

К.В. Богданов<sup>1,2</sup>, С.М. Игнатъева<sup>2</sup>

## Диагностика аспергиллеза у больных гемобластозами с использованием количественной полимеразной цепной реакции и иммуноферментного анализа

<sup>1</sup>НИИ Гематологии, Федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова,  
<sup>2</sup>НИИ Медицинской микологии им. П. Н. Кашкина, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, С-Петербург

Одним из основных возбудителей аспергиллеза является *A. fumigatus*, вид плесневых микромицетов наиболее распространенный у больных гемобластозами. Инфицирование аспергиллезом онкогематологических больных приводит к развитию различных заболеваний, среди которых чрезвычайно высокой летальностью характеризуется инвазивный аспергиллез (ИА). Диагностика аспергиллеза, как правило, включает применение традиционных культуральных методов исследования и иммуноферментного анализа (ИФА). Последний тест используется для определения антигена галактоманнана *Aspergillus spp.* Оба метода обладают недостаточной чувствительностью и специфичностью. Более чувствительным методом для диагностики аспергиллеза является амплификация специфических участков ДНК. Недавно были предложены новые подходы к стандартизации количественной оценки ДНК-мишени *A. fumigatus*. Это позволило провести сравнительное определение маркеров аспергиллеза у больных гемобластозами с использованием двух тестов: ПЦР и ИФА. Исследование показало целесообразность проведения комбинированного анализа для обнаружения антигена и копий ДНК-мишени микромицета в биосубстрате больных гемобластозами. Кроме того, было отмечено, что использование количественной ПЦР повышает выявление аспергиллеза у онкогематологических больных, в том числе у пациентов с высоким риском развития ИА, получающих высокодозную химиотерапию и/или трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК).

**Ключевые слова:** гемобластоzy, инвазивный аспергиллез, *Aspergillus fumigatus*, полимеразная цепная реакция и иммуноферментный анализ

### Введение

Аспергиллез представляет собой инфекционное заболевание, причиной которого является

распространение в организме человека плесневых грибов рода *Aspergillus*. Наиболее распространенным возбудителем аспергиллеза является вид *A. fumigatus*, обнаруживаемый также наиболее часто у онкогематологических больных и реципиентов алло-ТГСК [1, 3-5]. Микромицеты этого рода могут вызывать различные заболевания, отличающиеся по патогенезу, клиническим проявлениям и прогнозу, включая тяжело поддающийся лечению и характеризующийся высокой летальностью, ИА. В настоящее время лабораторная диагностика аспергиллеза у больных гемобластозами проводится разными методами. Как правило, первоначально, возбудителя заболевания определяют путем микроскопирования образца больного и культивирования на среде. Также, с целью выявления антигена галактоманнана *Aspergillus spp.* выполняют ИФА. Следует отметить, что последний тест наиболее эффективен для ранней диагностики ИА [6]. Несмотря на широкое применение обоих методов в клинической диагностике, они характеризуются невысокой чувствительностью и специфичностью. В частности, известны данные о появлении ложноположительных результатов ИФА. Одной из причин такого явления могут быть перекрестные реакции с экзоантигенами других микромицетов и бактерий [7, 8]. Кроме того, неспецифичные взаимодействия типа антиген-антитело могут возникать из-за проведения больным ТГСК, курса цитостатической химиотерапии, назначения ряда антибактериальных препаратов, и наконец, присутствия галактоманнана в некоторых продуктах питания [9]. С другой стороны, благодаря развитию более чувствительных и специфичных молекулярно-биологических методов исследования, в том числе ПЦР, во многом улучшилась идентификация микромицетов, включая *A. fumigatus* [2, 10]. Кроме того, недавно было показано, что количественная ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР) может успешно применяться как для диагностики ИА у больных гемобластозами после аллогенной ТГСК, так и мониторинга больных, получающих терапию микотиками [10-12].

