

Διαλεύκανση λοίμωξης από κυτταρομεγαλοϊό και υποτροπής της σε HIV-1(+) ασθενή

Χ. Κοτταρίδη,¹ Γ. Πλουμίδης,² Ε. Γράψας,²
Χ. Φερέτης,³ Π. Μπενάκης,³ Π. Φιλαλήθης,²
Δ. Μπουζαρέθου,¹ Γ. Νασιούθας¹

.....
¹Τμήμα Μοριακής Βιολογίας, Ερευνητικό Κέντρο «Υγεία»
«Αντώνης Παπαγιάννης», ²Α' Παθολογική Κλινική, ΔΘΚΑ
«Υγεία», ³ Γαστρεντερολογικό Τμήμα, ΔΘΚΑ «Υγεία»

Elucidation of cytomegalovirus infection and
recurrence in a HIV-1(+) patient

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου:

Ανθεκτικότητα
Ganciclovir
HIV-1
Κυτταρομεγαλοϊός

Η ευκαιριακή λοίμωξη από κυτταρομεγαλοϊό (CMV) αποτελεί σοβαρή αιτία θνησιμότητας σε ασθενείς με σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS).^{1,2} Σε σημαντικό ποσοστό ανοσοκατασταλμένων ο ιός αναζωπυρώνεται από τη λανθάνουσα κατάσταση, με αποτέλεσμα ενεργό λοίμωξη.³ Ο πεπτικός σωλήνας, και ιδιαίτερα το κόλον, αναφέρεται πολύ συχνά ως ο κύριος στόχος οξείας CMV-λοίμωξης στους HIV-1(+) ασθενείς. Η κολονοσκόπηση εφαρμόζεται ευρέως για τη διάγνωση CMV-κολίτιδας, σε συνδυασμό με τα ιστολογικά ευρήματα και την καλλιέργεια του CMV.^{2,4-6} Η ακριβής όμως συσχέτιση ανάμεσα στο CMV και στο βλεννογόνο του κόλου παραμένει ασαφής.⁵ Τελευταία, η CMV-λοίμωξη στο κόλον διερευνήθηκε διεξοδικότερα με την εφαρμογή μεθόδων μοριακής βιολογίας, βασισμένων κυρίως στην PCR.^{6,8,9}

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιώντας μεθόδους μοριακής βιολογίας, απεικονίζεται η παρουσία CMV στα ιστολογικά παρασκευάσματα από τις χαρακτηριστικές βλάβες του κόλου. Επιπλέον, η ανάλυση αλληλουχίας DNA συσχετίζει την υποτροπή της νόσου με την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών CMV στην αντιρετροϊκή θεραπεία.

Υποβλήθηκε 25.2.2002

Εγκρίθηκε 22.5.2003

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΣ

Άνδρας ηλικίας 54 ετών, ομοφυλόφιλος, γνωστός από τετραμήνου ως HIV-1 οροθετικός, διακομίστηκε στο νοσοκομείο στις 29/9/2000. Από κρατικό νοσοκομείο αναφέρονταν τα εξής: από διμήνου απογευματινή δεκαπική πυρετική κίνηση και το τελευταίο δεκαήμερο εμπύρετο έως 39–40 °C με ρίγη. Επίσης, από εξαήμερου ελάττωση του επιπέδου συνείδησης. Κατά το πρώτο διήμερο της εισαγωγής του αναφέρονταν τρία ή τέσσερα επεισόδια τοξικο-κλονικών σπασμών. Ο ασθενής ελάμβανε αντιρετροϊκή θεραπεία με zidovudin 250 mg 1 × 2 και lamivudin 150 mg 1 × 2.

