ PCR) assays specific to the species identified. In total, between January 2009 and December 2012 we analyzed 99 BAL samples from 86 patients with pulmonary abnormalities using PCR/HRMA. Ninety (91%) BAL samples were negative, and 9 (9%) samples were positive. The sensitivity and specificity of PCR/HRMA were 100% and 93%, respectively. By combining the positive results of PCR/HRMA with positive RQ PCR results, the specificity was raised to 98%. PCR/HRMA, due to its high negative predictive value (99%), represents a fast and reliable tool for routine BAL sample screening for the differential diagnosis of pulmonary infiltrates in immunocompromised patients for the four most clinically important mucormycetes.

Invasive mucormycosis (IM), characterized by rapid progression, high morbidity, and mortality, is a serious infectious complication in patients with a hematological malignancy (1). More than 90% of cases are caused by *Rhizopus oryzae* (or *Rhizopus microsporus*), followed by *Mucor* species, *Lichtheimia corymbifera*, and *Rhizomucor pusillus* and rarely by some other mucormycetes (2, 3).

Early diagnosis and a prompt start of targeted IM antifungal therapy are crucial for successful patient outcomes. However, definitive diagnosis of these infections in routine clinical practice is very difficult, and the diagnosis is often not confirmed until there is histological proof of mucormycete-like elements in affected tissues or positive cultures (4, 5).

Contrary to invasive aspergillosis diagnosis, where a large number of attempts were made to detect galactomannan, both in serum and bronchoalveolar lavage (BAL) samples, no such serological test is available for mucormycetes. Even  $\beta$ -D-glucan, when used as a panfungal antigen, is negative in IM.

Therefore, one of the most promising tools for early mucormycete detection is the use of molecular methods, mainly various PCR modifications. Until now, only a limited number of mucormycete-specific PCR methods have been published. Moreover, only some of them allow the quantification of the fungal DNA load in samples (6–10), which can be important to differentiate between a real infection and contamination/colonization of the sample/patient.

We recently introduced a semiquantitative method for the specific detection of mucormycetes in tissue samples using high-resolution melt analysis (HRMA) (11). This method is based on amplification of DNA with specific primers in the presence of an intercalating dye. After PCR, the change in fluorescence is mea-

sured during controlled melting of the PCR product. The shape of the melting curve depends mainly on the GC content, length, and sequence of the PCR product. The ability of this method to detect and identify the most common pathogenic species has been proven in both cultures and tissue samples. Since this technique is very fast and suitable for routine testing, it might be an ideal tool for screening clinical samples from immunocompromised patients who are at risk of IM.

The most frequent manifestation of IM in this patient group is pulmonary disease; however, obtaining lung tissue samples (e.g., by fine-needle biopsy) can be accompanied by serious complications (bleeding and pneumothorax). Therefore, bronchoscopy with BAL is routinely used for the differential diagnosis of pulmonary abnormalities.

The aim of this study was to validate PCR/HRMA for the screening of BAL samples from hematological malignancy patients with pulmonary infiltrates and assess the clinical relevance of mucormycete detection in BAL. Moreover, we designed new species-specific real-time quantitative PCR (RQ PCR) assays for the most clinically relevant mucormycetes (*R. oryzae*, *R. microspo-*

Received 4 March 2014 Returned for modification 16 April 2014

Accepted 15 May 2014

Published ahead of print 21 May 2014

Editor: G. A. Land

Address correspondence to Martina Lengerova, mlengerova@fnbrno.cz.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00637-14



TABLE 1 Demographic characteristics

| Characteristic <sup>a</sup>             | No. of patients |
|---|-----------------|
| Male                                    | 50              |
| Female                                  | 36              |
| AML                                     | 33              |
| CLL                                     | 10              |
| ALL                                     | 9               |
| HL                                      | 3               |
| HCL                                     | 3               |
| CML                                     | 1               |
| MM                                      | 9               |
| NHL                                     | 12              |
| Other                                   | 6               |
| Allogeneic unrelated HSCT               | 17              |
| Autologous HSCT                         | 7               |
| Induction/reinduction of acute leukemia | 25              |
| Consolidation of acute leukemia         | 6               |
| Chemotherapy                            | 12              |
| Other therapy                           | 9               |
| No therapy                              | 10              |

<sup>a</sup> AML, acute myeloid leukemia; CLL, chronic lymphocytic leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; HL, Hodgkin's lymphoma; HCL, hairy cell leukemia; CML, chronic myeloid leukemia; MM, multiple myeloma; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation.

*rus*, *Mucor* spp., *R. pusillus*, and *L. corymbifera*), which were used to quantify the fungal load in positive samples.

## MATERIALS AND METHODS

**Mucormycete isolates.** Mucormycete isolates were obtained from the Czech Collection of Microorganisms (CCM), Czech Republic (*Absidia* [*Lichtheimia*] *corymbifera*, CCM8077; *Mucor racemosus*, CCM8190; *Rhizomucor pusillus*, CCMF-211; and *Rhizopus oryzae*, CCM8075) and culture-positive clinical specimens from the Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Czech Republic (2 *Lichtheimia corymbifera*, 3 *Rhizopus microsporus*, 2 *Rhizopus oryzae*, and 1 *Mucor circinelloides*). Fungal cultures were grown for 5 days, and spores were harvested by scraping the agar surfaces of Petri dishes using a sterile microbiological loop, transferred to 1 ml of 0.9% sodium chloride solution, and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Clinical samples.** Baseline patient population characteristics are summarized in Table 1. Overall, we tested 99 samples from 86 patients. All patients provided informed consent before the BAL procedure, and the institutional review board approved the study. The samples were processed immediately or stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Fungal DNA isolation.** DNA was isolated from the clinical samples in a biological safety cabinet in a separate laboratory. An aliquot of sterile water was processed with each set of samples as a control for potential contamination during the isolation process. Before the isolation step, samples were thawed for 30 min at room temperature, and DNA was isolated from 50  $\mu\text{l}$  of fungal inoculum or 2 ml of BAL fluid using a ZR fungal/bacterial kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). The sample vortexing time with glass beads was extended from 5 to 15 min, and DNA was eluted with 100  $\mu\text{l}$  of elution buffer as described previously (11).

**Detection of the human albumin gene.** To verify the DNA isolation process, the human albumin gene was detected in each sample. Quantitative PCR was carried out in a total volume of 25  $\mu\text{l}$  containing 2 $\times$  Absolute QPCR mix (Thermo Scientific, UK), 400 nM each primer, 200 nM TaqMan probe, and 5  $\mu\text{l}$  of genomic DNA. PCR was performed as follows: 95 $^{\circ}\text{C}$  for 10 min, followed by 50 cycles of 95 $^{\circ}\text{C}$  for 15 s and 60 $^{\circ}\text{C}$  for 1 min (12). Samples with negative albumin amplification were excluded from the analysis. All clinical samples were analyzed in duplicate.

**PCR/HRMA.** PCR amplification was carried out in seminested PCRs followed by HRMA using the protocol described previously (11). Samples

were analyzed in duplicate. DNA extracted from 5 mucormycete strains (*R. microsporus*, *R. oryzae*, *M. racemosus*, *R. pusillus*, and *L. corymbifera*), at a 100 $\times$  dilutions in TE buffer (10 mM Tris-Cl, 0.1 mM disodium EDTA [pH 8]), was used as a positive control in every run. A sample was considered positive if at least one parallel PCR produced a melting curve that was different from that of the negative sample. Rotor-Gene 6000 series software (version 1.7) was used to analyze the results.

**RQ PCR assays.** We designed new species-specific real-time PCR assays (targeting the internal transcribed spacer 2 [ITS2] region of ribosomal DNA) with Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems, USA). The sequences of primers and probes, the sequences used as a template, and the lengths of the PCR products are summarized in Table 2. Due to the intraspecies sequence variability among *Lichtheimia* isolates, it was necessary to design two different assays. Five microliters of isolated DNA was amplified in duplicate in 25  $\mu\text{l}$  of amplification mixture that contained 12.5  $\mu\text{l}$  of 2 $\times$  Absolute QPCR ROX mix (Thermo Scientific, UK), 400 nM primers, and a 200 nM TaqMan MGB probe (for the list of primers and probes used for each assay, see Table 2). Cycling conditions were 15 min at 95 $^{\circ}\text{C}$  for 50 cycles (15 s at 95 $^{\circ}\text{C}$  and 60 s at 60 $^{\circ}\text{C}$ , with acquisition on the green and yellow channels) on the Rotor-Gene 6000. *Mucor* and *Rhizomucor* assays were run as multiplex PCRs. Sterile water (B. Braun, Germany) was used as a no-template control (NTC) in each run. Rotor-Gene 6000 series software (version 1.7) was used to analyze the results. Quantification was done using a standard curve; 5  $\mu\text{l}$  of PCR product was cloned into plasmid vector pCR 2.1 (Invitrogen, USA) in 10 $\times$  dilutions from 2 $\times$  10<sup>6</sup> to 2 $\times$  10<sup>0</sup> copies of plasmid DNA/5  $\mu\text{l}$ .

**Statistical analysis.** The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and positive and negative likelihood ratios were calculated using MedCalc for Windows (online version 12.7.0; MedCalc Software, Ostend, Belgium [[http://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](http://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php)]). The criteria for a positive test were PCR/HRMA positive only or both PCR/HRMA and RQ PCR positive.

## RESULTS

We adopted a previously published nested PCR (6) that is targeted to a conservative part of the mucormycete genome and replaced sequencing of the PCR product, which was necessary for species identification using HRMA. As we described in our previous study (11), each of the mucormycete species produces a unique curve shape, and PCR products melt at defined temperatures. Representative results of mucormycete-positive and -negative BAL samples are presented in Fig. 1.

**In vitro standardization.** The sensitivity of PCR/HRMA and individual RQ PCR assays was tested on serially diluted genomic DNA isolated from mucormycete cultures. The last dilution detected using both PCR/HRMA and RQ PCR contained 1 fg of genomic DNA (<1 genome). The linear dynamic range of the RQ PCR assays was initially assessed using a dilution series of genomic DNA of all species. The assays were shown to be linear over the entire range of 1 ng/ $\mu\text{l}$  to 1 fg/ $\mu\text{l}$ .

**Testing clinical samples.** In this study, we analyzed 99 BAL samples from 86 patients using PCR/HRMA. Ninety BAL samples were negative; 9 samples were positive (Table 3). None of the samples presented inhibition, and negative controls were never amplified. Species detected using PCR/HRMA were *Rhizopus* spp. (6 samples), *Rhizomucor pusillus* (2 samples), and *Lichtheimia corymbifera* (1 sample). This is in agreement with previously published data, because *Rhizopus* spp. are considered to be the most frequent causes of IM.

Two BAL samples (belonging to two patients with proven IM) were clearly positive (the melting curve was a copy of the one from the positive control, and all parallel reactions were positive). The other 7 samples were marked as weakly positive (the melting curve

TABLE 2 Sequences of primers and TaqMan MGB probes (5' to 3') of assays used in this study

| Target species                           | Primers and probe  | Sequence (5' → 3')  | Query sequence (GenBank accession no.) | PCR product length (bp) |
|--|--|---|--|-------------------------|
| <i>Rhizopus microsporus</i>              | Forward primer<br>Reverse primer<br>MGB <sup>a</sup> probe | TTCGTGAATCATCGAGTCTTTGA<br>AGCAAGCGTACTCTATAGAAGATCCA<br>6-FAM-CGCAGCTTGCCTCT-MGBNFQ <sup>b</sup> | DQ119010.1                             | 66                      |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                   | Forward primer<br>reverse primer<br>MGB probe              | AGCAAAGTGCATAACTAGTGTGAA<br>TGAAGCAGGCGTACTCTATAGAAAAA<br>6-FAM-CGCAGCTTGCCTCT-MGBNFQ             | DQ119031.1                             | 102                     |
| <i>Mucor</i> spp.                        | Forward primer<br>Reverse primer<br>MGB probe              | GCAACTTGCCTCATTGGTA<br>GGATAGAGGGTTGTTTTGATACTGAA<br>6-FAM-CCAATGAGCACGCCTG-MGBNFQ                | DQ118996.1                             | 66                      |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>               | Forward primer<br>Reverse primer<br>MGB probe              | CCGTTCAAGCTACCCGAACA<br>AATGCAAAGCCCTCAAGGAAA<br>6-VIC-TTTGTATGTTGTTGACCCTTG-MGBNFQ               | DQ119000.1                             | 65                      |
| <i>Lichtheimia corymbifera</i> (assay 1) | Forward primer 1<br>Reverse primer 1<br>MGB probe 1        | TTCAGTTGCTGTCATGGCCTTA<br>CATCCGGCAAATGACTAAAGC<br>6-FAM-ATACATTTAGTCTTAGGCAATT-MGBNFQ            | FJ713084.1                             | 67                      |
| <i>Lichtheimia corymbifera</i> (assay 2) | Forward primer 2<br>Reverse primer 2<br>MGB probe 2        | GTTGAGTTGGAAGTGGCTTCT<br>AGGACATTGATTTAAGGCCATGA<br>6-FAM-TTGATGGCAITTAGTTGCT-MGBNFQ              | DQ118983.1                             | 67                      |

<sup>a</sup> MGB, minor-groove binder.

<sup>b</sup> 6-FAM, 6-carboxyfluorescein; MGBNFQ, minor-groove binder nonfluorescent quencher.

was present but diverted slightly from the positive control, and/or amplification was not present in all parallel reactions from the same sample).

Retrospective analysis of medical records was performed, and these cases were not classified as IM, but 2 were classified as pos-

sible invasive fungal disease (IFD) according to the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group [EORTC/MSG] criteria (13), 4 as other infections (3 as bacterial pneumonia and 1 as *Pneumocystis pneumonia* [PCP]), and 1 as a noninfectious process. Most cases of false positivity of

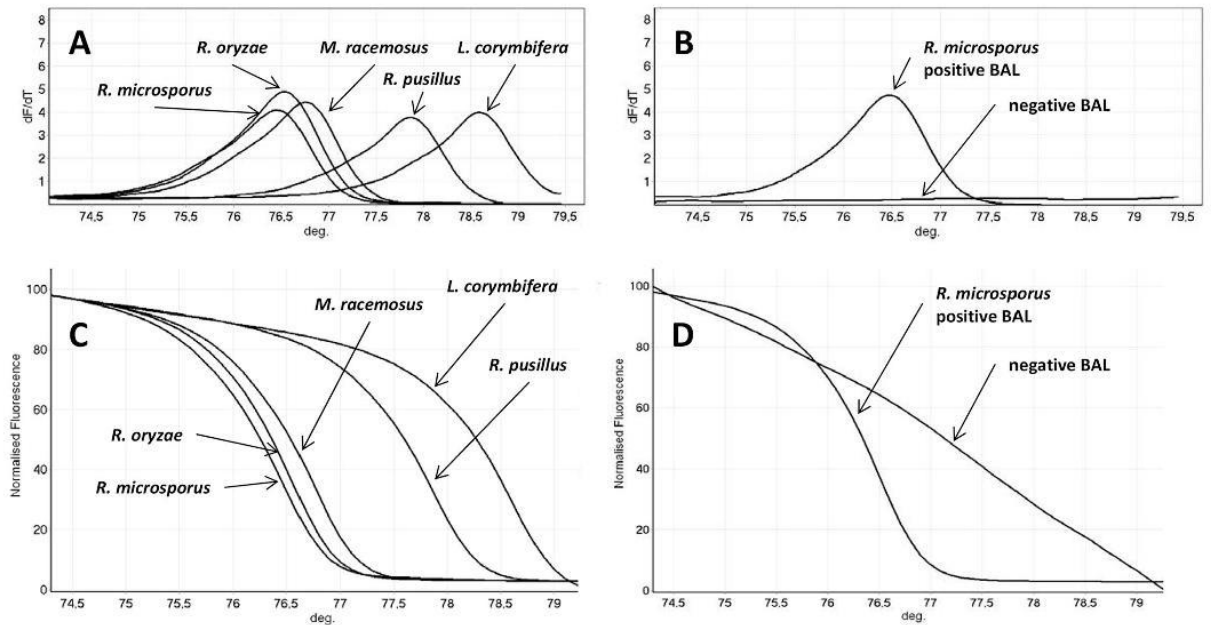


FIG 1 Representative results for HRMA: melting curves of 5 mucormycete isolates (A and C) and positive/negative BAL samples (B and D).

TABLE 3 Summary of cases with positive PCR/HRMA

| Patient no. | Date (day-mo-yr) | Underlying disease <sup>a</sup> | Therapy <sup>b</sup>  | Results of PCR/HRMA | Species detected by PCR/HRMA   | Results of RQ PCR <sup>c</sup> | C <sub>T</sub> <sup>d</sup> | Clinical diagnosis <sup>e</sup> |
|-------------|------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| 1           | 29-3-2011        | AML                             | Induction/reinduction | Weakly positive     | <i>Rhizopus</i> spp.           | Negative                       | NA                          | Bacterial pneumonia             |
| 2           | 28-3-2012        | MM                              | Autologous HSCT       | Weakly positive     | <i>Rhizopus</i> spp.           | Negative                       | NA                          | Possible IFD                    |
| 3           | 23-6-2009        | HL                              | CHT                   | Weakly positive     | <i>Lichtheimia corymbifera</i> | Positive                       | 38.2                        | Bacterial pneumonia             |
| 4           | 30-4-2012        | NHL                             | No therapy            | Weakly positive     | <i>Rhizopus</i> spp.           | Negative                       | NA                          | Bacterial pneumonia             |
| 5           | 19-3-2009        | AML                             | Consolidation         | Weakly positive     | <i>Rhizomucor pusillus</i>     | Negative                       | NA                          | Possible IFD                    |
| 6           | 20-2-2009        | ALL                             | Induction/reinduction | Positive            | <i>Rhizopus</i> spp.           | Positive                       | 24.9                        | Proven mucormycosis             |
| 7           | 5-1-2009         | HCL                             | Other                 | Weakly positive     | <i>Rhizopus</i> spp.           | Negative                       | NA                          | Pulmonary fibrosis              |
| 8           | 7-10-2009        | NHL                             | CHT                   | Weakly positive     | <i>Rhizopus</i> spp.           | Positive                       | 34.1                        | PCP                             |
| 9           | 25-4-2012        | HCL                             | CHT                   | Positive            | <i>Rhizomucor pusillus</i>     | Positive                       | 31.6                        | Proven mucormycosis             |

<sup>a</sup> AML, acute myeloid leukemia; MM, multiple myeloma; HL, Hodgkin's lymphoma; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; ALL, acute lymphoblastic leukemia; HCL, hairy cell leukemia.

<sup>b</sup> HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; CHT, chemotherapy.

<sup>c</sup> RQ PCR, real-time quantitative PCR.

<sup>d</sup> C<sub>T</sub>, cycle threshold; NA, not applicable.

<sup>e</sup> IFD, invasive fungal disease; PCP, *Pneumocystis pneumonia*.

the PCR/HRMA test were thus associated with other ongoing infections. Patients with possible IFD did not respond to the initial treatment with antibiotics; therefore, antimycotic drugs (1 patient treated with micafungin [Mycamine] and 1 with amphotericin B) were empirically added, and the patients recovered. The patients classified as having bacterial pneumonia received only antibiotic therapy according to culture findings and recovered. PCP pneumonia was treated successfully with high-dose trimethoprim-sulfamethoxazole.

All PCR/HRMA-positive samples were retested using real-time PCR specific to the species identified; 2/2 (100%) samples from patients with proven IM were positive, and only 2/7 (29%) samples from patients without proven IM were also positive with RQ PCR.

Results for basic statistical parameters were calculated and are presented in Table 4. The two methods showed excellent sensitivity, specificity, and negative predictive value. The combination of PCR/HRMA with species-specific RQ PCR raised the specificity to 98%.

## DISCUSSION

The differential diagnosis of fungal pulmonary infections remains challenging, although the early initiation of effective treatment clearly impacts patient outcomes (14). Millon et al. (15) recently published a strategy based on monitoring the mucormycete DNA in serum samples from patients with histopathologically proven IM. Testing serum samples is very convenient, but due to the low

amount of circulating fungal DNA, the positivity of serum samples can be expected only in advanced stages of the disease.

In this study, we evaluated the use of PCR/HRMA to screen BAL samples in which higher loads of the pathogen might be expected. In general, the use of PCR/HRMA was significantly simpler, and the diagnostic results were obtained faster than with the original protocol that consisted of nested PCR and sequencing. We can obtain the results in about 5 h from sample receipt at the laboratory, including the time necessary for DNA isolation.

Our PCR/HRMA showed an excellent NPV (100%). Therefore, a negative test result can virtually rule out an IM diagnosis, and empirically used amphotericin B therapy might be switched to less toxic drugs.

Overall, only 9/99 (9%) BAL samples in our study were PCR/HRMA positive, making it a very useful screening test for testing these nonsterile clinical samples. If patients were treated for IM based on PCR/HRMA positivity, in 4 patients (proven IM or possible IFD), the treatment would be correct, and in only 5/99 (5%) patients (without IFD) would it lead to possible overtreatment. Taking into consideration the lack of a specific diagnostic method and the risk of rapid progression and high mortality due to IM, preemptive treatment based on our results is more than clinically acceptable.

Moreover, the quantification of fungal load with species-specific RQ PCRs is supposed to distinguish contamination or colonization of the airways from an ongoing infection. In this study, RQ PCR increased the specificity and positive predictive value. The discrepancy between PCR/HRMA and RQ PCR results giving low positive samples can be explained by the very low amount of fungal DNA present at the detection limits of both assays, which could be identified with a higher probability with a seminested PCR/HRMA than with a single-round RQ PCR. Moreover, in low positive samples, the primers used in this study coamplify human DNA (present in excess), and this causes distortion of the melting curve (proved by sequencing; data not shown). We suppose that after testing a larger cohort of patients with more IM cases, we will be able to set a threshold (threshold cycle [C<sub>T</sub>] value) coupled with IM, which would further increase the positive predictive value.

The main limitation of our study is the low prevalence of the disease (<2.5%) in our cohort; however, this is the limitation of all single-center studies focusing on differential diagnosis of pul-

TABLE 4 Sensitivity, specificity, PPV, and NPV of the tests using various parameters<sup>a</sup>

| Measure                   | % (95% CI <sup>b</sup> ) of samples PCR/HRMA positive only | % (95% CI) of samples PCR/HRMA and RQ PCR positive |
|---------------------------|--|--|
| Sensitivity               | 100 (19.29–100.00)   | 100 (19.29–100)                                    |
| Specificity               | 93 (85.69–97.04)   | 98 (92.73–99.69)                                   |
| PPV                       | 22 (3.47–59.94)  | 50 (8.30–91.7)                                     |
| NPV                       | 100 (95.94–100)  | 100 (96.15–100)                                    |
| Positive likelihood ratio | 13.86 (6.79–28.29)   | 48.5 (12.3–191.16)                                 |
| Negative likelihood ratio | 0 (NA)   | 0 (NA)   |

<sup>a</sup> PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

<sup>b</sup> CI, confidence interval; NA, not applicable.

monary infections in hematological malignancy patients. The utility of the methods to diagnose IM should be tested on a larger panel of clinical samples or probably more likely on an animal model of IM.

In conclusion, we suggest that PCR/HRMA is a fast and reliable tool for routine screening of BAL samples for the differential diagnosis of pulmonary infiltrates in immunocompromised patients. Specific real-time PCR assays might be used to confirm positive results, to quantify the fungal load, or to monitor the response to therapy in patients with proven or probable IM.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministry of Health, Czech Republic—conceptual development of research organization (FNBr grant 65269705) and project CZ.1.05/1.1.00/02.0068.

#### REFERENCES

- Pagano L, Akova M, Dimopoulos G, Herbrecht R, Drgona L, Blijlevens N. 2011. Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 66(suppl 1):i5–i14. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq437>.
- Chayakulkeeree M, Ghannoum MA, Perfect JR. 2006. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25:215–229. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-006-0107-1>.
- Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. 2006. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin. Infect. Dis.* 43:S3–S14. <http://dx.doi.org/10.1086/504490>.
- Lass-Flörl C. 2009. Zygomycosis: conventional laboratory diagnosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 15(suppl 5):S60–S65. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02999.x>.
- Pagano L, Offidani M, Fianchi L, Nosari A, Candoni A, Piccardi M, Corvatta L, D'Antonio D, Girmenia C, Martino P, Del Favero A, GIMEMA (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto) Infection Program. 2004. Mucormycosis in hematologic patients. *Haematologica* 89:207–214. <http://www.haematologica.org/content/89/2/207.long>.
- Bialek R, Konrad F, Kern J, Aepinus C, Cecenas L, Gonzalez GM, Just-Nübling G, Willinger B, Presterl E, Lass-Flörl C, Rickerts V. 2005. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. *J. Clin. Pathol.* 58: 1180–1184. <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2004.024703>.
- Francesconi A, Kasai M, Harrington SM, Beveridge MG, Petraitis R, Petraitis V, Schaufele RL, Walsh TJ. 2008. Automated and manual methods of DNA extraction for *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* analyzed by quantitative real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 46:1978–1984. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02246-07>.
- Hata DJ, Buckwalter SP, Pritt BS, Roberts GD, Wengenack NL. 2008. Real-time PCR method for detection of zygomycetes. *J. Clin. Microbiol.* 46:2353–2358. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02331-07>.
- Ibrahim AS, Bowman JC, Avanesian V, Brown K, Spellberg B, Edwards JE, Douglas CM. 2005. Caspofungin inhibits *Rhizopus oryzae* 1,3-beta-D-glucan synthase, lowers burden in brain measured by quantitative PCR, and improves survival at a low but not a high dose during murine disseminated zygomycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:721–727. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.2.721-727.2005>.
- Kasai M, Harrington SM, Francesconi A, Petraitis V, Petraitis R, Beveridge MG, Knudsen T, Milanovich J, Cotton MP, Hughes J, Schaufele RL, Sein T, Bacher J, Murray PR, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. 2008. Detection of a molecular biomarker for zygomycetes by quantitative PCR assays of plasma, bronchoalveolar lavage, and lung tissue in a rabbit model of experimental pulmonary zygomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 46:3690–3702. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00917-08>.
- Hrncirova K, Lengerova M, Kocmanova I, Racil Z, Volfova P, Palousova D, Moulis M, Weinbergerova B, Winterova J, Toskova M, Pospisilova S, Mayer J. 2010. Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. *J. Clin. Microbiol.* 48:3392–3394. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01109-10>.
- Chiu RWK, Murphy MF, Fidler C, Zee BCY, Wainscoat JS, Lo YMD. 2001. Determination of RhD zygosity: comparison of a double amplification refractory mutation system approach and a multiplex real-time quantitative PCR approach. *Clin. Chem.* 47:667–672. <http://www.clinchem.org/content/47/4/667.full.pdf+html>.
- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Muñoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin. Infect. Dis.* 46:1813–1821. <http://dx.doi.org/10.1086/588660>.
- Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. 2008. Delaying amphotericin B-based frontline therapy significantly increases mortality among patients with hematologic malignancy who have zygomycosis. *Clin. Infect. Dis.* 47:503–509. <http://dx.doi.org/10.1086/590004>.
- Millon L, Larosa F, Lepiller Q, Legrand F, Rocchi S, Daguindau E, Scherer E, Bellanger AP, Leroy J, Grenouillet F. 2013. Quantitative polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.* 56:e95–e101. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cit094>.

Příloha 6: Bezdicek M., Lengerova M., Ricna D., Weinbergerova B., Kocmanova I., Volfova P., Drgona L., Poczova M., Mayer J., Racil Z. Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis. *Medical Mycology*. 2016 May 9. [Epub ahead of print]



Original Article

## Rapid detection of fungal pathogens in bronchoalveolar lavage samples using panfungal PCR combined with high resolution melting analysis

Matej Bezdicek<sup>1,2</sup>, Martina Lengerova<sup>1,2,3,\*</sup>, Dita Ricna<sup>1,2</sup>,  
Barbora Weinbergerova<sup>1,2</sup>, Iva Kocmanova<sup>4</sup>, Pavlina Volfova<sup>1</sup>,  
Lubos Drgona<sup>5</sup>, Miroslava Poczova<sup>6</sup>, Jiri Mayer<sup>1,2,3</sup> and Zdenek Racil<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic, <sup>2</sup>Department of Internal Medicine – Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic, <sup>3</sup>CEITEC – Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic, <sup>4</sup>Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic, <sup>5</sup>Department of Oncohematology, Comenius University in Bratislava and National Cancer Institute, Bratislava, Slovakia and <sup>6</sup>Department of Mycology, HPL Ltd., Bratislava, Slovakia

\*To whom correspondence should be addressed. Martina Lengerova, Center of Molecular Biology and Gene Therapy, Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Cernopolni 9, 613 00, Brno, Czech Republic, Tel: +420532234629; Fax: +420532234623; E-mail: [mlengerova@fnbrno.cz](mailto:mlengerova@fnbrno.cz)

Received 25 January 2016; Revised 24 March 2016; Accepted 29 March 2016

### Abstract

Despite advances in the treatment of invasive fungal diseases (IFD), mortality rates remain high. Moreover, due to the expanding spectrum of causative agents, fast and accurate pathogen identification is necessary. We designed a panfungal polymerase chain reaction (PCR), which targets the highly variable ITS2 region of rDNA genes and uses high resolution melting analysis (HRM) for subsequent species identification. The sensitivity and specificity of this method was tested on a broad spectrum of the most clinically important fungal pathogens including *Aspergillus* spp., *Candida* spp. and mucormycetes. Despite the fact that fluid from bronchoalveolar lavage (BAL) is one of the most frequently tested materials there is a lack of literature sources aimed at panfungal PCR as an IFD diagnostic tool from BAL samples. The applicability of this method in routine practice was evaluated on 104 BAL samples from immunocompromised patients. Due to high ITS region variability, we obtained divergent melting peaks for different fungal species. Thirteen out of 18 patients with proven or probable IFD were positive. Therefore, the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of our method were 67%, 100%, 100%, and 94%, respectively. In our assay, fungal pathogens identification is based on HRM, therefore omitting the expensive and time consuming sequencing step. With the high specificity, positive and negative predictive values, short

time needed to obtain a result, and low price, the presented assay is intended to be used as a quick screening method for patients at risk of IFD.

**Key words:** Panfungal PCR, High resolution melting analysis, Bronchoalveolar lavage fluid, Immunocompromised patients.

## Introduction

Although new drugs are available, IFD mortality rates in immunocompromised patients remain high.<sup>1</sup> Prolonged neutropenia is a major risk factor, related mostly to the treatment of acute myeloid leukemia (AML) and/or allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT).

The vast majority of IFDs are caused by the genera *Aspergillus* and *Candida*. However, in the last few decades more cases caused by rare filamentous fungi (mucormycetes – *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. and *Absidia* spp; *Fusarium* spp.; *Scedosporium* spp.), yeasts (*Trichosporon* spp.) and yeast-like fungi (*Geotrichum* spp.) have been observed.<sup>2–4</sup> These species' varying susceptibility to antifungal drugs brings the necessity of not only detecting fungal hyphae in biological samples but also identifying the causative agents of infection.

Molecular methods, the most important of which is polymerase chain reaction (PCR), have provided a powerful tool to improve the detection and identification of fungal pathogens in clinical microbiology practice.<sup>5</sup> However in medical mycology, cultivation, microscopy and detecting fungal antigens in serum still remain the major approaches. In hemato-oncological patients, cultures are often negative due to low load of fungal cells and reduced fungal cells viability after prophylactic therapy. With positive culture, MALDI-TOF with its low cost, resolving power (especially for yeasts), speed and simplicity can be used to identify infectious agents.<sup>6–9</sup> Histological examination and detection of serological markers are reliable tools to detect a fungal disease, but they are not specific enough to identify fungal pathogens. Direct observation of fungal elements in biological samples using microscopy enables only an estimate of the species based on its size and shape.<sup>10</sup> Both galactomannan (GM) and 1,3-beta-D-glucan (BG) can be produced by multiple species. With negative culture, PCR is the only method that enables pathogen detection and identification to the species level, including the discrimination of closely related species. In comparison with culture, PCR is fast and its sensitivity is significantly higher in immunocompromised patients.<sup>10,11</sup>

Because of the rising spectrum of fungal pathogens, panfungal PCR could be a favourable method. So far, it is mostly utilized when primarily sterile material is examined.<sup>12–14</sup> However, as pulmonary disease is the most prominent manifestation of IFD, one of the most frequently tested materials is fluid from BAL. So far, to diagnose

invasive aspergillosis (IA) and invasive mucormycosis (IM) from BAL mostly genus/species specific PCR is used.<sup>15–17</sup> However, support of the use of panfungal PCR as a diagnostic tool for IFD from BAL samples is missing in the literature. BAL is a primarily nonsterile material and thus interpreting a positive panfungal PCR result can be difficult. It is important to distinguish ongoing infection from the colonization of airways with nonpathogenic species and/or, possible contamination with environmental fungi. Sequencing the obtained PCR product is therefore necessary, but it is costly, time consuming, and mixed sequences are frequently detected in primarily nonsterile material. Besides sequencing, fragment length analysis can be used to identify products obtained from panfungal PCR. However, this method is not discriminatory enough because the length of different fungal species' fragments can be very similar.<sup>18</sup>

Recently, high-resolution melting (HRM) analysis was described as a faster, cheaper and more convenient alternative to sequencing.<sup>10,19–21</sup> This method is based on PCR amplification in the presence of an intercalating dye (EvaGreen or SYBRgreen).<sup>22</sup> After PCR, the next step is controlled melting of the PCR product while measuring changes in fluorescence depending on amplicon length, sequence, and CG content. In fungi, this approach is suitable when variable regions are targeted, such as ITS1 and ITS2 rDNA regions.

