

Laboratorní diagnostika herpetických virů

RNDr. Kateřina Roubalová, CSc.

Vidia s. r. o., Jesenice u Prahy

Herpetické viry navozují u svého hostitele celoživotní perzistentní infekci, provázenou obdobími latence a reaktivace. Tato biologická vlastnost přináší komplikace pro jejich laboratorní diagnostiku. Pro tyto účely jsou k dispozici nepřímé diagnostické metody, založené na průkazu specifických protilátek, nebo přímé metody průkazu virového materiálu v klinických vzorcích. Při sérologickém vyšetření je nutno odlišit protilátky, které mají anamnestický charakter, od protilátek souvisejících s aktivní infekcí. Stanovení protilátek je užitečné hlavně pro diagnostiku primární infekce. U reaktivovaných infekcí, u chronicky nemocných a u imunodeficientních pacientů je interpretace sérologických nálezů nejednoznačná. Přímý průkaz infekce má v těchto případech významně vyšší výpovědní hodnotu. V příspěvku je uveden přehled dostupných diagnostických metod, způsob jejich použití, způsob odběru vzorků i interpretace laboratorních nálezů.

Klíčová slova: herpetické viry, diagnostika, laboratorní metody.

Laboratory diagnosis of herpesviruses

Herpesviruses establish a lifelong persistent infection in their host characterized by periods of latency and reactivation. This biological property is associated with difficulties in their laboratory diagnosis. For this purpose, indirect diagnostic methods based on the demonstration of specific antibodies or direct methods for demonstrating viral material in clinical samples are available. In serological tests, it is necessary to distinguish antibodies that are related to the patient's history from those related to active infection. Antibody assay is mainly useful in diagnosing primary infection. In reactivated infections, in the chronically ill, and in immunodeficient patients, the interpretation of serological findings is unclear. Direct evidence of infection has a significantly higher informative value in these cases. The paper provides an overview of available diagnostic methods and describes how they are used, how samples are collected and how laboratory findings are interpreted.

Key words: herpesviruses, diagnosis, laboratory methods.

Med. Pro Praxi 2010; 7(5): 241–244

Úvod

Skupina herpetických virů má v současné době 8 lidských zástupců: virus herpes simplex typu 1 a 2 (HSV1, HSV2), virus varicella zoster (VZV), cytomegalovirus (CMV), virus Epsteina a Barrové (EBV), lidský herpesvirus 6, 7 a 8 (HHV6, HHV7, HHV8). Jejich charakteristickou společnou vlastností je schopnost navodit celoživotní perzistentní infekci, provázenou obdobími latence a reaktivace, která bývá spojena s asymptomatickým vylučováním viru do tělních sekretů. Důsledkem je nekontrolované šíření herpetických virů v populaci a vysoký stupeň promořenosti většinou z nich. Infekce je kontrolována imunitním systémem hostitele, zejména buněčnou imunitou. U imunokompetentních jedinců probíhá většina infekcí bezpříznakově. Klinické příznaky jsou spojeny hlavně s primárními infekcemi organismu a většinou samy odeznívají bez nutnosti léčby. U imunodeficientních jedinců patří tyto viry naopak mezi nejnebezpečnější oportunní patogeny. Infekce u nich mají tendenci k chronicitě a generalizaci, spojené s orgánovým poškozením. V těchto případech jsou vhodná preventivní opatření (monitorování průběhu infekce, profylaxe) a v případě aktivní infekce nasazení antivirotik.

Pro virologickou diagnostiku herpetických infekcí slouží nepřímé metody, založené na průkazu specifických protilátek, a metody přímého průkazu přítomnosti virového materiálu v klinických vzorcích.