Несмотря на высокую эффективность ПЦР-тестов при определении количества ДНК-копий *A. fumigatus* у больных гемобластозами, появление ложно-положительных результатов амплификации не исключается. Однако, такие результаты встречаются редко и, как правило, могут быть вызваны случайной контаминацией ДНК или биосубстратов, увеличением исследуемых объемов сыворотки (>1мл) больных, а также использованием гнездовой ПЦР, которая значительно повышает чувствительность методики [13, 14]. В настоящее время продолжают исследования по оптимизации и стандартизации методов количественного анализа *A. fumigatus* с целью их широкого использования в клинике [15, 16]. Сложность выполнения этой работы объясняется несколькими причинами. Во-первых, многообразие биосубстратов больного (сыворотка, цельная периферическая кровь, бронхо-альвеолярный лаваж, мокрота), которые используются в лабораторной диагностике аспергиллеза, и методов, применяемых для экстракции ДНК (на основе мини-колонок или сорбента) и последующей постановки ПЦР. Во-вторых, широким выбором ДНК-мишеней *A. fumigatus*, используемых для амплификации. Среди них наибольшее распространение получили нуклеотидные последовательности, кодирующие большие 28S или малые 18S субъединицы рибосом, спейсерную область ITS рибосом, цитохром Б митохондрий и другие [12, 17-19]. И, наконец, в-третьих, разнообразие методов РТ-ПЦР (на основе технологии TaqMan, FRET), оборудования (термоциклеры Applied Biosystems, BioRad, RotorGene, LightCycler) и реактивов [2]. Следует отметить, что недавно работа по стандартизации методов пробоподготовки и ПЦР, предназначенных для количественной оценки ДНК-мишени *A. fumigatus*, была выполнена с привлечением нескольких исследовательских центров, причем полученные результаты оказались обнадеживающими [16]. И хотя подходы к стандартизации методов количественного определения ДНК-мишени *A. fumigatus* были основаны на использовании цельной крови больных аспергиллезом, вопрос о том какой тип биосубстрата (периферическая кровь или сыворотка) больше подходит для количественной оценки аспергиллеза, остается открытым. В настоящем исследовании был проведен анализ клинического материала больных гемобластозами с ИА с помощью двух методик: количественной ПЦР и ИФА. Следует отметить, что оптимизация методов пробоподготовки при использовании двух типов биосубстрата больных (цельная периферическая кровь, сыворотка) и ПЦР, была выполнена с учетом анализа данных научной литературы и собственных исследований.

## Материалы и методы

### Описание пациентов.

Обследовано 45 образцов цельной периферической крови и сыворотки от 35 больных гемобластозами в возрасте от 5 до 73 лет, из них 14 больных с вероятным ИА и 21 с возможным ИА. Распределение больных по группам ИА проводилось согласно классификации исследователей из Европейской организации по изучению и лечению рака/микозов (EORTC/MSG, 2008) [20]. В качестве контрольной группы были использованы образцы цельной крови и сыворотки онкогематологических больных (n=20) без ИА с основными диагнозами: ОМЛ — 30%, ОЛЛ — 15%, ХМЛ — 15%, ХЛЛ — 15%, ММ — 5%, МЛ — 5%, МДС — 5%. Следует также отметить, что больные данной группы не отличались от пациентов с ИА по демографическим признакам.

### Экстракция ДНК из биосубстратов больных и суспензии спор микромицета.

Выделение ДНК из биосубстратов больных проводили двумя способами с использованием мини-колонок и сорбента. В обоих случаях выделение ДНК из сыворотки крови ( $\geq 0.2$ мл) и цельной периферической крови ( $\geq 3$ мл) проводили в ламинарном шкафу с автоматической подачей стерильного воздуха, во избежание контаминации исследуемых образцов спорами *A. fumigatus* из окружающей воздушной среды. Первый способ включал экстракцию ДНК из сыворотки крови и/или цельной периферической крови с использованием лизирующего раствора на основе протеиназы К по протоколу QIAmp DNA minikit (Qiagen, Германия), согласно рекомендациям Löffler, с добавлением бусин Баллотини, с последующим встряхиванием, центрифугированием и процессированием на колонке [21]. Во втором случае выделение ДНК из сыворотки крови и/или цельной периферической крови выполняли с использованием отечественного набора реактивов «ДНК Сорб В» (ИнтерЛабСервис, Россия) с добавлением бусин Баллотини, с последующим встряхиванием, центрифугированием и процессированием на сорбенте. В обоих случаях образец ДНК элюировали в 70 мкл стерильной деионизированной воды. Полученный образец ДНК хранили в морозильной камере при  $-20^{\circ}\text{C}$  до постановки ПЦР. Следует отметить, что до начала экстракции ДНК из цельной периферической крови, проводили лизирование эритроцитов гипотоническим раствором (10mM Tris pH 7.6, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM NaCl).