The aim of this study is to develop a rapid screening method based on panfungal PCR followed by HRM analysis (pan-HRM) to detect clinically significant fungi in BAL samples from immunocompromised patients and to determine its contribution to IFD diagnostics. We verified our method both on cultures and clinical samples. The Pan-HRM results were compared to the results of other methods—culture, BAL GM detection, and detection of aspergilli and mucormycetes using PCR.

## Materials and methods

### Fungal strains

Twenty-eight fungal species (105 strains) were used to test the ability of the assay to detect clinically relevant fungal species and create a library of reference HRM temperatures (Table 1). Reference strains were obtained from the Czech Collection of Microorganisms (CCM, Masaryk University, Czech Republic) and Culture Collection of Fungi (CCF, Charles University in Prague, Czech Republic). Clinical and

**Table 1.** List of fungal reference strains and clinical isolates.

| Species                            | Reference strains   | No. of strains from clinical isolates |
|------------------------------------|---|---------------------------------------|
| <i>Absidia corymbifera</i>         | CCM 8077  | 2                                     |
| <i>Aspergillus flavus</i>          | CCM 8363, CCM F-171, CCF 3151, CCF 1624, CCF 642, CCF 1739, CCF 1288, CCF 2497          | 2                                     |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>       | CCM 8338, CCF 1187, CCF 3623  | 12                                    |
| <i>Aspergillus nidulans</i>        | CCM F-266, CMF 1189, CMF 1767, CMF 1766, CMF 1768                                       | 0                                     |
| <i>Aspergillus niger</i>           | CCM 8155, CCM 8189, CCF 1297, CCF 629, CCF 1610, CCF 3264, CCF 3433, CCF 2875, CCF 2477 | 1                                     |
| <i>Aspergillus sydowii</i>         |   | 2                                     |
| <i>Aspergillus terreus</i>         | CCM 8082, CCF 2539, CCF 3389, CCF 3315, CCF 2911  | 2                                     |
| <i>Aspergillus ustus</i>           | CCM F-414   | 0                                     |
| <i>Aspergillus versicolor</i>      | CCM F-581   | 0                                     |
| <i>Candida albicans</i>            |   | 10                                    |
| <i>Candida glabrata</i>            |   | 10                                    |
| <i>Candida krusei</i>              |   | 1                                     |
| <i>Candida parapsilosis</i>        |   | 2                                     |
| <i>Candida tropicalis</i>          |   | 1                                     |
| <i>Cryptococcus neoformans</i>     | CCM 8312  | 0                                     |
| <i>Cunninghamella blakesleeana</i> | CCM F-705   | 0                                     |
| <i>Fusarium oxysporum</i>          | CCM F-485   | 3                                     |
| <i>Fusarium proliferatum</i>       |   | 1                                     |
| <i>Fusarium solani</i>             | CCM F-358, CCM 8014, CCM 8079, CCM 8034   | 1                                     |
| <i>Mucor circunelloides</i>        |   | 1                                     |
| <i>Mucor racemosus</i>             | CCM 8190  | 0                                     |
| <i>Paecilomyces variotti</i>       | CCM F-566, CCM F-398  | 0                                     |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>         | CCM F-211   | 0                                     |
| <i>Rhizopus microsporus</i>        |   | 1                                     |
| <i>Rhizopus oryzae</i>             | CCM 8075  | 2                                     |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>         | CCM F-445   | 0                                     |
| <i>Scedosporium apiospermum</i>    |   | 1                                     |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> |   | 1                                     |

environmental isolates were obtained from the Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno. Clinical isolate identification was done by microscopy and sequencing the rDNA ITS2 region.<sup>23</sup>

### Clinical samples

We tested 104 BAL samples from immunocompromised patients with an episode of pulmonary infection in this study. Patient characteristics are shown in Table 2. All patients provided informed consent to use their BAL samples for scientific purposes. The BAL samples were processed immediately or stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . The episodes were classified according to the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group (EORTC/MSG) criteria<sup>24</sup> into three categories—proven ( $n = 2$ ), probable ( $n = 16$ ), and possible ( $n = 86$ ).

### Culture

Cultivation was carried out on the Sabouraud dextrose agar (Laboratorios CONDA, Madrid, Spain) with Amikacin (200 mg/l) (Bristol-Myers Squibb, Prague, Czech Republic) and Vancomycin (6 mg/l) (SANDOZ, Prague, Czech Republic) for 6 days/ $30^{\circ}\text{C}$  (yeasts) or 7 days/ $25^{\circ}\text{C}$  and  $37^{\circ}\text{C}$  (filamentous fungi). Identification of positive culture was done by microscopy and colony morphology and confirmed by sequencing.

GM detection. BAL fluid GM concentrations were determined using the Platelia Aspergillus kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's instructions. The BAL fluid samples were centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min, and 300  $\mu\text{l}$  of the supernatant of each sample was used for GM detection. A sample with a GM index of positivity above 0.5 was considered positive.



**Table 2.** Demographic characteristics of patients.

|                                | No. of patients |
|--------------------------------|-----------------|
| Total                          | 104             |
| Male                           | 57              |
| Female                         | 47              |
| Acute lymphoblastic leukemia   | 11              |
| Acute myeloid leukemia         | 26              |
| Chronic lymphocytic leukemia   | 11              |
| Chronic myeloid leukemia       | 1               |
| Hairy cell leukemia            | 1               |
| HIV positive patients          | 9               |
| Hodgkin's lymphoma             | 4               |
| Myelodysplastic syndrome       | 3               |
| Multiple myeloma               | 4               |
| non-Hodgkin's lymphoma         | 4               |
| Solid tumor                    | 9               |
| Unspecified malignant neoplasm | 9               |
| Other                          | 12              |
| Probable IFD                   | 16              |
| Proven IFD                     | 2               |
| Possible IFD                   | 86              |

### DNA extraction

DNA extraction from both fungal cultures and BAL samples was carried out using a ZR Fungal/Bacterial Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) with a few modifications as described previously.<sup>17</sup> With each batch of samples an aliquot of sterile water was processed to uncover possible contamination during the DNA isolation step.

### pan-HRM

Primers were designed on the free online Primer3 program. (<http://simgene.com/Primer3>). We chose broad range primers that hybridize to conserved sequences of 5.8S (MB-F 5'-GATGAAGAACGCAGCGAAAT-3') and 28S (ITS-R 5'-TCCTCCGCTTATTGATAT-3') of rDNA, surrounding variable ITS2, which is suitable for HRM analysis. Bioinformatics' analysis of possible cross reactivity with other fungal species was done in Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software (<http://www.megasoftware.net/>). The reaction volume of 20  $\mu$ l contained 10  $\mu$ l of SensiFast HRM mix (Bioline, London, United Kingdom), 0.8  $\mu$ M of each primer MB-F and ITS-R and 4  $\mu$ l of extracted DNA. Thermal cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 120 s, followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 5 s), annealing (60°C for 10 s), and extension (72°C for 20 s). HRM analysis started at 74°C for 90 s (pre-melt conditioning), then the temperature was subsequently increased to 94°C by 0.05°C/s. A Rotorgene 6000 instrument (Corbett

Research, Sydney, Australia) was used for amplification. The results were analyzed using Rotor-Gene 6000 series software 1.7. We considered one clear peak (two peaks in *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*) which intersected the threshold dF/dT > 0.5 as a positive result. Each strain was tested in duplicate in two separate experiments by pan-HRM and a library of their melting temperatures was created. The sensitivity of the pan-HRM reaction was determined by testing the genomic DNA isolated from fungal cultures (*C. albicans*, *F. solani*, and *A. fumigatus*), serially diluted in sterile deionized water. The last positive dilutions for *C. albicans* and *F. solani* contained 1 fg of fungal DNA which corresponds to less than 1 genome. The last positive dilution for *A. fumigatus* was a dilution containing 10 fg of fungal DNA.

### Detecting aspergilli and mucormycetes

In our institution, BAL from patients at high risk of IFD or with suspicious IFD symptoms are tested with two methods—commercial real-time PCR assay to detect the four most common *Aspergillus* species *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, and *A. terreus* (gb MICRO Aspergillus, Generi Biotech, Hradec Kralove, Czech Republic) and mucormycetes-specific nested PCR followed by HRM analysis as described previously.<sup>17</sup> Detecting aspergilli was performed according to the manufacturer's instructions.

### Statistical analysis

The contribution of pan-HRM to IFD diagnostics was assessed. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), positive likelihood ratios, and negative likelihood ratios were calculated using the online version of MedCalc Version 14.12.0 ([http://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](http://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php)).

## Results

### pan-HRM in reference strains and strains from clinical isolates

The ranges of each species' melting temperatures were determined using both reference strains and strains from clinical isolates to create the HRM temperature library (Table 3). Our method proved its ability to detect a broad spectrum of fungal pathogens.

Detection and accurate identification of the five most common species of *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, and *C. parapsilosis*) is presented in Figure 1. *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. krusei* provide a

**Table 3.** Melting temperatures library of reference fungal strains and strains from Department of Clinical Microbiology.

| Species  | Range of melting temperature (°C) | No. of strains | Length (bp) | GenBank Acc. number |
|--|-----------------------------------|----------------|-------------|---------------------|
| <i>Absidia corymbifera</i>                       | Neg                               | 3              | NA          | NA                  |
| <i>Aspergillus flavus</i>                        | 89.88–90.15                       | 10             | 347         | AJ853764.1          |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>                     | 90.43–90.92                       | 15             | 348         | HF677588.1          |
| <i>Aspergillus nidulans</i>                      | 90.67–90.95                       | 5              | 348         | AJ937756.1          |
| <i>Aspergillus niger</i>                         | 89.67–90.25                       | 10             | 350         | AJ876876.1          |
| <i>Aspergillus sydowii</i>                       | 90.48–90.65                       | 2              | 348         | AM883163.1          |
| <i>Aspergillus terreus</i> genotype 1            | 90.78–90.95                       | 2              | 356         | AB661667.1          |
| <i>Aspergillus terreus</i> genotype 2            | 91.53–91.80                       | 5              | 356         | AB661667.1          |
| <i>Aspergillus ustus</i>                         | 91.17–91.25                       | 1              | 350         | HG964332.1          |
| <i>Aspergillus versicolor</i>                    | 90.42–90.47                       | 1              | 347         | AM883156.1          |
| <i>Candida albicans</i>                          | 84.63–84.85                       | 10             | 333         | KJ187033.1          |
| <i>Candida glabrata</i>                          | 83.37–83.52                       | 10             | 414         | HE993757.1          |
| <i>Candida krusei</i>                            | 88.43–88.45                       | 1              | 341         | KF959839.1          |
| <i>Candida parapsilosis</i>                      | 81.47–81.70                       | 2              | 305         | AB828583.1          |
| <i>Candida parapsilosis</i> 2 <sup>nd</sup> peak | 83.10–83.25                       | 2              | 305         | AB828583.1          |
| <i>Candida tropicalis</i>                        | 81.00–81.22                       | 1              | 322         | JQ904699.1          |
| <i>Candida tropicalis</i> 2 <sup>nd</sup> peak   | 82.32–82.35                       | 1              | 322         | JQ904699.1          |
| <i>Cryptococcus neoformans</i>                   | 84.02–84.03                       | 1              | 369         | AJ876525.1          |
| <i>Cunninghamella blakesleeana</i>               | 77.33–77.40                       | 1              | 397         | JN205865.1          |
| <i>Fusarium oxysporum</i>                        | 85.23–85.68                       | 4              | 332         | HF546393.1          |
| <i>Fusarium proliferatum</i>                     | 88.20–88.27                       | 1              | 346         | AJ810449.1          |
| <i>Fusarium solani</i>                           | 89.63–90.33                       | 5              | 353         | AB775570.1          |
| <i>Mucor circinelloides</i>                      | 80.22–80.33                       | 1              | 365         | AM745433.1          |
| <i>Mucor racemosus</i>                           | 80.02–80.05                       | 1              | 362         | AB369913.1          |
| <i>Paecilomyces variotti</i>                     | 90.85–90.95                       | 2              | 349         | KC237293.1          |
| <i>Rhizomucor pusillus</i>                       | Neg                               | 1              | NA          | NA                  |
| <i>Rhizopus microsporus</i>                      | Neg                               | 1              | NA          | NA                  |
| <i>Rhizopus oryzae</i>                           | Neg                               | 3              | NA          | NA                  |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>                       | Neg                               | 1              | NA          | NA                  |
| <i>Scedosporium apiospermum</i>                  | 88.07–88.10                       | 1              | 381         | AB489090.1          |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i>               | 90.12–90.17                       | 1              | 363         | Z97995.1            |

Note: Expected length of PCR products according to representative strain from NCBI database.

single melting peak (84.63–84.85°C, 83.37–83.52°C, and 88.43–88.45°C), while *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* are characterized by a pattern with two peaks (81.00–81.22°C and 82.32–82.35°C; 81.47–81.70°C, and 83.10–83.25°C).

Our pan-HRM method was also positive for *Aspergillus* spp. including the most clinically important species of this genus—*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, and *A. niger* (Fig. 1). Due to the similar melting temperatures, it can be difficult to distinguish *A. fumigatus*/*A. nidulans*/*A. sydowii* and *A. niger*/*A. flavus* (Fig. 1). However, using analysis of the melting curves *A. fumigatus* can be distinguished from *A. nidulans* and *A. niger* from *A. flavus* (Fig. 2). Strains of *A. terreus* provided melting peaks in two different temperature ranges (90.78–90.95°C and 91.53–91.80°C). However, after sequencing we found the explanation in two different genotypes of *A. terreus* sp. analysed in our collection of fungal strains.

*Fusarium oxysporum*, *F. solani* and *F. proliferatum* generated a distinct melting peak (85.23–85.68°C, 88.20–88.27°C and 89.63–90.33°C). The melting peaks for *Fusarium* spp. and other medically important pathogens are presented in Figure 3. The range of melting temperatures of *F. solani* was similar to ranges of melting temperatures of *A. flavus* and *A. niger*. Differentiation of those species is also possible by using melting curves (Fig. 4).

From the group of mucormycetes, we obtained positive results only for *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and *Cunninghamella blakesleeana*. Also *M. circinelloides* and *M. racemosus* provide similar melting temperature but can be distinguished via comparison of their melting curves (Fig. 4). We obtained negative results for the rest of mucormycetes, namely *Absidia corymbifera*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizomucor pusillus*. This was expected due to several

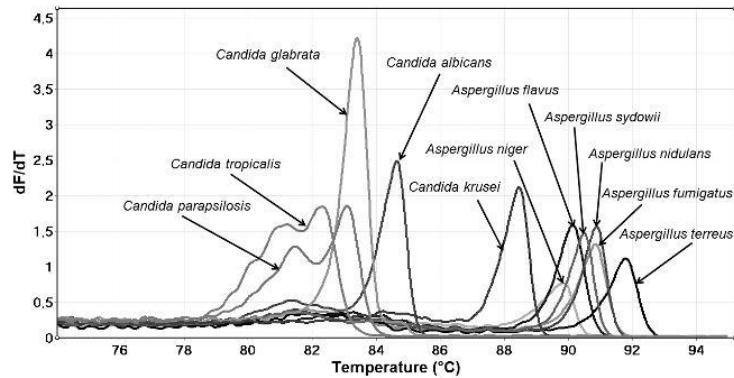


Figure 1. Melting peaks of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.

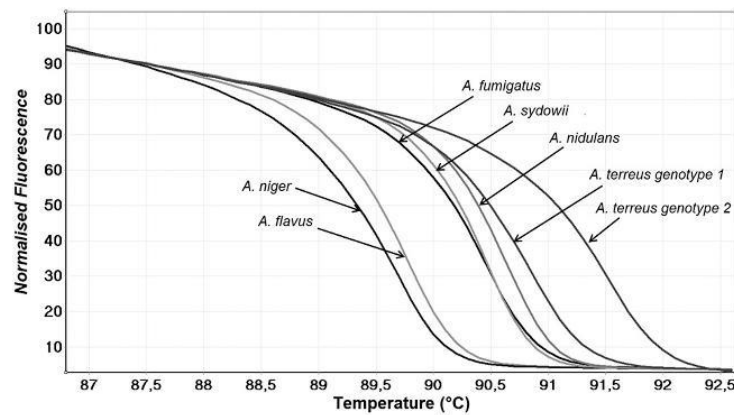


Figure 2. Identifying *Aspergillus* spp. using melting curves from high resolution melting analysis.

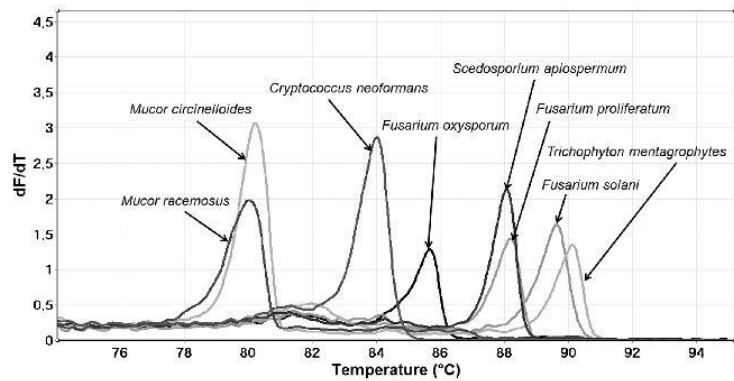
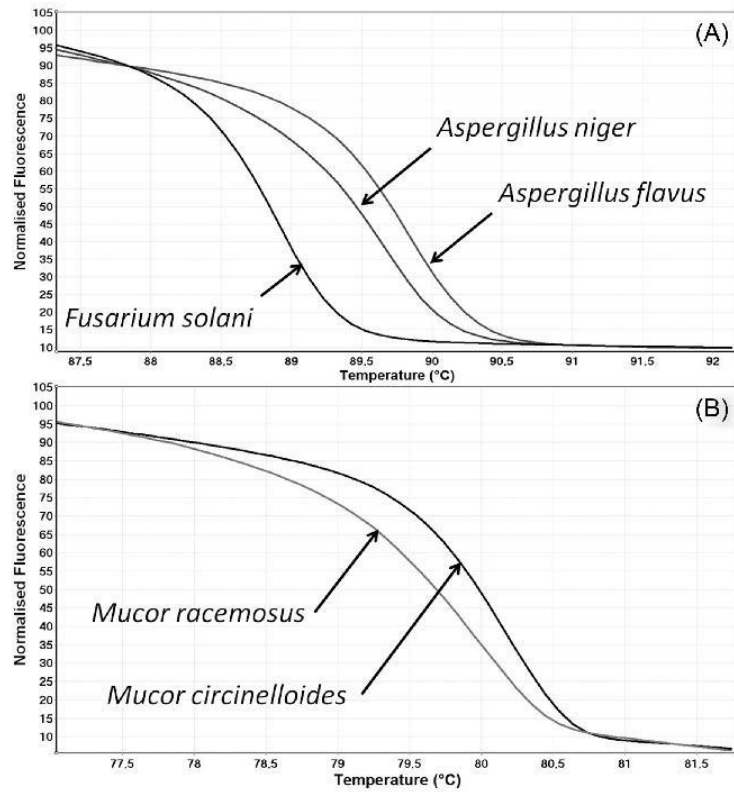


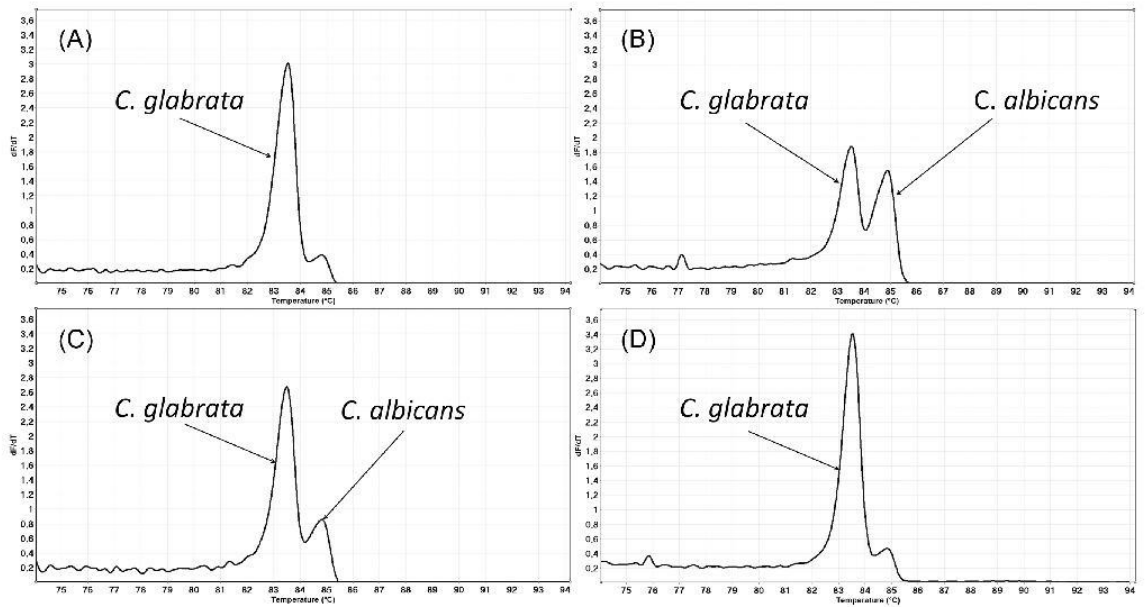
Figure 3. Melting peaks of other medically important fungi.

mismatches between primers and target sequence in mucormycetes DNA caused by low sequence homology of the 5.8S and 28S rDNA region compared to the other fungi. Detecting mixed infection was tested on mixed samples of

*C. albicans* and *C. glabrata* with DNA concentration ratios 1:1, 1:10, and 1:100 (Fig. 5). Our method is able to differentiate a mixed sample of two fungal species if the DNA concentration ratio between those two agents is 1:1



**Figure 4.** Differentiation of fungal species with similar melting temperature using high resolution melting curve analysis. (A) *Fusarium solani*/*Aspergillus flavus*/*Aspergillus niger*; (B) *Mucor racemosus*/*Mucor circinelloides*.



**Figure 5.** Detecting mixed samples. (A) *Candida glabrata*, (B) *Candida glabrata* : *Candida albicans* 1:1, (C) *Candida glabrata* : *Candida albicans* 10:1, (D) *Candida glabrata* : *Candida albicans* 100:1.

**Table 4.** Results of microbiological and molecular tests in BAL samples from patients with proven or probable IFD.

| Patient | Gender | IFD <sup>†</sup> | Diagnosis* | Culture                                | GM (IP) | Species-specific PCR                   | Pan-HRM                                  |
|---------|--------|------------------|------------|--|---------|--|--|
| 1       | M      | Proven IA        | CLL        | Neg                                    | 2.21    | <i>A. fumigatus</i>                    | Neg                                      |
| 2       | M      | Probable IA      | AML        | Neg                                    | 3.88    | Neg                                    | <i>C. albicans</i>                       |
| 3       | M      | Probable IA      | MM         | <i>A. fumigatus</i>                    | 9.44    | <i>A. fumigatus</i>                    | <i>C. glabrata</i> + <i>A. fumigatus</i> |
| 4       | M      | Probable IA      | IAA        | <i>A. fumigatus</i>                    | 8.96    | <i>A. fumigatus</i> + <i>A. niger</i>  | <i>C. glabrata</i> + <i>A. fumigatus</i> |
| 5       | F      | Probable IA      | AML        | <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> | 8.49    | <i>A. fumigatus</i> + <i>A. flavus</i> | <i>A. fumigatus</i>                      |
| 6       | F      | Probable IA      | HL         | <i>A. fumigatus</i>                    | 6.81    | <i>A. fumigatus</i>                    | Neg                                      |
| 7       | M      | Probable IA      | ALL        | <i>A. fumigatus</i>                    | 8.6     | <i>A. fumigatus</i>                    | <i>A. fumigatus</i>                      |
| 8       | F      | Probable IA      | MA         | <i>A. fumigatus</i>                    | 5.54    | <i>A. fumigatus</i>                    | <i>A. fumigatus</i>                      |
| 9       | F      | Probable IA      | AML        | <i>A. fumigatus</i>                    | 9.53    | <i>A. flavus</i>                       | <i>A. flavus</i>                         |
| 10      | M      | Probable IA      | MNoL       | Neg                                    | 1.5     | Neg                                    | Neg                                      |
| 11      | M      | Probable IA      | ALL        | <i>A. fumigatus</i>                    | 6.96    | <i>A. fumigatus</i>                    | <i>A. fumigatus</i>                      |
| 12      | F      | Probable IA      | AML        | Neg                                    | 0.5     | Neg                                    | Neg                                      |
| 13      | F      | Probable IA      | ALL        | <i>A. fumigatus</i>                    | 5.14    | <i>A. fumigatus</i>                    | <i>A. fumigatus</i>                      |
| 14      | M      | Probable IA      | CLL        | <i>A. fumigatus</i>                    | 6.57    | <i>A. fumigatus</i> + <i>A. flavus</i> | <i>A. fumigatus</i> + <i>A. flavus</i>   |
| 15      | M      | Probable IA      | CLL        | Neg                                    | 7.1     | <i>A. fumigatus</i> + <i>A. flavus</i> | <i>A. fumigatus</i>                      |
| 16      | F      | Probable IA      | AML        | ND                                     | 6.2     | <i>A. flavus</i>                       | <i>A. flavus</i>                         |
| 17      | F      | Probable IA      | AML        | Neg                                    | 9.39    | <i>A. fumigatus</i> + <i>A. flavus</i> | <i>A. fumigatus</i>                      |
| 18      | M      | Proven IM        | HL         | <i>Rhizomucor miehei</i>               | neg     | <i>Rhizomucor</i> sp.                  | neg                                      |

<sup>†</sup>IA, invasive aspergillosis, IM, invasive mucormycosis; \*IAA, idiopathic aplastic anemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; CLL, chronic lymphocytic leukemia; HL, Hodgkin's lymphoma; MA, mastocytosis; MM, multiple myeloma; MNoL, malignant neoplasm of unspecified part of bronchus or lung; GM (IP), galactomannan in BAL (index of positivity).

or 1:10. When the DNA concentration ratio between two pathogens is higher our method is able to detect only the pathogen with a higher DNA concentration.

#### pan-HRM in BAL samples

In this study, we tested 104 BAL samples. One BAL sample was obtained from a patient with proven IA, 16 BAL samples were obtained from patients with probable IA. 1 sample was obtained from a patient with proven IM and 86 BAL samples were collected from patients with possible IFD.

Results from patients with proven or probable IFD are summarized in Table 4. In BAL samples from the patients with proven or probable IA (n = 17) culture was positive in 10/17 (59%) cases; 17/17 (100%) samples had highly positive GM. Aspergillus PCR was positive in 14/17 (82%) cases, in five cases, it revealed a mixed infection with two different *Aspergillus* species.

Pan-HRM was positive in 13/17 (76%) samples. Apart from aspergilli, *Candida* spp. were detected, which were most probably contaminants from the upper airways. In Figure 6 we demonstrate the performance of the assay on BAL samples—positive detection of *A. fumigatus*, *A. flavus*, and *C. glabrata* and a negative sample are presented.

The culture from the patient with proven IM revealed *Rhizomucor miehei*. GM was negative, which is in concordance with a diagnosis of invasive mucormycosis. Mu-

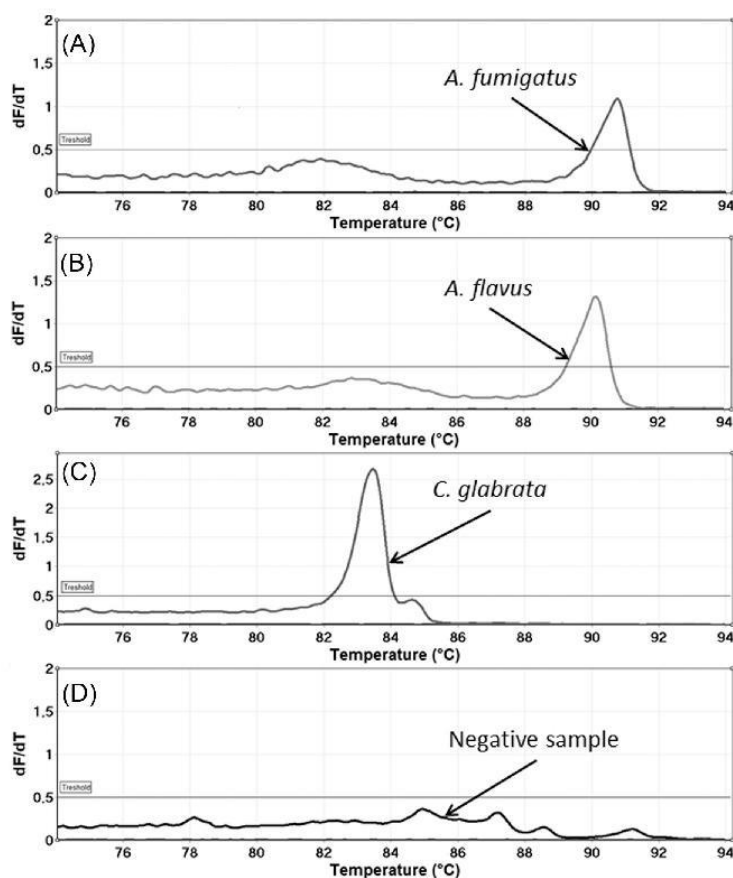
cormycetes PCR was positive for *Rhizomucor* sp. Pan-HRM was negative, which confirmed our expectations, based on the results mentioned above.

Culture results, aspergillus PCR and mucormycetes PCR of all 86 samples from patients with possible IFD were negative. All 86 samples were negative using pan-HRM, and we did not observe any false positive results caused by contamination, which is crucial as the BAL is not sterile material and our method is able to detect a broad range of fungi.

The sensitivity, specificity, NPV and PPV of the pan-HRM method based on its ability to prove or rule out IFD are summarized in Table 5.

#### Discussion

Rapid and accurate diagnostic tests are needed to improve clinical IFD outcomes. For PCR detection of fungi in clinical specimens, either species-specific or broad-range methods can be used. The advantages or disadvantages of both approaches must be considered. Species-specific primers might miss infections caused by untargeted fungi; conversely, pan-fungal primers can provide false positive results due to environmental fungal DNA contamination. The results of species-specific methods are usually available within 24 h, while when panfungal PCR assays are done, verification of the results by sequencing is necessary, which usually takes 2–3 d.



**Figure 6.** Results of fungal detection in BAL samples. (A) *Aspergillus fumigatus*, (B) *Aspergillus flavus*, (C) *Candida glabrata* and (D) negative sample.

**Table 5.** Sensitivity, specificity, PPV and NPV of pan-HRM.

|                           | Pan-HRM | 95% CI       |
|---------------------------|---------|--------------|
| Sensitivity               | 66.67%  | 40.99–86.66  |
| Specificity               | 100%    | 95.80–100.00 |
| Positive Likelihood Ratio | —       | NA           |
| Negative Likelihood Ratio | 0.33    | 0.17–0.64    |
| PPV                       | 100.00% | 73.35–100    |
| NPV                       | 93.48%  | 86.34–97.57  |

Note: PPV – positive predictive value, NPV – negative predictive value, HRM – high-resolution melt analysis, CI – confidence interval.