Metody nepřímého průkazu herpesvirových infekcí

IgG protilátky proti strukturálním virovým proteinům (proteiny, obsažené ve virových částicích) se vytváří většinou již v časně fázi primární infekce a mají anamnestický charakter (přetrvávají po celý život jedince). Výjimkou jsou některé infekce u malých dětí, u nichž může být nástup těchto protilátek pomalejší (např. u infekce HHV6) (1, 2). Proto je u malých dětí vhodné vyšetřit párový vzorek séra, odebraný v intervalu 14 dnů. Obě vyšetření by měla provádět stejná laboratoř. Anamnestické protilátky jsou důležité hlavně pro epidemiologické účely a pro posouzení vnímavosti pacienta k primární infekci. Pro diagnostiku je významné stanovení IgG protilátek hlavně u těch herpetických virů, které nejsou ubikvitně rozšířeny (HSV2, HHV8) (3). Za průkaz aktivní infekce se považuje významný vzestup IgG protilátek (za významný se pokládá aspoň čtyřnásobný vzestup titru protilátek) v párových vzorcích séra. **IgM a IgA protilátky** se tvoří pře-

chodně jako odezva na aktivní replikaci viru (4). Jejich přítomnost tedy indikuje probíhající nebo recentně proběhlou aktivní infekci. Podobný charakter mají i IgG protilátky proti některým nestrukturálním antigenům **EBV** (4). U tohoto viru sérologické vyšetření zahrnuje detekci protilátek proti několika virovým antigenním komplexům, které umožňují rozlišení fází latence a aktivní infekce, a to buď primární, nebo reaktivované (tabulka 1). U ostatních herpetických virů takto propracovaná diagnostická schémata dosud nejsou k dispozici. Pro rozlišení primární a reaktivované infekce lze využít i **stanovení avidity** (vazebné schopnosti) IgG protilátek: při primární infekci se tvoří nízkavidní protilátky, které jsou během 2–3 měsíců rekonvalescence postupně nahrazeny protilátkami s vysokou aviditou. Toto vyšetření je zvláště důležité pro diagnostiku infekce u těhotných žen, u nichž může být primární infekce některými herpetickými viry (CMV, VZV, HSV) spojena s rizikem přenosu z matky na plod (5, 6). Užitečným sérologickým testem pro diagnostiku EB-virové infekční mononukleózy je stanovení **heterofilních protilátek**. Jedná se o nespecifické polyvalentní protilátky, které jsou důsledkem masivní aktivace B-lymfocytů, provázející toto onemocnění. Vyšetření heterofilních protilátek (Paul-Bunnell-Ericsonův test) je

Tabulka 1. Interpretace výsledků testů na stanovení specifických protilátek proti EBV

Stadium infekce	Základní vyšetření			Doplňková vyšetření			
	IgG proti VCA ¹	IgM proti VCA	IgG proti EBNA1 ²	IgM proti EBNA1	IgG proti EA ³	IgA proti VCA	IgM proti EA
Latence	++ (vysoká avidita)	-	++	-	+/- ⁴	-	-
Primární infekce	++ (nízká avidita)	+ /+++	-	++	++	+++	++
Reaktivace	+++ (vysoká avidita)	+	+++	+/-	+++	++	+/-
Chronická aktivní infekce	Nemá charakteristický vzorec protilátek (pro diagnostiku je nezbytný průkaz vysoké hladiny viru v periferní krvi pomocí PCR)						
¹ VCA – virový kapsidový antigen, ² EBNA1 – EB-virový nukleární antigen1, ³ EA – časný antigen, ⁴ Nízké hladiny IgG protilátek proti EA má až 20% zdravých lidí							

Tabulka 2. Způsob odběru, skladování a transportumateriálu u jednotlivých vyšetřovacích metod