Выделение ДНК из суспензии спор *A. fumigatus* (штамм РКПГФ-1076 Российской коллекции патогенных грибов НИИ медицинской микологии им. Н. Н. Кашкина), смешанной с образцами донорской цельной крови или сыворотки, было выполнено по аналогии с двумя вышеназванными способами экстракции ДНК в отдельном ламинарном шкафу, строго изолированном от помещений для работы с биосубстратом больных.

### Постановка количественной ПЦР и ИФА.

Для количественной оценки ДНК-мишени микромицета, выполняли амплификацию участка нуклеотидной последовательности рибосомального гена 28S *A. fumigatus* с использованием РТ-ПЦР. Ранее было показано, что амплификация выбранного участка ДНК позволяет избегать перекрестных реакций с *Penicillium spp.* [18]. С целью контроля качества выделенной ДНК амплифицировали участок нуклеотидной последовательности  $\beta$  глобинового гена человека. Для количественной РТ-ПЦР использовали набор реактивов TaqMan PCR core reagents (Applied Biosystems, США). Применение этого набора реактивов позволяет снизить риск возникновения контаминации благодаря действию фермента урацил-ДНК-гликозилазы, ингибирующему перенос ампликонов предыдущей ПЦР [22]. Смесь реактивов ПЦР в объеме 25 мкл содержала: 1xTaqMan буфер А, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM каждого из четырех дезоксирибонуклеотидтри-

фосфатов dNTP, 0.01ед./мкл урацил-ДНК-гликозилазы и 0.025 ед./мкл AmpliTaqGold ДНК полимеразы. Кроме того, смесь ПЦР включала 500mM каждого праймера и 100mM зонда для амплификации 28S rRNA гена *A. fumigatus*, а также 300mM каждого праймера и 150mM зонда для амплификации  $\beta$  глобинового гена человека. Программа ПЦР состояла из удержания при 95oC в течение 10 мин., за которым следовали 45 циклов: 95oC -15сек. и 60oC -1мин. Оценку количества копий ДНК-мишени микромицета в исследуемом клиническом образце проводили с помощью прилагаемого программного обеспечения к термоциклеру «Rotor-Gene 6000» (Corbett Research, Австралия) после построения калибровочных кривых стандартов, приготовленных на основе разведений спор *A. fumigatus* (от 101 до 105 клеток/мл) в донорской крови или сыворотке.