Due to the issues raised above, panfungal PCR use has so far been mainly focused on sterile samples (serum, blood, cerebrospinal fluid)<sup>12,13,25</sup> or to identify fungal pathogens in fresh or formalin-fixed paraffin embedded tissue specimens from patients with culture or histologically proven IFDs.<sup>14</sup> However, since the lungs are the most common organ affected, BAL samples are frequently tested

for the presence of fungal pathogens. BAL samples are usually tested using species/genus specific PCR to IA and eventually to other possible fungal pathogens such as mucormycetes.<sup>15–17</sup>

Within the framework of differential diagnosis in our laboratory, we routinely test BAL samples from immunocompromised patients for the presence of *Aspergillus* spp. and mucormycetes. If the results of these two tests are negative, but there is still a suspicion of IFD and/or positive results in other tests (detecting GM and/or BG; microscopy) we then test the samples with nested panfungal PCR followed by sequencing.<sup>23</sup> Unfortunately, due to the presence of colonizing/contaminating microbiota sequences frequently being a non-pathogenic species, sequencing only prolongs the time necessary to obtain results and increases the analysis costs<sup>14</sup> with no significant contribution to the final diagnosis.

In this study, we decided to replace sequencing with a method based on panfungal PCR followed by HRM

analysis. The sensitivity and specificity of this method was validated on both reference strains and clinical isolates. Testing the fungal strains showed that the generated melting peaks together with melting curves are highly discriminatory. It was proved that the assay is able to detect as low as 1–10 fg of fungal DNA (which is similar to real-time PCR). We successfully amplified DNA from the most important fungal pathogens—*Candida* spp., *Aspergillus* spp., and *Fusarium* spp.

After the HRM temperature library was created, our method was tested on a set of samples from immunocompromised patients. In patients with proven or probable IFD, a comparison of results from other tests (culture, GM detection) showed high compliance. The positive detection of yeasts in three patients can most likely be classified as BAL contamination from the oral cavity, since none of these patients had evidence of an infection caused by the *Candida* spp. We were able to detect mixed infections (Patients 3, 4 and 14). In some cases (patients 4, 5, 15, and 17), pan-HRM captured only one species of *Aspergillus*, while the aspergillus specific assay found two different species. When we analysed these cases closely, we found that the DNA load of the species not detected by pan-HRM in the sample was 20 to 25 times lower than the species captured. This correlates with our findings listed above (Fig. 5).

The low false positivity frequency compared to other panfungal methods can be explained by the more stringent PCR amplification conditions. In previously published studies, high sensitivity was usually obtained by using nested PCR, by using our method this was done in a single round. Moreover, our method has a high annealing temperature (60°C) ensuring specific amplification. In our opinion, this makes our method more robust and less susceptible to detecting air-borne fungi.

Due to the single center character of this study, we are aware that our research is limited by its low number of proven and possible cases of IFD. The most prominent drawback of our assay is its inability to detect mucormycetes (possibly except *Mucor* spp.) due to the low sequence homology of the 5.8S and 28S region of rDNA compared to other fungi. It prohibits MB-F/ITS-R primers binding to this region. Therefore, additional tests (e.g., PCR followed by HRM analysis<sup>17</sup>) are necessary to exclude invasive mucormycosis.

The role of our method in routine laboratory diagnosis is designed to rapidly detect a fungal pathogen or exclude IFD. A positive pan-HRM result can be obtained in less than 2.5 h (including DNA extraction). Species identification can be difficult using only melting peaks, but as there are differences in IFD treatment caused by different fungal genera, the differentiation at genus level can be enough for an

appropriate start of treatment. The exception is species specific treatment of invasive candidiasis; however, our method is able to reliably distinguish the five most common *Candida* spp. Within detailed differential diagnosis, our method takes place as a screening method which further determines the direction of testing and thereby excludes the necessity of using a complete range of species specific tests, which are costly and time consuming.

In conclusion, we have developed a quick (30 min hands-on time with 1.5 h for PCR and HRM analysis) and cheap (1 USD/reaction) method to detect the most common fungal pathogens. This method is characterized by high specificity (100%), PPV (100%) and NPV (94%), and sensitivity (67%). Despite a lower sensitivity, the great specificity, PPV and NPV together with the low cost and short time needed to obtain the initial results make it an ideal tool for fast screening in patients at risk of IFD. Its results may determine the course of further testing (verification of the results and quantification of fungal DNA load with species-specific tests) and thus shorten the overall time required to achieve the final result.

### Acknowledgements

Supported by Ministry of Health, Czech Republic - conceptual development of research organization (FNBr, 65269705), MUNIA/1028/2015 and TE02000058.

### Declaration of interest

ZR is a consultant and speaker for Astellas Pharma and Pfizer. The other authors declare that they have no relevant conflict of interest.

### References

1. Cordonnier C, Robin C, Alanio A et al. Antifungal pre-emptive strategy for high-risk neutropenic patients: why the story is still ongoing. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20** (Suppl 6): 27–35.
2. Richardson M, Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14** (Suppl 4): 5–24.
3. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2007; **48**: 1–12.
4. Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 4419–4431.
5. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**: 165–256.
6. Duyvejonck H, Cools P, Decruyenaere J et al. Validation of High Resolution Melting Analysis (HRM) of the Amplified ITS2 Region for the Detection and Identification of Yeasts from Clinical Samples: Comparison with Culture and MALDI-TOF Based Identification. *PLoS One* 2015; **10**: e0132149.

Příloha 7: Lengerová M., Bezdíček M., Ráčil Z., Mayer J., Kocmanová I. Sada pro detekci a identifikaci mykotických patogenů. 2016, PUV 2015-31689, Vydavatel: Úřad průmyslového vlastnictví. Místo vydání: Praha. Název vlastníka: Fakultní nemocnice Brno a Masarykova univerzita Brno. Datum přihlášení: 26. 10. 2015. Datum zapsání: 15. 3. 2016.





ČESKÁ REPUBLIKA  
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ



OSVĚDČENÍ

O ZÁPISU UŽITNÉHO VZORU

Josef Kratochvíl  
předseda  
Úřadu průmyslového vlastnictví

Úřad průmyslového vlastnictví  
zapsal podle § 11 odst. 1 zákona č. 478/1992 Sb., v platném znění, do rejstříku

# UŽITNÝ VZOR

číslo

# 29263

na technické řešení uvedené v příloženém popisu.



V Praze dne 15.3.2016

Za správnost:

Ing. Jan Mrva  
vedoucí oddělení rejstříků

Číslo zápisu: **29263** Datum zápisu: 15.03.2016

Číslo přihlášky: **2015-31689** Datum přihlášení: 26.10.2015

MPT: *C 12 Q 1/68* (2006.01)  
*C 12 N 15/11* (2006.01)

Název: Sada pro detekci a identifikaci mykotických patogenů

Majitel: Masarykova univerzita, Brno  
Fakultní nemocnice Brno, Brno - Bohunice

Původce: Mgr. Martina Lengerová, Ph.D., Rousínov  
Mgr. Matěj Bezdíček, Budislav  
prof. MUDr. Zdeněk Ráčil, Ph.D., Boskovice  
prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc., Bílovice nad Svitavou  
Mgr. Iva Kocmanová, Brno

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení nezjišťuje, zda předmět užitého vzoru  
splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 29 263

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*C12Q 1/68* (2006.01)  
*C12N 15/11* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2015-31689**  
(22) Přihlášeno: **26.10.2015**  
(47) Zapsáno: **15.03.2016**

- (73) **Majitel:**  
Masarykova univerzita, Brno, CZ  
Fakultní nemocnice Brno, Brno - Bohunice, CZ
- (72) **Původce:**  
Mgr. Martina Lengerová, Ph.D., Rousínov, CZ  
Mgr. Matěj Bezdíček, Budislav, CZ  
prof. MUDr. Zdeněk Ráčil, Ph.D., Boskovice, CZ  
prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc., Bílovice nad  
Svitavou, CZ  
Mgr. Iva Kocmanová, Brno, CZ
- (74) **Zástupce:**  
INVENTIA s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na  
Bělidle 3, 150 00 Praha 5

- (54) **Název užitého vzoru:**  
**Sada pro detekci a identifikaci mykotických  
patogenů**

**CZ 29263 U1**

**Sada pro detekci a identifikaci mykotických patogenů**Oblast techniky

Předkládané technické řešení se týká sady pro detekci a identifikaci mykotických patogenů v klinických vzorcích.

5 Dosavadní stav techniky

10 Screening na přítomnost mykotických infekcí metodami molekulární biologie je zásadní pro identifikaci pacientů, kteří vyžadují neprodlené zahájení antimykotické terapie. Velký význam má i negativní výsledek vyšetření, který v kombinaci s výsledky dalších testů, zejména sérologických, může invazivní mykotickou infekci v podstatě vyloučit. Pozitivní přínos má, kromě  
10 potvrzení výsledků detekce galaktomannanu a 1,3-beta-D-glukanu, zejména v případech infekcí způsobených vzácnými mykotickými patogeny (*Fusarium sp.*, *Scedosporium sp.*, a další), které vyžadují specifickou antimykotickou terapii (zejména dle známé primární rezistence na některá antimykotika).

15 V současné době jsou k dispozici na trhu komerční soupravy pro panfungální detekci (např. MycoReal Fungi (Panfungal PCR) LightCycler® 2.0 (Ingenu) - pro panfungální detekci kvasinek a plísní nebo Mastermix 18S Complete (Molzym) - opět detekce fungálních patogenů pomocí panfungálních primerů. Většinou jsou tyto soupravy použitelné pouze pro detekci a nikoliv pro identifikaci mykotických patogenů, která je ale často zásadní pro interpretaci výsledků. Souprava tudíž neumožňuje přímou identifikaci, je nutná sekvenční reakce. Ne všechny diagnostické laboratoře však mají dostupné a zavedené metody sekvenace DNA, tudíž se hledají jiné vhodné alternativy.

20 Podstata technického řešení

25 Předkládané technické řešení poskytuje sadu pro detekci a identifikaci mykotických patogenů, která obsahuje primery, navržené tak, aby nasedaly do konzervativních oblastí fungálního genomu (geny pro 5,8S a 28S rRNA), které ohraničují variabilní oblast genomu ITS2 (Obr. 1). Sada dále obsahuje směs pro vysokorozlišovací analýzu křivek tání (High Resolution Melt, HRM) včetně DNA polymerázy a soubor teplot tání DNA jednotlivých kmenů hub ze sbírkových i klinických izolátů. Použité oligonuklotidy slouží k amplifikaci vhodných úseků genomu kvasinek a plísní a HRM směs k následné identifikaci rodů/druhů patogenních mikroorganismů pomocí  
30 analýzy křivek tání s vysokým rozlišením. Při tradičním pojetí panfungální polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) je etiologické agens infekce identifikováno sekvenací, což vede ke zdržení získání výsledku (většinou alespoň o 48 hodin) a významnému navýšení nákladů na analýzu. Předkládané technické řešení urychluje analýzu a významně snižuje její náklady.

35 Předmětem předkládaného technického řešení je sada pro detekci a identifikaci mykotických patogenů, která obsahuje alespoň jeden forward primer o sekvenci mající alespoň 90 % identitu se sekvencí 5'-GATGAAGAACGCAGCGAAAT-3' a alespoň jeden reverse primer o sekvenci mající alespoň 90 % identitu se sekvencí 5'-TCCTCCGCTTATTGATAT-3' pro expresi fungálních genů pro 5,8S a 28S rRNA genomu ITS2 metodou polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR), směs pro vysokorozlišovací analýzu křivek tání (High Resolution Melt, HRM), obsahující fluorescenční barvivo; a soubor teplot tání DNA jednotlivých kmenů hub. 90 % identita zahrnuje například prodloužení nebo zkrácení řetězce o jeden až dva nukleotidy. Fluorescenční barvivo pro HRM analýzu je s výhodou vybrané ze skupiny obsahující interkalační barviva (např. EvaGreen®, což jsou barviva, která mají nižší úroveň inhibice PCR a zároveň zajišťují vyšší senzitivitu reakce než dřívější typy interkalačních barviv). Soubor teplot tání  
45 může být ve formě např. tabulky nebo grafu.

Ve výhodném provedení obsahuje sada podle předkládaného technického řešení dále DNA polymerázu. DNA polymerázou může být s výhodou hot-start Taq polymeráza.

Výhodou předkládaného technického řešení oproti stavu techniky je umístění nově navržených oligonukleotidů do oblastí ohraničujících variabilní úseky genomu kvasinek a plísní, což umožňuje přímou identifikaci etiologického agens. Technické řešení umožňuje používat uzavřený PCR systém s jednokolovou PCR a výsledky jsou dostupné cca za 2 hodiny. Výsledky jednoznačně odliší původce infekce (zejména *Aspergillus sp.*) od kolonizující/kontaminující bakteriální flóry (zejména *Candida sp.*). Technické řešení vede k unikátní, rychlé a nízkonákladové metodě detekce mykotických patogenů v klinickém materiálu. Na rozdíl od nemnoha komerčně dostupných řešení není pro identifikaci etiologického agens nutná sekvenace. Sada podle předkládaného technického řešení slouží k rychlému screeningu klinických vzorků a identifikaci patogenních a nepatogenních kvasinek a plísní. Byla rozsáhle validována na širokém panelu kmenů kvasinek a plísní a velkém souboru vzorků bronchoalveolární laváže, které jsou získávány pro určení etiologického agens u pacientů s podezřením na pneumonii způsobenou mykotickými patogeny.

#### Objasnění výkresů

Obr. 1: Schéma nasedání primerů.

Obr. 2: Stanovení teploty tání jako průsečíku kolmice spuštěné z nejvyššího bodu daného piku na osu x.

Obr. 3: Křivky tání rodů *Candida* - *C. tropicalis* (1), *C. parapsilosis* (2), *C. glabrata* (3), *C. albicans* (4), *C. krusei* (5) a *Aspergillus* - *A. flavus* (6), *A. niger* (7), *A. sydowii* (8), *A. fumigatus* (9), *A. nidulans* (10), *A. terreus* (11).

Obr. 4: Křivky tání dalších klinicky významných plísní - *Mucor circinelloides* (1), *Mucor racemosus* (2), *Cryptococcus neoformans* (3), *Fusarium oxysporum* (4), *Scedosporium apiospermum* (5), *Fusarium proliferatum* (6), *Fusarium solani* (7), *Trichophyton mentagrophytes* (8)

Obr. 5: Výsledky detekce fungálních patogenů ve vzorcích bronchoalveolární laváže: - A) pozitivní detekce *Aspergillus fumigatus*, B) pozitivní detekce *Aspergillus flavus*, C) pozitivní detekce *Candida glabrata* a D) negativní vzorek.

#### Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Testování fungálních kontrol pro zjištění teploty tání jednotlivých druhů

Reakční směs (Tabulka 1) byla podrobena PCR amplifikaci a následné HRM analýze za podmínek uvedených v Tabulce 2.

Tabulka 1

|        |   |
|--------|---|
| 10 µl  | SensiFast HRM mix (Bioline)                       |
| 0,8 µl | primer MB-F (25 mM)<br>5'-GATGAAGAACGCAGCGAAAT-3' |
| 0,8 µl | primer ITS-R (25 mM)<br>5'-TCCTCCGCTTATTGATAT-3'  |
| 4 µl   | extrahovaná DNA                                   |
| 4,4 µl | deionizovaná sterilní voda                        |
| 20 µl  | Celkem  |

Tabulka 2

| Fáze reakce:    | Krok č. |  |
|-----------------|---------|--|
| PCR amplifikace | 1.      | 95 °C/120 s                                    |
|                 | 2.      | 40 × (95 °C/5 s; 60 °C/10 s; 72 °C/20 s)       |
| HRM analýza     | 3.      | 74 °C/90 s                                     |
|                 | 4.      | 74 °C → 94 °C (zvyšování teploty o 0,1 °C/2 s) |

Analýzy byly provedeny na přístroji Rotorgene 6000 (Corbett Research, Austrálie) pomocí softwaru Rotor-Gene 6000 series software 1.7. Jako pozitivní byly hodnoceny klinické vzorky, u kterých byl po analýze získán jeden pík (nebo dva píky u *C. tropicalis* a *C. parapsilosis*), který překročil threshold  $dF/dT > 0,5$ . Sensitivita reakce byla hodnocena na sériovém ředění genomické DNA *C. albicans*, *F. solani* a *A. fumigatus* v deionizované vodě. Bylo stanovena citlivost metody 1 fg DNA (*C. albicans* a *F. solani*) až 10 fg DNA *A. fumigatus*. Na Obr. 2 je zobrazen princip hodnocení teplot tání, které proběhlo při tresholdu 0,7. Teplota tání odpovídá průsečíku kolmice spuštěné z nejvyššího bodu daného píku na osu x. Po nastavení tresholdu vyhodnotí program Rotor-Gene 6000 Series Software 1,7 teploty tání automaticky.

HRM analýzou bylo otestováno 135 kmenů hub ze sbírkových i klinických izolátů patřících do 40 druhů. Z pozitivních výsledků HRM analýzy byla sestavena tabulka teplot tání (Tabulka 3). Ukázky křivek tání u klinicky významných druhů kvasinek a plísní jsou zobrazeny na Obr. 3 a 4.

15

Tabulka 3

| Druh                                 | Rozmezí teplot tání (°C) |       | Počet kmenů |
|--------------------------------------|--------------------------|-------|-------------|
| <i>Arthroderma otae</i>              | 89,50                    | 89,58 | 1           |
| <i>Aspergillus flavus</i>            | 89,88                    | 90,30 | 10          |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>         | 90,42                    | 91,05 | 15          |
| <i>Aspergillus nidulans</i>          | 90,67                    | 90,90 | 5           |
| <i>Aspergillus niger</i>             | 89,67                    | 90,25 | 10          |
| <i>Aspergillus sydowii</i>           | 90,48                    | 90,65 | 2           |
| <i>Aspergillus terreus genotyp 1</i> | 90,78                    | 90,90 | 2           |
| <i>Aspergillus terreus genotyp 2</i> | 91,53                    | 91,80 | 5           |
| <i>Aspergillus ustus</i>             | 91,17                    | 91,25 | 1           |
| <i>Aspergillus versicolor</i>        | 90,42                    | 90,47 | 1           |
| <i>Aureobasidium pullulans</i>       | 85,55                    | 85,55 | 1           |
| <i>Beauveria bassiana</i>            | 89,28                    | 89,33 | 1           |
| <i>Candida albicans</i>              | 84,55                    | 84,85 | 10          |
| <i>Candida glabrata</i>              | 83,37                    | 83,52 | 10          |
| <i>Candida krusei</i>                | 88,30                    | 88,63 | 1           |
| <i>Candida parapsilosis</i>          | 81,47                    | 81,70 | 2           |
| <i>Candida parapsilosis 2. peak</i>  | 83,10                    | 83,25 | 2           |
| <i>Candida tropicalis</i>            | 81,00                    | 81,22 | 1           |
| <i>Candida tropicalis 2. peak</i>    | 82,32                    | 82,35 | 1           |
| <i>Cladophialophora bantiana</i>     | 87,05                    | 87,07 | 1           |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i>  | 86,93                    | 87,25 | 1           |
| <i>Cladosporium herbatum</i>         | 86,65                    | 87,03 | 3           |
| <i>Cladosporium sphaerospermum</i>   | 88,13                    | 88,22 | 1           |
| <i>Cryptococcus neoformans</i>       | 84,02                    | 84,03 | 1           |
| <i>Cunninghamella blakesleeana</i>   | 77,33                    | 77,40 | 1           |
| <i>Emericella nidulans</i>           | 90,65                    | 90,90 | 3           |
| <i>Exophiala dermatitidis</i>        | 88,00                    | 88,10 | 2           |
| <i>Fusarium oxysporum</i>            | 85,23                    | 85,68 | 4           |
| <i>Fusarium proliferatum</i>         | 88,20                    | 88,27 | 1           |
| <i>Fusarium solani</i>               | 88,95                    | 90,33 | 5           |
| <i>Mucor circunelloides</i>          | 80,22                    | 80,33 | 1           |
| <i>Mucor racemosus</i>               | 80,03                    | 80,03 | 1           |
| <i>Paecilomyces variotti</i>         | 90,85                    | 90,95 | 2           |
| <i>Penicillium biourgeinum</i>       | 89,03                    | 89,25 | 2           |
| <i>Penicillium brevicompactum</i>    | 89,32                    | 89,40 | 1           |
| <i>Penicillium commune</i>           | 90,47                    | 90,60 | 1           |
| <i>Penicillium chrysogenum</i>       | 90,25                    | 90,48 | 6           |
| <i>Penicillium radicum</i>           | 90,50                    | 90,53 | 1           |
| <i>Scedosporium apiospermum</i>      | 88,07                    | 88,10 | 1           |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i>   | 90,12                    | 90,17 | 1           |
| <i>Wallemia sebi</i>                 | 79,55                    | 79,60 | 1           |

Příklad 2: Detekce a identifikace fungálních patogenů ve vzorcích bronchoalveolární laváže

- 5 Sada pro detekci a identifikaci mykotických patogenů obsahovala SensiFast HRM mix (Bioline), primer MB-F, primer ITS-R, extrahovanou DNA vzorku bronchoalveolární laváže a deionizovanou vodu. Jako kontrolní vzorek byla použita sada neobsahující extrahovanou DNA. Pro identifikaci fungálních patogenů byl použit soubor teplot tání získaný v Příkladu 1 (Tabulka 3). Reakční směs, obsahující vzorky bronchoalveolární laváže, byla podrobena PCR amplifikaci a následně
- 10 HRM analýze za podmínek uvedených v Příkladu 1. Výsledky detekce fungálních patogenů ve vzorcích bronchoalveolární laváže jsou vyobrazeny na Obr. 5.



## NÁROKY NA OCHRANU

1. Sada pro detekci a identifikaci mykotických patogenů, **v y z n a ě n á t í m**, že obsahuje alespoň jeden primer o sekvenci mající alespoň 90 % identitu se sekvencí 5'- GATGAAG-AACGCAGCGAAAT-3', alespoň jeden primer o sekvenci mající alespoň 90 % identitu se sekvencí 5'-TCCTCCGCTTATTGATAT-3' pro expresi fungálních genů pro 5,8S a 28S rRNA genomu ITS2 metodou polymerázové řetězové reakce; směs pro vysokorozlišovací analýzu křivek tání, obsahující fluorescenční barvivo, a soubor teplot tání DNA jednotlivých kmenů hub.
2. Sada podle nároku 1, **v y z n a ě n á t í m**, že dále obsahuje DNA polymerázu.

3 výkresy

Sequence listing\_ST25  
SEQUENCE LISTING

<110> Masarykova univerzita v Brně  
Fakultní nemocnice v Brně

<120> Sada pro detekci a identifikaci mykotických patogenů

<130> UM1123CZ00

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> forward primer

<400> 1  
gatgaagaac gcagcgaaat 20

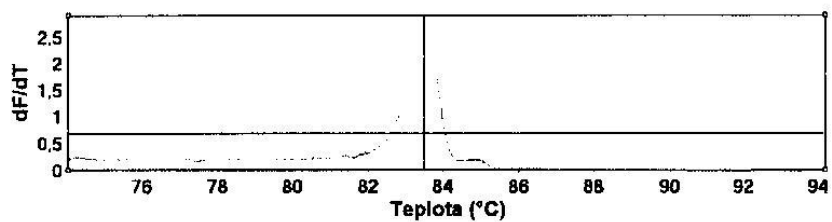
<210> 2  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> reverse primer

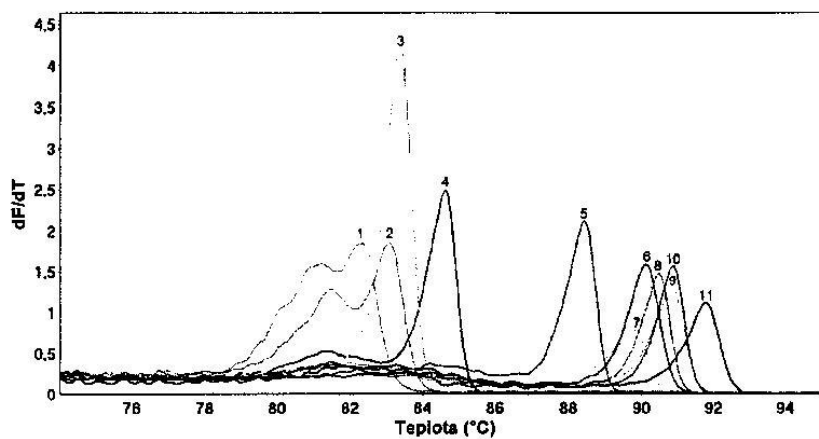
<400> 2  
tcctccgctt attgatat 18



Obr. 1

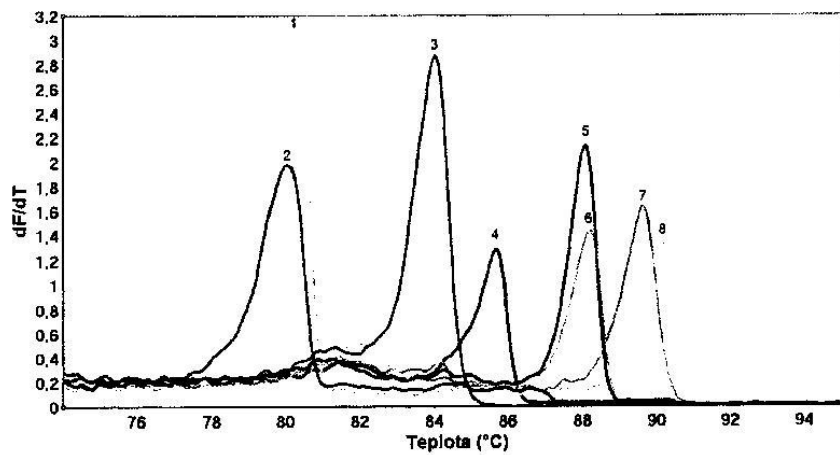


Obr. 2



Obr. 3

CZ 29263 U1



Obr. 4

Příloha 8: Lengerová M., Volfová P., Říčná D., Palacková M., Ráčil Z. Diagnostika pneumocystové pneumonie molekulárněbiologickými metodami. Postgraduální medicína, Mladá fronta a.s., 2013, roč. 15, příl. 4, s. 24-27.

# Diagnostika pneumocystové pneumonie molekulárněbiologickými metodami

<sup>1,2</sup>Mgr. Martina Lengerová, Ph.D., <sup>1</sup>Mgr. Pavlína Volfová, Ph.D., <sup>1</sup>Mgr. Dita Říčná, <sup>1</sup>MUDr. Martina Palacková, <sup>1,2</sup>doc. MUDr. Zdeněk Ráčil, Ph.D.

<sup>1</sup>Masarykova univerzita, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Brno, Interní hematologická a onkologická klinika

<sup>2</sup>Masarykova univerzita, CEITEC – Středoevropský technologický institut, Brno

## Souhrn

Pneumonie způsobená *Pneumocystis jirovecii* (PCP) je život ohrožující mykotickou infekcí, která se vyskytuje zejména u HIV-pozitivních a jinak imunokompromitovaných jedinců. Specifickou skupinu nemocných tvoří imunokompromitovaní pacienti s hematologickými malignitami, u kterých bylo prokázáno, že konvenčně používané metody, zejména mikroskopická analýza, jsou velmi specifické, ale nejsou dostatečně citlivé. U těchto pacientů je metodou volby detekce DNA *Pneumocystis jirovecii* v klinických vzorcích (nejčastěji v indukovaném sputu nebo v tekutině získané bronchoalveolární laváží) metodami založenými na PCR. První metody umožňující záchyt *P. jirovecii* v klinických vzorcích byly publikovány v 90. letech minulého století<sup>(1)</sup> a od té doby následovaly desítky prací, které využívaly různé PCR platformy (jednokolová, nested, semi-nested, real-time PCR) a byly zaměřeny do různých cílových genů. Cílem tohoto přehledového článku je popsat přednosti a úskalí PCR diagnostiky PCP u pacientů s hematologickými malignitami.

## Klíčová slova

pneumocystová pneumonie • PCR • real-time PCR • diagnostika

## Summary

*Lengerova, M., Volfova, P., Ricna, D., Palackova, M., Racil, Z. Diagnostics of pneumocystis pneumonia using methods of molecular biology*  
Pneumonia caused by *Pneumocystis jirovecii* (PCP) is a life-threatening fungal infection that occurs especially in HIV-positive and other immunocompromised individuals. A specific group are patients with haematological malignancies in which it was shown that conventionally used methods, in particular microscopic analysis, are highly specific but not sensitive enough. In these patients, the method of choice is detection of *P. jirovecii* DNA in clinical specimens (mostly induced spu-

tum or bronchoalveolar lavage fluid) using methods based on PCR. The first methods allowing detection of *P. jirovecii* in clinical specimens have been published in the 1990's<sup>(1)</sup> and were followed by dozens of papers that were aimed at various target genes and used different PCR platforms (single-round, nested, semi-nested, real-time PCR). The aim of this review is to describe the advantages and pitfalls of PCR diagnosis of PCP in patients with haematological malignancies.

## Key words

pneumocystis pneumonia • PCR • real-time PCR • diagnostics

## Genetická výbava *P. jirovecii*

*P. jirovecii* byla dlouhá léta mylně považována za protozoon, a to zejména na základě morfologických znaků, teprve molekulárněbiologické analýzy malé podjednotky ribosomální RNA ji přiřadily do říše hub.<sup>(2)</sup> V roce 2012 Cissé a kol.<sup>(3)</sup> provedli rozsáhlou analýzu genomu *P. jirovecii* metodami sekvenování nové generace. Z jejich výsledků vyplynulo, že genom pneumocysty je velký 8,1 Mb a obsahuje celkem 3878 kódujících sekvencí. Potvrdilo se, že stejně jako v případě *P. carinii* chází i tomuto mikroorganismu celá řada genů kódujících základní enzymy důležité pro základní metabolismus, zejména syntézu aminokyselin – tyto pravděpodobně získává přímo z prostředí v plicích. Další významnou odchylkou je skutečnost, že genom postrádá charakteristické enzymy glyoxylátového cyklu, které patří k důležitým faktorům virulence ostatních mykotických patogenů. Tyto poznatky podporují názor, že *P. jirovecii* je obligátní parazit, kolonizující lidské plíce, který způsobuje závažné a často smrtelné onemocnění u imunokompromitovaných nemocných. Nové poznatky o skladbě genomu, získané s pomocí nejnovějších technologií, jsou velmi cenné a mohou pomoci při: i) identifikaci nutričních doplňků pro kultivaci pneumocysty *in vitro*, ii) identifikaci nových cílů pro léčbu a vývoj nových

# infekce vyvolané *Pneumocystis jirovecii*

terapeutik pro léčbu PCP, iii) identifikaci cílových proteinů pro vývoj vakcín.

## Detekce *P. jirovecii* v klinických vzorcích molekulárněbiologickými metodami

### VÝBĚR VHODNÉHO VZORKU

Dříve publikované studie prokázaly na zvířecích modelech přenos infekce *P. carinii* mezi jedinci nemocnými PCP a zdravými jedinci, proto je tento způsob přenosu velmi pravděpodobný i u lidí. Z aeroskopického měření a následné analýzy pomocí kvantitativní real-time PCR v okolí (zejména HIV pozitivních) pacientů s PCP bylo zjištěno, že velkou nálož pneumocyst lze detekovat i ve vzdálenosti několika metrů od nemocného ( $7 \times 10^2$  až  $5 \times 10^5$  organismů na  $m^3$  vzduchu ve vzdálenosti 1 m).<sup>(4)</sup> Tím lze vysvětlit vysoké nálože nalezené ve vzorcích z dutiny ústní a nosohltanu u HIV-pozitivních pacientů a byla tak potvrzena možnost horizontálního přenosu *P. jirovecii* mezi pacienty. Alanio a kol.<sup>(5)</sup> ve své studii srovnávali nálož *P. jirovecii* ve vzorcích získaných od HIV-pozitivních a HIV-negativních imunokompromitovaných pacientů. Zjistili, že u obou skupin nemocných byla fungální nálož měřená pomocí kvantitativní real-time PCR ve vzorcích indukovaného sputa a v tekutině získané bronchoalveolární laváží (BAT) srovnatelná. Samuel a kol.<sup>(6)</sup> u pediatrických pacientů porovnávali výsledky získané testováním vzorků z horních cest dýchacích (nazofaryngeální aspirát) a dolních cest dýchacích (indukované sputum nebo BAT) a prokázali, že při použití real-time PCR lze pro diagnostiku PCP použít i neinvazivně získané vzorky z horních cest dýchacích.

