

*Sylwia Rynans^{1,5}, Tomasz Dzieciatkowski^{1,2}, Rafał Krenke³, Magdalena Grabczak³,
Agnieszka Kolkowska-Leśniak⁴, Maciej Przybylski^{1,2}, Agata Sulowska^{1,2}, Ryszarda Chazan³,
Krzysztof Warzocha⁴, Grażyna Młynarczyk¹*

WYKORZYSTANIE ILOŚCIOWEJ REAKCJI ŁAŃCUCHOWEJ POLIMERAZY W CZASIE RZECZYWISTYM DO WYKRYWANIA ZAKAŻEŃ DOLNYCH DRÓG ODDECHOWYCH WYWOŁANYCH ADENOWIRUSAMI U OSÓB Z CHOROBIAMI NOWOTWOROWYMI UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO

**REAL-TIME PCR ASSAY FOR DETECTION AND QUANTIFICATION OF HUMAN
ADENOVIRUSES IN PATIENTS WITH HAEMATOLOGICAL MALIGNANCIES AND
SYMPTOMS OF LOWER RESPIRATORY TRACT INFECTION**

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

²Zakład Mikrobiologii SP CSK

³Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii, Warszawski Uniwersytet
Medyczny

⁴Klinika Hematologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

⁵Międzywydziałowe Studium Biotechnologii, SGGW

STRESZCZENIE

Adenowirusy ludzkie (HAdV) są istotnym czynnikiem wywołującym zakażenia u chorych z zaburzeniami odporności, w tym zwłaszcza z chorobami nowotworowymi układu krwiotwórczego. Z powodu dużej liczby serotypów HAdV oraz istniejących pomiędzy nimi różnic genomowych diagnostyka zakażeń adenowirusowych nie jest łatwa. Ostatnio z powodzeniem zastosowano technikę real-time PCR, pozwalającą na szybkie oraz wysoce swoiste wykrywanie adenowirusów.

Celem pracy było zbadanie częstości występowania zakażeń adenowirusowych w grupie 60 pacjentów z chorobami nowotworowymi układu krwiotwórczego wykazujących objawy zakażenia dolnych dróg oddechowych. Materiał do badań wirusologicznych stanowił płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF) i surowica krwi. DNA HAdV wykrywano przy użyciu metody real-time PCR, w której wykorzystano sekwencję DNA kodującą białko heksonowe.

Częstość izolacji materiału genetycznego HAdV w badanej grupie była wysoka i wynosiła 21,7% dla próbek DNA izolowanych z BALF i 15,0% dla próbek surowicy. Uzyskane wyniki wskazują, iż uzasadnione jest stosowanie techniki qPCR w diagnostyce zakażeń HAdV, gdyż metoda ta zapewnia szybkie wykrycie oraz oznaczenie ilościowe DNA HAdV. Jej czułość i swoistość może znacząco ułatwić wykrywanie tych patogenów nawet w przypadkach zakażeń przebiegających z niewielkim nasileniem replikacji wirusa.

ABSTRACT

Human adenoviruses (HAdV) are one of the important infectious etiological factors that affect immunocompromised patients. Because of the large number of HAdV serotypes and their genomic variations, they present a lot of difficulty in laboratory diagnostics. The recent introduction of real-time PCR (qPCR)-based assays has opened new ways to rapid, specific, and highly sensitive HAdV detection.

For detection and quantification of HAdV DNA we retrospectively tested serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples obtained from a cohort of 60 adult patients with haematological malignancies presenting clinical and radiological symptoms of lower respiratory tract infections. Human adenoviruses DNA was detected by qPCR method, using primers targeting a conserved region of the adenoviral hexon gene and a specific TaqMan[®] probe.

Adenovirus infection occurred with a high incidence in our study group patients. Using qPCR we found that a 21,7% and 15,0% of patients had adenoviral DNA in BALF and serum samples, respectively. The high level of sensitivity, specificity and accuracy provided by real-time PCR assay are favorable for the use in the detection of adenoviral DNA in clinical specimens, especially in immunocompromised patients.