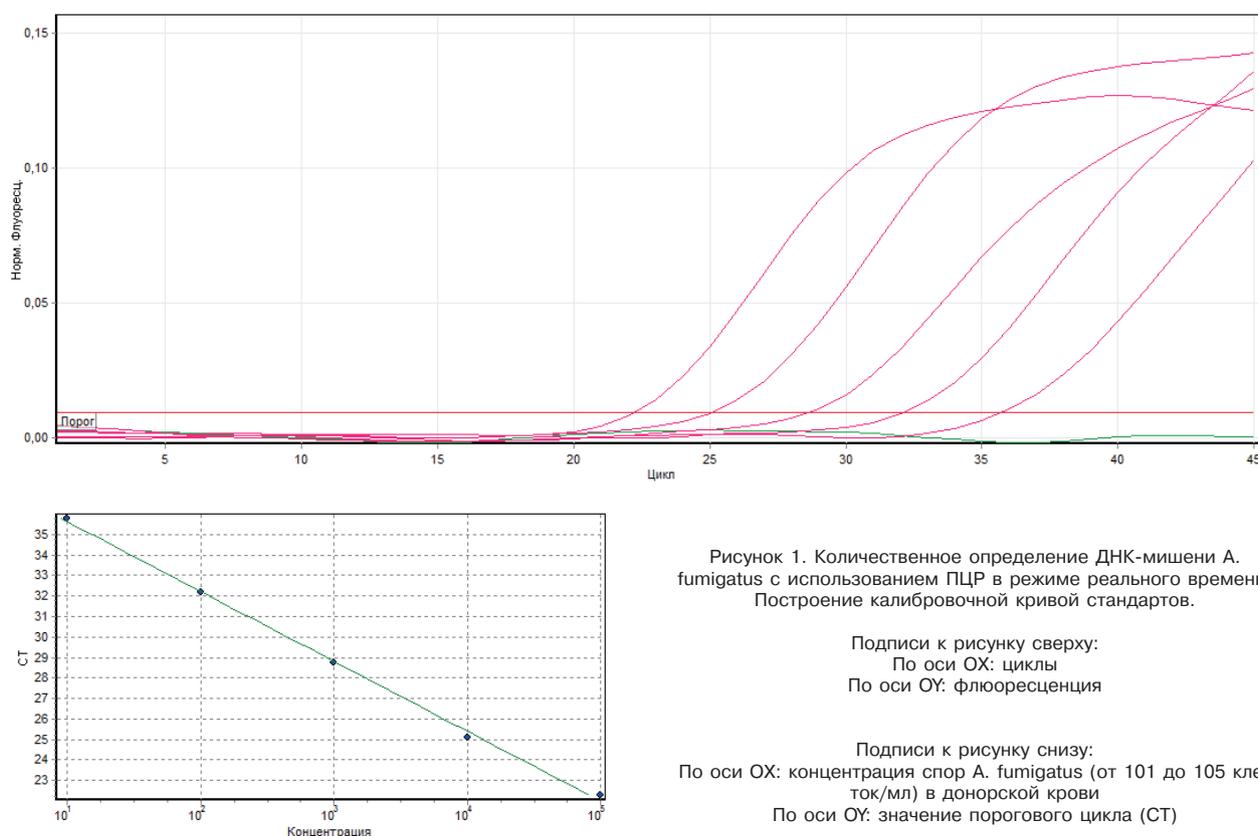
Для определения индекса антигена галактоманна в сыворотке крови больных выполняли ИФА с использованием набора реактивов ELISA Platelia Aspergillus EIA (Bio-Rad, США), как было описано ранее [23]. Следует отметить, что тестирование клинических образцов с использованием ИФА и РТ-ПЦР проводили повторно, при этом тесты считали действительными только после их подтверждения.

### Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании было проанализировано 45 образцов от 35 больных гемобластозами, характеристика которых представлена в таблице 1. При выделении ДНК из биосубстратов больных двумя методами с использованием колонок и сорбента было показано, что они оба подходят для выполнения количественной ПЦР. Построение кривой стандартов на основе разведения спор *A. fumigatus* позволило определить

аналитическую чувствительность РТ-ПЦР. Она составляла 10 копий ДНК-мишени *A. fumigatus*, обнаруженных на 35.7 цикла ПЦР (рис. 1). Также, анализ результатов амплификации специфического участка  $\beta$ -глобинового гена человека показал, что выход геномной ДНК, выделенной на сорбенте, был несколько выше выхода ДНК, выделенной на колонках. По-видимому, это объясняется способностью сорбента активно абсорбировать ДНК из лизируемых биосубстратов и удерживать ее во время отмывочной процедуры от изопропилового спирта. Таким образом, в дальнейшем, способу выделения ДНК из биосубстратов больных аспергиллезом с использованием сорбента, было отдано предпочтение.