Z literatury tedy vyplývá, že kromě tradičních a ověřených klinických vzorků (BAT, indukované sputum, plicní tkáň) lze pravděpodobně pro detekci pneumocysty využít i neinvazivní klinické vzorky (výplach dutiny ústní, nazofaryngeální aspirát). Možnost detekce pneumocysty ve vzorcích získaných neinvazivními metodami je vítána zejména u pacientů, kteří nemohou podstoupit BAL, případně dětských pacientů.

### IZOLACE DNA Z KLINICKÝCH VZORKŮ

Jako výchozí materiál pro detekci *P. jirovecii* je většinou využíván sediment buněk z indukovaného sputa nebo BAT. V případě zpracování velmi viskózních vzorků (zejména sputa) se osvědčilo před vlastní izolací zařadit krok, při kterém je ke vzorku přidán roztok mukolytika, jež napomůže rozvolnění hlenu a uvolnění buněk. K následné izolaci DNA jsou nejčastěji využívány komerční soupravy, které separují celkovou DNA na kolonce (např. QIAmp DNA Mini kit, Qiagen).

### PCR METODIKA

Cílovými úseky pro detekci *P. jirovecii* pomocí PCR jsou nejčastěji gen pro: dihydropteroát syntázu (DHPS), dihydrofolát reduktázu (DHFR), oblasti ITS (internal transcribed spacer) genu pro rRNA, velká podjednotka genu pro mitochondriální rRNA (mitochondrial large subunit, mtLSU), beta-tubulin, hlavní povrchový glykoprotein (major-surface glycoprotein, MSG), *kex-1* a *cdc-2*.<sup>(7)</sup> Obecně se soudí, že vyšší citlivost mají metody detekující tzv. multikopiové geny (nejčastěji MSG a mtLSU). Většina doposud publikovaných metod pro detekci pneumocysty byla vyvinuta v přímo v laboratořích a jedná se tedy o tzv. in-house metody. Na trhu jsou již dostupné také komerční soupravy. Jejich nespornou výhodou je standardizace

PCR metodiky, která by umožnila získat srovnatelné výsledky z různých pracovišť. První multicentrickou prospektivní studii využívající komerční soupravu od firmy Myconostica publikovali Hauser a kol.<sup>(8)</sup> Bohužel počet pacientů s hematologickou malignitou byl v této studii příliš nízký (9 ze 110 pacientů) a neumožňuje proto dělat větší závěry o možnosti použití soupravy u této skupiny pacientů. Stejnou soupravu použili také Seah a kol.<sup>(9)</sup> a McTaggart a kol.<sup>(10)</sup> Z obou těchto studií vyplývá, že metoda má excelentní negativní prediktivní hodnotu (99–100 %), a tudíž negativní výsledek může vyloučit diagnózu PCP.

### Normalizace výsledků

Stejně jako v případě jiných patogenů detekovaných z BAL nebo jiných nehomogenních typů klinických vzorků (sputum, výplachy dutiny ústní) komplikuje snahu o porovnání výsledků celá řada preanalytických faktorů – standardizace provedení BAL, rozdílná návratnost BAL u různých pacientů, homogenizace materiálu (obzvláště vazkého) a další. Tyto faktory lze jen obtížně ovlivnit a jediným způsobem je zcela standardizovaný postup pro provádění odběrů klinických vzorků.<sup>(11)</sup> Abychom mohli porovnávat kvantitativní výsledky získané z různých analýz a různých vzorků, je důležité provádět normalizaci výsledků. Jedním ze způsobů je uvádět fungální nálož na mililitr výchozího vzorku (v tomto případě je vhodné při izolaci DNA vycházet vždy ze stejného množství klinického materiálu), dále je možná detekce přítomnosti lidské DNA (nejčastěji jako paralelní real-time PCR reakce detekující některý z lidských housekeeping genů) a normalizace na počet lidských genomických ekvivalentů (přenesené množství DNA vložené do reakce). Ani jeden z těchto způsobů však není ideální, nejsprávnějším přístupem je použití externí kontroly, nejčastěji v podobě určitého množství DNA (plazmidové, genomové nehumánního (například rostlinného) původu, která je přidána do vzorku před zpracováním, odizolována spolu s DNA obsaženou ve vzorku, a následně detekována v nezávislé real-time PCR reakci. Tento způsob není při použití in-house metod používán rutinně, protože je poměrně technicky náročný na vlastní provedení a optimalizaci. Taková kontrola by však měla být nutnou součástí komerčních souprav pro *in vitro* diagnostiku.

### Stanovení hodnoty kritické nálože *P. jirovecii* ve vzorku

Největším úskalím použití citlivých molekulárněbiologických metod je odlišení kolonizace (přítomnosti mikroorganismu nebo jeho DNA v plicích bez příznaků pneumocystové pneumonie) od aktivní infekce. Míra kolonizace u imunokompetentních jedinců je asi 20 %, může se ale lišit u různých skupin a např. i geograficky (Tab. 1). Protože bronchoalveolární laváž je prováděna u nemocných s horečkou a/nebo plicním postižením, nelze u žádného z pacientů jednoznačně hovořit o pouhém nosičství. Z tohoto důvodu se v současné době u imunokompromitovaných pacientů upouští od klasických kvalitativních metod PCR, které jsou velmi citlivé, avšak pouhý pozitivní výsledek není dostatečný pro automatické zahájení léčby. Na většině pracovišť je v současné době používána pro detekci *P. jirovecii* kvantitativní real-time PCR. Kvantifikace fungální nálože v klinických vzorcích umožňuje stanovit riziko PCP u jednotlivých pacientů. Nalezením vhodného cut-off pro

# infekce vyvolané *Pneumocystis jirovecii*

**Tab. 1** Míra kolonizace u zdravých imunokompetentních jedinců

| Studie                | Citace | Charakteristika souboru  | Míra kolonizace (%) |
|-----------------------|--------|--|---------------------|
| Ponce a kol. (2010)   | (12)   | imunokompetentní dospělí (tkáně z autopsie – vraždy, sebevraždy) – Santiago, Chile     | 65–79               |
| Vargas a kol. (2010)  | (13)   | imunokompetentní dospělí – výplach dutiny ústní (+ nazofaryngeální stěry)              | 13 (22)             |
| Medrano a kol. (2005) | (14)   | imunokompetentní dospělí (výplach dutiny ústní) – administrativní pracovníci nemocnice | 20                  |
| Nevez a kol. (1997)   | (15)   | imunokompetentní dospělí (BAL)   | 20                  |

**Tab. 2** Hraníční hodnoty pro odlišení kolonizace do aktivní infekce

| Studie                  | Citace | Počet pacientů                    | Cílový gen   | Hodnota cut-off  | Senzitivita (%) | Specificita (%) |
|-------------------------|--------|-----------------------------------|--------------|--|-----------------|-----------------|
| Alanio a kol. (2011)    | (5)    | 238 (69 HIV + 115 HM + 15 OT aj.) | <i>mtLSU</i> | horní > 1900 TFEq/ml<br>dolní < 120 TFEq/ml  | 86<br>100       | 100<br>97       |
| Botterel a kol. (2012)  | (16)   | 287 (39 HIV + 111 HM + 47 OT aj.) | <i>mtLSU</i> | $\geq 4,0 \log_{10}$ kopií / $\mu$ l<br>$\geq 2,6 \log_{10}$ kopií / $\mu$ l                               | 100             | 100             |
| Matsumura a kol. (2012) | (17)   | 147 (5 HIV + 20 HM + 29 OT)       | <i>DHPS</i>  | 1300 kopií/ml<br>(odlišení prokázané PCP x možná PCP)<br>340 kopií/ml<br>(odlišení možné PCP x kolonizace) | 100<br>67       | 80<br>73        |

HIV – HIV pozitivní, HM – hematologická malignita, OT – orgánové, *mtLSU* transplantace – velká podjednotka mitochondriální DNA (z angl. mitochondrial DNA large subunit), *DHPS* – dihydropteroát syntáza, TFEq – ekvivalenty trofické formy (z angl. trophic form equivalents)

zahájení terapie se zabývá řada recentně publikovaných prací (Tab. 2). Publikované hodnoty lze jen obtížně srovnávat mezi sebou, protože se liší jak způsob zpracování materiálu, metoda izolace DNA, metodika PCR (cílový gen [více- nebo jednokopiový] atd.), tak jednotka, v níž je pozitivita vyjádřena. Obecně lze ale říci, že se většina autorů shoduje v tom, že existují dvě hodnoty – dolní, která diagnózu PCP vylučuje, a horní, která je spojena s vysokou pravděpodobností PCP. Mezi nimi leží „šedá zóna“, kdy je při hodnocení nutné zvážit četné klinické faktory (základní onemocnění, podávání profylaxe, podávání steroidů a míru imunoprese atd.). Cut-off pravděpodobně někde v oblasti  $10^3$ – $10^4$  kopií/PCR reakci je spojen s vysokou pravděpodobností PCP.

## Závěr

Protože kultivace *P. jirovecii* není za běžných podmínek možná a ostatní konvenční metody nejsou dostatečně citlivé, je použití molekulárněbiologických metod vhodnou alternativou těchto tradičních přístupů. Vzhledem k velkému procentu kolonizace u zdravých jedinců je pro stanovení rizika PCP u imunokompromitovaných nemocných nutná kvantifikace fungální nálože ve vzorku. Mnohé práce ukazují, že pro diagnostiku PCP je možné použít i neinvazivní klinické vzorky, tyto poznatky je však nutné ověřit na větší skupině pacientů.

Poděkování: Tato práce byla podpořena projekty MZ-RVO (FNBr, 65269705) a SV MUNI/A/0723/2012.

Prohlášení: autor v souvislosti s tématem práce nespolupracuje s žádnou farmaceutickou firmou.

## Literatura

- WAKEFIELD, AE, PIXLEY, FJ, BANERJI, S, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. Lancet, 1990, 336, p. 451–453.
- EDMAN, JC, KOVACS, JA, MASUR, H, et al. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. Nature, 1998, 334, p. 519–522.
- CISSÉ, OH, PAGNI, M, HAUSER, PM. De novo assembly of the *Pneumocystis jirovecii* genome from a single bronchoalveolar lavage fluid specimen from a patient. MBio, 2012, 4, e00412–00428.
- CHOUKRI, F, MENOTTI, J, SARFATI, C, et al. Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis pneumonia*. Clin Infect Dis, 2010, 51, p. 259–265.
- ALANIO, A, DESOUBEAUX, G, SARFATI, C, et al. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. Clin Microbiol Infect, 2011, 17, p. 1531–1537.
- SAMUEL, CM, WHITELOW, A, CORCORAN, C, et al. Improved detection of *Pneumocystis jirovecii* in upper and lower respiratory tract specimens from children with suspected *pneumocystis pneumonia* using real-time PCR: a prospective study. BMC Infect Dis, 2011, 11, p. 329.
- REID, AB, CHEN, SC, WORTH, LJ. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients: new risks and diagnostic tools. Curr Opin Infect Dis, 2011, 24, p. 534–544.
- HAUSER, PM, BILLE, J, LASS-FLÖRL, C, et al. Multicenter, prospective clinical evaluation of respiratory samples from subjects at risk for *Pneumocystis jirovecii* infection by use of a commercial real-time PCR assay. J Clin Microbiol, 2011, 49, p. 1872–1878.
- SEAH, C, RICHARDSON, SE, TSUI, G, et al. Comparison of the FXG™: RESP (Asp+) real-time PCR assay with direct immunofluorescence and calcofluor white staining for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory specimens. Med Mycol, 2012, 50, p. 324–327.
- McTAGGART, LR, WENGENACK, NL, RICHARDSON, SE. Validation of the MycAssay *Pneumocystis* kit for detection of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage specimens by comparison to a laboratory standard of direct immunofluorescence microscopy, real-time PCR, or conventional PCR. J Clin Microbiol, 2012, 50, p. 1856–1859.
- SAMPSONAS, F, KONTOYIANNIS, DP, DICKEY, BF, EVANS, SE. Performance of a standardized bronchoalveolar lavage protocol in a comprehensive cancer center: a prospective 2-year study. Cancer, 2011, 117, p. 3424–3433.



## infekce vyvolané *Pneumocystis jirovecii*

**12. PONCE, CA., GALLO, M., BUSTAMANTE, R., VARGAS, SL.** *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. Clin Infect Dis, 2010, 50, p. 347-353.

**13. VARGAS, SL., PIZARRO, P., LÓPEZ-VIEYRA, M., et al.** *Pneumocystis* colonization in older adults and diagnostic yield of single versus paired noninvasive respiratory sampling. Clin Infect Dis, 2010, 50, e19-e21.

**14. MEDRANO, FJ., MONTES-CANO, M., CONDE, M., et al.** *Pneumocystis jirovecii* in general population. Emerg Infect Dis, 2005, 11, p. 245-250.

**15. NEVEZ, G., JOUNIEAUX, V., LINAS, MD., et al.** High frequency of *Pneumocystis carinii* sp. f. *hominis* colonization in HIV-negative patients. J Eukaryot Microbiol, 1997, 44, 36S.

**16. BOTTEREL, F., CABARET, O., FOULET, F., et al.** Clinical significance of quantifying *Pneumocystis jirovecii* DNA by using real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients. J Clin Microbiol, 2012, 50, p. 227-231.

**17. MATSUMURA, Y., ITO, Y., IINUMA, Y., et al.** Quantitative real-time PCR and the (1→3)- $\beta$ -D-glucan assay for differentiation between *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization. Clin Microbiol Infect, 2012, 18, p. 591-597.

---

e-mail: [mlengerova@fnbrno.cz](mailto:mlengerova@fnbrno.cz)

Příloha 9: Lengerova M., Racil Z., Volfova P., Lochmanova J., Berkovcova J., Dvorakova D., Vorlicek J., Mayer J. Real-time PCR diagnostics failure caused by nucleotide variability within exon 4 of human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, roč. 45, č. 3, s. 1042-1044.

## Real-Time PCR Diagnostics Failure Caused by Nucleotide Variability within Exon 4 of the Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Gene<sup>†</sup>

Martina Lengerova,<sup>1\*</sup> Zdenek Racil,<sup>2</sup> Pavlina Volfova,<sup>1</sup> Jana Lochmanova,<sup>1</sup> Jitka Berkovcova,<sup>1</sup> Dana Dvorakova,<sup>1</sup> Jiri Vorlicek,<sup>2</sup> and Jiri Mayer<sup>2</sup>

*Center of Molecular Biology and Gene Therapy, Department of Internal Medicine-Hematology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic,<sup>1</sup> and Department of Internal Medicine-Hematology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic<sup>2</sup>*

Received 30 May 2006/Returned for modification 17 July 2006/Accepted 4 January 2007

**Here we report how variability in the human cytomegalovirus genome sequence may seriously affect the outcome of its molecular diagnosis. A real-time quantitative PCR assay targeting the major immediate-early gene failed to detect the viral load in some, but not all, clinical samples from hematological patients. By amplification and sequencing the DNA across the regions targeted by this assay we found a number of nucleotide substitutions which accounted for decreased primer/probe binding. This decreased the sensitivity of the assay up to 1,000-fold.**

Human cytomegalovirus (CMV) persists in the host organism for a lifetime and becomes frequently reactivated in immunocompromised patients, such as recipients of bone marrow or solid organ transplants (1, 15, 20). Establishment of a reliable real-time quantitative PCR assay (Q-PCR) for detection of CMV is crucial for successful management of CMV infection. Despite the importance of precise diagnosis of CMV, a generally accepted methodology has not yet been established. Optimal detection of CMV DNA in all clinical samples can be achieved only if primer sequences capable of detecting all the CMV strains are used. A number of different genes are used as a target for quantitative detection of CMV, including the major immediate-early (MIE) gene (5, 10, 12), the phosphoprotein 65 (pp65) gene (6, 7, 18), and the glycoprotein B (gB) gene (9, 11). Some groups use duplex assays to detect two different genes simultaneously (2, 8).

The coding sequence for the MIE gene consists of three exons and has long been assumed to be highly conserved due to the important function that MIE plays in the CMV life cycle and from sequence comparisons of the MIE genes from laboratory strains AD169 and Towne. Later studies described significant sequence variability in some parts of this gene, mainly in its exon 4 (3, 4, 16, 21). Zwegyberg Wirgart et al. (21) found the MIE exon 4 sequence to be more variable than the CMV DNA polymerase gene or the glycoprotein B gene. Despite these findings, the MIE gene is still a popular target sequence for routine CMV diagnostics.

In our laboratory, we simultaneously used the Q-PCR assay published by Tanaka et al. (19) that detects a part of exon 4 of the MIE gene (primers RQ1 and RQ2 and RQ probe) and an in-house qualitative PCR assay that detects a region between exon 2 and exon 4 of the same gene (primers CMV 2-4F and

CMV 2-4R). Table 1 has further details on the assays and primer/probe sequences. We compared the sensitivities of these two methods by amplifying 10-fold dilutions of  $1 \times 10^7$  copies of CMV DNA, which had been isolated from the CMV strain AD169 (each dilution was tested in triplicate). The Q-PCR has proven to be about 10 times more sensitive than the qualitative method. The Q-PCR detection limit was 10 copies of CMV DNA apart from 100 copies detected by qualitative PCR.

Between January 2004 and January 2005 we assayed 1,854 samples from 363 patients including immunocompromised patients with hematological disorders, patients with bone marrow transplants, and/or recipients of peripheral blood stem cells. DNA isolated from  $4 \times 10^6$  peripheral blood leukocytes (using the QIAamp blood kit [QIAGEN, Germany]) was used as a template. The Q-PCR detected virus reactivation in 64 patients. In contrast, Q-PCR repeatedly failed to detect any viral load in 18 patients who were previously shown as CMV positive using the less-sensitive qualitative method. We hypothesized that such a discrepancy could be explained by primer/probe mismatch due to sequence variability in the MIE exon 4.

Therefore, we performed a sequence analysis of the Q-PCR target region (nucleotide positions 2719 to 2919, GenBank accession no. M21295) in samples from all 18 patients with false-negative results. We designed two pairs of primers spanning this region and used nested PCR to obtain sufficient amounts of PCR product for sequencing (Table 1 shows primer sequences and locations). Both strands were sequenced using the inner primers and the BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) on an ABI PRISM 310 Analyzer. As a control group we sequenced 10 samples in which viral copies were detected by Q-PCR. We used Clustal W (freeware, [www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)) to align the obtained sequences with the available sequences of laboratory strains AD169, Towne, and Toledo (results are compiled in Fig. 1).

We found a number of nucleotide substitutions in both primers and probe sequence in all 18 false-negative samples. In

\* Corresponding author. Mailing address: Center of Molecular Biology and Gene Therapy, University Hospital, Cernopolni 9, CZ-613 00 Brno, Czech Republic. Phone and fax: 420-532 234 623. E-mail: [mlengerova@fnbrno.cz](mailto:mlengerova@fnbrno.cz).

<sup>†</sup> Published ahead of print on 17 January 2007.

TABLE 1. Primers, probes, and PCR specifications used for amplification of various parts of the MIE gene<sup>a</sup>

| Primer/probe designation | Sequence, 5'→3'                 | Genomic coordinate <sup>b</sup> | Cycling conditions  |
|--------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|
| RQ1                      | GACTAGTGTGATGCTGGCCAAG          | 2719                            | 95°C/10 min → 50 times (95°C/15 s → 60°C/1 min)                           |
| RQ2                      | GCTACAATAGCCTCTTCTCATCTG        | 2919                            |   |
| RQ probe                 | AGCCTGAGGTTATCAGTGTAAATGAAGCGCC | 2758                            |   |
| CMV 2-4F                 | GACCCTGATAATCCTGACGA            | 1506                            | 95°C/10 min → 35 times (95°C/30 s → 53°C/30 s → 72°C/30 s) → 72°C/7 min   |
| CMV 2-4R                 | ATGTGCTCCTTGATTCTATG            | 2073                            |   |
| exon4celyF               | GAAATTCACTGGCGCCTTTA            | 2101                            | 95°C/3 min → 35 times (95°C/1 min → 53°C/1 min → 72°C/2 min) → 72°C/7 min |
| exon4celyR               | AGCACCATCCTCCTCTTCTCT           | 3169                            |   |
| CMV4F                    | AGTGAGTTCTGTGCGGGTGCT           | 2678                            | 95°C/3 min → 25 times (95°C/30 s → 53°C/30 s → 72°C/1 min) → 72°C/7 min   |
| CMV4R                    | CCCTCCTCCTCTTCTCATC             | 3075                            |   |

<sup>a</sup> RQ1, RQ2, and RQ probe, primers and probe for Q-PCR; CMV 2-4F and CMV 2-4R, primers for qualitative PCR; exon4celyF, exon4celyR, CMV4F, and CMV4R, primers for nested PCR and consecutive sequencing.  
<sup>b</sup> MIE gene sequence (GenBank accession no. M21295).

seven samples, there were substitutions in the forward primer sequence, and all samples had substitutions in the probe and reverse primer regions. When the sequences were compared to the sequences of different laboratory strains, they were found to be more similar to strains Towne and Toledo than to AD169, which served as the template for designing the assay (19). Sequences of all 10 samples of the control group were homologous to the laboratory strain AD169. No association between the sequence of MIE exon 4 and sex, age, clinical diagnosis, and the progression of CMV infection was observed.

We also investigated the effects of primer/probe template mismatches on PCR efficiency. We cloned the PCR products (amplified with primers CMV4F and CMV4R) from AD169 (no mismatch), sample 13 (four mismatches), and sample 3 (six mismatches) into plasmids and used them as templates for real-time PCR (each sample was tested in triplicate). Comparisons of average cycle threshold values for 10-fold dilutions (10<sup>6</sup> to 10<sup>2</sup> copies/tube) revealed major differences between plasmid DNA with mismatches and that without mismatches. On average, plasmid derived from sample 13 (four mismatches) was amplified 6.4 cycles later than the mismatch-free

plasmid. This represents sensitivity almost 100 times lower (assuming the average 3.32-cycle difference between 10-fold dilutions of standard DNA). Plasmid derived from sample 3 (six mismatches) was amplified about 12.3 cycles later than mismatch-free plasmid. This represents sensitivity over 1,000 times lower.

Genetic variability of CMV has been reported several times (13, 14), and this study documents how seriously this variability can influence PCR results. Considering that CMV is the most frequent cause of life-threatening infections in immunocompromised patients, its diagnosis must be fast and precise. Our data show that the assay published by Tanaka et al. (19) would not detect CMV in 21.9% of positive samples (18/82) from our patients. These samples would have been misjudged as CMV negative without simultaneous use of two PCR assays, and patients could therefore have been at risk of progression of a fatal CMV disease.

Based on our experience and previously published data we strongly recommend not using exon 4 of the MIE gene for routine PCR diagnostics. Schaade et al. (17) suggests that novel real-time PCR assays should be rigorously tested on

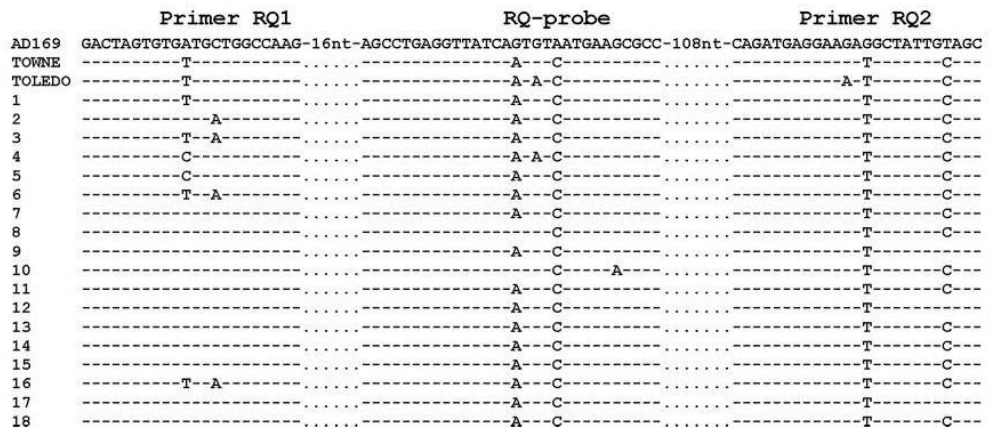


FIG. 1. Sequence comparison of selected areas of the MIE gene exon 4 of the laboratory strains AD169, Towne, and Toledo with those of clinical isolates. Dashes indicate homology to AD169.

large panels of viral isolates. However, the existence of rare or newly arising variants cannot be excluded.

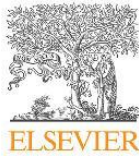
**Nucleotide sequence accession number.** The GenBank accession number for the MIE gene sequence is M21295.

We thank Richard C. Moore for reviewing the English.

#### REFERENCES

1. Boeckh, M., B. Fries, and W. G. Nichols. 2004. Recent advances in the prevention of CMV infection and disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr. Transplant.* **8**(Suppl. 5):19–27.
2. Boeckh, M., M. Huang, J. Ferrenberg, T. Stevens-Ayers, L. Stensland, W. G. Nichols, and L. Corey. 2004. Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42**:1142–1148.
3. Brytting, M., J. Wahlberg, J. Lundeberg, B. Wahren, M. Uhlen, and V. A. Sundqvist. 1992. Variations in the cytomegalovirus major immediate-early gene found by direct genomic sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **30**:955–960.
4. Chou, S. 1992. Effect of interstrain variation on diagnostic DNA amplification of the cytomegalovirus major immediate-early gene region. *J. Clin. Microbiol.* **30**:2307–2310.
5. Drago, L., A. Lombardi, E. De Vecchi, G. Giuliani, R. Bartolone, and M. R. Gismondo. 2004. Comparison of nested PCR and real time PCR of herpesvirus infections of central nervous system in HIV patients. *BMC Infect. Dis.* **4**:55.
6. Gault, E., Y. Michel, A. Dehee, C. Belabani, J. C. Nicolas, and A. Garbarg-Chenon. 2001. Quantification of human cytomegalovirus DNA by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **39**:772–775.
7. Griscelli, F., M. Barrois, S. Chauvin, S. Lastere, D. Bellet, and J. H. Bourhis. 2001. Quantification of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **39**:4362–4369.
8. Herrmann, B., V. C. Larsson, C. J. Rubin, F. Sund, B. M. Eriksson, J. Arvidson, Z. Yun, K. Bondeson, and J. Blomberg. 2004. Comparison of a duplex quantitative real-time PCR assay and the COBAS Amplicor CMV Monitor test for detection of cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* **42**:1909–1914.
9. Kearns, A. M., M. Guiver, V. James, and J. King. 2001. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR for the detection of human cytomegalovirus. *J. Virol. Methods* **95**:121–131.
10. Leruez-Ville, M., M. Ouachee, R. Delarue, A. S. Sauget, S. Blanche, A. Buzyn, and C. Rouzioux. 2003. Monitoring cytomegalovirus infection in adult and pediatric bone marrow transplant recipients by a real-time PCR assay performed with blood plasma. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2040–2046.
11. Li, H., J. S. Dummer, W. R. Estes, S. Meng, P. F. Wright, and Y. W. Tang. 2003. Measurement of human cytomegalovirus loads by quantitative real-time PCR for monitoring clinical intervention in transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* **41**:187–191.
12. Nitsche, A., N. Steuer, C. A. Schmidt, O. Landt, and W. Siebert. 1999. Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA. *Clin. Chem.* **45**:1932–1937.
13. Nye, M. B., A. R. Leman, M. E. Meyer, M. A. Menegus, and P. G. Rothberg. 2005. Sequence diversity in the glycoprotein B gene complicates real-time PCR assays for detection and quantification of cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4968–4971.
14. Pignatelli, S., P. Dal Monte, G. Rossini, and M. P. Landini. 2004. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Rev. Med. Virol.* **14**:383–410.
15. Prentice, H. G., and P. Kho. 1997. Clinical strategies for the management of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant.* **19**:135–142.
16. Retiere, C., B. M. Imbert, G. David, P. Courcoux, and M. M. Hallet. 1998. A polymorphism in the major immediate-early gene delineates groups among cytomegalovirus clinical isolates. *Virus Res.* **57**:43–51.
17. Schaade, L., P. Kockelkorn, K. Ritter, and M. Kleines. 2001. Detection of cytomegalovirus DNA in human specimens by LightCycler PCR: melting point analysis is mandatory to detect virus strains with point mutations in the target sequence of the hybridization probes. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3809.
18. Stocher, M., V. Leb, M. Bozic, H. H. Kessler, G. Halwachs-Baumann, O. Landt, H. Stekel, and J. Berg. 2003. Parallel detection of five human herpes virus DNAs by a set of real-time polymerase chain reactions in a single run. *J. Clin. Virol.* **26**:85–93.
19. Tanaka, N., H. Kimura, K. Iida, Y. Saito, I. Tsuge, A. Yoshimi, T. Matsuyama, and T. Morishima. 2000. Quantitative analysis of cytomegalovirus load using a real-time PCR assay. *J. Med. Virol.* **60**:455–462.
20. Zaia, J. A. 2002. Prevention and management of CMV-related problems after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **29**:633–638.
21. Zweyberg Wirgart, B., M. Brytting, A. Linde, B. Wahren, and L. Grillner. 1998. Sequence variation within three important cytomegalovirus gene regions in isolates from four different patient populations. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3662–3669.

Příloha 10: Volfova P., Lengerova M., Lochmanova J., Dvorakova D., Ricna D., Palackova M., Weinbergerova B., Mayer J., Racil Z. Detecting human cytomegalovirus drug resistant mutations and monitoring the emergence of resistant strains using real-time PCR. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam: Elsevier Science Inc, 2014, roč. 61, č. 2, s. 270-274.



## Detecting human cytomegalovirus drug resistant mutations and monitoring the emergence of resistant strains using real-time PCR



Pavlina Volfova<sup>a,\*,1</sup>, Martina Lengerova<sup>a,b,c,1</sup>, Jana Lochmanova<sup>a</sup>, Dana Dvorakova<sup>a,b,c</sup>, Dita Ricna<sup>a</sup>, Martina Palackova<sup>a</sup>, Barbora Weinbergerova<sup>a</sup>, Jiri Mayer<sup>a,b,c</sup>, Zdenek Racil<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Department of Internal Medicine–Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>c</sup> CEITEC—Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 May 2014

Received in revised form 30 June 2014

Accepted 15 July 2014

#### Key words:

HCMV resistance

Real-time PCR

Sensitive/resistant strain

Repopulation

### ABSTRACT

**Background:** Antiviral resistance development is a serious complication of human cytomegalovirus virostatic therapy caused by mutations in UL97 and/or UL54 genes.

**Objectives:** To determinate the presence of sensitive and resistant strains in patients developing antiviral resistance.

**Study design:** We used three different molecular biological methods for mutation analysis—restriction fragment length polymorphism, sequencing and real-time PCR approach.

**Results:** We describe three allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients developing the GCV resistant HCMV strains manifested by virostatic treatment failure. In these patients we identified UL97 mutations L595S, A594V and A594T and monitored the dynamics of coexisted sensitive/resistant strains. We confirmed the presence of mixed HCMV populations and in two patients a phenomenon of sensitive strain repopulation which occurred after 6.5 months and 1 month after removing GCV pressure.

**Conclusions:** Our results show changes in proportions of sensitive/resistant subpopulations over time but other studies would be required to demonstrate the beneficial impact of their monitoring on clinical outcome.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Background

The management of human cytomegalovirus (HCMV) in hematopoietic stem cell transplant patients is now mostly based on preemptive therapy, which is initialized in patients with no clinical symptoms of infection but with viral DNAemia (the presence of HCMV DNA) detected in a peripheral blood sample using (real-time) polymerase chain reaction (PCR). This strategy has been proved to be safe and effective in preventing the development of HCMV disease and detailed clinical management guidelines have been published [1].

Ganciclovir (GCV) (or its oral prodrug valganciclovir—VGCV) is the drug of choice to treat HCMV infections in immunocompromised patients, with foscavir (FOS) and cidofovir (CDV) as alternatives. The results of HCMV treatment can be influenced by many factors such as the underlying disease, the severity of

immunosuppression, antiviral drug doses, the time of dosing and the susceptibility of the patient's viral strain to the administrated drug. These factors may contribute to the emergence of a drug-resistant virus [2]. Viral resistance to therapy is considered if antigenemia (specific antigen monitoring) and/or viral load (measured by real-time PCR) increases despite 2 weeks of virostatic therapy.