Την ημέρα της εισαγωγής του ο ασθενής ήταν συγχυτικός, με όψη βαρέως πάσχοντος και θερμοκρασία 39,5 °C. Δεν υπήρχαν στοιχεία μηνιγγισμού ή εστιακά νευρολογικά σημεία κατά τη νευρολογική εξέταση. Η λοιπή αντικειμενική εξέταση ήταν χωρίς ουσιώδη παθολογικά ευρήματα. Η βυθοσκόπηση ήταν αρνητική. Έγινε οσφουνοωτιαία παρακέντηση, όπου διαπιστώθηκε αύξηση λευκώματος του εγκεφαλονωπιαίου υγρού (90 mg/dL), 7 κύτταρα/mm³, σάκχαρο 54 mg/dL, χλωριούχα 124 mEq/L, η δε δοκιμασία INDIA INK και ο έλεγχος IgM/IgG αντισωμάτων για CMV στο εγκεφαλονωπιαίο υγρό απέβησαν αρνητικά. Παρόλα αυτά, ο ασθενής τέθηκε αρχικά σε ενδοφλέβια αγωγή με φλουκοναζόλη (400 mg × 3) παράλληλα με κεφτριαξόνη και μετά από διήμερο σε abelcet (λιπιδικό σύμπλεγμα αμφοτερικίνης) 200 mg ανά ημέρα, ενώ διακόπηκε η φλουκοναζόλη. Παρά τη θεραπεία με abelcet, ο ασθενής δεν παρέμεινε ποτέ απύρετος. Αντιθέτως, στις 10/10/2000 εμφάνισε πυρετό 40 °C και 5–6 διαρροϊκές κενώσεις.

Έγινε προγραμματισμός για γαστροσκοπικό/κολοσκόπικό έλεγχο. Στις 12/10/2000 έγινε η κολοσκόπηση, κατά την οποία διαπιστώθηκαν στο τυφλό-ανιόν-εγκάρσιο-κατιόν κόλον κατά τόπους μονήρεις βλάβες και, συγκεκριμένα, πετέχειες με υπέγερση και κεντρική εξέλιξη, απ' όπου ελήφθησαν βιοψίες και τεμάχιο βλεννογόνου προς εξέταση για CMV με PCR. Το αποτέλεσμα της PCR ήταν θετικό για CMV και ο ασθενής τέθηκε σε αγωγή με ganciclovir (Cytovene) 500 mg 1 × 2. Μετά από διήμερο παρέμεινε απύρετος και ανέφερε υποκειμενική βελτίωση και υποχώρηση του διαρροϊκού συνδρόμου. Στις 26/10/2000 επαναλήφθηκε η κολοσκόπηση,

στην οποία διαπιστώθηκε ότι ο βλεννογόνος του παχέος εντέρου ήταν φυσιολογικός σε όλο το μήκος του. Ο ασθενής συνέχισε per os αγωγή με ganciclovir, με βελτίωση της κατάστασής του.

Σημειώνεται ότι ο ασθενής στις 29/11/2000 παρουσίασε επίπεδα CD4 λεμφοκυττάρων 122 κ/μL και αρνητική ποσοτική μέτρηση για HIV-1-RNA στο πλάσμα, ενώ στις 19/3/2001 τα CD4 ήταν 19 κ/μL και το HIV-1-RNA αρνητικό. Όσον αφορά στον έλεγχο του ανώτερου πεπτικού, στις 29/3/2001 βρέθηκε γαστρίτιδα και 2–3 λευκωπά οζίδια βολβού δωδεκαδακτύλου. Ο ασθενής μετά από 8 μήνες εμφάνισε λέμφωμα μαλακών μορίων αριστερής κάτω γνάθου και στη συνέχεια απεβίωσε.

Κατά τη διάρκεια της νοσηλείας του ασθενούς εξετάστηκαν τα εξής δείγματα: αίμα, πτύελα, μυελός των οστών, υλικό γαστροσκόπησης, ιστός από έντερο και στόμαχο, προκειμένου να ελεγχθούν για CMV, *Mycobacterium tuberculosis* (TB), *Legionella*, *Chlamydia pneumoniae*, *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus* spp και HSV (πίν. 2).