Ранее уже предпринимались попытки сравнения результатов ИФА и ПЦР у больных аспергиллезом [18, 24]. Однако, одни группы исследователей сравнивали результаты ИФА и ПЦР, когда матрицей для амплификации была ДНК изолированная из сыворотки крови, а другие — когда матрицей для амплификации была ДНК, выделенная из цельной крови. Основной задачей настоящего исследования было сравнить результаты ИФА и количественной ПЦР как для образцов сыворотки, так и цельной крови с учетом оптимизации методики ПЦР. Следует отметить, что большинство биосубстратов больных было получено во время лечения основного онкогематологического заболевания. Анализ 4 образцов сыворотки крови (4 больных, из которых 1 с ве-



роятным ИА и 3 с возможным ИА) с использованием ИФА и ПЦР показал, что все они были антиген-позитивными, тогда как только 3 из них были ПЦР-позитивными (75% совпадений ПЦР-ИФА) (табл. 2). У одного больного с вероятным ИА, диагноз ИА был подтвержден обоими методами анализа. Следует отметить, что среднее количество обнаруженных копий ДНК-мишени микромицета в группе больных с возможным ИА составило 900/мл, а средний индекс антигена галактоманнана — 1.2. Для больного с вероятным ИА количество копий ДНК-мишени составило 3400, а индекс антигена был равен 1.0. Анализ 31 образца цельной периферической крови (31 больного, из которых 13 с вероятным ИА, 18 с возможным ИА) показал, что 21 из них были антиген-позитивными и 13 ПЦР-позитивными (45.4% совпадений ПЦР-ИФА). У 13 больных с вероятным ИА, диагноз ИА был подтвержден в 10 и 7 случаях с помощью ПЦР и ИФА, соответственно (46.1% совпадений ПЦР-ИФА). При этом количество позитивных ИФА-тестов составляло 53.8%, а позитивных ПЦР-тестов — 77%. В одном случае диагноз ИА не согласовался с негативными результатами обоих тестов, что, по-видимому, объясняется проведением больному длительной (около двух лет) высокодозной антифунгальной терапии вориконазолом (600мг). Следует также отметить, что среднее количество обнаруженных копий ДНК-мишени микромицета в группе больных с вероятным ИА оказалось выше в 5.1 раза в цельной крови, чем в сыворотке и составило 17538 и 3400, соответственно. У больных с возможным ИА этот же показатель оказался выше в 1.3 раза в цельной крови, чем в сыворотке (1200 и 900). Повышенное количество копий ДНК-мишени *A. fumigatus*, выявленное с помощью ПЦР в периферической крови, может быть связано с объемом исследуемых биосубстратов (3мл для цельной крови и 0.2мл для сыворотки), а также способностью некоторых клеток крови к фагоцитозу. Что касается контрольной группы больных гемобластозами (n=20) без ИА, то все образцы этих пациентов были ПЦР-негативными и только 3 из них оказались ИФА-позитивными (15% ИФА+). Следует также отметить, что для исследуемых больных гемобластозами, относящихся к двум разным группам ИА, был выполнен статистический анализ результатов ПЦР/ИФА. Среди всех изучаемых выборок статистически значимыми оказались только различия между группами больных, тестируемых с использованием ПЦР. Было показано, что в группе больных гемобластозами с вероятным ИА, выявление копий ДНК-мишени *A. fumigatus* в периферической крови с использованием количественной ПЦР происходит достоверно чаще, чем у больных с возможным ИА (p<0.05, табл. 2).

В настоящем исследовании также был выполнен мониторинг лечения больных гемобластозами с вероятным ИА (n=3) (табл. 3). Двоим из этих больных (ЛХ и В-ОЛЛ) после ТГСК была назначена эмпирическая терапия микотиками. Пациент с В-ОЛЛ получал терапию вориконазолом (600мг) и фунгинолом. Первоначально, у этого больного результаты ПЦР и ИФА тестов на наличие аспергиллеза были негативными. Однако, неделю спустя результаты ПЦР стали позитивными (11900 копий), тогда как результаты ИФА не изменились и остались негативными. В литературе известно о возникновении подобных ложноотрицательных результатов ИФА после высокодозной терапии микотиками. [25]. У другого больного с ЛХ через 1 месяц после ТГСК и терапии вориконазолом стандартными дозами, спустя 2 недели после первого позитивного теста ПЦР, наблюдалось увеличение копий ДНК *A. fumigatus* в 3.6 раза (от 1200 до 4400). При этом показатели антигена почти не изменились (от 0.78 до 0.80). В этом случае мы констатируем совпадение результатов обоих тестов, ПЦР и ИФА, и диагноза вероятного ИА. И, наконец, у третьего пациента с ОЛЛ на фоне устойчивости к полихимиотерапии, развившегося рецидива основного заболевания (45% бластных клеток) и эффективной ЦМВ-инфекционной терапии ганцикловиром, количественные показатели ДНК-мишени микромицета и антигена галактоманнана выросли через две недели после первых тестов ПЦР и ИФА в 3.5 раза. Одной из причин роста позитивных значений ИФА и ПЦР у больных гемобластозами может быть длительная антивирусная терапия ганцикловиром, повышающая риск развития ИА [26].