Druh vyšetření	Indikace	Druh vyšetřovaného materiálu	Způsob odběru	Teplota skladování	Transport
Stanovení protilátek	Diagnóza primární infekce, stanovení vnímavosti k infekci	Sérum, plazma	Odběr plné venózní krve	+2–8 °C	Při běžné teplotě, do 3 dnů
	Dif. diagnostika neuroinfekcí – stanovení intratekálních protilátek	Párový vzorek séra a likvoru	Odběr plné venózní krve a likvoru do sterilní zkumavky		
Izolace viru na tkáňové kultuře	Diferenciální diagnostika viru HSV1 a HSV2	Stěr z léze	Stěr z vezikulárního stadia exantému, sterilním suchým tamponem, vložit do zkumavky s virologickým odběrovým médiem	+2–8 °C	Do 24 hod. na ledu
	Diagnostika CMV u malých dětí a novorozenců	Moč	Střední proud moče do sterilní zkumavky		
CMV antigenemie	Diagnostika aktivní infekce CMV u imunodeficientních pacientů	Krev	Odběr nesrážlivé venózní krve (EDTA nebo heparin)	+2–8 °C	Při běžné teplotě, do tří hod.
Průkaz virové DNA	Dif. diagnostika neuroinfekcí	Likvor	Lumbální punkce, do sterilní zkumavky	+2–8 °C	Při běžné teplotě, do 3 hod.
	Dif. diagnostika kožních eforescencí a očních infekcí – průkaz HSV, VZV	Stěr z léze nebo ze spojivky	Stěr z vezikulárního stadia exantému, sterilním suchým tamponem, vložit do zkumavky s 1 ml sterilního fyziologického roztoku		
	Diagnostika aktivní infekce CMV, EBV, HHV6, HHV7, HHV8 u imunodeficientních pacientů	Krev (kostní dřeň)	Odběr nesrážlivé venózní krve, resp. kostní dřeně (EDTA)		
	Diagnostika aktivní infekce v dolních dýchacích cestách (imunodeficientní pacient, kriticky nemocný pacient – ARO)	BAL, aspirát	Odsátí do sterilní zkumavky	-20 °C	Do tří hodin na ledu
	Prenatální diagnostika kongenitální infekce CMV u žen s primoinfekcí v těhotenství	Plodová voda	Amniocentéza, alikvot do sterilní zkumavky		
	Průkaz viru v biopsii při orgánovém postižení (imunodeficientní pacient)	Biopsie	Vložení tkáně do vhodné transportní nádoby		

podstaně méně nákladné, nicméně jeho specifita i citlivost je nižší, než u stanovení virové specifických protilátek. Heterofilní protilátky se zpravidla nevytváří u dětí do šesti let.

Pro stanovení protilátek proti herpetickým virům se dnes používají komerční **testy**, založené na principu enzymoimunoassay (ELISA), nepřímé imunofluorescence, imunoblottingu, či komplement-fixace. Tyto testy se liší složením používaného antigenu: zatímco imunofluorescenční testy využívají komplexní mnohosložkový nativní virový antigen, imunoenzymatické testy

mohou být založeny jak na nativním antigenu, tak na vysoce purifikovaných rekombinantních proteinech nebo syntetických antigenních epitopech a imunoblotting využívá výhradně purifikované rekombinantní nebo syntetické antigeny. Proto se výsledky jednotlivých metod mohou vzájemně lišit, a to i při stanovení stejného typu protilátek. Pro stanovení heterofilních protilátek jsou k dispozici i imunochromatografické rychlotesty. Tyto testy jsou pro svoji rychlost a jednoduchost provedení určeny přímo pro použití v ordinaci, nebo u lůžka pacienta,

vesměs se však jedná o orientační testy s nižší citlivostí a specifitou, než mají ostatní laboratorní sérologické metody.