HCMV has developed a way to escape treatment by point mutations emerging in two viral genes involved in the drug's mechanism of action. Resistance to GCV and VGCV is caused by mutations in the viral protein kinase gene (UL97) and/or the viral DNA-polymerase gene (UL54). Resistance to FOS or CDV results from mutations in the UL54 gene and CDV-resistant mutants are generally cross-resistant to GCV [3].

Common methods for detecting certain mutations are PCR followed by restriction enzyme digestion (restriction fragment length polymorphism, RFLP) and direct sequencing of PCR products containing the region of interest [4].

We routinely use PCR-RFLP to detect the most common mutations in the UL97 gene and the presence of the mutations is simultaneously detected by direct sequencing. The use of

\* Corresponding author. Tel.: +420 532234628; fax: +420 532234623.

E-mail address: [pvolfova@fnbrno.cz](mailto:pvolfova@fnbrno.cz) (P. Volfova).

<sup>1</sup> PV and ML contributed equally.

PCR-RFLP allows fast detection of the most frequent mutations (till 1 day) while direct sequencing precludes the false negative results and allows detection of all mutations in the amplified region. In our patients, we noticed the presence of both GCV sensitive and resistant strain in recurrent episodes of infection.

Here we report three patients with recurrent HCMV infections and detected mutations in the UL97 gene. We used real-time PCR with TaqMan-MGB probes specific for three UL97 mutations (L595S, A594V and A594T) and retrospectively analyzed the presence and quantity of sensitive and resistant HCMV strains.

## 2. Study design

### 2.1. Patients

All patients were routinely monitored for the presence of HCMV viral load after allogeneic hematopoietic stem cell transplant (HSCT) at the Department of Internal Medicine–Hematology and Oncology, University Hospital Brno. The Patients' demographic characteristics are contained in Table 1. All patients signed informed consent for the scientific use of samples. Antiviral resistance testing was performed if HCMV viral load increased despite virostatic therapy.

## 3. Materials and methods

### 3.1. DNA isolation

5 ml of peripheral blood was lysed with 10 × lysis solution (1.55 M NH<sub>4</sub>Cl, 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA) in 1:4 ratios, 15 min on ice. After the dissolution of erythrocytes, leucocytes were collected using centrifugation and a pellet was resuspended in 200 μl of 0.9% NaCl. The DNA was isolated from 4 × 10<sup>6</sup> peripheral blood leukocytes using the QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions, DNA concentration was measured with NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) and samples were stored at –20 °C before use.

### 3.2. Quantitative real-time PCR

Monitoring the HCMV viral load was performed weekly using an in house real-time PCR method targeted at the UL83 gene. The real-time PCR assay was performed in a total reaction mixture of 25 μl containing 5 μl of extracted DNA (100–500 ng), 12.5 μl of Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems, USA), 400 nM forward primer (3'-ACGTCAGCGTTCGTGTTCC-5'), 400 nM reverse primer (3'-CTCGCAGAAGGACTCCAGGTA-5'), and 200 nM TaqMan probe (BHQ–TCACCTATCACCTGCATCTGGTTGCG–FAM). The assay was performed under the following cycling conditions: 1 cycle of 15 min at 95 °C, followed by 50 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C. The threshold for initiating virostatic therapy was 500 copies HCMV/μg DNA.

**Table 1**

Patient's characteristics. Age (years) – patient's age at the time of HSCT, Days after tx – days of first HCMV infection after HSCT. The duration of antiviral therapy days of VGCV/CGV treatment to GCV resistance development.

| Patient number | Sex    | Age (years) | Diagnosis | Type of HSCT | D/R CMV status | Mutation detected | First HCMV infection (days after HSCT) | Duration of antiviral therapy (days) | Sensitive strain repopulation |
|----------------|--------|-------------|-----------|--------------|----------------|-------------------|--|--------------------------------------|-------------------------------|
| 1              | Female | 32          | AML       | MUD          | D–/R+          | L595S             | 40                                     | 30                                   | No                            |
| 2              | Male   | 52          | AML       | MUD          | D–/R+          | A594V             | 42                                     | 41                                   | Yes                           |
| 3              | Female | 56          | B-CLL     | MUD          | D–/R+          | A594T             | 11                                     | 35                                   | Yes                           |

### 3.3. Detecting CMV resistance mutations

PCR followed by RFLP was carried out to detect the presence of the most frequent UL97 mutations—M460V, A594V, L595S and L595F as previously published [5]. At the same time, 776bp fragments of the UL 97 gene (codons 439–696) were analyzed by direct sequencing [6].

### 3.4. Specific real-time PCR methods for A594V, L595S and A594T

We used highly specific minor groove binder (MGB) TaqMan probes which are able to distinguish between UL97 sensitive and resistant strain sequences with high accuracy. Probes matching the sensitive or resistant HCMV strains were labeled with FAM and VIC reporter, respectively. The reactions of total volume 25 μl contained 5 μl of template or standard DNA and 12.5 μl Universal ROX ABmix (ABgene, Thermo Scientific, USA). The sequences of primers and probes of all assays and their optimal concentrations to amplify sensitive (WT) and resistant (mut) forms are summarized in Table 2. The temperature profile of all assays was 15 min at 95 °C followed by 50 cycles 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C. Standard DNA of sensitive strain, A595S, A594V and A594T was prepared by cloning patients' PCR product samples in the pCR2.1 vector (TA Cloning Kit, Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions and standard curves from serially diluted plasmid DNA (2 × 10<sup>6</sup> to 2 × 10<sup>0</sup> copies/5 μl DNA) were constructed. RotorGene 6000 Series Software 1.7 was used to analyze the results. All samples were amplified in duplicate and the copy number of sensitive and resistant strains were calculated from the standard curve and expressed as copies per 1 μg of DNA in PCR reaction.

## 4. Results

We describe three cases of patients after allogeneic HSCT carrying GCV resistant HCMV manifested by antiviral treatment failure. The HCMV DNAemia monitoring results, type and duration of virostatic therapy and the proportion of sensitive and resistant strain in individual clinical samples in these patients are presented in Figs. 1–3. Figure part (A) shows the dynamics of viral load in repeated virus infection episodes, with cut off set as 500 copies/μg of DNA to initiate treatment (marked with a solid line), and applied therapy. Figure part (B) shows the ratio between sensitive (black) and resistant strain (white) in individual samples.

The development of HCMV resistance in Patient 1 (Fig. 1) occurred +30 days of VGCV therapy. After a short period on combination therapy and based on the detection of L595S mutation, the therapy was changed to FOS. It was administrated in all following HCMV episodes. The GCV resistant strain was present and dominant in all subsequent infections. After day +172 the patient was monitored for the next two months and did not develop further HCMV infections.

In Patient 2 (Fig. 2), a resistant strain carrying an A594V mutation was detected after +41 days of VGCV therapy and it promptly replaced sensitive strain. However, in the next episodes of HCMV infection sensitive strain appeared again and in the last episode it



**Table 2**

Sequences of primers and probes, oligonucleotide concentration in PCR reaction and length of PCR product.

| Assay     | Primer/probe name | 5'-sequence-3'           | Concentration (nM) | PCR product (bp) |
|-----------|-------------------|--------------------------|--------------------|------------------|
| A594V-WT  | A594V-F1          | AGGCGTTGCTCTTTAAGCAC     | 400                | 94               |
|           | A594V-R           | AGGCGCGTAGCTCATT         | 400                |                  |
|           | A594Vwt           | FAM-TCCAACGCGCGG-MGBNFQ  | 200                |                  |
| A594V-mut | mutUL97-F         | AGGCGTTGCTCTTTAAGCAC     | 900                | 117              |
|           | mutUL97-R         | GCCAGAATGAGCAGACAGG      | 900                |                  |
|           | A594Vmut          | VIC-CTCAAACGCGCGG-MGBNFQ | 200                |                  |
| L595S-WT  | mutUL97-F         | AGGCGTTGCTCTTTAAGCAC     | 900                | 117              |
|           | mutUL97-R         | AGGCGCGTAGCTCATT         | 900                |                  |
|           | A595Swt           | FAM-CGCGTTGGAGAAC-MGBNFQ | 200                |                  |
| L595S-mut | mutUL97-F         | AGGCGTTGCTCTTTAAGCAC     | 900                | 117              |
|           | mutUL97-R         | AGGCGCGTAGCTCATT         | 900                |                  |
|           | A595S-mut         | VIC-TTCTCCGACGCGCG       | 200                |                  |
| A594T-WT  | A594T-F           | ACGAGGCCGTGCTCTTTAA      | 400                | 112              |
|           | A595T-R           | GGAGCAGTCGCTGAGCTT       | 400                |                  |
|           | A594Twt           | FAM-TGCCGCGCGTTGG-MGBNFQ | 200                |                  |
| A594T-mut | A594T-F           | ACGAGGCCGTGCTCTTTAA      | 400                | 112              |
|           | A595T-R           | GGAGCAGTCGCTGAGCTT       | 400                |                  |
|           | A594Tmut          | VIC-CTCCCGACGTTGG-MGBNFQ | 200                |                  |

completely replaced the resistant strain. The patient was monitored for the next 4 months, but no other viral infection occurred.

In Patient 3 (Fig. 3), the first episode of HCMV infection was detected +11 days after HSCT and treated with GCV, which was replaced by FOS due to patient's cytopenia. During the follow up, a further CMV infection occurred and was treated with GCV. A GCV resistant strain, with an A594T mutation, emerged after 80 days of therapy and was eliminated with FOS treatment. FOS was administered in the following HCMV infections, between days 146 and 178, in a reduced dose because of impaired renal function, and was later replaced by VGCV for outpatient treatment. The last infection episode (day +250) was complicated by hypertension and nephrotoxicity therefore the patient had no treatment, but was only under frequent HCMV viral load monitoring. The viral load decreased spontaneously, possibly due to the restoration of immune functions and during a further 5 month's monitoring no HCMV infection

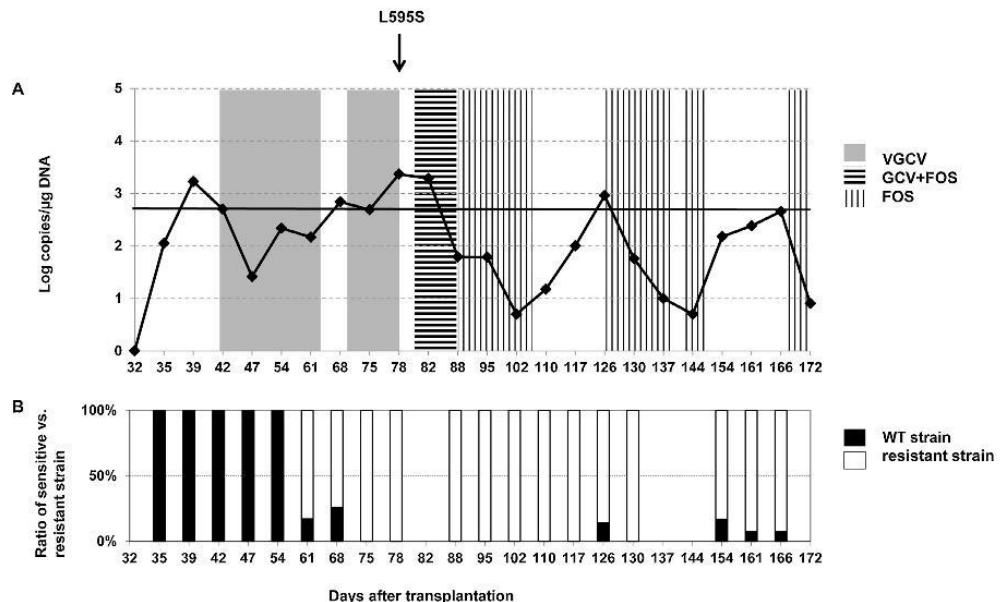
developed. In the retrospective analysis we found, that resistant strain was present only transiently and was replaced by sensitive strain shortly after removing selection pressure.

All patients reached molecular remission of their disease and at present have no specific hematological treatment.

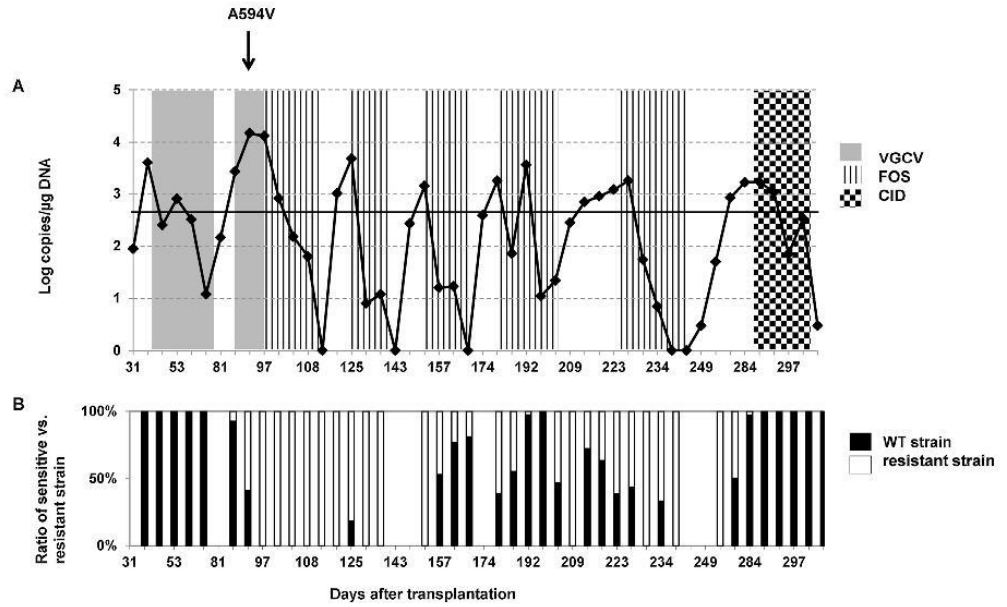
## 5. Discussion

The development of antiviral drug resistance remains a relatively rare but serious complication in the treatment of HCMV infections in immunocompromised patients. For this group, the incidence of resistance to GCV was estimated at 2–8% of treated patients, and usually occurred after 2–3 months of therapy [1,7].

The genotypic detection of relevant mutations in UL97 and UL54 genes is usually performed by widely used molecular



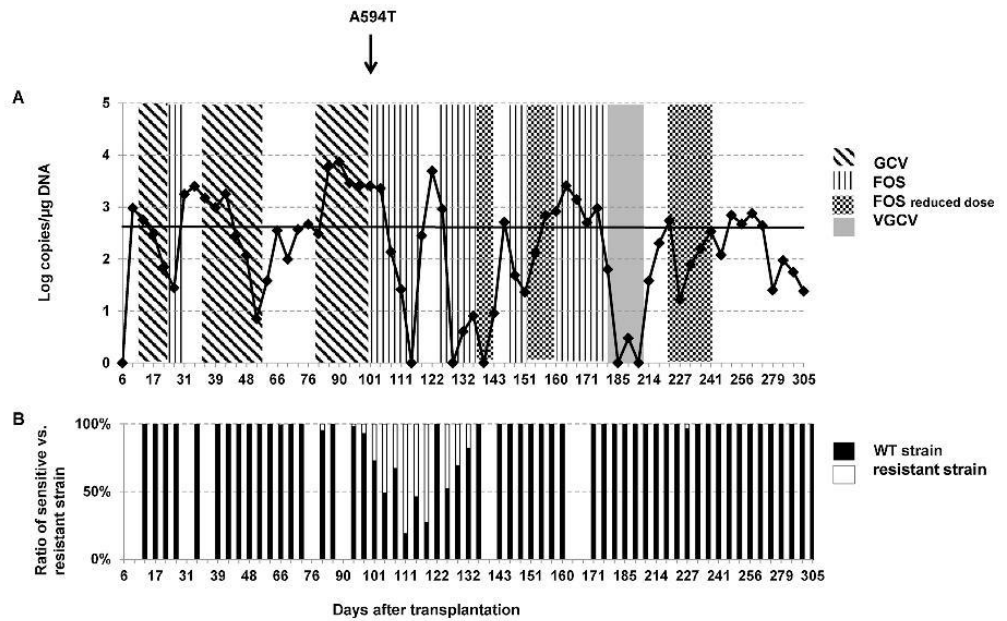
**Fig. 1.** (A) Dynamics of viral load in repeated episodes of viral infection after transplantation. Cut off 500 copies/μg of DNA for initiation of treatment is marked with a solid line. Columns show the duration of applied therapy. (B) The ratio between sensitive (black) and resistant strain (white) in individual samples. Missing columns indicate the lack of DNA.



**Fig. 2.** (A) Dynamics of viral load in repeated episodes of viral infection after transplantation. Cut off 500 copies/μg of DNA for initiation of treatment is marked with a solid line. Columns show the duration of applied therapy. (B) The ratio between sensitive (black) and resistant strain (white) in individual samples. Missing columns indicate the lack of DNA.

biological methods based on direct sequencing and/or PCR-RFLP. Single-nucleotide polymorphism (SNP) detection using real-time PCR with TaqMan-MGB probes represents a more modern approach, which allows a highly specific and sensitive way of detecting mutations. The main advantage of these methods is the high sensitivity, where the very small amounts of virus variants

can be detected in contrast with conventional Sanger sequencing, which can detect a viral strain representing a population of more than 10–20% [2]. The most modern application for drug resistance mutation detection represents next-generation sequencing technologies, which allow detecting of low-percentages of resistant virus. So far their routine use is limited by high costs.



**Fig. 3.** (A) Dynamics of viral load in repeated episodes of viral infection after transplantation. Cut off 500 copies/μg of DNA for initiation of treatment is marked with a solid line. Columns show the duration of applied therapy. (B) The ratio between sensitive (black) and resistant strain (white) in individual samples. Missing columns indicate the lack of DNA.

In this study, we performed a retrospective analysis of three patients after HSCT with recurrent HCMV infections that developed resistance to GCV. The emergence of resistance in these patients occurred very rapidly after 28, 42 and 77 days of antiviral therapy, respectively, which corresponds to the published data. In all patients point mutations in 594 and 595 codons in the UL97 gene were found. These mutations belong to the most frequently detected mutations with a known confirmed GCV resistant phenotype [4]. L595S, A594V and A594T represent about 53% of all mutations in UL97 [8], therefore our assays enable sensitive/resistant strain monitoring in majority of affected patients.

Furthermore, we confirmed the possibility that resistant strain may be repopulated by sensitive strain. The phenomenon of mixed HCMV populations in one patient has already been described [9,10], but to our best knowledge there are only few reports which have quantified sensitive and resistant HCMV strains to monitor the emergence of resistance and possible repopulation by the sensitive strain after selection pressure removal [11]. Drew et al. [12] observed repopulation with residual sensitive strain after ceasing treatment with an antiviral drug to which a virus had become resistant. Authors described one case and summarized another six cases with repopulation published previously. The patient population consisted of two patients with AIDS, three patients who had undergone solid organ transplantation (two lung, one heart) and two who had undergone hematopoietic cell transplantation. In five patients, sensitive strain repopulated after 3, 5, 6 (two patients) and 8 months after the completion of therapy. In two patients with mutations sensitive strain did not replace resistant strains. In this study, the repopulation with sensitive strain occurred in two patients (Patient 2 and 3) after 6.5 months and 1 month after the cessation of GCV, respectively.

Repopulation with sensitive strain could lead to a change of treatment and the patient could again be treated by GCV, which is milder and less toxic in comparison with FOS. In our study, therapy was empirically changed to GCV due to renal toxicity of FOS in Patient 3. The use of GCV resulted in a reduction of HCMV load and did not lead to the expansion of previously present resistant strain.

The major limitation of our study is the small number of the patients with confirmed mutations causing resistance to virostatics. However this reflects the generally low incidence of these cases among hematological patients. It appears that quantitative sensitive/resistant strain monitoring can be useful but other studies are needed to determinate benefit of such assays for the management of effective therapy.

## Funding

This work was supported by Ministry of Health, Czech Republic—Conceptual Development of Research Organization (FNBr, 65269705) and research grant of Internal Grant Agency of the Ministry of Health, Czech Republic NT13691-4/2012.

## Competing interests

All authors declare no conflict of interest.

## Ethical approval

Not applicable.

## References

- [1] Emery V, Zuckerman M, Jackson G, Aitken C, Osman H, Pagliuca A, et al. Management of cytomegalovirus infection in haemopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2013;162(1):25–39.
- [2] Chevillotte M, von Einem J, Meier BM, Lin FM, Kestler HA, Mertens T. A new tool linking human cytomegalovirus drug resistance mutations to resistance phenotypes. *Antiviral Res* 2010;85(2):318–27.
- [3] Gilbert C, Boivin G. Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(3):873–83.
- [4] Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2010;23(4):689–712.
- [5] Chou S, Erice A, Jordan MC, Vercellotti GM, Michels KR, Talarico CL, et al. Analysis of the UL97 phosphotransferase coding sequence in clinical cytomegalovirus isolates and identification of mutations conferring ganciclovir resistance. *J Infect Dis* 1995;171(3):576–83.
- [6] Prix L, Hamprecht K, Holzhuber B, Handgretinger R, Klingebiel T, Jahn G. Comprehensive restriction analysis of the UL97 region allows early detection of ganciclovir-resistant human cytomegalovirus in an immunocompromised child. *J Infect Dis* 1999;180(2):491–5.
- [7] Hantz S, Garnier-Geoffroy F, Mazon MC, Garrigue I, Merville P, Mengelle C, et al. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J Antimicrob Chemother* 2010;65(12):2628–40.
- [8] Chou S, Waldemer RH, Selters AE, Michels KS, Kemble GW, Miner RC, et al. Cytomegalovirus UL97 phosphotransferase mutations that affect susceptibility to ganciclovir. *J Infect Dis* 2002;185(2):162–9.
- [9] Allice T, Busca A, Locatelli F, Falda M, Pittaluga F, Ghisetti V. Valganciclovir as pre-emptive therapy for cytomegalovirus infection post-allogeneic stem cell transplantation: implications for the emergence of drug-resistant cytomegalovirus. *J Antimicrob Chemother* 2009;63(3):600–8.
- [10] Göhring K, Feuchtinger T, Mikeler E, Lang P, Jahn G, Handgretinger R, et al. Dynamics of the emergence of a human cytomegalovirus UL97 mutant strain conferring ganciclovir resistance in a pediatric stem-cell transplant recipient. *J Mol Diagn* 2009;11(4):364–8.
- [11] Göhring K, Wolf D, Bethge W, Mikeler E, Faul C, Vogel W, et al. Dynamics of coexisting HCMV-UL97 and UL54 drug-resistance associated mutations in patients after haematopoietic cell transplantation. *J Clin Virol* 2013;57(1):43–9.
- [12] Drew WL, Liu C. Repopulation of ganciclovir-resistant cytomegalovirus by wild-type virus. *Clin Transplant* 2012;26(6):949–52.

Příloha 11: Volfova P., Lengerova M., Winterova J., Racil Z., Dvorakova D., Mayer J. Monitoring of Epstein Barr virus load in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Infection*, Mnichov: Springer-Verlag, 2012, roč. 40, č. 5, s. 583-587.

## Monitoring of Epstein–Barr virus load in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

P. Volfova · M. Lengerova · J. Winterova ·  
Z. Racil · D. Dvorakova · J. Mayer

Received: 24 October 2011 / Accepted: 2 April 2012 / Published online: 19 April 2012  
© Springer-Verlag 2012

The Epstein–Barr virus (EBV) belongs to the family Herpesviridae and is a ubiquitous virus present in over 90 % of the world's population. Virus reactivation in immunocompromised patients can be associated with a broad spectrum of clinical presentations. In particular, the development of EBV-associated post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) remains a serious complication following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and solid-organ transplantation, with a high mortality rate of 50–80 % [1]. Although the incidence of EBV-PTLD is generally low following allogeneic HSCT, it may increase in patients with established risk factors—receipt of unrelated donor graft, the use of T-depleted allografts, the use of anti-thymocyte globulin (ATG), and immunosuppression for the prevention and treatment of graft-versus-host-disease (GVHD) [2]. EBV viral load measurement has become a routine test for monitoring transplant recipients, and numerous published studies have previously shown that elevated EBV DNA levels are highly predictive for PTLD development in HSCT recipients and can identify patients at high risk [3, 4]. Because the viral copy number correlates with the severity and duration of EBV symptoms and could have diagnostic relevance for the development of PTLD, the serial monitoring of EBV DNA load in the peripheral blood

(PB) of transplant recipients is recommended [5]. Here, we report using accurate real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) in patients after allogeneic HSCT. The main objective of this study was to confirm the benefits of regular EBV viral load screening in allogeneic transplant patients compared to sporadic monitoring in patients with EBV infection symptoms and to confirm the previously published cut-off (1,000 copies/ $\mu$ g DNA) as the convenient threshold for the prediction of PTLD.

We retrospectively analyzed 899 PB samples from 46 patients treated at the Department of Internal Medicine–Hematology, University Hospital Brno, between August 2007 and May 2011. Samples were primarily intended for the routine PCR screening of viral pathogens in patients at risk of opportunistic infections. The patient demographics are summarized in Table 1.

There is currently no consensus on which clinical material is a better specimen type for EBV viral load monitoring [6]. Several assays that have been developed used various biological materials, such as whole blood [7], serum/plasma [8, 9], or peripheral blood leucocytes [10]. In our study, we decided to use peripheral blood leucocytes for EBV viral load monitoring, which allows for the detection of cell-associated virus.

DNA was extracted from  $4 \times 10^6$  peripheral blood leucocytes using the QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Germany), according to the manufacturer's instructions. The primers and probe for the detection of EBV targeted 88 bp of the BALF5 gene, which encodes viral DNA polymerase, as previously described [11]. The real-time PCR assay was performed in a total reaction mixture of 25  $\mu$ l, which contained 5  $\mu$ l of extracted DNA (100–500 ng), 12.5  $\mu$ l of Absolute<sup>TM</sup> QPCR ROX Mix (Thermo Scientific, UK), 400 nM forward primer, 400 nM reverse primer, and 200 nM TaqMan probe. The assay was

P. Volfova · M. Lengerova (✉) · J. Winterova · Z. Racil ·  
D. Dvorakova · J. Mayer  
Department of Internal Medicine–Hematology,  
Faculty of Medicine of Masaryk University and University  
Hospital Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno, Czech Republic  
e-mail: mlengerova@fnbrno.cz

M. Lengerova · J. Mayer  
CEITEC—Central European Institute of Technology,  
Masaryk University, Brno, Czech Republic

**Table 1** Demographics of the patients

| Patient characteristics | Study population, <i>n</i> = 46 |
|-------------------------|---------------------------------|
| Clinical parameters     |                                 |
| Sex                     |                                 |
| Male/female             | 26/20                           |
| Diagnosis               |                                 |
| AML                     | 20                              |
| ALL                     | 11                              |
| CML                     | 3                               |
| MDS                     | 1                               |
| MM                      | 1                               |
| MPS                     | 3                               |
| NHL                     | 5                               |
| AA                      | 2                               |
| Donor type              |                                 |
| MUD                     | 30                              |
| HLAid                   | 16                              |
| Conditioning regimen    |                                 |
| ATG/CY/FLU/RIC/TBI      | 1                               |
| BU/CY/ATG               | 1                               |
| CY/TBI                  | 4                               |
| CY/TBI/ATG              | 8                               |
| FLAMSA/RIC              | 23                              |
| FLAMSA/RIC/TBI/CY       | 3                               |
| BU/CY                   | 1                               |
| BU/FLU/ATG              | 4                               |
| FLU/CY/ATG/TBI          | 1                               |
| Stem cell source        |                                 |
| BM                      | 7                               |
| PBSC                    | 39                              |

AML acute myeloid leukemia, ALL acute lymphoblastic leukemia, CML chronic myeloid leukemia, MDS multidrug disease syndrome, MM multiple myeloma, MPS myeloproliferative syndrome, NHL non-Hodgkin's lymphoma, AA aplastic anemia, MUD match unrelated donor, HLAid HLA identical family donor, ATG anti-thymocyte globulin, CY cyclophosphamide, FLU fludarabine, RIC reduced intensity condition, TBI total body irradiation, BU busulfan, BM bone marrow, PBSC peripheral blood stem cell

performed using a Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Australia) with the following cycling conditions: 1 cycle of 15 min at 95 °C, followed by 50 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C. A no-template control (NTC) was added to each run. As a positive control, a plasmid that contained the BALF5 gene was constructed from the pCR 2.1 vector using the TA Cloning Kit (Invitrogen, USA). Standard curves of the  $C_T$  values obtained from serially diluted plasmid DNA ( $2 \times 10^6$  to  $2 \times 10^0$  copies/5  $\mu$ l DNA) were constructed. The  $C_T$  values from clinical samples were plotted on the standard curve, and the copy number was calculated automatically with the Rotor-Gene 3000 software (Corbett Research). The detection limit of the assay

**Table 2** The sensitivity and specificity of the assay using three different cut-off values

| Cut-off (copies/ $\mu$ g DNA) | Sensitivity (%) | Specificity (%) |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|
| 100                           | 100             | 45              |
| 1,000                         | 100             | 74              |
| 10,000                        | 98              | 75              |

was determined as 2 fg of plasmid DNA, which corresponds to two copies of plasmid DNA per reaction. All samples were amplified in duplicate and the number of viral DNA copies was calculated from the standard curve and expressed as copies per 1  $\mu$ g of DNA.

We observed wide variability in the EBV load in the tested samples, with a range of 0–865,169 copies/ $\mu$ g DNA (a median of 10 copies/ $\mu$ g DNA). Because an EBV real-time PCR cut-off for positivity has not yet been standardized, we established a positive cut-off for samples if the copy number exceeded 1,000 copies per 1  $\mu$ g DNA. We determined the sensitivity and specificity of the assay using three different cut-offs (the data are summarized in Table 2). Based on the values of these parameters, we found that 1,000 copies/ $\mu$ g DNA provides 100 % sensitivity and 74 % specificity for the prediction of PTLD, and that this cut-off was the most convenient compared to the other two thresholds.

Eighty-six samples (10 %) from 15 patients (33 %) had an EBV DNA load of more than 1,000 copies/ $\mu$ g DNA, and in this cohort, only 4 patients (9 %) developed an EBV-associated disease. The data are summarized in Table 3.

The first patient with histologically proven PTLD had clinical symptoms that included lymphadenopathy, fever, and neurological symptoms; however, despite receiving two doses of rituximab treatment at 700 mg/m<sup>2</sup> and 1,500 mg/m<sup>2</sup>, respectively, the patient progressed and died. The second patient developed multifocal lymphadenopathy, and because of a high EBV viral load in the PB diagnosed as PTLD, it was not verified by histology due to persistent thrombocytopenia. This patient received two doses of rituximab (375 mg/m<sup>2</sup>), resulting in a regression of the lymphadenopathy and a decrease of the EBV load in PB. The third patient developed lymphadenopathy coupled with high EBV viral load and had histologically proven EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). This patient received two doses of rituximab (375 mg/m<sup>2</sup>), which caused a decrease in the EBV viral load.