Таким образом, в исследовании показано, что количественная ПЦР повышает выявление ИА у больных гемобластозами, позволяет отслеживать ложноотрицательные результаты ИФА и эффективно проводить мониторинг лечения больных с ИА, в том числе пациентов после ТГСК. Следует отметить, что оценка только свободно циркулирующих ДНК-мишеней микромицета и антигена галактоманнана в сыворотке крови у больных аспергиллезом может приводить к снижению чувствительности обоих методов, ПЦР и ИФА, и появлению ложно-негативных результатов. В частности, после выделения ДНК, преимущественно из сыворотки крови, чувствительность ПЦР может быть снижена, так как гифы или фагоцитируемые внутриклеточные фрагменты микромицетов будут удалены из анализа из-за образования сгустка крови и последующего центрифугирования. С другой стороны, не исключаются ситуации, когда количество отдельных клеток периферической крови у пациентов может быть снижено из-за развития нейтропении. В этом слу-

чае, напротив, количество свободно циркулирующих ДНК-мишеней микромицета в сыворотке может достигать высоких значений. Поэтому, одновременное использование методик ИФА и ПЦР с выделением ДНК на сорбенте, как из сыворотки, так и цельной периферической крови, является необходимым условием для определения наличия аспергиллеза. Также, важно подчеркнуть, что для выполнения РТ-ПЦР большое значение имеет количество исследуемого биосубстрата больных. Оно не должно быть ниже 0.2 мл для сыворотки и 3 мл для цельной периферической крови. Кроме того, на завершающем этапе экстракции нуклеиновых кислот, во время элюции ДНК, следует использовать деионизированную воду в количестве не более 0.1 мл. В заключение необходимо отметить, что ДНК элюированная в количестве  $\leq 0.1$  мл деионизированной воды, подходит для оценки минимального количества копий *A. fumigatus* в клиническом материале больных, что было показано ранее двумя разными исследовательскими группами и подтверждено в настоящем исследовании [16, 18].

Таблица 1. Общая характеристика больных.

Характеристика больных	Количество	Процент
Все	35	-
Пол (муж/жен)	17/18	49%/51%
Возраст средний	37 (5-73)	-
Взрослые/Дети	31/4	89%/11%
Диагноз:	-	-
ОМЛ (острый миелоидный лейкоз)	13	36%
ОЛЛ (острый лимфобластный лейкоз)	4	11%
В-ОЛЛ (В-клеточный ОЛЛ)	3	9%
ХМЛ (хронический миелолейкоз)	4	11%
ХЛЛ (хронический лимфолейкоз)	2	6%
ЛХ (лимфома Ходжкина)	3	9%
МЛ (мелкоклеточная лимфома)	1	3%
ММ (множественная миелома)	3	9%
МДС (миелодиспластический синдром)	2	6%
Вариант ИА	-	-
вероятный	14	40%
возможный	21	60%
контрольная группа без ИА (негативный контроль)	20	-

Таблица 2. Определение ДНК-мишени *A. fumigatus* и индекса оптической плотности (ИОП) антигена *Aspergillus spp.* у больных гемобластомами в зависимости от варианта ИА