Συνοπτικά, η επεξεργασία των δειγμάτων που περιείχαν βλέννα (πτύελα και υλικό γαστροσκόπησης) έγινε με τη χρήση NALC (N-acetyl-L-cysteine), σύμφωνα με τους Nolte και Metchock (1993).⁷ Τα μονοκύτταρα από το αίμα και το μυελό των οστών απομονώθηκαν με τη χρήση Biocoll Separating Solution (Biochrom AG). Το DNA από τα πτύελα, το υλικό γαστροσκόπησης, το αίμα και το μυελό των οστών απομονώθηκε, στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το Talent seek viral DNA extraction kit, ενώ το DNA από τα δείγματα ιστών απομονώθηκε με τη μέθοδο πρωτεϊνάσης K/SDS φαινόλης/χλωροφόρμιου.¹⁶

Η «φωλιασμένη» PCR, που ακολούθησε, έγινε σε τελικό όγκο 50 μL και περιείχε 20 mM Tris HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM από κάθε dNTP, 1,5 U Taq πολυμεράση (Invitrogen, The Netherlands), 200 pM εκκινητές (MWG). Οι αλληλουχίες των εκκινητών προέρχονταν από προηγούμενες δημοσιεύσεις.^{17–23} Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αгарόζης, που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1 μg/mL, ενώ για την οπτική παρατήρηση των τελευταίων χρησιμοποιήθηκε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

Πίνακας 1. Μικροοργανισμοί και γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR.

Μικροοργανισμός	Γονίδιο	Αναφορά
CMV	IE	Shibata, 1990 ²³
<i>M. tuberculosis</i>	IS6110	Marcheti et al, 1998 ²²
<i>Legionella</i>	Lmip	Koide & Saito, 1995 ¹⁸
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	MOMP	Kaltenboeck et al, 1992 ¹⁹
<i>Pneumocystis carinii</i>	Μεγάλη υπομονάδα mt rRNA	Weig et al, 1997 ²¹
<i>Aspergillus</i>	18s rRNA	Skladny et al, 1999 ²⁰
HSV	UL42	Hirsch & Bossart, 1999 ¹⁷

Πίνακας 2. Έλεγχος για παθογόνους μικροοργανισμούς και απεικονιστικά ευρήματα.

Ημερομηνία	Υλικό	Απεικονιστικά αποτελέσματα	PCR					
			CMV	Ανάλυση αλληλουχίας DNA CMV	Άλλοι μικρο-οργανισμοί	TB	HSV	
02/10/2000	Αίμα		+				-	-
05/10/2000	Πτύελα		+			-		-
12/10/2000	Ιστός εντέρου	Ύπαρξη ελκών	+	wt			-	-
12/10/2000	Ιστός στομάχου		+					-
27/10/2000	NE	Απουσία ελκών						
13/03/2001	Υλικό γαστροσκόπησης		+	wt/mt				-
19/03/2001	Μυελός		+	wt/mt			-	-

+ : Θετικός

- : Αρνητικός

NE: Δεν υπήρξε δείγμα

wt: Φυσιολογικό στέλεχος AD169

mt: Μεταλλαγμένο στέλεχος C8702 στο κωδικόνιο 594: Αλανίνη → Βαλίνη (GCG→GTG)

Άλλοι μικροοργανισμοί: *Legionella*, *Chlamydia pneumoniae*, *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus*

Για να διαπιστωθεί αν το στέλεχος του CMV που ανιχνεύθηκε μετά την υποτροπή της λοίμωξης του ασθενούς ήταν ανθεκτικό στο φάρμακο που χορηγήθηκε (ganciclovir), έγινε ανάλυση αλληλουχίας DNA (sequencing) του γονιδίου *UL97*. Για την εκλεκτική ενίσχυση του γονιδίου *UL97* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές και οι συνθήκες από προηγούμενη μελέτη.¹² Η ανάγνωση της αλληλουχίας DNA έγινε στον DNA αναλυτή ABI Prism® 310. Οι αλληλουχίες DNA, που προέκυψαν, μελετήθηκαν και στοιχίστηκαν με τις αλληλουχίες του γονιδίου *UL97* από το φυσιολογικό και μεταλλαγμένο στέλεχος AD169 και C8702,¹⁰ αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SEQUENCHERa.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΟ

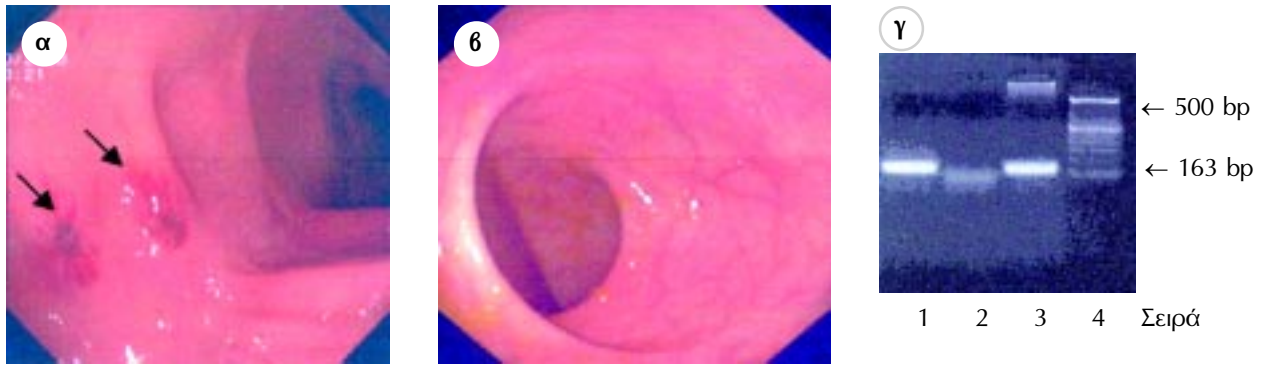
Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συγκεντρώνονται στον πίνακα 2. Όπως φαίνεται, το DNA του CMV ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν στις διαφορετικές χρονικές περιόδους της νοσηλείας του ασθενούς, διάρκειας 4 μηνών. Αντίθετα, δεν ανιχνεύθηκε γενετικό υλικό των άλλων μικροοργανισμών που εξετάστηκαν προκειμένου να τεκμηριωθεί το αίτιο του εμπυρέτου του ασθενούς. Πολλοί από αυτούς τους μικροοργανισμούς αποτελούν αίτια ευκαιριακών λοιμώξεων για HIV-1(+) ασθενείς.¹³⁻¹⁵

Το πρώτο σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης είναι η ανεύρεση γενετικού υλικού του CMV στα έλκη του κόλου, στη φάση επιδείνωσης της κατάστασης του ασθενούς (εικ. 1α, γ). Ο Goodgame, σε μια συγκριτική μελέτη, χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημεία, καλλιέργεια και PCR για CMV σε 244 βιοψίες από το κόλον, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η PCR αποτελεί πολύ ταχεία μέθοδο, με υψηλή ευαισθησία και ικανοποιητική ειδικό-

τητα. Μια άλλη μεταγενέστερη συγκριτική μελέτη⁸ με 21 μεταμοσχευμένους έδειξε ότι η PCR συνέβαλε αποφασιστικά στην πρόωπη ανίχνευση CMV στο μόσχευμα. Στην παρούσα μελέτη, η ανίχνευση DNA του CMV στο υλικό των χαρακτηριστικών απεικονιστικών βλαβών (εικ. 1α) εξηγεί την αιτία αυτών των αλλοιώσεων. Όπως φαίνεται από τα απεικονιστικά αποτελέσματα (εικ. 1β), παρατηρήθηκε ύφεση της CMV-λοίμωξης και, στη συνέχεια, υποτροπή της.