Słowa kluczowe: adenowirusy, zaburzenia odporności, choroby nowotworowe układu krwiotwórczego, zakażenia układu oddechowego, real-time PCR

Key words: adenoviruses, immunosuppression, hematological malignancies, respiratory tract infections, real-time PCR

WSTĘP

W ostatnich latach zauważono wzrost częstości zakażeń adenowirusowych (HAdV; *human adenoviruses*) u osób leczonych z powodu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego (1,2). Transmisja wirusów odbywa się drogą kropelkową, fekalno-oralną, poprzez kontakt z zakażonymi tkankami lub krwią, a także poprzez bezpośredni kontakt wirusa ze spojówką oka. Zakażenia HAdV mogą być powodowane zarówno przez kontakt *de novo* z wirusem, jak i poprzez jego reaktywację z zakażenia przewlekłego (persystentnego) (3). Zapalenia płuc wywołują najczęściej serotypy 3, 4, 7 oraz 21 adenowirusów. Okres wylegania zależy od serotypu wirusa i wynosi od dwóch dni do dwóch tygodni (1). U chorych bez zaburzeń odporności HAdV wywołują zwykle łagodne i samoograniczające się zakażenia górnych dróg oddechowych. W grupie chorych z zaburzeniami odporności spektrum objawów klinicznych jest znacznie szersze i obejmuje także zapalenie płuc o ciężkim przebiegu (1). W obrazie radiologicznym zapalenie płuc wywołane przez adenowirusy nie wykazuje cech swoistych i może przebiegać jako zapalenie odoskrzelowe lub płątowe, w tym także wielopłątowe. Objawia się naciekami o dystrybucji odoskrzelowej. W postaciach o łagodniejszym przebiegu badanie mikroskopowe płuc ujawnia obecność nacieków komórkowych w śródmiąższu i pęcherzykach płucnych oraz jądrowe ciała wtrętowe (4). W cięższych postaciach bardzo często stwierdza się masywne nacieki komórkowe, zmiany krwotoczne i martwicze; może także pojawić się wysięk w opłucnej (5). W niektórych grupach chorych, w tym z zaburzeniami odporności po przeszczepieniu szpiku, śmiertelność w przebiegu zapalenia płuc wywołanych adenowirusami może sięgać 50-80% (1). U części pacjentów tej grupy dochodzi do zarostowego zapalenia oskrzelików, a w konsekwencji do nieodwracalnej obturacji z narastającymi zaburzeniami oddychania (6)

Ponieważ kliniczne i radiologiczne objawy zakażeń dolnych dróg oddechowych wywołanych adenowirusami nie różnią się od objawów występujących podczas innych zakażeń wirusowych a także bakteryjnych, rozpoznanie etiologii zakażenia jest możliwe tylko na podstawie badań mikrobiologicznych (7). „Złotym standardem” w diagnostyce zakażeń HAdV była dawniej izolacja wirusa w hodowlach komórkowych, jednak metoda ta nie była wystarczająco czuła, aby wykrywać małą liczbę cząsteczek wirusa krążących we krwi obwodowej. Technika ta była także zbyt

kosztowna oraz czasochłonna. Obecnie w diagnostyce zakażeń adenowirusami wykorzystuje się wykrywanie swoistych przeciwciał w klasach IgM oraz IgG lub też badanie obecności DNA HAdV w próbce metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) (8,9).