Вариант ИА	Количество									
	среднее				совпадений (позитивных тестов)					
	кровь		сыворотка		кровь, сыво-ротка		кровь		сыворотка	
копий ДНК	ИОП Анти-гена	копий ДНК	ИОП анти-гена	ПЦР ИФА	ПЦР	ИФА	ПЦР ИФА	ИФА	ПЦР	
Все	8051,6 (n=31)	0,71 (n=31)	1525 (n=4)	1,2 (n=4)	13/31 41,9%	13/31 41,9%	21/31 67,7%	3/4 75%	4/4 100%	3/4 75%
Вероятный	17538 (n=13)	0,6 (n=13)	3400 (n=1)	1,0 (n=1)	6/13 46,1%	10/13 77%	7/13 53,8%	1/1 100%	1/1 100%	1/1 100%
Возможный	1200 (n=18)	0,79 (n=18)	900 (n=3)	1,2 (n=3)	7/18 38,8%	3/18 16,6%	14/18 77,7%	2/3 66,6%	3/3 100%	2/3 66,6%
Уровень значимости, p					>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

Таблица 3. Мониторинг количественного определения ДНК-мишени *A. fumigatus* и антигена галактоманна *Aspergillus spp.* у больных гемобластомами с вероятным ИА

Пациент	Основной диагноз	Терапия		Мониторинг	Количество копий ДНК/ индекс антигена
		противоопухолевая	противомикробная		
1	В-ОЛЛ	полихимиотерапия, 1 мес. после нерод. алло-ТГСК	вориконазол 600, фунгизон	Д+1	0/0.35-
				Д+8	11900+/0.45-
2	ЛХ, прогрессирование	полихимиотерапия, 1.5 мес. после ауто-ТГСК	вориконазол 400	Д+1	7400+/0.80 +
				Д+29	13900+/0.78+
3	ОЛЛ, рецидив	полихимиотерапия	ЦМВ-терапия (ганцикловир)	Д+1	1200+/1.72+
				Д+15	4400+/6.1+

ЛИТЕРАТУРА

1. Аравийский Р.А., Климко Н.Н., Васильева Н.В. Диагностика микозов / СПб: Издательский дом СПбМАПО.-2004.-186с. Araviyskiy RA, Klimko NN, Vasilieva NV, Diagnostika Mikozov, Izdat. Dom SPbMAPO, St.Petersburg. — 2004. — P. 186.
2. Богданов К.В., Игнатъева С.М. К вопросу об основных методах экстракции и молекулярного анализа ДНК микромицетов // Клиническая лабораторная диагностика. — 2009. — № 10. — С. 42-44. Bogdanov KV, Ignat'eva SM. Basic methods for extraction and molecular analysis of micromycetic DNA // Klin Lab Diagn. — 2009. — Vol. 10. — P. 42-44.
3. Latge J.P. Aspergillus fumigatus and aspergillosis // Clin. Microbiol. Rev. — 1999. -Vol. 12. — P. 310-350.
4. Perfect J.R., Cox GM, Lee JY, et al. The impact of culture isolation of Aspergillus species: a hospital-based survey of aspergillosis // Clin. Infect. Dis. — 2001. -Vol. 33. — P. 1824-33.