Προκειμένου να διερευνηθεί αν η υποτροπή στις 13/3/2001 οφειλόταν σε επαναλοίμωξη (άλλο στέλεχος) ή στην εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών λόγω της θεραπείας, έγινε ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας DNA (sequencing). Στα διαθέσιμα δείγματα από τις 13/3/2000 και 19/3/2000 βρέθηκαν ανθεκτικά στελέχη σε ποσοστό 50% (πίν. 2, εικ. 2), με τη χαρακτηριστική μεταλλαγή V594 στο γονίδιο *UL97*. Οι πιο σημαντικές μεταλλαγές στο γονίδιο *UL97*, που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε ganciclovir, περιγράφονται από τους Chou et al (1995)¹⁰ και χαρτογραφούνται μεταξύ των κωδικονίων 591 και 603.¹⁰⁻¹² Η διαπίστωση των ανθεκτικών στελεχών αποτελεί το δεύτερο εύρημα αυτής της αναδρομικής μελέτης και εξηγεί την υποτροπή του ασθενούς. Από την ανάλυση της DNA αλληλουχίας βρέθηκαν επίσης δύο πολυμορφισμοί στα κωδικόνια 579 (GGC→GGT) και 598 (GGT→GGC) σε όλα τα δείγματα από τις 12/10/2000. Αυτοί οι πολυμορφισμοί υποδηλώνουν ότι δεν υπήρξε επαναμόλυνση κατά την υποτροπή.

Συμπερασματικά, η χρήση μεθόδων μοριακής βιολογίας βασισμένων στην PCR, σε συνδυασμό με τα απεικονιστικά ευρήματα, αποτελεί πολύτιμο εργαλείο στην έγκαιρη διάγνωση της CMV-λοίμωξης. Επίσης, όπως στην



Εικόνα 1. Απεικονιστικά ευρήματα. (α) Αλλοιώσεις CMV-λοίωσης σε κολonosκόπηση του HIV-1(+) ασθενούς. (β) Φυσιολογική εμφάνιση του κόλου μετά από θεραπεία για CMV. (γ) Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πύκνωμα αγαρόζης 2%. Σειρά 1: Γενετικό υλικό από τις αλλοιώσεις, θετικό για CMV. Σειρά 2: Αρνητικός μάρτυρας για CMV. Σειρά 3: Θετικός μάρτυρας για CMV 163 bp. Σειρά 4: Δείκτης μοριακού βάρους τμημάτων DNA.

προκειμένη περίπτωση, η ανίχνευση ανθεκτικών στελεχών εξηγεί την υποτροπή, ενώ η ταυτοποίηση ταυτώσεων πολυμορφισμών αποκλείει την επαναμόλυνση.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Οι συγγραφείς θέλουν να εκφράσουν τις ευχαριστίες τους προς το Μ. Μιχαλάτο για τη συμβολή του στο σχεδιασμό των εικόνων.

ABSTRACT

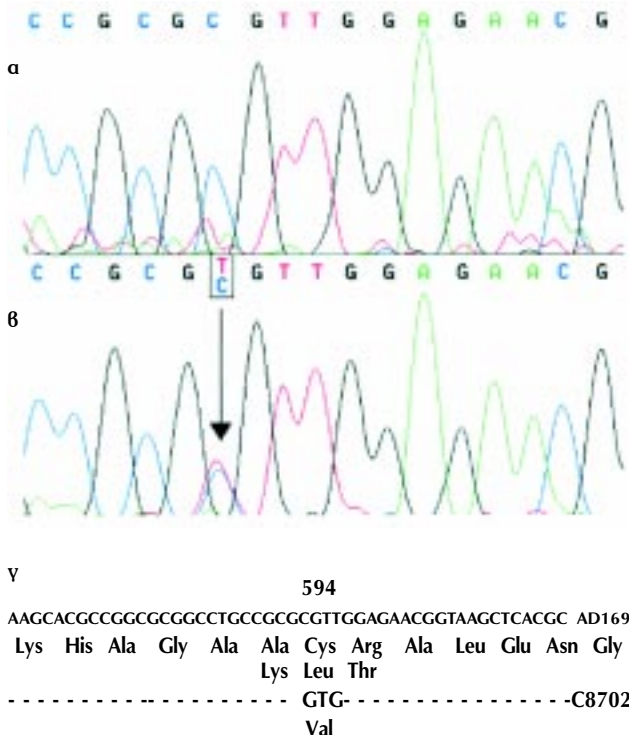
Elucidation of cytomegalovirus infection and recurrence in a HIV-1(+) patient