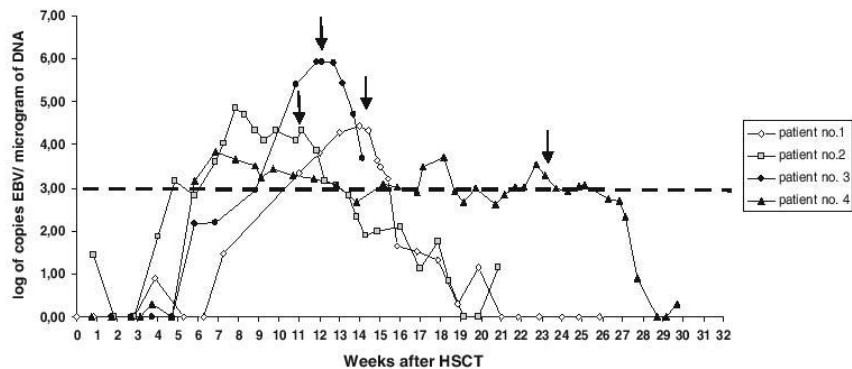
A fourth patient developed neurological symptoms and had a detectable EBV viral load in the cerebrospinal fluid (CSF; 56,025 copies/1 ml), and EBV-associated encephalopathy was diagnosed. This patient was given two doses of rituximab (375 mg/m<sup>2</sup>) and the elevated EBV DNA level decreased to the normal level. The clinical condition of the patient subsequently improved, but, ultimately, the patient

**Table 3** Patients with Epstein-Barr virus (EBV) viral load >1,000 copies/ $\mu$ g DNA

| Patient no. | Diagnosis | Donor type | Clinical outcome     | Week of first result >1,000 copies/ $\mu$ g DNA | Log copies/ $\mu$ g DNA max. | Week of max. EBV DNA level |
|-------------|-----------|------------|----------------------|---|------------------------------|----------------------------|
| 1           | ALL       | MUD        | EBV-PTLD             | 11  | 4.43                         | 14                         |
| 2           | ALL       | MUD        | EBV-PTLD             | 5   | 4.85                         | 8                          |
| 3           | AML       | MUD        | EBV-PTLD             | 11  | 5.94                         | 12                         |
| 4           | AML       | MUD        | EBV-encephalopathy   | 6   | 3.84                         | 7                          |
| 5           | AML       | MUD        | Adenovirus hepatitis | 11  | 4.53                         | 13                         |
| 6           | AML       | HLAid      | Toxoplasmosis        | 9   | 3.78                         | 9                          |
| 7           | NHL       | MUD        | GVHD                 | 46  | 3.43                         | 46                         |
| 8           | AA        | MUD        | GVHD                 | 32  | 3.09                         | 35                         |
| 9           | AML       | MUD        | GVHD                 | 38  | 3.43                         | 38                         |
| 10          | AML       | HLAid      | GVHD                 | 46  | 3.22                         | 46                         |
| 11          | ALL       | MUD        | GVHD                 | 35  | 3.49                         | 46                         |
| 12          | ALL       | MUD        | GVHD                 | 13  | 4.19                         | 13                         |
| 13          | AML       | HLAid      | GVHD                 | 10  | 3.80                         | 10                         |
| 14          | CML       | MUD        | Other <sup>a</sup>   | 20  | 3.06                         | 20                         |
| 15          | ALL       | MUD        | Other <sup>a</sup>   | 7   | 3.62                         | 7                          |

ALL acute lymphoblastic leukemia, AML acute myeloid leukemia, NHL non-Hodgkin's lymphoma, AA aplastic anemia, CML chronic myeloid leukemia, MUD match unrelated donor, HLAid HLA identical family donor, EBV-PTLD Epstein-Barr virus post-transplant lymphoproliferative disorder, GVHD graft-versus-host disease

<sup>a</sup> Patients with single EBV positivity and no EBV-associated clinical symptoms



**Fig. 1** Change in Epstein-Barr virus (EBV) viral load in four patients after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) with EBV-associated disease. Patient no. 1, 2, and 3 developed EBV-associated post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD).

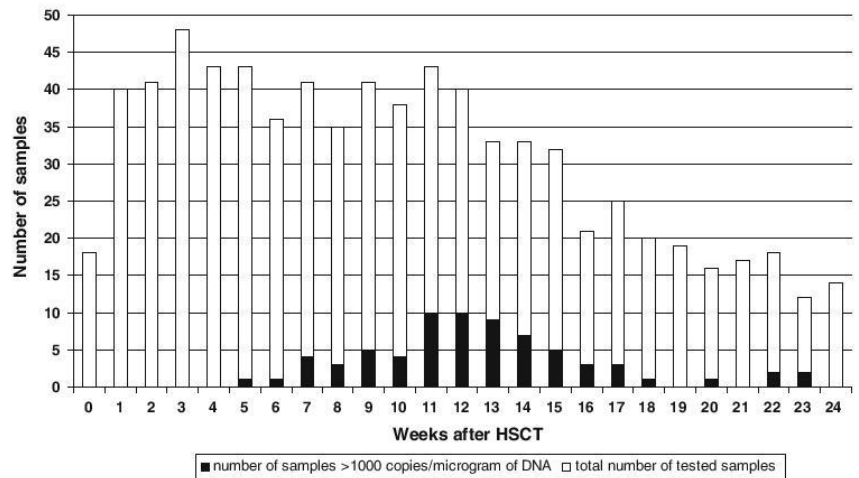
Patient no. 4 was diagnosed with EBV-associated encephalopathy. The arrows indicate the day of diagnosis. The cut-off for positivity (1,000 copies/ $\mu$ g DNA) is marked with a dashed line

died of primary disease progression. The viral loads detected in samples from these four patients are shown in Fig. 1. In all patients, the elevation in viral load occurred 5–11 weeks after the HSCT and increased very rapidly by over three logs within 1 week.

Similarly, EBV positivity above 1,000 copies/ $\mu$ g DNA appeared five weeks after the HSCT and later in the other 11 patients (Fig. 2). In this cohort, one patient had an increased EBV load at the time of adenoviral hepatitis

diagnosis and died due to this infectious complication. A second patient was diagnosed with toxoplasmosis of the central nervous system, and the EBV load normalized spontaneously during treatment. In the other seven patients, the EBV viral load increased during the treatment of chronic or acute GVHD, but was not accompanied by clinical symptoms. After the management of this complication, the EBV load decreased spontaneously. In two patients, the viral load was found to be elevated only once,

**Fig. 2** Incidence of samples with EBV viral load  $>1,000$  copies/ $\mu\text{g}$  DNA over a period of 0–24 weeks after HSCT



and both patients did not present any clinical signs of EBV infection.

In summary, the cumulative incidence of EBV-related diseases within the cohort of tested patients was 9 %. A viral load above 1,000 copies/ $\mu\text{g}$  of DNA was associated with EBV disease in only 4 patients, and the other 11 cases exhibited asymptomatic EBV reactivation coupled with chronic or acute GVHD or an altered clinical state due to another infection. In all cases, EBV reactivation occurred more than 1 month after the HSCT, and the late detection of EBV viremia was always associated with chronic GVHD treatment. The data for these findings are presented in Table 3.

Based on our results, we recommend the weekly monitoring of patients for at least 3 months after HSCT (2 out of 4 patients with EBV-associated disease passed the cut-off at week 11) and longer in patients with GVHD, due to the rapid progression of EBV infection, particularly in patients who develop clinical symptoms (lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, or organ manifestations) related to EBV disease according to the European Conference on Infections in Leukemia (ECIL) 2011 guidelines. EBV reactivation occurred in some of the patients suffering from GVHD in this cohort, but did not require clinical intervention unless the copy numbers were steadily increasing. A stable EBV viral load  $<1,000$  copies/ $\mu\text{g}$  DNA temporarily occurred in some patients after HSCT; however, clinical symptoms of EBV infection did not develop and they did not require therapeutic intervention. Therefore, to improve the diagnostic value of EBV monitoring, the load measurement and quantitative monitoring of viral load kinetics is necessary.

**Acknowledgments** This study was supported, in part, by grants from the Ministry of Education of the Czech Republic, MUNI/A/0784/2011 and MSM 0021622430.

**Conflict of interest** None.

## References

- Heslop HE. How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood*. 2009;114:4002–8.
- Gulley ML, Tang W. Using Epstein–Barr viral load assays to diagnose, monitor, and prevent posttransplant lymphoproliferative disorder. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23:350–66.
- Styczynski J, Einsele H, Gil L, Ljungman P. Outcome of treatment of Epstein–Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in hematopoietic stem cell recipients: a comprehensive review of reported cases. *Transpl Infect Dis*. 2009;11:383–92.
- Wagner HJ, Cheng YC, Huls MH, Gee AP, Kuehnl I, Krance RA, Brenner MK, Rooney CM, Heslop HE. Prompt versus preemptive intervention for EBV lymphoproliferative disease. *Blood*. 2004;103:3979–81.
- Weinstock DM, Ambrossi GG, Brennan C, Kiehn TE, Jakubowski A. Preemptive diagnosis and treatment of Epstein–Barr virus-associated post transplant lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplant: an approach in development. *Bone Marrow Transplant*. 2006;37:539–46.
- Ljungman P. Molecular monitoring of viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2010;91:596–601.
- Stevens SJ, Verschuuren EA, Pronk I, van Der Bij W, Hamsen MC, The TH, Meijer CJ, van Den Brule AJ, Middeldorp JM. Frequent monitoring of Epstein–Barr virus DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of post-transplant lymphoproliferative disease in high-risk patients. *Blood*. 2001;97:1165–71.
- van Esser JW, Niesters HG, Thijsen SF, Meijer E, Osterhaus AD, Wolthers KC, Boucher CA, Gratama JW, Budel LM, van der Holt B, van Loon AM, Löwenberg B, Verdonck LF, Cornelissen JJ. Molecular quantification of viral load in plasma allows for fast and accurate prediction of response to therapy of Epstein–Barr virus-associated lymphoproliferative disease after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2001;113:814–21.



9. Ocheni S, Kroeger N, Zabelina T, Sobottka I, Ayuk F, Wolschke C, Muth A, Lellek H, Petersen L, Erttmann R, Kabisch H, Zander AR, Bacher U. EBV reactivation and post transplant lymphoproliferative disorders following allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42:181–6.
10. Hakim H, Gibson C, Pan J, Srivastava K, Gu Z, Bankowski MJ, Hayden RT. Comparison of various blood compartments and reporting units for the detection and quantification of Epstein–Barr virus in peripheral blood. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2151–5.
11. Kimura H, Morita M, Yabuta Y, Kuzushima K, Kato K, Kojima S, Matsuyama T, Morishima T. Quantitative analysis of Epstein–Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 1999;37:132–6.

Příloha 12: Lengerová M., Volfová P., Ráčil Z. Laboratorní diagnostika CMV infekce u nemocných s hematologickou malignitou. Postgraduální medicína, Mladá fronta a.s., 2013, roč. 15, Příl. 4, s. 45-50

# Laboratorní diagnostika CMV infekce u nemocných s hematologickou malignitou

<sup>1,2</sup>Mgr. Martina Lengerová, Ph.D., <sup>1</sup>Mgr. Pavlína Volfová, Ph.D., <sup>1,2</sup>doc. MUDr. Zdeněk Ráčil, Ph.D.

<sup>1</sup>Masarykova univerzita, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Brno, Interní hematologická a onkologická klinika

<sup>2</sup>Masarykova univerzita, CEITEC – Středoevropský technologický institut, Brno

## Souhrn

Lidský cytomegalovirus (CMV) je příčinou závažných infekčních komplikací imunokompromitovaných pacientů. Pravidelné monitorování hladiny virové nálože se stalo nedílnou součástí péče o pacienty po transplantaci krvetvorných buněk. Pro detekci CMV byla vyvinuta řada diagnostických metod, z nichž největší přínos představují molekulárněbiologické metody, zejména kvantitativní real-time PCR. Tato metoda umožňuje stanovit velikost virové nálože, avšak dosud nebyla jasně stanovena hladina viru predikující rozvoj CMV onemocnění. V tomto přehledovém článku jsou shrnuty současné poznatky o diagnostice CMV infekce založené zejména na detekci viru molekulárněbiologickými metodami a jejich úloze v preemptivním přístupu k terapii. Dále se věnujeme problému vzniku rezistence CMV k podávaným antivirotikům a způsobu detekce mutací vedoucích ke vzniku rezistence.

## Klíčová slova

**cytomegalovirus • kvantitativní real-time PCR • periferní krev • likvid • bronchoalveolární laváž • CMV rezistence**

## Summary

*Lengerova, M., Volfova, P., Racil, Z. Laboratory diagnostics of CMV infections in patients with haematological malignancies*

Human cytomegalovirus (CMV) infection is the cause of serious infections in immunocompromised patients. Regular monitoring of serum viral load has become an integral part of the care for patients after stem cell transplantation. A number of diagnostic methods was developed for detection of CMV, from which molecular-biological methods are the most significant ones, especially quantitative real-time PCR. This method allows us to determine the size of the viral load, but there has not yet been a clearly defined cut-off level of virus load predicting the development of CMV disease. This review article summarises the current knowledge about the diagnostics of CMV infection mainly based on the detection of the virus using molecular-biological methods and their role in pre-emptive approach to therapy. Furthermore, we discuss the problem of CMV resis-

tance to administered antivirals and detection of mutations leading to resistance.

## Key words

**cytomegalovirus • quantitative real-time PCR • peripheral blood • cerebrospinal fluid • bronchoalveolar lavage • CMV resistance**

Infekce způsobená lidským cytomegalovirem (CMV) je jednou z nejčastějších infekčních komplikací u pacientů s hematologickou malignitou a pacientů po transplantaci krvetvorných buněk (TKB). Její příčinou je nejčastěji reaktivace viru, který je v organismu přítomen v tzv. latentním stavu. Pokud dojde k oslabení imunitního systému (v důsledku transplantace nebo protinádorové terapie), ztrácí organismus kontrolu nad tímto stavem a dochází k aktivní replikaci viru, a následně k rozvoji klinických příznaků. Méně často je pak příčinou komplikací tzv. přímoinfekce CMV, tj. stav, kdy se organismus s virem potkáva poprvé. V tomto případě je u imunokompromitovaných pacientů průběh infekce obvykle velice vážný, s vysokým rizikem vzniku orgánového postižení (tzv. CMV onemocnění), které je spojeno s vysokou morbiditou.

V posledním desetiletí jsou ve většině transplantáčních center používány pro prevenci vzniku CMV infekce a rozvoje CMV onemocnění dvě základní strategie – profylaxe (preventivní podávání virostatik všem pacientům v riziku) nebo preemptivní terapie (léčení jsou pouze pacienti, u kterých byl virus detekován některou z laboratorních metod ještě před rozvojem klinických příznaků).

## Metody detekce CMV v klinických vzorcích

Klasické metody založené na kultivaci se pro detekci CMV u hematologických nemocných v praxi nepoužívají, protože jsou časově velmi náročné (několik týdnů) a málo citlivé.

### pp65 ANTIGENÉMIE

CMV antigenémie spočívá v přímém barvení leukocytů monoklonální protilátkou specifickou pro povrchový fosfoprotein 65 (pp65, gen UL83). Výsledky jsou pak udávány jako počet pozitivních buněk vztažený na počet buněk použitých k přípravě

# infekce vyvolané herpetickými viry

preparátu. Její hlavní výhodou ve srovnání s kulturačními metodami je rychlost a relativní nenáročnost na laboratorní vybavení. Hlavními nevýhodami jsou pak nutnost okamžitého zpracování vzorku a to, že výsledek může být částečně ovlivněn subjektivním hodnocením a zkušenostmi pracovníka, stejně jako množstvím jaderných buněk přítomných v periferní krvi.

## DETEKCE PROTILÁTEK

U pacientů po TKB jsou sérologické testy pro detekci protilátek IgG a IgM důležité hlavně pro stanovení rizika vzniku CMV infekce, ale ne pro stanovení její diagnózy nebo diagnózy CMV onemocnění.

## DETEKCE CMV SPECIFICKÝCH T-LYMFOCYTŮ

Rekonstituce buněčné imunitní odpovědi po TKB je dlouhodobý proces. Detekce CMV-specifických CD4+ a CD8+ cytotoxických T-lymfocytů v periferní krvi je známkou obnovy přirozené obranné schopnosti organismu a může pomoci odlišit pacienty, kteří jsou sami schopni kontrolovat CMV reaktivaci, od pacientů, kteří budou profitovat z preemptivní terapie CMV.<sup>(1)</sup>

## KVALITATIVNÍ PCR

V současné době jsou nejčastěji používány molekulárněbiologické metody, zejména polymerázová řetězová reakce (PCR – polymerase chain reaction). Protože od prvního záchytu přítomnosti viru u TKB pacienta do rozvoje prokazatelného CMV onemocnění může uplynout i méně než 7 dní,<sup>(2)</sup> je rychlá a citlivá diagnostika velmi důležitá. PCR umožňuje mnohonásobné zmožení cílového templátu v klinickém vzorku pomocí páru oligonukleotidových primerů a termostabilní DNA polymerázy. Výsledkem kvalitativního testování je informace, že vzorek je CMV pozitivní nebo CMV negativní. Interpretace výsledku však není jednoduchá a často je samostatný průkaz viru nedostatečným kritériem pro zahájení terapie.

## KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

Koncem minulého století začala být kvalitativní PCR nahrazena její modifikací, tzv. kvantitativní real-time PCR. Kromě detekce velmi malého množství templátu lze touto metodou také stanovit množství viru ve sledovaném materiálu, což umožňuje sledovat průběh infekce – nárůst počtu kopií viru (virových částic), popř. sledovat efekt léčby. Principem real-time PCR je sledování kumulace amplikonu v reálném čase pomocí interkalačních barviv nebo specifických DNA sond značených fluorescenčními barvivy (Obr. 1).

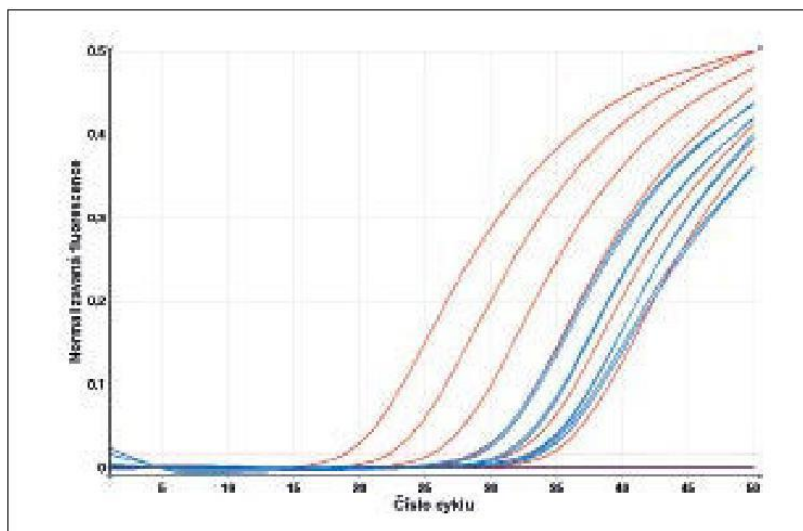
## Diagnostika CMV infekce metodou PCR

Pro izolaci DNA z klinických vzorků jsou rutinně využívány komerční soupravy, založené většinou na separaci DNA na kolonkách. V současnosti jsou pro izolaci DNA s úspěchem používány také plně automatizované systémy (roboty pro

izolaci DNA). Jejich výhodou je automatizace a standardizace celého procesu a úspora času laboratorního personálu.

Při výběru primerů vycházíme většinou z již publikovaných sekvencí. Studie prováděné jak na úrovni DNA, tak na úrovni proteinů prokázaly, že míra homologie mezi jednotlivými kmeny CMV dosahuje až 95 %. I když se jedná o velmi rozšířený a významný patogen, dosud se světová vědecká a diagnostická komunita jednoznačně neshodla na nevhodnějším cílovém genu pro PCR diagnostiku CMV. Mezi nejčastěji používané geny patří: gen pro major immediate-early (MIE) protein, gen pro virovou DNA polymerázu, glykoprotein B nebo gen pro tegumentový fosfoprotein 65 (pp65). V některých studiích dokonce používají paralelně dva různé geny.<sup>(3)</sup> Optimální diagnostika CMV může být dosažena jen v případě použití primerů schopných detekovat všechny kmeny CMV, což může být komplikováno přítomností přirozené genetické variability mezi jednotlivými kmeny.<sup>(4, 5)</sup>

Stejně jako v mnohých dalších oblastech molekulární mikrobiologie, tak i v oblasti detekce CMV chybí větší míra standardizace používaných metod. Jediným doporučením mezinárodních organizací (např. ECIL – European Conference on Infections in Leukemia) je použití kvantitativních metod pro monitorování pacientů v riziku. Pro detekci CMV jsou tedy běžně využívány jak metody vyvinuté v laboratoři (tzv. in-house metody), tak dostupné komerční soupravy (Tab. 1). K použití in-house metod se hlásí i celá řada velkých světových transplantáčních center, protože výsledky jimi získané jsou velmi dobré, laboratoře s nimi mají dlouholeté zkušenosti a jejich použití významně snižuje náklady na jednotlivá vyšetření. Použitá in-house metoda by měla obsahovat systém kontrol, který odhalí selhání preanalytické fáze (např. neúspěšnou izolaci DNA) a případnou inhibici PCR reakce. Vlastní metodiku (in-house i komerční) je potom doporučeno testovat na panelu slepých vzorků, např. účastí v kontrolách externího hodnocení kvality (pro CMV dostupné QCMD – Quality Control For Molecular Diagnostics, Velká Británie, nebo Instandt, Německo). Nově lze také provést normalizaci vlastní metodiky testování mezinárodním stan-



**Obr. 1** Příklad výsledku detekce a kvantifikace CMV metodou real-time PCR. Červené křivky – amplifikace tzv. standardní DNA (DNA o známé koncentraci v různých ředěních, která slouží pro sestavení kalibrační křivky), modré křivky – detekce CMV v klinických vzorcích.

# infekce vyvolané herpetickými viry

**Tab. 1** Výhody a nevýhody použití in-house a komerčních laboratorních souprav

| In house metody |  | Komerční soupravy |  |
|-----------------|--|-------------------|--|
| +               | nízké náklady na vyšetření   | -                 | vysoké náklady na vyšetření  |
| +               | dlouholeté zkušenosti s používáním – lepší možnost interpretace výsledků                   | -                 | neposkytují informaci o interpretaci – tj. nutno stanovit si vlastní cut-off |
| -               | vyžaduje personál s velkými zkušenostmi s metodami mol. biologie – příprava standardů atd. | +                 | rychlé zavádění nových metod do praxe  |
| -               | nutná důslednější kontrola celého procesu (nové šarže oligonukleotidů, master-mixu atd.)   | +                 | vysoká standardizace vyšetření s malým úsilím                                |
| -               | nutnost zapracování vlastních interních kontrol do analýzy                                 | +                 | u některých kitů rozsáhlý systém kontrol celého procesu (včetně izolace DNA) |

dardu pro kvantifikaci CMV (1<sup>st</sup> WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques, NIBSC, Velká Británie). Po otestování tohoto standardu laboratoř získá konverzní faktor pro přepočet výsledků získaných danou metodikou (izolace DNA + real-time PCR), což umožní vyjádření detekované kvantity v mezinárodních jednotkách a lepší srovnání výsledků s ostatními laboratořemi a publikovanými pracemi.

## METODY DETEKUJÍCÍ VIROVOU RNA

Byly publikovány studie využívající metody NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) pro detekci virové mRNA (messenger RNA). Přestože bylo prokázáno, že tato metoda má srovnatelnou citlivost s detekcí virové DNA pomocí real-time PCR, není využívána rutinně.<sup>(6)</sup>

## Hranice virové nálože v periferní krvi pro zahájení preemptivní terapie

V současnosti nejčastěji používaná preemptivní terapie je založena na monitorování virové nálože pomocí real-time PCR a zahájení léčby po překročení určitého cut-off. Doposud však nebyla stanovena ani doporučena žádná univerzální hodnota. Prvním z důvodů je výše zmiňovaná variabilita v metodice detekce CMV (klinický materiál, metoda izolace DNA, in-house x komerční metody atd.). Druhým pak skutečnost, že u různých skupin pacientů je riziko progresu CMV různě vysoké. Rychlost replikace CMV je asi 1–2 dny, ale u těžce imunokompromito-

vaných pacientů může být i kratší a virová nálož pak může narůstat velmi rychle. Některé studie navrhují odstupňování této hranice podle rizika rozvoje CMV onemocnění (Obr. 2). Např. 100 kopií/ml plazmy u vysoce rizikových pacientů po TKB, 500 kopií/ml u méně rizikových a 1000 kopií/ml u pacientů po dni 100 od TKB.<sup>(7)</sup> V rutinní praxi si každé pracoviště stanovuje tuto hodnotu retrospektivní analýzou výsledků a jejich korelací s klinickými daty. Dalším důležitým aspektem screeningu CMV je frekvence monitorování. Většina autorů doporučuje testování vzorků 1krát týdně a u pacientů v riziku s již detekovaným CMV (pod hranicí pro zahájení léčby) nebo pacientů léčených pro CMV infekci pak zvýšit frekvenci na zkrát týdně.<sup>(7)</sup>

## Význam detekce CMV v různých klinických vzorcích

### DETEKCE CMV V PERIFERNÍ KRVI

Jako výchozí klinický materiál pro detekci CMV je používána periferní krev nebo její frakce. Detekce DNA v leukocytech periferní krve vyžaduje separaci leukocytů erytrolyzou, tedy náročnější zpracování, ale protože CMV je virus často infikující jaderné buňky periferní krve, je detekovaná virová nálož často vyšší ve srovnání s ostatními materiály, a představuje tedy nejcitlivější způsob detekce. Zvláštní pozornost je však třeba věnovat pacientům krátce po TKB, u kterých mohou být výsledky zkresleny v důsledku leukopenie. Při detekci DNA v plazmě nebo séru je detekován pouze virus, který není asociován s buňkami, uvolnil

**Tab. 2** Kvantifikace CMV v BAL

| Autor                          | Typ transplantace    | Metoda   | Hodnocení   |
|--------------------------------|----------------------|--|---|
| Westall a kol. <sup>(7)</sup>  | pľíce                | COBAS AmpliCor HCMV Monitor test (Roche)       | 46 000 kopií/ml BAL – histologicky potvrzená CMV pneumonie<br>> 64 000 kopií/ml BAL – specifické klinické příznaky  |
| Riise a kol. <sup>(17)</sup>   | pľíce, pľíce a srdce | in-house real-time PCR                         | pacienti po transplantaci se signifikantně vyšší nálož než pacienti bez transplantace (1120 vs. 180 kopií/ml BAL), avšak pacienti s pneumonií a bez pneumonie nebyli dostatečně rozlišení |
| Chemaly a kol. <sup>(18)</sup> | pľíce                | CMV Hybrid Capture Assay, (Digene Corporation) | > 500 000 kopií/ml BAL – histologicky potvrzená CMV pneumonie   |
| Gerna a kol. <sup>(19)</sup>   | pľíce                | in-house real-time PCR                         | 100 000 kopií/ml BAL – hraniční hodnota pro preemptivní terapii   |
| Travi a kol. <sup>(20)</sup>   | TKB                  | in-house real-time PCR                         | rozdíl mezi pacienty s CMV pneumonií a asymptomatickými (medián 50 828 vs. 194 kopií/ml BAL),<br>6000 kopií/ml BAL (specifická 92 % a senzitivita 62 % pro diagnózu CMV pneumonie)        |

BAL – tekutina získaná bronchoalveolární laváží, HCMV – lidský cytomegalovirus,  
TKB – transplantace hematopoetických kmenových buněk, PCR – polymerázová řetězová reakce

## infekce vyvolané herpetickými viry

se z nich v průběhu lytické fáze, a je tedy známkou replikace viru a aktivní infekce. Do budoucna se jeví jako nejnadějnější použití plné krve. Je výhodné nejen pro relativně snadné zpracování vzorku (lze snadno kombinovat s automatickými metodami izolace DNA), ale také tím, že umožňuje detekci CMV jak v buněčné, tak v nebuněčné frakci. Ruell a kol.<sup>(8)</sup> publikovali rozsáhlou analýzu 577 pacientů po transplantaci krvevorných buněk. U 3 z 8 pacientů, u nichž bylo kultivačně nebo histologicky prokázáno CMV onemocnění, byla detekce CMV v periferní krvi negativní. Všichni tito pacienti však v minulosti reaktivovali CMV. Negativní nález v periferní krvi tedy někdy nemusí zcela jednoznačně vyloučit orgánové postižení.

### DETEKCE CMV V TEKUTINĚ ZÍSKANÉ BRONCHOALVEOLÁRNÍ LAVÁŽÍ

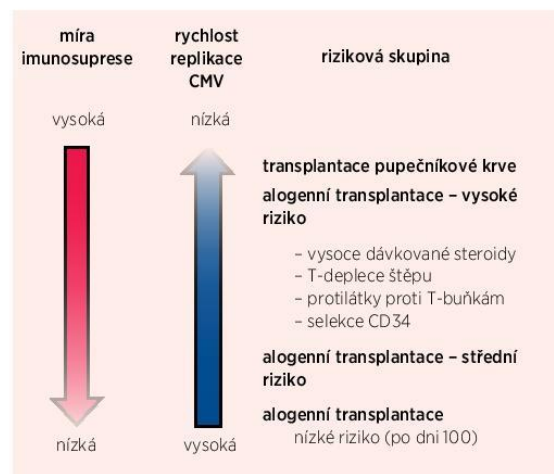
CMV je jednou z příčin vzniku pulmonálních infekcí a intersticiální pneumonie. Diagnostika CMV pneumonie zahrnuje přítomnost klinických příznaků a zároveň detekci infekčního agens v biologickém materiálu z dolních cest dýchacích. Pro stanovení etiologie je nejvhodnějším materiálem bronchoalveolární laváž (BAL). Obsahuje buněčné i bezbuněčné složky dolního respiračního traktu, v nichž byla při detekci viru prokázána vysoká korelace.<sup>(9)</sup> Významným přínosem v diagnostice CMV infekce v BAL je detekce pomocí PCR. Vyšetření poskytuje vysokou negativní prediktivní hodnotu, ale pro predikci vzniku CMV pneumonie je třeba stanovení klinicky významné hladiny, která by rozlišila závažnou reaktivaci od asymptomatického šíření viru, případně jen od nálože viru přítomné v leukocytech aťrahaných do dýchacích cest z jiných důvodů. Přítomnost viru byla zjištěna i v BAL zdravých osob. Z dostupných publikací je zřejmé (Tab. 2), že virová nálož u pacientů s pneumonií je signifikantně vyšší než u asymptomatických pacientů nebo zdravých dobrovolníků. Pravděpodobnost CMV infekce je spojena s virovou náloží  $> 10^5$  kopií/1 ml BAL. Nicméně samostatné kvantitativní stanovení metodou PCR v BAL není pro diagnostiku dostatečné a doporučuje se korelace s nálezem viru v periferní krvi a klinickými příznaky.

### DETEKCE CMV V LIKVORU

Virová encefalitida je velice vzácnou infekční komplikací u pacientů po alogenní TKB. Její incidence je méně než 2 %, z toho se na ní CMV podílí 6 %.<sup>(10)</sup> Pro její diagnózu je klíčový průkaz CMV v likvoru metodou PCR. V práci Reddy a kol.<sup>(11)</sup> je shrnuto 11 případů CMV infekce CNS, ve všech případech byla spojena s předchozí detekcí CMV v krvi, opakovanou preemptivní terapií ganciklovirem nebo foscavirem a vznikem rezistence CMV. Pro detekci CMV v likvoru není možné jednoznačně určit kritickou virovou nálož, obecně se dá říci, že jakýkoliv záchyt CMV v likvoru je nutné považovat za závažný, zvláště při nepřítomnosti buněk v likvoru a v případech popsaných výše.

### DETEKCE CMV VE TKÁNI

V současné době není technicky žádný problém detekovat nukleové kyseliny v jakémkoli biologickém vzorku včetně tkání. Důležité je odebrat vzorek nefixovat před odesláním do laboratoře ve fixačním roztoku a vzorek odeslat nativní (ať jen v suché zkumavce či malém množství fyziologického roztoku) nebo pouze zamražený. Problém s kvantitativní detekcí pak spočívá v interpretaci nálezu, protože ta může být ještě složitější než v případě BAL. I proto by součástí potvrzení CMV nemoci mělo být histologické vyšetření se zaměřením na CMV.



**Obř. 2** Vztah rychlosti replikace CMV a cut-off pro zahájení léčby u různých rizikových skupin  
Upraveno podle<sup>(7)</sup>

Platí ale také, že při nasazení virostatické terapie může být výsledek histologického vyšetření modifikován a přítomnost infekce prokáže jen vysoká nálož v bioptickém vzorku. Při rozvinuté CMV nemoci a orgánovém postižení je pak tato nálož často významně pozitivnější (o několik řádů) než výsledky z periferní krve.