Průkaz virově specifických protilátek, má dobrou výpovědní hodnotu hlavně při diagnostice primárních infekcí. Vzhledem k následujícímu celoživotnímu nosičství infekce je hostitelský organizmus opakovaně stimulován virovými antigeny. Důsledkem toho má dlouhodobě vysokou hladinu protilátek, která při reaktivaci infekce vykazuje pouze malé, laboratorně často obtížně prokazatelné změny. Proto

je diagnostický význam sérologických metod u reaktivovaných infekcí nízký (7). U dospělých pacientů je **interpretace sérologického nálezu** často komplikovaná a nejednoznačná: dospělý organismus je již infikován více druhy herpetických virů, které se mohou v různých klinických situacích sekundárně reaktivovat a vyvolávat tvorbu jak druhově specifických, tak zkříženě reagujících protilátek. Typickým příkladem je sekundární reaktivace CMV a HHV6 při infekční mononukleóze. Reaktivace mnoha herpetických virů je běžným jevem v těhotenství, v souvislosti s přirozeným oslabením buněčné imunity. Riziko přenosu infekce na plod je však ve většině těchto případů zanedbatelné. Protilátkovou odpověď proti herpetickým virům často pozorujeme při chronických zánětech různé povahy, autoimunitních onemocněních, nádorových procesech, chronických neurologických onemocněních nebo dlouhodobém působení stresu (8). V těchto případech nelze jednoznačně určit, zda se jedná o důsledek reaktivace herpetických virů nebo polyklonální aktivace imunitního systému. Vzhledem k velmi rozsáhlé genetické výbavě herpetických virů (tyto viry nesou genetickou informaci pro mnoho desítek různých proteinů, z nichž mnohé jsou buněčného původu) je zde i vysoké riziko zkřížené reaktivity, způsobené přirozenými protilátkami, či autoprotiátkami (9). Tyto nespecifické interakce se uplatňují zvláště při stanovení IgM protilátek. Falešné pozitivita v testech na průkaz specifických IgM protilátek mohou být způsobeny též interferencí revmatoidních faktorů. Dlouhodobé sérologické známky aktivace některých herpetických virů (zejména EBV) mohou být signálem přítomnosti jiného, závažnějšího patologického procesu. V těchto případech je vhodné vyšetřit, zda se skutečně jedná o chronickou replikaci viru, která se projevuje zvýšenou hladinou virové DNA v periferní krvi (viz dále), a případně se snažit zjistit příčinu tohoto stavu.

Metody přímého průkazu viru

U imunodeficientních pacientů, kteří jsou nejvíce ohroženi klinicky závažnými herpesvirovými infekcemi, je sérologická diagnostika nespolehlivá a podstatně účinnější (v mnoha případech nezbytná) je přímý průkaz viru v klinickém materiálu.

Klasické virologické metody přímého průkazu viru v klinických vzorcích, založené na **izolaci** a následné identifikaci viru v tkáňové kultuře, jsou použitelné pouze pro některé druhy herpetických virů: V kulturách lidských embryonálních fibroblastů se dobře replikuje HSV1 a HSV2

(7). Přítomnost viru v kultuře lze zjistit během 2–3 dnů na základě rozvoje charakteristického cytopatického efektu. CMV a VZV lze rovněž izolovat v tkáňové kultuře, replikace viru je však příliš pomalá, a proto jsou tyto metody nevhodné pro diferenciální diagnostiku. Používají se však pro speciální účely, kdy je nutno získat virový kmen (například pro genetickou analýzu). Vhodným materiálem pro izolaci viru jsou stěry z lézí, výtěry či výplachy z horních a dolních cest dýchacích, výtěry ze spojivkového vaku, moč (CMV) nebo izolované leukocyty pacienta (CMV, VZV). Pro vyšetření periferní krve nebo mozkomíšního moku jsou tyto metody nevhodné. Vzorky, určené k izolaci viru, je nutno odebrat do speciálního virologického transportního média (např. odběrové soupravy Copan, dodává DiaLab), transportovat do laboratoře na ledu a zpracovat do 24 hod. Pro svou pracnost, nízkou citlivost a časovou náročnost jsou izolační metody nyní široce nahrazovány molekulárně biologickými metodami (viz dále).