C. KOTTARIDI,¹ G. PLOUMIDIS,² E. GRAPSAS,²
C. FERETIS,³ P. BENAKIS,³ P. FILALITHIS,²
D. BOUZARELOU,¹ G. NASIOULAS¹

¹Department of Molecular Biology, "Hygeia" Research Center "Antonis Papayiannis", Athens, ²1st Department of Internal Medicine, "Hygeia" Diagnostic and Therapeutic Center of Athens, ³Department of Gastroenterology, "Hygeia" Diagnostic and Therapeutic Center of Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2003, 20(3):311-315

This study illustrates the power of molecular biology techniques based on PCR in the elucidation of cytomegalovirus (CMV) infection in a HIV-1(+) patient. CMV is responsible for the most common viral opportunistic infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The colon is a common site of CMV infection in AIDS patients. Clinical diagnosis of CMV infection is based on the characteristic endoscopic appearance of extensive ulceration of the gastric mucosa. A 54 year-old homosexual man who had AIDS complicated by CMV visited the hospital because of high fever. PCR tests for *Legionella*, *Chlamydia pneumoniae*, *Pneumocystis carinii* and *Aspergillus* were negative. In addi-



Εικόνα 2. Χρωματογράμματα και αλληλουχίες DNA στελεχών CMV. (α) Χρωματογράμμα φυσιολογικού στελέχους (12/10/2000) με αλληλουχία όμοια με το φυσιολογικό στέλεχος AD169. (β) Χρωματογράμμα από το στέλεχος της 13/3/2001, που δείχνει την ύπαρξη της μεταλλαγής (GCG→GTG), όμοιας με το ανθεκτικό στέλεχος C8702. (γ) Στοιχισμός αλληλουχιών των AD169 και C8702.

tion, the patient presented with diarrhea and DNA prepared from biopsies of colon ulceration sampled on colonoscopy scored positive for CMV. Ganciclovir was administered, with good clinical response but diarrhea recurred six months later. PCR for CMV scored positive again and the emergence of CMV mutants conferring ganciclovir resistance was investigated. The presence for the most common mutations of the *UL97* gene associated with ganciclovir resistance was directly assessed in DNA from the patient's leukocytes. Direct sequencing of the PCR products revealed the known V594 mutation predisposing to ganciclovir resistance, and the same gene polymorphism (579, GGC→GGT and 598, GGT→GGC) in all samples tested. Finally the patient died. In summary, molecular biology methods can be used for early detection of CMV in characteristic colonic lesions in AIDS patients. Detection of mutant strains resistant to antiviral drugs and polymorphism may elucidate the natural history of the infection in the particular patient.