## Rezistence CMV na léčbu virostatiky

### INCIDENCE CMV REZISTENCE

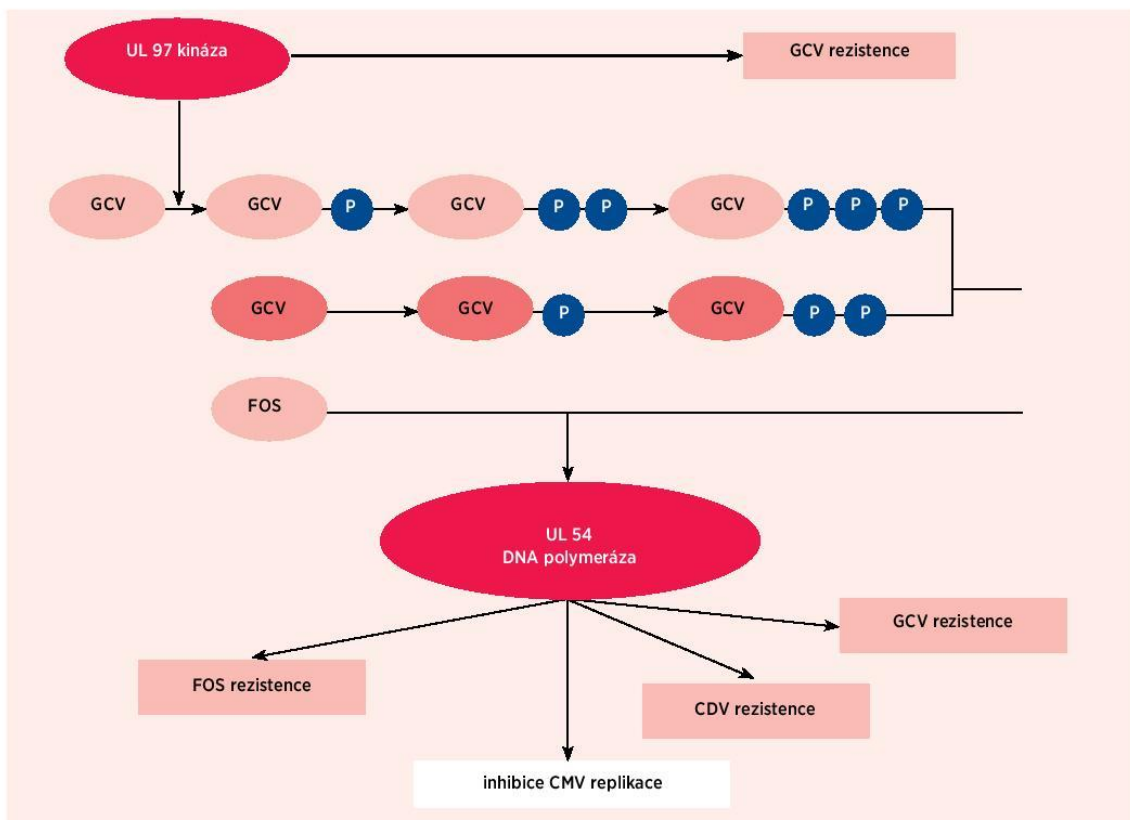
Vznik rezistence na virostatika je relativně vzácná, ale závažná komplikace léčby CMV, která byla popsána u pacientů infikovaných HIV po transplantaci solidních orgánů a TKB. Incidence výskytu rezistentních kmenů se u jednotlivých skupin pacientů liší. Nejčastěji je vznik rezistence dokumentován u HIV pacientů, u nichž je asi 8 % po terapii delší než tři měsíce.<sup>(12)</sup> U pacientů po TKB je incidence vzniku rezistence na ganciklovir (GCV) odhadována na 2–8 % léčených pacientů a obvykle se objevuje po 2–3 měsících terapie.<sup>(13)</sup> Velmi rychlý vznik od počátku terapie je popisován u pediatrických pacientů, u nichž může dojít k rozvoji již během několika týdnů trvající terapie a incidence výskytu je přibližně 5,1 %.<sup>(14)</sup> U pacientů po transplantaci solidních orgánů je udáván medián vzniku rezistence 10 měsíců a incidence 4–6 %.<sup>(15)</sup> Rizikovými faktory vzniku rezistence jsou dlouhotrvající expozice léku, T-buněčná deplece, vysoké dávky virostatik a suboptimální dávky virostatik z důvodu redukováné absorpce nebo špatné spolupráce ze strany pacienta.

Podezření na vznik rezistence je spojeno se zhoršenou odpovědí na terapii a rozvoj rezistence by měl být očekáván a vzorky testovány na přítomnost rezistentních kmenů u pacientů léčených virostatiky, u nichž CMV DNA nálož v krvi neklesá po 14 dnech terapie, a to především u ne-leukopenických a předléčených pacientů.<sup>(13)</sup>

### VIROSTATIKA POUŽÍVANÁ K LÉČBĚ CMV

V současné době jsou k léčbě HCMV infekce licencovány tři léky. Lék první volby je ganciklovir (GCV), který je v buňce

## infekce vyvolané herpetickými viry



**Obr. 3** Mechanismus účinku virostatik

Upraveno podle<sup>(17)</sup>

GCV – ganciklovir, CDV – cidofovir, FOS – foscavir

infikované CMV nejprve fosforylován virovou proteinkinázou pUL97, a následně buněčnými kinázami do formy GCV trifosfátu. Virostatický účinek GCV je výsledkem inhibice syntézy virové DNA. Orální forma GCV – valganciklovir (VGCV) – je nejprve hydrolyzována v gastrointestinálním traktu střevními a jaterními esterázami na GCV, tato forma léčiva umožňuje lepší vstřebávání a jeho biologická dostupnost je ve srovnání s orálním GCV 10krát vyšší. Dalším virostatikem s odlišným mechanismem účinku je foscavir (FOS). Mechanismus účinku spočívá ve vazbě FOS na virovou polymerázu. Dochází tak k její inhibici a inhibici virové proliferace. Nevyžaduje počáteční fosforylaci proteinkinázou pUL97. Dalším virostatikem je cidofovir (CID), který také nevyžaduje počáteční fosforylaci a působí jako nukleosidový analog, který inhibuje syntézu virové DNA. Schematické znázornění působení virostatik je znázorněno na Obr. 3. Se vznikem rezistence souvisí dva relevantní geny – gen *UL97*, který kóduje virovou proteinkinázu, a *UL54*, kódující virovou DNA polymerázu. Mutace genu *UL97* jsou spojeny pouze s rezistencí na GCV a jsou detekovány až u 85–95 % pacientů s rozvojem rezistence na GCV, zatímco mutace v *UL54* způsobují rezistenci i na ostatní virostatika – FOS a CID. Pokud jsou nalezeny mutace v *UL54* u pacienta léčeného GCV, virus může být rezistentní také k CID, zatímco zkřížená rezistence k FOS je vzácná.<sup>(16)</sup> Mutace způsobující rezistenci na FOS se objevují obvykle pouze u pacientů léčených FOS.

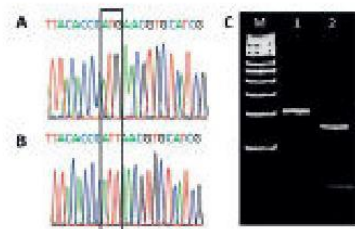
### MUTACE V GENECH *UL97* A *UL54*

Analýzy *in vivo* ukazují, že nejčastějším typem mutací *UL97* jsou jednonukleotidové bodové mutace v kodonech 460, 594 a 595. Mutace nalezené v klinických vzorcích jsou shromážděny v kodonech 460, 520 a 590–607 a ve více než 80 % izolátů pacientů s terapií GCV se nacházejí mutace M460V/I, H520Q, C592G, A594V, L595S a C603W.<sup>(17)</sup> V genu *UL54* je ve srovnání s *UL97* větší počet a diverzita mutací, které se nacházejí v oblasti dlouhé 2,5 kbp, kterou je nutné vyšetřit. V tomto genu se nachází velké množství mezikmenových polymorfismů, jež mohou komplikovat interpretaci výsledku. Mutace způsobující rezistenci na GCV jsou nejčastěji identifikovány mezi kodony 400–600 a 900–1000. V těchto lokusech mutace způsobují rezistenci na GCV a CID, ale na FOS obvykle ne. Mutace vedoucí k rezistenci na FOS se objevují mezi kodony 696–850 a mutace v těchto místech nezpůsobují obvykle zkříženou rezistenci na ostatní virostatika.<sup>(18)</sup>

### METODY DETEKCE MUTACÍ VEDOUČÍCH K REZISTENCI CMV NA LÉČBU

Pro stanovení rezistence k virostatiku lze využít dva přístupy – fenotypickou a genotypickou analýzu. Fenotypické metody jsou založeny na stanovení koncentrace antivirotika potřebného pro redukci virového růstu v buněčné kultuře. Zlatým standardem je plaková redukční metoda. Klinický izolát je inokulován

# infekce vyvolané herpetickými viry



**Obr. 4** Příklad výsledku detekce mutací vedoucích k CMV rezistenci.

A – sekvence citlivého kmene, B – sekvence kmene s mutací M460I – v kodonu 460 záměna ATG → ATT, vedoucí k nahrazení aminokyseliny methionin za izoleucin. C – detekce mutace v kodonu 595 metodou RFLP, M – délkový žebříček (marker), 1 – neshtěpený PCR produkt o délce 99 bp, 2 – štěpený PCR produkt u pacienta s mutací s fragmenty o délce 71 bp a 28 bp.

výhodou je ale jednoznačný popis fenotypu (míry rezistence) vyšetřovaného kmene a jsou proto nutnou součástí validací metod genotypických. Zásadní výhodou genotypických metod je jejich relativní časová nenáročnost (detekce je prováděna přímo v klinickém vzorku), vysoká citlivost a možnost stanovení mutantní subpopulace. Nevýhodou ovšem může být ne zcela jasně charakterizovaný fenotyp všech detekovaných mutací. Nejběžnějším způsobem detekce mutací je sekvenční analýza příslušné oblasti genu. Konvenční Sangerovo sekvenování umožňuje detekovat mutovanou populaci viru, pokud je její zastoupení vyšší než 10–20 %. Pro snadnější interpretaci výsledků detekce mutací v genech UL97 a UL54 lze použít dostupný server (<http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/mitarbeiter/HKestler/hcmv/>), který zadanou sekvenci srovná s dostupnými referenčními sekvencemi a vyhledá dostupné publikované zdroje týkající se konkrétní mutace.<sup>(19)</sup> V současné době se i objevují nové sekvenční technologie, tzv. sekvenování nové generace (NGS – next generation sequencing), které zvyšuje citlivost záchytu až na 1 %. Nevýhodou těchto nových přístupů jsou však vysoké provozní náklady.<sup>(17)</sup>

Další možností detekce mutací je PCR spojená se štěpením PCR produktů restrikčními enzymy (RFLP – restriction fragment length polymorphism), analýza polymorfismu délek restrikčních fragmentů, která je založená na vzniku nebo zániku restrikčního místa v sekvenci vlivem mutace (Obr. 4). Tato metoda je vhodná pro screening nejčastějších mutací, stejně jako specifické PCR navržené přímo pro takovou detekci.<sup>(20)</sup>

## Závěr

Molekulárněbiologické metody, především real-time PCR, umožňují detekci a kvantifikaci CMV v širokém spektru biologických materiálů. I přes velké pokroky v této oblasti však stále chybí standardizace postupů a stanovení prediktivních hladin CMV v různých klinických vzorcích. Důvodem je velká variabilita v použitých metodách, výběru cílových genů a hodnocení nálezů v laboratořích. Avšak i přes to monitorování výskytu CMV u pacientů s hematologickými malignitami významně přispívá k úspěšné léčbě a snižuje riziko úmrtí z důvodu této závažné infekční komplikace.

Poděkování: tato práce podpořena projektem MZ-RVO (FNBr, 65269705) a projektem IGA MZ ČR NT13691-4/2012.

na monovrstvu buněčné kultury společně se snižující se koncentrací antivirotek a po několika dnech je zhodnocen počet plaků srovnáním s kontrolním vzorkem a stanovena 50% inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>). Tyto klasické metody jsou časově velmi náročné, a proto nejsou vhodné pro rutinní diagnostickou praxi. Nespornou

Prohlášení: autor v souvislosti s tématem práce nespolupracuje s žádnou farmaceutickou firmou..

## Literatura

1. KRÓL, L., STUHLÝ, J., HUBÁČEK, P., et al. Signature profiles of CMV-specific T-cells in patients with CMV reactivation after hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*, 2011, 46, p. 1089–1098.
2. EMERY, VC., COPE, AV., BOWEN, EF., et al. The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J Exp Med*, 1999, 190, p. 177–182.
3. BOECKH, M., HUANG, M., FERREBERG, J., et al. Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2004, p. 1142–1148.
4. LENGEROVA, M., RACIL, Z., VOLFOVA, P., et al. Real-time PCR diagnostics failure caused by nucleotide variability within exon 4 of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *J Clin Microbiol*, 2007, 45, p. 1042–1044.
5. WAGGONER, J., HO, DY., LIBIRAN, P., PINSKY, BA. Clinical significance of low cytomegalovirus DNA levels in human plasma. *J Clin Microbiol*, 2012, 50, p. 2378–2383.
6. HEBART, H., Lengerke, C., Ljungman, P., et al. Prospective comparison of PCR-based vs late mRNA-based preemptive antiviral therapy for HCMV infection in patients after allo-SCT. *Bone Marrow Transplant*, 2011, 46, p. 408–415.
7. BOECKH, M., Ljungman P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*, 2009, 113, p. 5711–5719.
8. RUELL, J., BARNES, C., MUTTON, K., et al. Active CMV disease does not always correlate with viral load detection. *Bone Marrow Transplant*, 2007, 40, p. 55–61.
9. WESTALL, GP., MICHAELIDES, A., WILLIAMS, TJ. Human cytomegalovirus load in plasma and bronchoalveolar lavage fluid: a longitudinal study of lung transplant recipients. *J Infect Dis*, 1990, p. 1076–1083.
10. SCHMIDT-HIEBER, M., SCHWENDER, J., HEINZ, WJ., et al. Viral encephalitis after allogeneic stem cell transplantation: a rare complication with distinct characteristics of different causative agents. *Haematologica*, 2011, 96, p. 142–149.
11. REDDY, SM., WINSTON, DJ., TERRITO, MC., SCHILLER, GJ. CMV central nervous system disease in stem-cell transplant recipients: an increasing complication of drug-resistant CMV infection and protracted immunodeficiency. *Bone Marrow Transplant*, 2010, 45, p. 979–984.
12. WOLF, DG., SMITH, IL., LEE, DJ., et al. Mutations in human cytomegalovirus UL97 gene confer clinical resistance to ganciclovir and can be detected directly in patient plasma. *J Clin Invest*, 1995, 95, p. 257–263.
13. EMERY, V., ZUCKERMAN, M., JACKSON, G., AITKEN, C., OSMAN, H., PAGLIUCA, A., POTTER, M., PEGGS, K., CLARK, A., British Committee for Standards in Haematology tBSBaMTatUVN. Management of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*, 2013, 162, p. 25–39.
14. KIM, YJ., BOECKH, M., COOK, L., et al. Cytomegalovirus infection and ganciclovir resistance caused by UL97 mutations in pediatric transplant recipients. *Transp Infect Dis*, 2012, 14, p. 611–617.
15. HANTZ, S., GARNIER-GEOFFROY, F., MAZERON, MC., GARRIGUE, I., MERVILLE, P., MENGELLE, C., ROSTAING, L., SAINT MARCOUX, F., ESSIG, M., REROLLE, JP., COTIN, S., GERMI, R., PILLET, S., LEBRANCHU, Y., TURLURE, P., ALAIN, S., Group FCRRS. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65, p. 2628–2640.
16. ECKLE, T., PRIX, L., JAHN, G., et al. Drug-resistant human cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation may have different clinical outcomes. *Blood*, 2000, 96, p. 3286–3289.
17. LURAIN, NS., CHOU, S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23, p. 689–712.
18. SMITH, IL., CHERRINGTON, JM., JILES, RE., et al. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis*, 1997, 176, p. 69–77.
19. CHEVILLOTTE, M., von EINEM, J., MEIER, BM., et al. A new tool linking human cytomegalovirus drug resistance mutations to resistance phenotypes. *Antiviral Res*, 2009, 85, p. 318–327.
20. LOCHMANOVA, J., LENGEROVA, M., VOLFOVA, P., et al. Quantitative monitoring of wild-type and ganciclovir (GCV) resistant human cytomegalovirus strains in consecutive episodes of virus reactivation in immunocompromised patients. Abstracts 49<sup>th</sup> ICAAC, San Francisco.

e-mail: mlengerova@fnbrno.cz



Příloha 13: Volfová P., Lengerová M., Dvořáková D., Paloušová D., Hrnčířová K., Ráčil Z., Mayer J., Pospíšilová Š. Význam PCR detekce a kvantifikace herpetických virů v bronchoalveolární laváži imunokompromitovaných pacientů. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, Praha: TRIOS, spol. s r. o., 2011, roč. 17, č. 6, s. 194-200.

## Význam PCR detekce a kvantifikace herpetických virů v bronchoalveolární laváži imunokompromitovaných pacientů

P. VOLFOVÁ<sup>1</sup>, M. LENGEROVÁ<sup>1,3</sup>, D. DVOŘÁKOVÁ<sup>1,3</sup>, D. PALOUŠOVÁ<sup>1</sup>,  
K. HRNČÍROVÁ<sup>1</sup>, Z. RÁČIL<sup>2</sup>, J. MAYER<sup>2,3</sup>, Š. POSPÍŠILOVÁ<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, LF MU a FN Brno  
<sup>2</sup>Interní hematologická klinika, LF MU a FN Brno, <sup>3</sup>Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno

### SOUHRN

Volfová P., Lengerová M., Dvořáková D., Paloušová D., Hrnčířová K., Ráčil Z., Mayer J., Pospíšilová Š.: **Význam PCR detekce a kvantifikace herpetických virů v bronchoalveolární laváži imunokompromitovaných pacientů**

Herpetické viry jsou u imunokompromitovaných pacientů častou příčinou infekčních komplikací spojenou s postižením respiračního traktu a důvodem vzniku pneumonií. Provedením bronchoalveolární laváže (BAL) je získán biologický materiál z dolních cest dýchacích a jeho vyšetřením lze přispět ke stanovení etiologie onemocnění. Zavedení kvantitativních molekulárně biologických metod do rutinní diagnostiky umožňuje rozlišit mezi akutní infekcí a nezávažnou reaktivací spojenou s asymptomatickým šířením viru. Cílem této práce je zhodnotit, na základě dosud publikované literatury, přínos zavedení kvantifikace herpetických virů v BAL u rizikových skupin pacientů a stanovení velikosti virové nálože, která by předikovala rozvoj herpesvirové pneumonie.

**Klíčová slova:** herpesvirus, pneumonie, bronchoalveolární laváž, real-time PCR, virová nálož, imunokompromitovaný pacient

### SUMMARY

Volfová P., Lengerová M., Dvořáková D., Paloušová D., Hrnčířová K., Ráčil Z., Mayer J., Pospíšilová Š.: **Role of PCR detection and quantification of herpes viruses in bronchoalveolar lavage of immunocompromised patients**

Herpes virus infections represent common complications associated with respiratory tract involvement which may result in pneumonia development in immunocompromised patients. The analysis of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid obtained from the lower respiratory tract may contribute to detection of aetiological agents of the disease. The routine use of quantitative molecular methods enables the discrimination between acute infection and viral reactivation with asymptomatic virus shedding. The aim of this review is to evaluate the contribution of BAL viral load monitoring in high-risk patients and to determine the cut-off of viral load leading to progression to herpes virus pneumonia.

**Keywords:** herpes virus, pneumonia, bronchoalveolar lavage, real-time PCR, viral load, immunocompromised patient

*Klin mikrobiol inf lék 2011;17(6):194–200*

**Adresa:** Mgr. Pavlína Volfová, Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika LF MU a FN Brno, Černopolská 9, 625 00 Brno, Česká republika, e-mail: pvolfova@fnbrno.cz

Došlo do redakce: 5. 5. 2011

Přijato k tisku: 5. 9. 2011

### Úvod

Intersticiální pneumonie (IP) je onemocnění, jehož původcem je různorodé spektrum infekčních agens. Jednu ze skupin tvoří herpetické viry, které jako oportunní patogeny způsobují infekce zejména u imunokompromitovaných osob. Pulmonární infekce jsou spojeny s vysokou morbiditou a mortalitou především u pacientů s orgánovými transplantacemi, transplantacemi kostní dřeně, periferních hematopoietických kmenových buněk a pacientů s hematologickými malignitami léčenými cytostatickou terapií [1].

V současné době je známo více než 80 druhů herpetických virů, jejichž hostiteli jsou obratlovci, ale přirozené infekce u člověka vyvolává pouze osm z nich: lidský cytome-

galovirus (human cytomegalovirus – HCMV), lidské herpesviry 6, 7 a 8 (human herpesvirus 6, 7, 8 – HHV6, HHV7, HHV8), lidský herpes simplex virus 1, 2 (human herpes simplex virus 1, 2 – HSV1, 2), varicella zoster virus (varicella zoster virus – VZV) a virus Epstein-Baarové (Epstein-Baar virus – EBV).

Diagnostika herpesvirové pneumonie je komplikovaná a diagnostická kritéria definující pneumonii zahrnují kromě klinických příznaků, jako jsou kašel, dušnost, horečka a radiologický nález pulmonárních infiltrátů, také nezbytnou detekci konkrétního infekčního agens v biologickém materiálu z dolních cest dýchacích [2].

### Patogenní šíření herpetických virů v hostitelském organismu

Herpesviry mají široký celulární tropismus a napadají množství buněčných typů [3]. Dělí se na lymfotropní, jejichž hlavní cíle jsou buňky imunitního systému (HCMV, EBV, HHV6, 7, 8) a neurotropní s latencí v nervové tkáni (HSV1, HSV2 a VZV). Charakteristickým znakem herpetických virů je vznik perzistence a celoživotní latence po proběhlé primární infekci a možnost virové reaktivity v období imunosuprese infikované osoby. Za nejčastější a běžnou příčinu herpesvirových pneumonií u imunokompromitovaných osob je považován HCMV, méně častý výskyt je popisován u pneumonií spojených s HSV1, ostatní herpetické viry způsobují toto onemocnění pouze výjimečně [4,5].

### HCMV

Z herpetických virů je patogenezé zřejmě nejlépe prozkoumána u HCMV. Možnými cestami vedoucími k nákaze člověka je kontakt organismu s HCMV – infikovanými tělesnými tekutinami a přenos viru krevní transfúzí, z matky na plod nebo transplantovanými orgány. Virus se váže glykoproteinem gp55K, který je součástí virového obalu, na specifický buněčný receptor annexin II a během aktivní infekce infikuje odlišné buněčné typy včetně hematopoietických a stromálních buněk kostní dřeně, endoteliálních, epitelálních, fibroblastů, neurálních buněk a buněk hladkých svalů [6]. Šíření CMV bylo studováno také na zvířecích modelech. U imunokompromitovaných myší byly infikovány buňky mnoha orgánů včetně plic, sleziny, jater, srdce, kostní dřeně, gastrointestinálního traktu, ledvin a mozku [7]. Experimentální studie u myší infikovaných myším CMV (mCMV) potvrdily plíce jako prominentní místo patogenezé mCMV a jako cílové buňky pro mCMV infekci byly identifikovány stromální a parenchymatické plicní buňky, stejně jako intersticiální fibrocyty, alveolární epitelální a endoteliální buňky [2]. Virová nálož v plicích byla až desetkrát vyšší než v ostatních tkáních [8].

Kontakt člověka s virem vede k infekci epitelálních buněk především respiračního, urogenitálního a gastrointestinálního traktu. Poté se HCMV se šíří krevní cestou z místa počáteční infekce do hostitelských tkání. Klíčovou roli v tomto procesu hrají buňky myeloidní řady a jejich progenitory. Zvláště to jsou monocyty, které jsou primárně infikovány během akutní fáze a jsou převládající infiltrující buněčný typ nalezený v infikovaných orgánech. Infikované monocyty však nejsou vhodné pro virovou replikaci, primární HCMV infekce však vede k jejich aktivaci a diferenciaci do permissivních makrofágů. Ty poté adherují k endoteliím formujícími krevní a lymfatické řečiště a prostupují do okolních tkání. Tento proces je zesílen několika faktory, které sám virus indukuje [9]. HCMV modifikuje funkce endoteliálních buněk – zvyšuje indukci buněčné motility, způsobuje změny aktivové polymerizace a ztrátu aktivové formace, způsobuje degradaci proteinů účastnících se tvorby laterálních mezibuněčných spojů, zvyšuje migraci monocytů skrze endoteliální buňky do okolních tkání zvyšováním exprese adhezivních povrchových molekul (ICAM-1, VCAM-1, E selektin, PECAM-1). Při průchodu endoteliální vrstvou probíhá infekce oběma směry – monocyty mohou přenést virus do endoteliálních buněk a naopak [10]. Zá-

roveň jsou infikované endoteliální buňky schopné se oddělit od bazální membrány a vstoupit do krevního toku a účastnit se tak virové diseminace a mohou vytvářet infekční ložiska v tkáních. Incidence těchto endoteliálních buněk se liší u různých imunokompromitovaných skupin a jejich nález v periferní krvi je asociován s vysokou virovou náloží a orgánovým postižením [11].

Účinnému šíření infekce napomáhá samotný virus řadou mechanismů vedoucích k potlačení funkcí imunitního systému. Snižuje expresi proteinů MHC I. a II. třídy na povrchu buněk v místě infekce, čímž dochází k omezení CD8 a CD4 T buněčné imunitní odpovědi. Potlačuje funkci NK (natural killers) buněk vytvářením nefunkčních homologů MHC I molekul na povrchu napadených buněk. Kóduje řadu chemokinů, chemokinových receptorů a cytokinových homologů (např. HCMV IL-10), které inhibují TH1 imunitní odpověď [12,13].

Během produktivní infekce je HCMV genom exprimován v regulované kaskádě dějů, která vede k syntéze tří kategorií virových proteinů. Nejprve jsou exprimovány bezprostředně časné geny (IE –immediate – early) kódující regulační proteiny, které jsou důležité pro další transkripci virové DNA. Následuje exprese časných genů (E – early), které kódují především nestrukturální proteiny účastnící se replikace virové DNA, opravné enzymy a proteiny umožňující únik imunitnímu systému. Během replikace viru jsou exprimovány tzv. pozdní geny (L – late), které kódují strukturální virové proteiny a přispívají ke kompletování a morfogenezi virových partikulí, které jsou poté uvolňovány z infikované buňky [14]. Po proběhlé infekci je virus schopen přejít do stavu latence, který je charakterizován absencí produkce infekčních virionů, ale zároveň schopností virového genomu se znovu reaktivovat. V tomto stavu omezuje expresi virových proteinů. Ačkoliv primární místo latence viru nebylo zatím jednoznačně určeno, virus se latentně nachází v různých buněčných typech – v monocitech, v progenitorech myelo-monocytové linie, v hematopoietických progenitorových buňkách CD34+, endoteliálních a epitelálních buňkách [15].

### HSV1

Dalším častým původcem infekcí imunokompromitovaných osob je HSV1. Virus způsobuje spektrum infekcí, které postihují mukokutánní povrchy, centrální nervový systém a viscerální orgány jako jsou plíce. Šíření viru probíhá infikovanými sekrety a primární infekce začíná napadením mukopitelálních buněk a fibroblastů v místě vstupu viru, kde se virus váže na tři různé buněčné receptory Hev-A, -B a -C. V tomto místě dochází k replikaci viru a navázání virových částic na zakončení nervových vláken a transportu virové kapsidy společně s virovou DNA a tegumentovým proteinem alfa TIF pomocí axonů do jader neuronů. V místě primárního množení dochází k tvorbě syncytií a nekróze. Virus poté navozuje perzistenci v lymfocytech a makrofázech a latentně zůstává v nereplikující se formě v senzoricích částech trojklaného nervu, běžně v trigeminálních a sakrálních gangliích. Způsob šíření viru do dolních cest dýchacích není zcela objasněn a je vysvětlován několika způsoby – postupným šířením do plicního parenchymu, aspirací u pacientů s šířením viru z mukokutánního či oro-

faryngeálního postižení a při masivní infekci šířením i hematogenní cestou. Další možností je reaktivace latentní infekce v gangliích a šíření podél bloudivého nervu, který inervuje krční, hrudní a břišní dutinu, do plicního epitelu [5].

### EBV

Odlišný buněčný tropismus EBV je limitován expresí receptoru pro C3d komponenty komplementárního systému (CD 1), na který se váže hlavním povrchovým glykoproteinem gp350/220. CD21 receptor je exprimován na B lymfocytech – hlavních cílových buňkách viru a na některých epitelálních buňkách orofaryngu a nazofaryngu. Během infekce jsou napadeny epitelální buňky sliznice dutiny ústní a orofaryngu, ve kterých se virus replikuje a dochází k rozpadu buněk a uvolnění nových virionů. Tato produktivní infekce umožní šíření viru slinami a B lymfocyty lokalizovanými v submukóze, tonzilách a krčních mžnicích uzlinách lymfatickou tkání. U zdravého přenašeče je možno detekovat 1–50 virových genomů/10<sup>6</sup> krevních mononukleárních buněk [16].

Po infekci B lymfocytů fúzí terminální repetice virové DNA a vytvoří cirkulární epizom, který je charakteristický pro latentní setrvání viru v buňce a virový genom exprimuje pouze devět proteinů (latentní membránové proteiny LMP, EBV jaderné antigeny EBNA) a dvě RNA – EBER-1 a -2). V paměťových B leukocytech virus dlouhodobě přežívá a infekce vede k jejich transformaci a imortalizaci díky proteinu LMP-1, který poskytuje B lymfocytům aktivační signály napodobující signální dráhu CD40/CD40L a aktivuje buňku prostřednictvím transkripčního faktoru NFκB [17].

Počet EBV infikovaných buněk je regulován CD4 a CD8 T cytotoxickými lymfocyty a NK buňkami. Virus dokáže negativně modulovat imunitní systém tak, že nedojde k jeho eliminaci. Pomocí antiapoptického proteinu Bcl-2 jsou infikované buňky chráněny před apoptózou, pomocí EBNA-1 blokuje vlastní degradaci v proteozomovém aparátu buňky, čímž omezuje antigenní prezentaci, kóduje homolog IL-10, který tlumí zánětlivou reakci Th1 T lymfocytů.

U běžné imunokompetentní populace probíhá primární EBV infekce buď symptomatically, nebo se manifestuje jako infekční mononukleóza [18]. Latentní EBV infekce je spojena s řadou malignit, například HIV asociovaným lymfomem, Burkittovým lymfomem, nasofaryngeálním lymfomem a hodkinovskými lymfomy. U imunosuprimovaných osob vede absence T lymfocytů k proliferaci latentně infikovaných B lymfocytů. Onemocnění způsobené expanzí EBV infikovaných imortalizovaných B lymfocytů v organizmu vnímavého jedince se označuje jako EBV-asociované LPD (EBV-Lymphoproliferative Disease), které patří k nejzávažnějším komplikacím chronické imunosuprese [19].

### VZV

Varicella zoster virus se šíří kapénkovou infekcí nebo přímým kontaktem s nakaženým jedincem. Váže se na hostitelské receptory přes gB, gC, gD a gH a vstupuje do organizmu pravděpodobně přes mukózní epitelální buňky horního respiračního traktu. Místem primárního pomnožení je faryngeální sliznice a replikace probíhající v lymfatických uzlinách vede k infekci mononukleárů, makrofágů a buněk retikuloendotelálního systému. Virus se v organiz-

mu šíří lymfatickým a krevním řečištěm, z endotelu kapilár přestupuje do vnímavých buněk kůže a sliznic, kde vytváří typický exantém. Poté způsobuje celoživotní latenci v gangliích kranálních nervů, zadních kořenů míšních a vegetativních systémů [20,21].

Primární infekce viru vznikají až v 90 % v dětství a projevují se jako plané neštovice a onemocnění probíhá většinou bez komplikací. Aktivace latentně perzistujícího viru v některém ze sensorických ganglií vede k rozvoji pásového oparu (herpes zoster), kdy se virus šíří osou neuronu a ze zakončení nervů přechází do kůže, kde vyvolává exantémy. Komplikace infekce jsou pozorovány především u dospělých nemocných, u novorozenců a imunokompromitovaných pacientů, např. u HIV pacientů může být postižena virem řada orgánů – např. oči, plíce, játra nebo CNS. Mezi nejzávažnější komplikace způsobené virem řadí intersticiální varicellové pneumonie, celkové sepse organismu a intrakraniální vaskulitidy. Virem způsobené pneumonie dosahují mortality 9–50 % a více než 90 % případů VZV pneumonií u dospělých je diagnostikováno u pacientů s lymfomy a imunokompromitovaných osob [22].

### Bronchoalveolární laváž

Vhodnou metodou umožňující získat buněčné i nebuňčné složky z dolního respiračního traktu a alveolů jako místa postižení je bronchoalveolární laváž (BAL). Tato nenáročná, minimálně invazivní a šetrná metoda představuje malou zátěž a nízké riziko komplikací a zároveň vysokou diagnostickou výtěžnost [23].

