

Samenvatting

Samenvatting

Longaandoeningen kunnen verschillende onderliggende oorzaken hebben. Hierbij kunnen infecties, immunologische processen, maligniteiten, omgevings- en werkgerelateerde factoren een rol spelen. Traditioneel worden deze ziektes gediagnosticeerd met behulp van laboratoriumtesten, longfunctietesten en radiologisch onderzoek eventueel met afname van een bronchoalveolaire lavage (BAL). In sommige gevallen zal getracht worden een histologische bevestiging te verkrijgen door middel van een longbiopt.

BAL is een veilige, beperkt invasieve en over het algemeen goed getolereerde methode voor het verkrijgen van cellulair en a-cellulair materiaal uit de onderste luchtwegen^{1,2}.

In het diagnostisch traject van longziekten kan BAL dus gezien worden als een waardevolle aanvulling. Een zorgvuldige analyse van de in BAL-vloeistof aanwezige cellen plus de eventueel aanwezige a-cellulaire componenten kunnen, in combinatie met klinische en radiologische bevindingen, helpen om tot een diagnose te komen. De toepassing van BAL-vloeistof in het diagnostisch traject van longinfecties heeft zijn waarde inmiddels al bewezen³, met name bij verdenking op een beademingspneumonie (VAP)⁴⁻⁶ en opportunistische infecties zoals *Pneumocystis pneumoniae* (PCP)^{7,8}.

BAL versus geïnduceerd sputum

Zowel BAL-vloeistof als (geïnduceerd) sputum kunnen gebruikt worden in het diagnostisch traject van longziekten. Echter, met name bij infectieuze aandoeningen, bestaan er verschillen in gevoeligheid tussen de twee methodes. In het geval van PCP bijvoorbeeld, varieert de sensitiviteit van geïnduceerd sputum voor de microscopische diagnose PCP tussen 50 and 90%, afhankelijk van de ervaring met de materiaalafname en de verwerking van het monster^{9,10}. Door introductie van een polymerase ketting- reactie (PCR) voor de detectie van *Pneumocystis jiroveci* is de sensitiviteit van geïnduceerd sputum voor de diagnose PCP toegenomen¹¹. Helaas is deze methode nog niet operationeel in alle Nederlandse ziekenhuizen. Een ander voorbeeld is de kwantitatieve kweek van BAL-vloeistof voor de diagnose VAP. Recent is er veel discussie ontstaan over de waarde hiervan. Met name de vraag of BAL-vloeistof nog steeds het materiaal van keuze is voor deze diagnose^{12,13}. Desondanks heeft het gebruik van BAL-vloeistof in plaats van (geïnduceerd) sputum als voordeel dat er een kwaliteitscontrole beschikbaar is voor BAL-vloeistof (verkregen volume, totale celtelling, aanwezigheid van epitheel). Dit geeft de bevestiging dat het materiaal dat verwerkt wordt ook daadwerkelijk uit de lagere luchtwegen afkomstig is. Een ander voordeel is dat

bij gebruik van BAL-vloeistof een differentiële celtelling voorhanden is. Dit biedt de mogelijkheid ook niet-infectieuze aandoeningen op te sporen¹⁴.

Doel van de studie

In dit proefschrift wordt het gebruik van BAL als een diagnosticum bij infectieuze longaandoeningen bij patiënten verdacht van een longinfectie beschreven. Het doel van de studies gepresenteerd in dit proefschrift was om te trachten de sensitiviteit van BAL-vloeistof als diagnosticum bij longinfecties te verbeteren en de tijd waarin dit gebeurt te verkorten. Hiertoe werden BAL-vloeistof gegevens verkregen van patiënten gedurende een periode vanaf 1998 tot 2005 bekeken.

In hoofdstuk 1 de algemene introductie, wordt de BAL procedure, verwerking van BAL-vloeistof in het laboratorium en de waarde van BAL bij infectieuze en niet-infectieuze aandoeningen die op VAP kunnen lijken beschreven. Verder wordt het gebruik van nucleïnezuur amplificatie technieken bij longinfecties in het algemeen kort besproken.

Microscopie van BAL-vloeistof

In hoofdstuk 2 werd het gebruik van polylysine gecoate glaasjes in de BAL diagnostiek geëvalueerd. Het gebruik van gecoate objectglaasjes zou zorgen voor een betere hechting van cellen aan het oppervlakte van de objectglaasjes. Om dit te testen voor BAL-vloeistof vergeleken we polylysine gecoate (PLC) glaasjes met conventionele objectglaasjes. In totaal werden twintig BAL-vloeistof monsters met een representatief aantal alveolaire macrofagen (Ams), lymfocyten (Lyms) en polymorfonucleaire neutrofiële granulocyten (PMNs) genomen. Van deze BAL-vloeistoffen werden cytospinpreparaten gemaakt op zowel conventionele als gecoate glaasjes. Met behulp van een May-Grünwald Giemsa kleuring werd gekeken naar de totale celopbrengst, de differentiële celtelling en de morfologie van de cellen. Klinische significantie van de eventueel aanwezige verschillen werden geëvalueerd door middel van een computerprogramma. Hieruit bleek dat de celopbrengst lager was indien gebruik werd gemaakt van de PLC glaasjes in vergelijking met de conventionele niet gecoate objectglaasjes. De opbrengst van Lyms was significant lager op de PLC glaasjes in vergelijking met de conventionele glaasjes ($25.89\% \pm 28.26$ versus 28.34 ± 29.96). De betrouwbaarheid van de telling van alveolar AMs, Lyms en PMNs was uitstekend voor beide type glaasjes. Er werden geen discrepanties gevonden in diagnose verkregen met