Choroby nowotworowe układu krwiotwórczego, a także stosowane w tych chorobach leczenie cytoredukcyjne i/lub przeszczepienie komórek krwiotwórczych szpiku kostnego, prowadzą do istotnych zaburzeń odporności. Skutkiem tych zaburzeń są częste zakażenia, w tym w obrębie dolnych dróg oddechowych. Ze względu na fakt, iż etiologia znacznej części tych zakażeń pozostaje nierozpoznana, postanowiono przeprowadzić badania częstości izolacji materiału genetycznego HAdV u chorych leczonych z powodu chorób nowotworowych układu krwiotwórczego, a u których wystąpiły objawy zakażenia dolnych dróg oddechowych. Celem pracy było także określenie przydatności ilościowego badania reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR, *quantitative PCR*), opracowanej przez *Rola i in.* (9), do wykrywania zakażeń HAdV u pacjentów, u których zakażenia dolnych dróg oddechowych rozwinęły się jako powikłanie leczenia chorób nowotworowych układu krwiotwórczego.

MATERIAŁ I METODY

Materiał diagnostyczny stanowiło 60 próbek płynu z płukania-oskrzelowo pęcherzykowego (BALF, *bronchoalveolar lavage fluid*) i 60 próbek surowicy krwi. Materiały uzyskano od 60 chorych z chorobami nowotworowymi układu krwiotwórczego leczonych w Klinice Hematologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie oraz w Katedrze i Klinice Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Badana grupa liczyła 44 mężczyzn oraz 16 kobiet, w wieku od 16 do 79 lat (średnia wieku 53 lata). W tabeli I przedstawiono charakterystykę badanej grupy podając liczbę chorych z poszczególnymi typami nowotworów. Dodatkowe dane dotyczące badanej grupy zamieszczono w tabeli II. U wszystkich chorych wskazaniem do wykonania bronchofiberoskopii i badań mikrobiologicznych było wystąpienie objawów zakażenia dolnych dróg oddechowych. U 16 osób (27%) pacjentów objawy zakażenia pojawiły się w okresie ostrej neutropenii. Ośmiu chorych z badanej grupy było wcześniej leczonych przeszczepieniem krwiotwór-

Tabela. I. Rodzaje schorzeń układu krwiotwórczego w badanej grupie pacjentów ($n=60$)Table. I. Underlying haematological disease in patients from the study group ($n=60$)

Choroba podstawowa	Liczba pacjentów
Ostra białaczka szpikowa	26
Chłoniak	13
Hodgkina	5
Nieziarnicy	8
Przewlekła białaczka limfocytowa	8
Szpiczak plazmocytowy	4
Aplazja/hipoplazja szpiku kostnego	3
Mielofibroza	2
Zespół mielodysplastyczny	1
Przewlekła białaczka szpikowa	1
Ostra białaczka limfoblastyczna	1
Makroglobulinemia Waldenstroema	1

Tabela II. Wybrane dane demograficzne i kliniczne charakteryzujące badaną grupę pacjentów ($n=60$)Table II. Demographic and clinical data of patients from the study group ($n=60$)

Średnia wieku	53,1 ± 15
Płeć (mężczyźni/kobiety)	44/16
Neutropenia ($<0,5 \times 10^9 \times L-1$) (n)	16
Przebyte przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych	13
Objawy zakażenia	60
gorączka	47
kaszel	28
duszność	12
Zmiany w obrazie radiologicznym (n)	52

czych komórek macierzystych (HSCT, *hematopoietic stem cell transplantation*). Wśród klinicznych objawów zakażeń dolnych dróg oddechowych stwierdzono: gorączkę u 47 chorych, kaszel u 28 chorych i duszność u 12 chorych. W badaniu rentgenowskim płuc u 87% chorych wykazano obecność nacieków w mięszu płuc. Bronchofiberoskopię i płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL, *bronchoalveolar lavage*) wykonano w obszarze płuc, w którym stwierdzono zmiany radiologiczne. Stosowano jałowy roztwór 0,9% NaCl ogrzany do temperatury 37 °C. Krew do badań pobrano bezpośrednio przed bronchofiberoskopią i BAL.