Další alternativou přímého průkazu virů je **imunohistochemický průkaz antigenu** v klinickém materiálu pomocí monoklonálních protilátek. Specializovanou aplikací této metody představuje průkaz antigenemie u infekcí CMV: V akutní fázi, kdy dochází k šíření infekce krevní cestou se v polymorfonukleárech periferní krve pacienta hromadí cytomegalovirový antigen (pp65), který lze v nátěrech těchto buněk detekovat metodou nepřímé imunofluorescence. Tento test je pro svou vysokou pozitivní prediktivní hodnotu vhodný pro monitorování infekce i u vysoce rizikových imunodeficientních pacientů (6, 10). Pomocí monoklonální protilátky proti bezprostředně časnému proteinu CMV (pp72) lze prokazovat infikované buňky v biopsiích z postižených orgánů, či v buňkách z bronchoalveolární laváže (BAL). Tímto způsobem lze též urychlit vyhodnocení izolačního pokusu na tkáňových kulturách (antigen pp72 je prokazatelný v jádre infikovaných buněk již 48 hod. po infekci). Existují specializované testy, určené k imunohistochemickému průkazu antigenu HSV1 a HSV2 v otiskových preparátech ze stěrů z kožních nebo slizničních lézí. Nevýhodou všech imunohistochemických testů je vysoké riziko falešných pozitivit, spojené s nespecifickou vazbou značené protilátky na některé typy buněk. Pro odlišení specifické a nespecifické fluorescence je potřeba značné zkušenosti. Průkaz virového antigenu v tělních tekutinách metodou ELISA je pro diagnostické účely většinou málo citlivý.

Nejširší uplatnění mají v současné době **molekulárně biologické diagnostické meto-**

dy, založené na průkazu virové DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Tyto metody jsou nyní již běžně dostupné a jejich cena je srovnatelná s komplexním sérologickým vyšetřením. Pro svou vysokou citlivost i specifitu a aplikovatelnost na vyšetření širokého spektra klinických vzorků stále více nahrazují ostatní metody přímého průkazu viru. Používají se různé varianty těchto metod, které se liší svou citlivostí a vhodností pro jednotlivé druhy virů nebo klinických vzorků. Klasická PCR s následnou elektroforetickou detekcí produktu amplifikace má nižší citlivost (50–100 kopií virového genomu (genom-ekvivalentů (GE)/reakci). Tato metoda je diagnosticky použitelná jen pro materiály, v nichž se nachází velké množství viru (například pro stěry z eforescencí u HSV nebo VZV). Zdvojená (tzv. nested) varianta této metody má vysokou citlivost (2–10 GE/reakci) i specifitu, ale i vyšší riziko falešných pozitivit, způsobených kontaminací během zpracování vzorku. PCR v reálném čase (real-time PCR), která umožňuje průběžnou detekci produktů amplifikace pomocí fluorescenčně značených sond, má mnoho výhod: má vysokou citlivost i specifitu, nízké riziko kontaminací, výrazně nižší pracnost a časovou náročnost i možnost kvantitativního hodnocení výsledku. Jedinou nevýhodou jsou vyšší ekonomické náklady a požadavek na relativně drahé přístrojové vybavení. U statistických vyšetření v současné době převyšuje reálná cena jednoho vyšetření náklady, hrazené pojišťovnami. PCR umožňuje detekci herpetických virů ve všech typech klinických vzorků, včetně periferní krve a mozkomíšního moku (11). Inaktivace viru během transportu nemá negativní dopad na výsledek vyšetření, proto lze odebraný materiál (s výjimkou biopsií) transportovat při běžné teplotě, či skladovat několik dní při +4°C. Druh vyšetřovaného materiálu závisí na druhu viru a účelu vyšetření. Při vyšetření, které je prováděno pro účely diferenciální diagnostiky onemocnění, je vhodné odebrat materiál odpovídající postiženým orgánům: např. mozkomíšní mok u onemocnění nervového systému, BAL nebo sputum při postižení dolních dýchacích cest, výtěr ze spojivkového vaku u keratokonjunktivit, oční tekutinu u retinitid, biopsii u gastroenteritid, u akutních horečnatých onemocnění, či uzlinových syndromů průkaz virémie. Pro diagnostiku kongenitální infekce CMV u novorozenců je nejvhodnějším materiálem moč. Při monitorování infekce pro účely včasného zachytu aktivace viru u vysoce rizikových pacientů je vhodným materiálem periferní krev (např. CMV a EBV u transplanto-