BAL se provádí flexibilním bronchoskopem z místa maximálního plicního postižení nebo v případě difúzního plicního postižení nestředního bronchu. Výplachovou tekutinou je 100–200 ml fyziologického roztoku ohřátého na 37 °C. Aplikace se provádí v několika frakcích (20–50 ml) rychlostí přibližně 5 ml/s s následným zpětným odsátím instilované tekutiny. Množství aplikovaného fyziologického roztoku se řídí návratností tekutiny, která by neměla klesnout pod 50 % [24].

Vyšetřovaným biologickým materiálem je tekutina získaná bronchoalveolární laváží obsahující buněčné a nebuňčné složky a jejím podrobným vyšetřením je možné přispět ke stanovení etiologie pneumonie. Detekci viru lze provést jak v DNA izolované z pelety buněk obsahující virové partikule [25–29], tak ze supernatantu obsahující volnou virovou DNA, které získáme centrifugací tekutiny BAL [4]. Srovnání detekce HCMV z obou frakcí u pacientů po transplantaci plic provedli Westall a kol. [30] pomocí kvantitativní metody COBAS Amplicor HCMV Monitor test (Roche), přičemž mezi virovými náložemi v obou částech BAL zjistili silnou korelaci. K rozdílným výsledkům v obou kompartmentech došlo pouze u vzorků s nízkou hladinou viru, kdy absolutní nálož byla nižší než 15. percentil virové nálože všech pozitivních vzorků. Pokud byla pro detekci použita metoda zrychlené kultivace s centrifugací a byl inokulován samotný supernatant a zároveň buňky společně se supernatantem, počet ložisek byl při inokulaci supernatantu pouze mírně snížen. Ačkoliv je obecně akceptováno, že herpesviry jsou intrabuněčné viry, lze tedy předpokládat, že i v supernatantu je signifikantní množství volné virové DNA [31].

### Detekční metody herpesvirů v BAL

Pro diagnostiku herpetických infekcí lze použít metody nepřímé nebo přímé detekce. Metody přímé detekce jsou založeny na průkazu přítomnosti virového materiálu (virové partikule nebo jejich části) v klinickém vzorku, zatímco metody nepřímé detekce identifikují specifické protilátky vznikající jako odpověď na přítomnost virů v organismu. U imunodeficientních pacientů s dlouhodobou imunosupresivní protinádorovou léčbou a pacientů krátce po alogenní transplantaci hematopoietických progenitorů se testování virových agens provádí výhradně metodami přímé detekce; metody nepřímé diagnostiky jsou pro zmíněnou skupinu pacientů nespolehlivé vzhledem k oslabenému imunitnímu systému, který není schopen adekvátní protilátkové odpovědi.

Z metod přímé diagnostiky se využívá cytologická detekce umožňující zjistit přítomnost charakteristických změn ve virem infikované buňce pomocí světelné mikroskopie. Společným znakem infekcí způsobených herpesviry jsou multinukleární gigantické buňky. HCMV vytváří tyto cytomegalické buňky s charakteristickými intranukleárními inkluzemi (tzv. Cowdryho inkluze) vytlačujícími chromatin na okraj jádra, čímž vytváří charakteristický vzhled tzv. sovích očí (owl's eyes) s četnými cytoplazmatickými inkluzemi. Stejně virové inkluze jsou však typické pro široké spektrum virů, což výrazně snižuje specifitu metody. Vzhledem k obdoby morfologickým znakům je velmi obtížné možné odlišení herpesvirů navzájem mezi sebou, například HSV1 od VZV [32]. Vzhled buněk infikovaných HSV1 je podobný buňkám infikovaným HCMV, tvoří také nukleární inkluze vyplňující jádro s chromatinem vytlačeným na okraj, rozlišení HSV od HCMV je založeno na absenci cytoplazmatických inkluzí [33]. Dalším limitním faktorem této metody je nutná přítomnost relativně vysoké koncentrace virových partikul, uvádí se titr  $10^6$ – $10^7$ /ml [34].

Další možnou diagnostickou metodou je virová *in vitro* kultivace. Kultivace virů je možná pouze v živém prostředí. Viry nemají vlastní enzymatický aparát pro syntézu proteinů a glycidů, k replikaci potřebují nutně metabolický aparát vhodné hostitelské buňky. Tkáňové kultury jsou nejjednodušším systémem živých buněk pro izolaci virů. Průkaz je založen na přítomnosti typických morfologických změn v kultivovaných buňkách – tzv. cytopatického efektu (CPE) vznikajícího během virové infekce, prokazatelných v optickém mikroskopu. Díky množství dostupných buněčných kultur vnímavých k virové replikaci lze virové kultivace využít pro izolaci širokého spektra virů a inokulací stejného biologického materiálu na několik odlišných buněčných kultur je možné odhalit případné koinfekce. Pro virologickou diagnostiku jsou dostupné primární kultury vhodné pouze k jedné pasáži vznikající enzymatickým rozvolněním buněk lidských nebo zvířecích tkání (bovinní fétus, myší tkáň), sekundární kultury s diploidním počtem chromozomů odvozené z primárních kultur obsahující pouze jeden vyselektovaný buněčný typ a heteroploidní buněčné linie s nepravidelným počtem chromozomů odvozené z různých nádorových tkání. Pro diagnostiku herpesvirů jsou používány například lidské fibroblasty (HCMV, HSV, VZV), buňky lidských embryonálních plic LEP (HSV), plicní fibroblasty MRC-5 (HCMV, HSV i VZV), buňky plicního karcinomu

A549 (HSV a VZV), lidské neonatální buňky ledvin HNK (VZV) nebo králičí buňky ledvin RK (HSV) [35].

Výhodou kultivace je vysoká specifita, například pro HCMV je 95 %, ale je nízká senzitivita 85,5 % a nízká pozitivní prediktivní hodnota pro diagnostiku pneumonie (60 %) [36]. Podobné závěry jsou i v případě HSV1 – specifita dosahuje 100 %, ale senzitivita je závislá na stupni postižení a době odběru vzorku a pohybuje se mezi 50–75 % [32]. Zásadní nevýhodou znemožňující rutinní využití pro vyšetřování imunokompromitovaných pacientů je doba trvání kultivací a rozvoje cytopatického efektu, která se pohybuje v rozmezí dní (HSV2 6 dní, VZV 6–8 dní) až týdnů (CMV 4–6 týdnů, HHV6 3 týdny) [35]. V případě EBV se tato technika vůbec nepoužívá, protože není k dispozici dostatečně vnímavá buněčná kultura a CPE je nevýrazný, stejně jako v případě HHV6 a HHV7.

Snížení potřebného času kultivace na 16–48 hodin přináší modifikace konvenční kultivační techniky – zrychlená kultivační metoda, které předchází pomalá centrifugace inokulovaného biologického materiálu s buněčnou kulturou (shell vial kultivace). Tato metoda je často využívána ve spojení s průkazem virových antigenů infikovaných buněk pomocí imunohistochemického nebo fluorescenčního značení monoklonální protilátkou. Krátká centrifugace o nízké rychlosti zlepšuje detekci řady virů, včetně HCMV, VZV a HSV, pravděpodobně díky stimulaci buněčné proliferace a aktivaci genové exprese [32]. Díky zkrácené inkubační době je ve srovnání s klasickou kultivací redukována možnost případné kontaminace [31]. Přímá cytologie stejně jako virová kultivace potvrdí sice přítomnost viru v testovaném materiálu, ale nejsou schopné odlišit aktivní infekci od asymptomatické exkrece viru [5]. Navíc metody izolace virů v tkáňových kulturách mají nižší citlivost, jsou značně pracné, časově náročné a jsou vhodné pouze pro některé druhy virů.

Další možností přímého důkazu viru v biologickém materiálu je imunohistochemický průkaz antigenu (antigenémie). Příkladem této metody je detekce cytomegalovirového antigenu pp65, který se v akutní fázi infekce hromadí v leukocytech periferní krve a lze ho dostatečně průkazně detekovat pomocí monoklonálních protilátek nepřímou fluorescencí (průkaz antigenémie HCMV). S využitím protilátek proti bezprostředně časnému HCMV antigenu pp72, který je detekovatelný v infikovaných buňkách v intervalu 48 hodin po vstupu infekce, lze časně diagnostikovat patogen v buňkách tkáňových biopsií nebo BAL. Nevýhodou imunohistochemických testů je částečná nespecifická vazba monoklonálních protilátek vytvářející nespecifickou fluorescenci v biologickém preparátu, která může být příčinou falešně pozitivních nálezů [37].

Porovnání kvantifikace HCMV v BAL u pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně metodami klasické kultivace, zrychlené kultivace a metodou přímé fluorescence ukázalo stejnou senzitivitu u klasické i zrychlené kultivace HCMV. Obě tyto metody byly více senzitivní než fluorescenční metoda detekce, při které byl směsí tří monoklonálních protilátek naměřených proti časnému a pozdním antigenům detekován virus pouze v infikovaných buňkách, zatímco kultivační metodou byly detekovány jak intracelulární viry, tak volné virové částice v supernatantu [12].

V klinické praxi jsou tyto metody nahrazovány molekulárně biologickými metodami, které v současnosti představují nejrozšířenější přístup v diagnostice herpetických virů. Jsou to především metody založené na průkazu virové DNA (označováno jako DNAémie) polymerázovou řetězovou reakcí (PCR – polymerase chain reaction), díky níž lze prokázat přítomnost viru v biologickém materiálu ve velmi krátkém čase a lze ji aplikovat na široké spektrum klinických vzorků.

Princípem PCR je opakovaná replikace části DNA hledaného patogena, která je ohraničená specifickými primery a pomocí termostabilní DNA polymerázy je namnožena na detekovatelné množství. Výběr cílového místa v DNA sekvenci pro identifikaci viru se může značně lišit. V současné době neexistují standardizované protokoly pro detekci herpetických virů a řada dosud publikovaných prací využívá tzv. „in house“ metod s variabilními primery, což komplikuje srovnání výsledků mezi laboratořemi [38]. Určitou možností kontroly funkčnosti a především správnosti těchto metod je účast ve srovnávacích testech, které jsou komerčně dostupné a ve kterých je možné ověřit správnost jak kvalitativních tak kvantitativních výsledků. Jsou to např. testy QCMD (Quality Control of Molecular Diagnostics, Velká Británie), Instandt e.V. (Německo) nebo SZÚ (Státní zdravotní ústav, ČR), který zajišťuje celostátní kontrolu úrovně vyšetřování sérologie, kultivace a PCR metod herpetických virů v diagnostických laboratořích ČR v rámci systému Externí kontroly kvality (EHK). Dostupné jsou sice i komerční diagnostické soupravy, ale jejich používání významně zvyšuje finanční náklady.

V diagnostické praxi se využívá několik modifikací PCR metod. Nejednodušší z nich je kvalitativní klasická PCR s elektroforetickou detekcí. Další rozšířenou variantou je nestandardní PCR, která má vyšší citlivost i specifitu ve srovnání s klasickou PCR (50–100 kopií virového genomu/reakci vs. 2–10 kopií virového genomu/reakci), ale i vyšší riziko kontaminace během manipulace se vzorkem a multiplex PCR umožňující detekci více cílových míst v jedné reakci [37]. PCR metoda disponuje vysokou senzitivitou a specificitou, což ale může mít za následek detekci DNA viru v klinickém materiálu i u asymptomatických pacientů. Nelze tedy rozlišit latentní virus od viru, který se replikuje, a PCR pozitivita v případě herpesvirů může být přítomna jak v akutní fázi infekce, tak i v asymptomatickém stádiu. Rozlišit tato stadia lze zavedením kvantitativní metody detekce umožňující stanovení hladiny virové nálože. Nejznámější modifikace PCR – real-time PCR (tzv. PCR v reálném čase) stanoví výchozí počet kopií viru s použitím fluorescenčních sond nebo barviv, které detekují množství PCR produktu během amplifikace na základě nárůstu fluorescence a z ní je poté možné srovnáním s použitým kalibrátorem stanovit množství virových kopií ve vzorku. Jejím hlavním přínosem je získání kvantitativních výsledků, a tedy možnost sledování dynamiky rozvoje infekce u konkrétního pacienta. Interpretace a srovnávání výsledků mezi jednotlivými laboratořemi je zde ztíženo také odlišným vyjádřením kvantity viru, které opět dosud nebylo standardizováno (kopie viru/reakci, kopie viru/μg DNA, kopie viru/ml klinického materiálu apod.). Výhodou metody real-time PCR je vysoká reprodukovatelnost, specificita, časová nenáročnost a senzi-

tivita. Určitou nevýhodou jsou vysoké finanční náklady na přístrojové vybavení.

### Kvantifikace herpesvirů v BAL

Cílem kvantifikace virové nálože je stanovení klinicky významné hladiny viru, která by odlišila závažnou reaktivaci od asymptomatického šíření viru a usnadnila by predikovat rozvoj herpesvirové pneumonie. Ačkoliv pravděpodobně platí, že čím vyšší je tato virová nálož, tím závažnější je průběh infekce, tak samotný nález viru v BAL ne vždy koreluje s diagnózou herpesvirové pneumonie a ani kvantifikace virové nálože nemusí účinně rozlišit pacienty s/bez herpesvirové pneumonie. Výskyt herpetických virů v BAL byl zaznamenán jak u zdravých osob bez jakýchkoliv známek pneumonie, tak u neimunokompromitovaných nemocných s jinou diagnózou. Bylo zjištěno, že například hladina HCMV stanovená metodou PCR v BAL se u zdravých osob pohybuje do 100 kopií/μg DNA [25], stejně jako u HHV6 [27]. Také výskyt EBV byl zjištěn až u 25,5 % zdravých osob [1]. Zároveň však bylo zjištěno, že nález HCMV v bezpříznakovém období představuje výrazné riziko onemocnění HCMV pneumonií [12] a již v roce 1991 bylo publikováno, že u příjemců kostní dřeně bez známek pneumonie se toto riziko zvýšilo až na 70 %, pokud nebyla započata antivirová terapie [39].

Časným prediktivním faktorem pro rozvoj pneumonie by mohl být nález viru v periferní krvi nebo plazmě. Je zde sice stejně jako v případě BAL možný záchyt u zdravých asymptomatických pacientů, ale například frekvence buněk nesoucích HCMV genom u zdravých séropozitivních osob je velice nízká (< 1 buňka na 10 000 mononukleárních buněk v periferní krvi) [40]. Korelace mezi nálezem v BAL a periferní krví byla potvrzena jak pomocí kvalitativních PCR metod [29], tak pomocí kvantitativních, kterými byla zjištěna vyšší hladina virové nálože u pacientů s pneumonií ve srovnání s pacienty bez známek pneumonie. Tato korelace ale nebyla vždy absolutní a i u pacientů bez známek pneumonie bylo v krvi naměřeno signifikantní množství viru [41], nebo naopak u pacientů s potvrzenou pneumonií byl nález v plazmě zcela negativní [28] nebo významně snížen, což bylo vysvětlováno vyšší lokální virovou replikací v plicích [42]. Proto negativní výsledek vyšetření přítomnosti viru v plazmě nebo periferní krvi k vyloučení herpesvirové pneumonie nestačí. Pro stanovení prediktivní hodnoty virové nálože byly porovnávány hladiny viru detekovaných u pacientů s pneumonií a u osob bez známek pneumonie. A i když hodnoty virových náloží mohou odrazet rozdíly ve výběru diagnostických metod, amplifikačních protokolů a různorodost skupin testovaných pacientů – v současné době se dostupné publikované práce týkají především pacientů po transplantaci plic, a v menší míře hematologických pacientů a ostatních imunokompromitovaných pacientů – je zřejmé, že virová nálož pacientů s pneumonií je signifikantně vyšší než u pacientů asymptomatických nebo zdravých dobrovolníků. Tímto způsobem byla kvantitativní metodou (COBAS AmpliCor HCMV Monitor test, Roche) stanovena hodnota 46 000 kopií HCMV/ml BAL predikující histologicky potvrzenou pneumonii u skupiny pacientů, kteří podstoupili transplantaci plic. Každý případ histologicky potvrzené pneumonie zde byl spojen s virovou náloží

> 2 SD nad průměrnou hodnotou virové nálože pacientů bez histologicky potvrzené HCMV pneumonie a použití tohoto thresholdu zlepšilo senzitivitu a specifitu vyšetření na 100 %, resp. 95 %. Nicméně autoři spekulují, že pravděpodobně až vyšší virová nálož (> 64 000 kopií HCMV/ml BAL) je spojena se specifickými symptomatickými příznaky HCMV pneumonie [30].

Stejně stanovení použili již dříve Riise a kol. [28], ale v jejich práci, i přes to, že HCMV hladina detekovaná metodou PCR ve skupině pacientů po transplantaci plic nebo kombinované transplantaci plic a srdce s HCMV nemocí byla signifikantně vyšší než u pacientů bez (1 120 vs. 180 kopií/ml BAL), nebyli dostatečně rozlišeni pacienti s pneumonií od pacientů bez pneumonie.

Pokud byly u pacientů po transplantaci plic s HCMV pneumonií detekovány mnohem vyšší hladiny viru v BAL – více než 500 000 kopií/ml BAL, nález byl vždy asociován s histologickou detekcí virových inkluzí, které byly detekovány pomocí imunohistochemických metod v bioptické plicní tkáni a tedy s potvrzenou HCMV pneumonií a takto vysoká nálož viru v BAL měla vyšší pozitivní prediktivní hodnotu pro HCMV pneumonii [26]. Stejně tomu bylo i v práci Gerna a kol., kteří ve skupině pacientů po transplantaci plic detekovali vysoké hladiny HCMV u pacientů s histologicky potvrzenou pneumonií. Na základě předěšlých závěrů ale autoři stanovili pro zahájení preventivní terapie pulmonární infekce HCMV, která by měla předejít rozvoji onemocnění, hladinu nižší – 100 000 kopií/ml BAL [26,43]. Stanovením velikosti virové nálože HCMV u pacientů, kteří podstoupili transplantaci hematopoietických kmenových buněk, se zabývá práce prezentovaná na ICCAC (Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy) v roce 2009. Autoři prokázali signifikantní rozdíl mezi pacienty s HCMV intersticiální pneumonií a asymptomatickými (106 vs. 12) – medián 50 828 vs. 194 kopií/ml BAL. Ačkoliv PCR threshold pro HCMV – IP nebyl stanoven, tak pomocí ROC (Receiver Operating Characteristic) analýzy byla stanovena hladina viru vyšší než 6 000 kopií/ml BAL, která je spojena vysokou specificitou (92 %), ale nízkou senzitivitou (62 %) pro diagnózu HCMV – IP. Z toho plyne, že použití kvantitativní PCR v BAL jako samostatného testu pro HCMV není dostatečné, napomoci v rozhodování může např. kvantitativní detekce HCMV v periferní krvi pacienta [44].

Jako další potenciální příčina pneumonie – HSV1, byl detekován v heterogenní skupině imunokompromitovaných pacientů kvantitativní metodou real-time PCR a u těchto pacientů byly naměřeny obdobně vysoké hladiny viru. Korelací výsledků s klinickým stavem bylo zjištěno, že virová nálož  $10^5$  kopií/ml již byla spojena se zvýšeným rizikem úmrtí a těžkým respiračním selháním a hladina viru  $10^8$  kopií/ml byla spojena s histologicky potvrzenou HSV1 pneumonií [45].

Stanovení diagnózy HSV1 infekce je ovšem problematické, protože detekce viru v dolních dýchacích cestách nemusí být spojena s klinickými příznaky. Jako běžná příčina pozitivního nálezu viru u asymptomatických pacientů je popisována orální kontaminace při odběru BAL [45]. U pacientů s vysokodávkovou chemoterapií a radioterapií dochází ke vzniku mukozitidy – charakteristickému poškození

epiteliálních povrchů a ke změnám v submukóze. Orální mukozitida postihuje 60–100 % příjemců hematopoietických kmenových buněk s myeloablativním přípravkem režimem a toto narušení bariér zvyšuje riziko průniku mikroorganismů [5,46].

Ke kontaminaci BAL při odběru může dojít také při reaktivaci viru spojené s asymptomatickým šířením slinami, které bylo popsáno jak u HSV1 (izolace viru ze slin byla potvrzena u 1–5 % zdravých pacientů [47]), tak i u HCMV a HHV6 [48,49]. Důvodem je množení viru v epitelálních buňkách slinných žláz, která patří mezi imunitně „privilegovaná“ místa. Vzhledem k nedostatku MHC I molekul na jejich povrchu nedochází k dostatečné stimulaci CD8+ lymfocytů. U pacientů s umělou plicní ventilací bylo popsáno šíření HSV1 z orofaciální oblasti do jícnu nebo trachey a výskyt viru v dutině ústní byl detekován ještě před rozvojem pneumonie [48]. Samotná přítomnost HSV1 v horních cestách dýchacích, infekce dutiny ústní, makroskopické bronchiální postižení či reaktivace viru v krku jsou však považovány za rizikové faktory pro rozvoj pneumonie [50].

Riziko kontaminace BAL při provádění bronchoskopie bylo popsáno také u VZV, kdy byl odebrán biologický materiál HIV pacienta s plicním postižením kontaminován virem z faryngálních lézí, což snížilo specifitu PCR detekce [51].

Také EBV DNA byla detekována v různých tkáních zdravých osob, včetně plic, které jsou považovány za místo latentního výskytu viru a byla potvrzena replikace v plicních alveolárních buňkách, ale patogenní role EBV v plicní tkáni nebyla dosud zcela objasněna, stejně jako mechanismus vzniku intersticiální pneumonie. Ačkoliv byl virus častěji detekován u pacientů po transplantaci (solidní orgány, kostní dřeň), tak srovnání velikosti virové nálože stanovené metodou real-time PCR ve skupině transplantovaných imunokompromitovaných pacientů a netransplantovaných neprokázalo signifikantní rozdíl mezi těmito skupinami pacientů, stejně jako nebyl prokázán signifikantní rozdíl ve virové náloži mezi příjemci solidních orgánů a příjemci kostní dřevě [1].

## Závěr

Významným přínosem pro diagnostiku výskytu a sledování dynamiky herpetických infekcí se stalo zavedení kvantitativních molekulárně biologických metod, které umožňují detekci herpetických virů v širokém spektru biologických materiálů. Vzhledem k jejich rychlému provedení a vysoké citlivosti a specifitě jsou v současnosti řazeny mezi rutinně používané diagnostické metody a nahrazují zdoluhavé dosud používané metody přímé detekce. I když interpretace výsledků vyšetření BAL není jednoznačná, tak je tato metoda účinným nástrojem pro vyšetření pacientů s respiračními symptomy a může významně přispět k odhadu rizika nebo průběhu onemocnění imunosuprimovaných pacientů. Vyšetření PCR metodami poskytuje vysokou negativní prediktivní hodnotu pro diagnostiku herpesvirové infekce. V případě pozitivního nálezu je ale nutné zvážit možný záchyt perzistujícího viru v plicích a vyloučit případnou kontaminaci vzorku při odběru BAL a i v případě vysoké virové nálože v BAL je nutné zhodnotit stav pacienta v kontextu dalších klinických a laboratorních vyšetření.

I přes to, že použití vyšetření BAL kvantitativními PCR metodami v případě respiračních komplikací jako samostatného testu pro diagnostiku herpesviróvé pneumonie v současné době není standardizováno a threshold pro zahájení herpesviróvé terapie dosud nebyl stanoven, přináší toto vyšetření v diagnostice herpesviróvých infekcí velmi cenné doplňující informace ke klinickým a radiologickým nálezům pacienta.

Práce byla podporována granty: MPO FR-TI2/254, MŠMT MSM 0021622430, NS10442-3/2009, NS10441-3/2009.

## Literatura

- Costa C, Elia M, Astegiano S, et al. Quantitative detection of Epstein-Barr virus in bronchoalveolar lavage from transplant and nontransplant patients. *Transplantation*. 2008;86(10):1389-1394.
- Podlech J, Holtappels R, Pahl-Selbert MF, Siefkens HP, Reddehase MJ. Murine model of interstitial cytomegalovirus pneumonia in syngeneic bone marrow transplantation: persistence of protective pulmonary CD8-T-cell infiltrates after clearance of acute infection. *J Virol*. 2000;74(16):7496-7507.
- Jarvis MA, Nelson JA. Human cytomegalovirus tropism for endothelial cells: not all endothelial cells are created equal. *J Virol*. 2007;81(5):2095-2101.
- Buchbinder S, Elmagaachi AH, Schaefer UW, Roggendorf M. Human herpesvirus 6 is an important pathogen in infectious lung disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000;26(6):639-644.
- Simoons-Smit AM, Kraan EM, Beishuizen A, Strack van Schijndel RJ, Vandenbroucke-Grauls CM. Herpes simplex virus type 1 and respiratory disease in critically-ill patients: Real pathogen or innocent bystander? *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(11):1050-1059.
- Goodrum FD, Jordan CT, High K, Shenk T. Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(25):16255-16260.
- Reddehase MJ, Podlech J, Grizmek NK. Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. *J Clin Virol*. 2002;25 Suppl 2: S23-36.
- Koffron AJ, Hummel M, Patterson BK, et al. Cellular localization of latent murine cytomegalovirus. *J Virol*. 1998;72(1): 95-103.
- Smith MS, Bentz GL, Alexander JS, Yurochko AD. Human cytomegalovirus induces monocyte differentiation and migration as a strategy for dissemination and persistence. *J Virol*. 2004;78(9):4444-4453.
- Bentz GL, Jarquin-Pardo M, Chan G, et al. Human cytomegalovirus (HCMV) infection of endothelial cells promotes naive monocyte extravasation and transfer of productive virus to enhance hematogenous dissemination of HCMV. *J Virol*. 2006;80(23): 11539-11555.
- Kas-Deelen AM, de Maar EF, Harmsen MC, et al. Uninfected and cytomegalic endothelial cells in blood during cytomegalovirus infection: effect of acute rejection. *J Infect Dis*. 2000;181(2):721-724.
- Emery VC. Investigation of CMV disease in immunocompromised patients. *J Clin Pathol*. 2001;54(2):84-88.
- Peggs KS, Mackinnon S. Cytomegalovirus: the role of CMV post-hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(4):695-701.
- Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther*. 2003;98(3):269-297.
- Gerna G, Baldanti F, Revello MG. Pathogenesis of human cytomegalovirus infection and cellular targets. *Hum Immunol*. 2004;65(5):381-386.
- Galley ML. Molecular Diagnosis of Epstein-Barr Virus-Related Diseases. *J Mol Diagn*. 2001;3(1):1-10.
- Schmidt CW, Misko IS. The ecology and pathology of Epstein-Barr virus. *Immunol Cell Biol*. 1995;73(6):489-504.
- Kimura H, Morita M, Yabuta Y, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. 1999;37(1):132-136.
- Kalinova L, Indrakova J, Bachleda P. Post-transplant lymphoproliferative disorder. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2009;153(4): 251-257.
- Roháčková H. Onemocnění vyvolaná virem varicella-zoster. *Pediatric pro praxi*. 2005;6:284-286.
- Opavský R, Herzig R, Kaňovský P. Herpetické infekce centrální nervové soustavy. *Neurologia pro praxi*. 2008;2:107-110.
- Kim EA, Lee KS, Primack SL. Viral Pneumonias in Adults: Radiologic and Pathologic Findings. *Radiographics*. 2002;22:137-149.
- Skříčková J, Kolaříková R. Standardní postup při provádění bronchoalveolární laváže (BAL) a vyšetřování bronchoalveolární tekutiny (BAT). *VnitřLék*. 1994;Mar 40(3):179-183.
- Tomášková M, Skříčková J. Bronchoalveolární laváž-možnosti a rizika pesedent, interpretace některých výsledků. *Postgraduální medicína*. 2010;12(příloha 5): 36-38.
- Ohyashiki JH, Nagata A, Ojima T, et al. Quantification of human cytomegalovirus using bronchoalveolar lavage cells in pulmonary complications associated with hematologic neoplasia. *Int J Mol Med*. 2003;11(6):779-783.
- Chemaly RF, Yen-Lieberman B, Castilla EA, et al. Correlation between Viral Loads of Cytomegalovirus in Blood and Bronchoalveolar Lavage Specimens from Lung Transplant Recipients Determined by Histology and Immunohistochemistry. *J Clin Microbiol*. 2004;42(5):2168-2172.
- Nagata A, Ohyashiki JH, Kasuga I, et al. Detection and quantification of human herpesvirus 6 genomes using bronchoalveolar lavage fluid in immunocompromised patients with interstitial pneumonia. *Int J Mol Med*. 2001;8(4):379-383.
- Risse GC, Andersson R, Bergstrom T, et al. Quantification of cytomegalovirus DNA in BAL fluid: a longitudinal study in lung transplant recipients. *Chest*. 2000;118(6):1653-1660.
- Bewig B, Haacke TC, Throke A, et al. Detection of CMV pneumonitis after lung transplantation using PCR of DNA from bronchoalveolar lavage cells. *Respiration*. 2000;67(2):166-172.
- Westall GP, Michaelides A, Williams TJ, Snell GI, Kotsimbos TC. Human cytomegalovirus load in plasma and bronchoalveolar lavage fluid: a longitudinal study of lung transplant recipients. *J Infect Dis*. 2004;190(6):1076-1083.
- Slavin MA, Gleaves CA, Schoch HG, Bowden RA. Quantification of cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage fluid after allogeneic marrow transplantation by centrifugation culture. *J Clin Microbiol*. 1992;30(11):2776-2779.
- Singh A, Preiksaitis J, Feenczy A, Romanowski B. The laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2005;16(2): 92-98.
- Powers CN. Diagnosis of infectious diseases: a cytopathologist's perspective. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(2):341-365.
- Bowden RA, Jungman P, Pava CV. Transplant infections. 1998: Lippincott-Raven.
- Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):49-78.
- Cathomas G, Morris P, Pekle K, Cunningham I, Emanuel D. Rapid diagnosis of cytomegalovirus pneumonia in marrow transplant recipients by bronchoalveolar lavage using the polymerase chain reaction, virus culture, and the direct immunostaining of alveolar cells. *Blood*. 1993;81(7):1909-1914.
- Roubalová K. Laboratorní diagnostika herpetických virů. *Med Pro Praxi*. 2010; 7(5):241-244.
- Drzw WL. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20(4):408-411.
- Boivin G, Olson CA, Quirk MR, et al. Quantitation of cytomegalovirus DNA and characterization of viral gene expression in bronchoalveolar cells of infected patients with and without pneumonitis. *J Infect Dis*. 1996;173(6):1304-1312.
- Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 7):1763-1779.
- Sanchez JL, Storch GA. Multiplex, quantitative, real-time PCR assay for cytomegalovirus and human DNA. *J Clin Microbiol*. 2002;40(7):2381-2386.
- Bauer CC, Jaksch P, Aberle SW, et al. Relationship between cytomegalovirus DNA load in epithelial lining fluid and plasma of lung transplant recipients and analysis of coinfection with Epstein-Barr virus and human herpesvirus 6 in the lung compartment. *J Clin Microbiol*. 2007;45(2):324-328.
- Gerna G, Lilkeri D, Rognoni V, et al. Preventive therapy for systemic and pulmonary human cytomegalovirus infection in lung transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009;9(5):1142-1150.
- Travi G. The Utility of CMV Viral load in BAL Fluid of Hematopoietic Cell transplant Recipients with CMV Pneumonia. in ICCAC 2009. 2009. Boston USA.
- Gooskens J, Templeton KE, Claas EC, et al. Quantitative detection of herpes simplex virus DNA in the lower respiratory tract. *J Med Virol*. 2007;79(5):597-604.
- O'Brien SN, Bljolewens NM, Mahfouz TH, Anaisse EJ. Infections in patients with hematological cancer: recent developments. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2003:438-472.
- Schuller D. Lower respiratory tract reactivation of herpes simplex virus. Comparison of immunocompromised and immunocompetent hosts. *Chest*. 1994;106(1 Suppl):3S-7S; discussion 34S-35S.
- Lagrt CE, Combes A, Deback C, et al. Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(9):935-942.
- Collet S, Petit B, Bordessoule D, et al. Real-time PCR for quantification of human herpesvirus 6 DNA from lymph nodes and saliva. *J Clin Microbiol*. 2002;40(7): 2445-2451.
- Greeneveld AB, Vandenbroucke-Grauls CM. One swallow does not make a summer: can herpes simplex virus-1 cause pneumonia and acute lung injury? *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(9):865-866.
- Fraisse P, Fuller M, Rey D, et al. Recurrent varicella pneumonia complicating an endogenous reactivation of chickenpox in an HIV-infected adult patient. *Eur Respir J*. 1998;11(3):776-778.