W celu uzyskania dodatkowych danych pozwalających na ocenę klinicznego znaczenia wyników dodatkich badania rozszerzono o grupę kontrolną. Stanowiło ją 20 chorych (11 mężczyzn i 9 kobiet w wieku od 16 do 86 lat; średnia wieku 56 lat) bez zaburzeń odporności i bez klinicznych i radiologicznych objawów zakażenia dolnych dróg oddechowych. Podobnie jak w grupie badanej, tak i w grupie kontrolnej, materiałem do badań mikrobiologicznych były surowica krwi i BALF. Płyn z BAL uzyskano podczas diagnostycznej bronchoskopii, do której wskazanie stanowiły nieinfekcyjne choroby

płuc lub śródpiersia (tab. III). Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe wykonano u tych chorych w obszarach płuc, w których nie stwierdzano istotnych nieprawidłowości w obrazie radiologicznym.

Tabela III. Wskazanie do diagnostyki bronchoskopowej u pacjentów z grupy kontrolnej ($n=20$)Table III. Underlying diseases/indications for bronchoscopy in the control group ($n=20$)

Choroba podstawowa	Liczba pacjentów
Złośliwy nowotwór płuc	10
Sarkoidoza	2
Aspiracja ciała obcego	2
Powiększenie węzłów chłonnych śródpiersia	2
Astma/Przewlekła obturacyjna choroba płuc	2
Nowotwór przełyku	1
Nienowotworowe zwężenie tchawicy	1

Izolacja DNA z BALF oraz z surowicy przeprowadzona została metodą lizy alkalicznej przy użyciu zastawu QIAmp® DNA Mini Kit (QIAGEN) zgodnie z zaleceniami producenta. W prowadzonych doświadczeniach real-time PCR do wykrywania adenowirusów prowadzono wg *Rola i in.* (9), uwzględniając modyfikację do wariantu ilościowego poprzez zastosowanie specyficznych kalibratorów w zakresie $6,07 \cdot 10^6 - 6,02 \cdot 10$ kopii/ml. Badania zostały wykonane na aparacie LightCycler 2.0 przy użyciu zestawu amplifikacyjnego LightCycler TaqMan® Master (Roche Diagnostic).

Analizę statystyczną, której celem było porównanie ilości DNA HAdV w BALF u dwóch grup pacjentów: osób, u których wykryto DNA adenowirusów zarówno w BALF, jak i w surowicy oraz osób u których DNA HAdV wykryto tylko w BALF, przeprowadzono stosując test Manna-Whitney'a.

WYNIKI

Wykorzystując metodę ilościową PCR z detekcją w czasie rzeczywistym (9) nie wykryto swoistych dla ludzkich adenowirusów sekwencji DNA w żadnej próbce pochodzącej od pacjentów z grupy kontrolnej, co potwierdziło brak zakażeń o etiologii HAdV wśród osób tej grupy.

Spółród 60 badanych próbek BALF, swoiste dla adenowirusów sekwencje DNA wykryto w 13 (21,7%), natomiast w 47 próbkach odnotowano wyniki ujemne (78,3%). Uzyskane w identyczny sposób wyniki dla 60 próbek surowicy były dodatnie dla 9 pacjentów (15,0%), a ujemne dla 51 pacjentów (85,0%) – tab. IV. Obecność DNA HAdV w surowicy zaobserwowano jedynie u pacjentów, u których liczba kopii DNA w BALF była bardzo wysoka. Wyjątkiem była jedna badana próbka, w której adenowirusy zostały wykryte tylko w surowicy. Może to świadczyć o prawdopodobnym wystąpieniu

Tabela IV. Porównanie wyników badań w kierunku wykrywania HAdV otrzymanych za pomocą ilościowego badania real-time PCR w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF) i w surowicy – grupa badana

Table IV. Comparison of HAdV qPCR results obtained in BALF and serum samples in the study group

Liczba badanych materiałów klinicznych	Wyniki real-time PCR			
	BALF		Surowica	
	+	-	+	-
n=60	13	47	9	51
%	21,67	78,33	15,00	85,00

u tego pacjenta innego zakażenia adenowirusowego niż zakażenie układu oddechowego. Średnia liczba kopii DNA adenowirusa stwierdzona w BALF wynosiła $1,72 \cdot 10^5$ kopii/ml i była wyższa niż w surowicy, gdzie wynosiła $3,8 \cdot 10^4$ kopii/ml.