.....
Key words: CMV, Ganciclovir, HIV-1, Resistance

Βιβλιογραφία

1. WU F, LI H, ZHANG DY. Differential detection of cytomegalovirus immediate-early messenger RNA in clinical samples using ligation-dependent PCR. *Mol Diagn* 2001, 6:233–239
2. SALMON-CERON D. Cytomegalovirus infection: the point in 2001. *HIV Med* 2001, 2:255–259
3. TENDERO DT. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus (CMV) infections in immunodepressed patients, mainly in patients with AIDS. *Clin Lab* 2001, 47:169–183
4. BINI EJ, GORELICK SM, WEINSHIEL EH. Outcome of AIDS-associated cytomegalovirus colitis in the era of potent antiretroviral therapy. *J Clin Gastroenterol* 2000, 30:414–419
5. MENTEC H, LEPOR C, LEPOR J, MARCHE C, HAZIC M, VILDE JL. Cytomegalovirus colitis in HIV-1-infected patients: a prospective research in 55 patients. *AIDS* 1994, 8:461–467
6. GOODGAME RW, GENTA RM, ESTRADA R, DEMMLER G, BUFFONE G. Frequency of positive tests for cytomegalovirus in AIDS patients: Endoscopic lesions compared with normal mucosa. *Am J Gastroenterol* 1993, 8:338–343
7. NOLTE FS, METCHOCK B, MCGOWAN JE JR, EDWARDS A, OKWUM-ABUA O, THURMOND C ET AL. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *J Clin Microbiol* 1993, 31:1777–1782
8. KUSNE S, MANEZ R, FRYE BL, ST GEORGE K, ABU-ELMAGD K, TABASCO-MENQUILLON J ET AL. Use of DNA amplification for diagnosis of cytomegalovirus enteritis after intestinal transplantation. *Gastroenterology* 1997, 112:1121–1128
9. COTTE L, DROUET E, BISSUEL F, DENOYEL GA, TREPO C. Diagnostic value of amplification of human cytomegalovirus DNA from gastrointestinal biopsies from human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Microbiol* 1993, 31:2066–2069
10. CHOU S, ERICE A, COLIN JORDAN M, 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. *JID* 1995, 171:576–583
11. CHOU S, GUENTZEL S, MICHELS KR, MINER RC, LAWRENCE DREW W. Frequency of *UL97* phosphotransferase mutations related to ganciclovir resistance in clinical cytomegalovirus isolates. *JID* 1995, 172:239–244
12. MENTEZ JC, SIA IG, TAU KR, ESPY MJ, SMITH TF, CHOU S ET AL. Novel mutation in the CMV *UL97* gene associated with resistance to ganciclovir therapy. *Transplantation* 1999, 67:755–757
13. MONNO R, MAGGI P, CARBONARA S, SIBILIO G, D'APRILE A, COSTA D ET AL. *Chlamydia trachomatis* and *Mycobacterium tuberculosis* lung infection in a HIV-positive homosexual man. *AIDS Care STDS* 2001, 15:607–610
14. MYLONAKIS E, BARLAM TF, FLANIGAN T, RICH JD. Pulmonary aspergillosis and invasive disease in AIDS: review of 342 cases. *Chest* 1998, 114:251–262
15. LLOYD A. HIV infection and AIDS. *P N G Med J* 1996, 39:174–180
16. MANIATIS ET AL. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Appendix E.3
17. HIRSCH H, BOSSART W. Two-center study comparing DNA preparation and PCR amplification protocols for herpes simplex virus detection in cerebrospinal fluids of patients with suspected herpes simplex encephalitis. *J Med Virol* 1999, 57:31–35
18. KOIDE M, SAITO A. Diagnosis of *Legionella pneumophila* infection by polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1995, 21:199–201
19. KALTENBOECK B, KOUSOULAS K, STORZ J. Two-step polymerase chain reactions and restriction endonuclease analyses detect and differentiate ompA DNA of *Chlamydia* spp. *J Clin Microbiol* 1992, 30:1098–1104
20. SKLADNY H, BUCHHEIDT D, BAUST C, KRIEG-SCHNEIDER F, SEIFARTH W, LEIB-MOSCH 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, 37:3865–3871
21. WEIG M, KLINKER H, BOGNER BH, MEIER A, GROSS U. Usefulness of PCR for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in different patient groups. *J Clin Microbiol* 1997, 35:1445–1449
22. MARCHETTI G, GORI A, CATOZZI L, VAGO L, NEBULONI M, ROSSI MC ET AL. Evaluation of PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: Comparison of four amplification assays. *J Clin Microbiol* 1998, 36:1512–1517
23. SHIBATA M, MORISHIMA T, TERASHIMA M, KIMURA H, KUZUSHIMA K, HANADA N ET AL. Human cytomegalovirus infection during childhood: detection of viral DNA in peripheral blood by means of polymerase chain reaction. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1990, 179:245–253

Corresponding author:

G. Nasioulas, Molecular Biology Research Centre "Hygeia" "Antonios Papayiannis", 4 Erythrou Stavrou & Kifissias Ave., GR-151 23 Marousi, Athens, Greece