5. Wald A., Leisenring W., van Burik J.A., et al. Epidemiology of Aspergillus infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation // *J. Infect. Dis.* — 1997. — Vol. 175. — P. 1459–66.
6. Becker M.J. de Marie S., Willemse D., et al. Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model // *J. Clin. Microbiol.* — 2000. — Vol. 38. — P. 1434–438.
7. Sanford J.P. The enigma of candiduria: evolution of bladder irrigation with amphotericin B for management—from Anecdote to Dogma and a lesson from Machiavelli // *Clin. Infect. Dis.* — 1993. — Vol. 16. — P. 145–147.
8. Giacchino M., Chiapello N., Bezzio S., et al. Aspergillus galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay cross-reactivity caused by invasive *Geotrichum capitatum* // *J. Clin. Microbiol.* — 2006. — Vol. 44. — P. 3432–3434.
9. Kirkpatrick CH, Windhorst DB. Mucocutaneous candidiasis and thymoma // *Am. J. Med.* — 1979. — Vol. 66. — P. 939–945.
10. 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. — Vol. 33. — P. 1504–1512.
11. Hummel M, Spiess B, Cornely OA, et al. Aspergillus PCR testing: results from a prospective PCR study within the AmBiLoad trial // *Eur. J. Haematol.* — 2010. — Vol. 85. — P. 164–169.
12. Hebart H, Lffler J, Meisner C, Serey F, et al. Early detection of aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening // *J. Infect. Dis.* — 2000. — Vol. 181. — P. 1713–1719.
13. Harrison E., Stalherberger T., Whelan R., et al. Aspergillus DNA contamination in blood collection tubes // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* — 2010. — Vol. 67. — P. 392–394.
14. Suarez F., Lortholary O., Buland S., et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance // *J. Clin. Microbiol.* — 2008. — Vol. 46. — P. 3772–3777.
15. Khot P.D., Ko D.L., Hackman R.C., et al. Development and optimization of quantitative PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid // *BMC Infect. Dis.* — 2008. — Vol. 8. — doi: 10.1186/1471-2334-8-73.
16. White P.L., Bretagne S., Klingspor L., et al. Aspergillus PCR: one step closer to standardization // *J. Clin. Microbiol.* — 2010. — Vol. 48. — P. 1231–1240.
17. Iwen P.C., Hinrichs S.H., Rupp M.E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. // *Med. Mycol.*—2002. — Vol. 40. — P. 87–109.
18. 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. — Vol. 42. — P. 844–846.
19. Buchheidt D, Hummel M, Schleiermacher D, et al. Prospective clinical evaluation of a Light-Cycler-mediated polymerase chain reaction assay, a nested-PCR assay and a galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay for detection of invasive aspergillosis in neutropenic cancer patients and hematological stem cell transplant recipients // *Br. J. Haematol.* — 2004. — Vol. 125. — P. 196–202.
20. De Pauw B., Walsh T. J., Donnelly J. P., et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Groups and the National Institute of Allergy and Infection Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group // *Clin. Infect. Dis.* — 2008. — Vol. 46. — P. 813–821.
21. Lffler J, Hebart H, Schumacher U, et al. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood // *J. Clin. Microbiol.* — 1997. — Vol. 35. — P. 3311–3312.
22. Gobert P., Buisson J.C., Vagner O., et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in formed human feces by a sensitive PCR-based assay including uracil-N-glycosylase inactivation // *J. Clin. Microbiol.* — 1997. — Vol. 35. — P. 254–256.
23. Maertens J.A., Klont R., Masson C., et al. Optimization of the cutoff value for the Aspergillus double-sandwich enzyme immunoassay // *Clin. Infect. Dis.* — 2007. — Vol. 44. — P. 1329–1336.
24. White PL, Linton CJ, Perry MD, et al. 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. — Vol. 42. — P. 479–486.
25. Singh N., Paterson D.L. Aspergillus infections in transplant recipients // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2005. — Vol. 18. — P. 44–69.
26. Einsele H., Hebart H., Kauffmann-Schneider C., et al. Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection // *BMT.* — 2000. — Vol. 25. — P. 757–763.

Поступила в редакцию 15.04. 2014 г.

*K.V.Bogdanov<sup>1,2</sup>, S.M.Ignatieva<sup>2</sup>*

### **Diagnosis of aspergillosis in hematological malignancy patients by using Q-PCR and ELISA**

<sup>1</sup>Research Institute of Hematology, V.A. Almazov Federal Medical Research Center

<sup>2</sup>P.N.Kashkin Research Institute of Medical Mycology, I.I.Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg

*Aspergillus fumigatus* is one of the most prevalent fungal pathogens has a worldwide distribution in patients with hematological malignancy. The patients infected with *A. fumigatus* have a high risk of the development of various diseases including often fatal invasive aspergillosis (IA). The insufficiency of traditional cultural and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods in diagnostics of IA makes some investigators to apply more sensitive technologies, such as PCR. Recently new approaches to standardization of quantitative aspergillosis evaluation by using PCR were elucidated. It is allowed to carry out comparative definition of aspergillosis in hematological patients by using the both tests, PCR and ELISA Platelia *Aspergillus*. Analysis showed expediency of the combined test for detection of galactomannan antigen and DNA target copies of *A. fumigatus*. Moreover, Q-PCR assay is able to improve the diagnosis of IA in hematological malignancy patients including those who underwent high-dose chemotherapy and/or hematopoietic stem cell transplant (HSCT).

Key words: hematological malignancies, invasive aspergillosis, *Aspergillus fumigatus*, Q-PCR, ELISA