Przeprowadzona analiza statystyczna z użyciem testu Manna-Whitney'a porównująca ilość DNA adenowirusów w BALF wykazała statystycznie znaczące różnice ($P \leq 0,001$) pomiędzy pacjentami, u których wykryto obecność DNA adenowirusów w obu rodzajach materiału klinicznego, a pacjentami u których DNA HAdV znajdowało się tylko w BALF. Mediana liczby kopii DNA adenowirusów w popłuczynach oskrzelowych u pacjentów wykazujących obecność DNA wirusa w surowicy oraz w BALF wynosiła 97400 kopii/ml (w zakresie od $2,5 \cdot 10^2$ do $1,5 \cdot 10^7$), natomiast u pacjentów nie wykazujących obecności DNA adenowirusa w surowicy była znacznie niższa i wynosiła zaledwie 3700 kopii/ml (od $2,14 \cdot 10^2$ do $1,1 \cdot 10^4$).

DYSKUSJA

W ostatnich latach notuje się znaczny wzrost liczby chorych z zaburzeniami odporności. Ponieważ liczba chorych z pierwotnymi zaburzeniami odporności utrzymuje się na stosunkowo stałym poziomie, za zjawisko to odpowiedzialne są przede wszystkim nabyte (wtórne) postaci zaburzeń odporności. Za najważniejsze przyczyny zwiększającego się rozpowszechnienia zaburzeń odporności uważa się wzrost liczby chorych zakażonych HIV, wzrost częstości występowania chorób nowotworowych oraz coraz szersze stosowanie metod leczenia, których konsekwencją są zaburzenia odporności (chemioterapia, radioterapia, leczenie immunosupresyjne po przeszczepieniu narządów). Wszystkie te stany obniżają zdolność układu immunologicznego do obrony przed zakażeniami wirusowymi, bakteryjnymi czy grzybiczymi (6). Jedną z głównych przyczyn zgonów w tej grupie chorych są zapalenia płuc, często o etiologii wirusowej. Ze względu na swe rozpowszechnienie w populacji znaczny odsetek tych zakażeń powodowany

jest przez adenowirusy. Zakażenia te, nieszkodliwe dla osób z prawidłową odpornością, mogą być bardzo niebezpieczne dla pacjentów z upośledzeniem mechanizmów odpornościowych. Szczególnie ważne znaczenie ma wczesne rozpoznanie tych zakażeń w grupie osób z chorobami nowotworowymi układu krwiotwórczego poddawanych intensywnej chemio- i radioterapii i/lub przeszczepieniu komórek krwiotwórczych (1,2,3).

Wykorzystując technikę real-time PCR do badania zakażeń HAdV u osób z chorobami nowotworowymi układu krwiotwórczego, wirusowy DNA wykryto w 21,7% próbek DNA izolowanych z BALF oraz 15,0% próbek surowicy. Wartości te są nieco niższe niż podawane przez innych autorów, bowiem *Lion i in.* stwierdzili obecność materiału genetycznego HAdV u 27% (8), zaś *Bil-Lula i in.* wykryli DNA adenowirusów u 50% pacjentów (10). Należy jednak nadmienić, że badania te prowadzone były we krwi pełnej (8) oraz w krwi pełnej, moczu i próbkach kału (10).