vaných (12, 13), CMV u pacientů s AIDS, VZV u novorozenců v riziku perinatální infekce), nebo stěry ze sliznic nosohltanu a spojivkového vaku (u novorozenců s rizikem perinatálního přenosu HSV) (14). Velkým přínosem PCR je možnost prenatální diagnostiky kongenitálního přenosu infekce CMV u žen, které prodělaly primoinfekci v těhotenství, pomocí průkazu viru v plodové vodě (15). Na základě průkazu virové DNA PCR nelze odlišit infekční virus od neinfekčního ani latentní virus od viru, který se replikuje. Výsledky vyšetření PCR mohou být pozitivní jak v akutní fázi infekce, tak v prodromálním asymptomatickém stadiu, či v časně fázi rekonvalescence. Rozlišit tyto stadia je často možné pouze pomocí sledování dynamiky hladin viru v opakovaně odebraných vzorcích pomocí kvantitativní PCR. Při interpretaci výsledků vyšetření je nutno mít na zřeteli přirozenou přítomnost latentního nebo asymptomaticky vylučovaného viru v určitých kompartmentech. EBV a přechodně i CMV, HHV6 či HHV7 lze citlivou metodou prokázat v krvi i u zdravých asymptomatických jedinců (16). Pro účely diagnostiky, či monitorování infekce je proto nezbytné kvantitativní vyšetření hladin těchto virů v krvi, případně sledování jejich dynamiky (viz výše) (12, 13, 17). Stejně tak je nutno počítat s asymptomatickým vylučováním všech herpetických virů do nasofaryngeálních sekretů, které mohou při intubaci kontaminovat dolní dýchací cesty a způsobit falešné pozitivitu u vzorků BAL. V těchto případech při interpretaci nálezů pomáhá vyšetření dalších vzorků – např. opakovaná vyšetření nebo souběžné vyšetření BAL a periferní krve. Různé komerční testy pro PCR diagnostiku herpetických virů jsou validovány pro různé druhy materiálů, či diagnostické účely. Proto je vhodné způsob vyšetření i odběru materiálu konzultovat s příslušnou laboratoří. Akreditované laboratoře mají pro tyto účely vypracované manuály (Příručky odběru primárních vzorků), podle nichž se mohou zdravotnická zařízení řídit.

Specifické místo v přímé diagnostice má průkaz EBV v lymfoproliferativních ložiscích.

Může se jednat o reaktivní lymfatickou tkáň, přirozeně infiltrovanou EBV-pozitivními latentně infikovanými B-lymfocyty, nebo přímo o proliferaci těchto buněk. Pouhé vyšetření biopsie metodou PCR to není schopno odlišit, a proto je pro tyto účely vhodná metoda, založená na imunohistochemickém průkazu virové latentní RNA v biopsii pomocí hybridizace in situ se značenými fluorescenčními sondami (18). Toto vyšetření je dostupné pouze na specializovaných patologicko-anatomických pracovištích.

Podobně, jako u nepřímých diagnostických metod, není ani diagnostická interpretace výsledků přímého průkazu viru vždy jednoznačná.

Závěr

Široká škála laboratorních metod, které jsou dnes běžně k dispozici, může významně přispět k diagnóze herpetických infekcí. Mnohá z laboratorních vyšetření mají i prognostický význam pro odhad rizika nebo průběhu onemocnění u imunodeficientních pacientů. Volba vhodné vyšetřovací metody závisí na klinických příznacích infekce i na typu vyšetřovaného pacienta.