Stosując tradycyjne techniki badawcze *Rocholl i in.* za pomocą testu immunofluorescencji bezpośredniej zastosowanej do badania popłuczyn nosowych (11), wykryli zakażenia adenowirusami u 143 (7,5%) spośród 1901 dzieci zakażonych wirusami powodującymi typowe zakażenia dróg oddechowych. Mimo niskich kosztów wykonania pojedynczego oznaczenia oraz szybkiego czasu wykonania badania (wyniki otrzymywano już po 4 godzinach) ograniczenie metody stanowi jej niska czułość, która wynosiła jedynie 63%. Wobec tego faktu autorzy badań rekomendują stosowanie bardziej czułych metod diagnostycznych, w tym wykorzystanie reakcji real-time PCR (11). Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez *Gonzales i in.* (12) częstość występowania zakażeń wirusowych u pacjentów z chorobami nowotworowymi układu krwiotwórczego, wykazujących objawy zakażenia dolnych dróg oddechowych, badano przy użyciu hodowli komórkowych, gdzie obecność wirusów potwierdzano przy użyciu przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluoresceiną. Wirusy powodujące zakażenia układu oddechowego wykryto w BALF u 21 (9%) pacjentów, z czego adenowirusy były przyczyną zakażeń dolnych dróg oddechowych jedynie u 3 z 21 pacjentów (12). Technika ta okazuje się jednak mało przydatna w chwili, gdy należy szybko ustalić etiologię zakażenia i zastosować odpowiednie leczenie. W tej sytuacji real-time PCR jest jedną z najskuteczniejszych metod wykrywania zakażeń wirusowych.

Pomimo wysokiej czułości i swoistości real-time PCR należy wziąć pod uwagę fakt, że wykrycie adenowirusów w surowicy możliwe jest tylko w przypadku zakażeń przebiegających z nasiloną replikacją DNA. Do wykrywania zakażeń adenowirusowych dolnych dróg oddechowych lepszym materiałem wydaje się być BALF, choć niezbędne są dalsze prace w grupie

osób poddanych immunosupresji, które pomogłyby w ustaleniu poziomu HAdV spotykanego u pacjentów bez żadnych zauważalnych objawów klinicznych, a wynikającego z zakażenia przewlekłego tymi patogenami. Stanowi to pewne ograniczenie przeprowadzonych badań. Monitorowanie obecności wirusa, poprzez częste oznaczanie liczby jego kopii w materiale klinicznym przy użyciu technik ilościowych, pozwala jednak na badanie skuteczności terapii przeciwwirusowej (2,13). Jej efektywnym rezultatem powinno być zmniejszenie poziomu replikacji wirusa, a co za tym idzie zmniejszenie liczby kopii wirusa. Jest to niezmiernie ważne, gdyż stosowane obecnie cidofovir oraz rybawiryna nie mają formalnego potwierdzenia jako leki skuteczne przeciwko HAdV i stosowane są jedynie w próbach klinicznych (2). W badaniach przeprowadzonych przez *Lankester i in.* (14), podczas badania skuteczności terapii rybawiryną, nie odnotowano zmniejszenia liczby kopii DNA HAdV u pacjentów. U niektórych chorych poziom DNA adenowirusów wzrastał, co świadczyło o dalszym rozwoju zakażenia. Po stwierdzeniu nieskuteczności rybawiryny, u dwóch pacjentów rozpoczęto terapię z użyciem cidofoviru. Zaobserwowano wówczas stabilizację poziomu DNA HAdV w surowicy pacjentów, nie udało się jednak przeprowadzić dalszych badań z powodu zgonu chorych. Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez *Neofytos i in.* (15), u 5 spośród 6 pacjentów po HSCT, u których stwierdzono zakażenie HAdV, odnotowano spadek wirēmii podczas leczenia cidofovirem. W 4 przypadkach obniżenie poziomu DNA HAdV w surowicy zauważono już po kilku dniach od rozpoczęcia terapii, co świadczyło o potencjalnej skuteczności leku.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Zastosowanie w rutynowej diagnostyce i monitorowaniu zakażeń HAdV metod wykrywania kwasów nukleinowych, w tym real-time PCR, zyskuje w chwili obecnej o wiele większe znaczenie niż tradycyjne badania wirusologiczne. Znając zmiany liczby kopii wirusa w czasie trwania leczenia można wnioskować o skuteczności zastosowanej terapii (2,10,13). Biorąc pod uwagę ilościowy wynik badania łatwiej jest podjąć decyzję o zmniejszeniu dawek leków przeciwwirusowych przy pojawieniu się skutków ubocznych lub o zmianie leczenia na skuteczniejsze. Podobnie, długotrwałe obserwacje prowadzone w wielu ośrodkach pozwalają także określić czy badanie krwi czy osocza mają większą wartość diagnostyczną.