Nesprávný odběr materiálu, jeho nevhodné skladování, či transport do laboratoře bývá příčinou získání neplatných a zavádějících výsledků. Pro všechny laboratorní vyšetřovací metody herpetických infekcí platí, že výsledek vyšetření pacienta je možno interpretovat pouze v kontextu s ostatními laboratorními a klinickými nálezy.

Literatura

1. Chiu SS, Cheung CY, Tse CYC, Peiris M. Early diagnosis of primary herpesvirus 6 infection in childhood: serology, polymerase chain reaction and virus load. *J Infect Dis* 1998; 178: 1250–1256.
2. Ward K. The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. *J Clin Virol* 2005; 32: 183–193.
3. Holub M, Aster V, Roubalová K, Záhumenský J, Radina J. Doporučený postup pro diagnostiku a terapii genitálního herpesu u žen. *Klin. mikrobiol. Inf. lék.* 2009; 15/3: 102–107.
4. Roubalová K, Horáček J, Němeček V, Otavová M, et al. Doporučené metody ve virologické diagnostice. *Acta hygien. epidemiol. mikrobiol* 2000; 1: 7–10, 11–12, 23–28, 53–55.
5. Grangeot-Keros L, Mayaux MJ, Lebon P, Freymuth F, et al. Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary infection in pregnant women. *J Infect Dis* 1997; 175: 944–946.
6. Grangeot-Keros L, Cointe D. Diagnostic and prognostic markers of HCMV infection. *J Clin Virol* 2001; 21: 213–221.
7. Ustacebi S. Diagnosis of herpes simplex virus infections. *J Clin Virol* 2001; 21: 255–259.
8. Venables P. Epstein Barr virus infection and autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1988; 47: 265–269.
9. McClain NT, Rapp EC, Harley JB, James JA. Infectious mononucleosis patients temporarily recognize a unique cross-reactive epitope of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *J Med Virol* 2003; 70: 235–257.
10. Gerna G, Percivalle E, Revello MG, Morini F. Correlation of quantitative human cytomegalovirus pp65-, p72- and p150-antigenemia, viremia and circulating endothelial giant cells with clinical symptoms and antiviral treatment in immunocompromised patients. *Clin Diagn Virol* 1993; 1: 47–59.
11. Tang YW, Mitchell PS, Espy MJ, Smith TS, Persing DH. Molecular diagnosis of herpes simplex virus infections in the central nervous system. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2127–2136.
12. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D. Application of viral load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 2000; 355: 2032–2036.
13. Berger C, Day P, Meier G, Zingg W, et al. Dynamics of Epstein-Barr virus DNA levels in serum during EBV-associated disease. *J Med Virol* 2001; 64: 505–512.
14. Kimberlin DW. Neonatal herpes simplex infection. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 1–13.
15. Revello MG, Gerna G. Pathogenesis and prenatal diagnosis of cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2004; 29: 71–83.
16. Maurmann S, Fricke L, Wagner HJ, et al. Molecular parameters for precise diagnosis of asymptomatic Epstein-barr virus reactivation in healthy carriers. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5419–5428.
17. Maeda A, Wakiguchi H, Yokohama W, Hisakawa H, et al. persistently high Epstein-Barr Virus (EBV) loads in peripheral blood lymphocytes from patients with chronic active EBV infection. *J Infect Dis* 1999; 179: 1012–1015.
18. Hamilton-Dutoit SJ, Raphael M, Audouin J, Diebold J, et al. In situ demonstration of Epstein Barr virus small RNAs (EBER1) in acquired immunodeficiency syndrome-related lymphomas: correlation with tumor morphology and primary site. *Blood* 1993; 82: 619–624.

RNDr. Kateřina Roubalová, CSc.

Vidia s. r. o.

*Nad Safinou II č. 365, Vestec, 252 42 Jesenice u Prahy
kroubalova@vidia.cz*