Należy podkreślić, że:

1. Częstość wykrywania DNA adenowirusów jest znaczna w badanej grupie pacjentów z chorobami nowotworo-

wymi układu krwiotwórczego, choć nieznacznie niższa w porównaniu z analogicznymi danymi światowymi.

2. Technika real-time PCR jest niezwykle przydatna do szybkiego wykrywania i potencjalnego monitorowania zakażeń o etiologii HAdV.

PIŚMIENNICTWO

1. Ison M. Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2006;43:331-9.
2. Lindemans CA, Leen AM, Boelens JJ. How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood* 2010;116:5476-85.
3. Kojaoghlanian T, Flomenberg P, Horwitz MS. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol* 2003;13:155-71.
4. Chong S, Lee KS, Kim TS, i in. Adenovirus pneumonia in adults: radiographic and high-resolution CT findings in five patients. *Am J Roentgenol* 2006;186:1288-93.
5. Kim EA, Lee KS, Primack SL, i in. Viral pneumonias in adults: radiologic and pathologic findings. *Radiographics* 2002;22:S137-49.
6. Willak-Janc E, Wójcik I. Powikłania płucne po przeszczepieniu komórek hematopoetycznych. *Alergia Astma Immunologia* 2006;11:87-92.
7. Okada M, Ogawa T, Kubonoya H, i in. Detection and sequence-based typing of human adenoviruses using sensitive universal primer sets for the hexon gene. *Arch Virol* 2007;152:1-9.
8. Lion T, Baumgartinger R, Watzinger F, i in. Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood* 2003;102:1114-20.
9. Rola A, Przybylski M, Dzieciatkowski T, i in. Zastosowanie metody real-time PCR z zastosowaniem sond TaqMan do wykrywania zakażeń adenowirusami człowieka. *Med Dośw Mikrobiol* 2007;59:371-7.
10. Bil-Lula I, Ussowicz M, Rybka B, i in. PCR diagnostics and monitoring of adenoviral infections in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Arch Virol* 2010;155:2007-15.
11. Rocholl C, Gerber K, Daly J, i in. Adenoviral infections in children: the impact of rapid diagnosis. *Pediatrics* 2004;113:51-6.
12. Gonzalez Y, Martino R, Rabella N, i in. Community respiratory virus infections in patients with hematologic malignancies. *Haematologica* 1999;84:820-3.
13. Schilham MW, Claas EC, van Zaane W, i in. High levels of adenovirus DNA in serum correlate with fatal outcome of adenovirus infection in children after allogeneic stem-cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2002;35:526-32.
14. Lankester AC, Heemskerk B, Claas EC, i in. Effect of ribavirin on the plasma viral DNA load in patients with disseminating adenovirus infection. *Clin Infect Dis* 2004;38:1521-5.
15. Neofytos D, Ojha A, Mookerjee B, i in. Treatment of adenovirus disease in stem cell transplant recipients with cidofovir. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:74-81.

Otrzymano: 7.01.2011 r.

Zaakceptowane do druku: 28.02.2011 r.

Adres do korespondencji:

Dr n. wet Tomasz Dzieciatkowski
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
Tel/fax: 22 599 17 78
e-mail: dzieciatkowski@wp.pl