beide type glaasjes. Wij concludeerden daarom dat PLC glaasjes niet superieur waren in vergelijking met conventionele glaasjes. Behalve een polylysine coating zijn nog enkele andere coatings beschreven in de literatuur^{15,16}, vaak werden deze vergeleken met polylysine gecoate glaasjes. Polylysine gecoate glaasjes bleken in deze studies superieur te zijn in vergelijking met albumine- en gelatine-gecoate glaasjes. Aangezien uit onze studie echter bleek dat conventionele glaasjes zonder coating niet inferieur waren in vergelijking met polylysine gecoate glaasjes, en conventionele glaasjes bovendien goedkoper zijn, gaat onze voorkeur uit naar het gebruik van ongecoate glaasjes bij de opwerking van BAL-vloeistof in de dagelijkse praktijk.

Reactieve pneumocyten type II

Het doel van de studie, beschreven in hoofdstuk 3, was om het voorkomen van reactieve pneumocyten type II (RPII) in BAL-vloeistof vast te stellen. Daarnaast werd de associatie van deze cellen met klinische aandoeningen en de bijkomende cytologische bevindingen geëvalueerd. Alle opeenvolgende BAL-vloeistof monsters verkregen van patiënten in de periode tussen 2000 en 2004 werden geïncubeerd. De algemene prevalentie van RPII cellen binnen onze studiepopulatie was 21.7%. Met betrekking tot de differentiële celtelling werden er geen verschillen gevonden tussen BAL-vloeistof monsters met en zonder RPII cellen. Echter, in BAL-vloeistof met RPII, werd vaker de aanwezigheid van schuimmacrofagen, geactiveerde lymfocyten en plasmacellen gezien. RPII werden geobserveerd in monsters van patiënten gediagnosticeerd met het ARDS, diffuse alveolaire beschadiging, acute eosinofiele pneumonie, extrinsiek allergische alveolitis of hypersensitiviteits pneumonitis, medicijn geassocieerde longafwijkingen, PCP en VAP. Er werden geen RPII cellen gevonden in BAL-vloeistof van patiënten met longtuberculose of sarcoïdose. Ondanks het feit dat RPII cellen niet pathognomonisch werden bevonden voor een specifieke ziekte, werden ze geassocieerd met ernstige longbeschadiging. In combinatie met de differentiële celtelling en specifieke morfologische bevindingen, zoals schuimmacrofagen, geactiveerde lymfocyten en plasmacellen zou de aanwezigheid van RPII cellen van toegevoegde waarde kunnen zijn in de differentiatie tussen interstitiële longziekten en longinfecties.

Beademingspneumonie

Bij intensive care patiënten die beademd worden heeft VAP een hoge prevalentie^{17,18} en wordt geassocieerd met een hoge mortaliteit¹⁷. BAL-vloeistof analyse, inclusief differentiële celtelling en tellen van het percentage geïnfecteerde cellen (IC) wordt gebruikt in de diagnostiek naar VAP^{4, 6}. Echter, de invloed van antibiotica op de differentiële celtelling, inclusief IC, is nog onbekend. Studies die gekeken hebben naar dit onderwerp leverden verschillende resultaten op¹⁹⁻²¹. In hoofdstuk 4 werd daarom gekeken naar de invloed van antibiotica op het voorspellen van de aanwezigheid van een VAP. Deze prospectieve studie werd gedurende een periode van 61 maanden uitgevoerd (januari 1999 tot februari 2004). Alle opeenvolgend afgenomen BAL-vloeistof monsters van intensive care patiënten, klinische verdacht van VAP, werden geïncludeerd. Eerdere studies lieten zien dat de kwantitatieve kweek beïnvloed werd door antibiotische therapie gestart binnen 72 uur voordat de BAL werd uitgevoerd. De voornaamste conclusie uit onze studie was dat antibiotische therapie, gestart binnen 72 uur voor uitvoering van de BAL, de betrouwbaarheid van de telling van de IC als voorspeller voor VAP niet beïnvloed. De cytologische parameter die de aanwezigheid van VAP het best voorspelde bleek het percentage IC te zijn indien een afkappunt van 2% werd gehanteerd. Het combineren van het percentage IC met andere cytologische parameters resulteerde niet in een betere voorspelling van VAP.

A-cellulaire factoren in BAL

Ondanks het feit dat de routinematige toepassing van BAL-vloeistof onderzoek een waardevol instrument in de identificatie van infectieuze en niet-infectieuze longaandoeningen is, wordt het toepassen ervan gelimiteerd. Het is namelijk een relatief dure en arbeidsintensieve methode en afhankelijk van gespecialiseerd personeel. In de meeste ziekenhuizen zijn faciliteiten voor cytologische bepalingen in BAL-vloeistof niet 24 uur per dag beschikbaar. Uit praktische overwegingen zijn we op zoek gegaan naar een snellere en meer betrouwbare methode om de aanwezigheid van een VAP te voorspellen die in de meeste ziekenhuizen uitvoerbaar is. Het gebruik van acute fase eiwitten leek veelbelovend²²; bovendien kunnen deze testen 24-uur per dag worden uitgevoerd in de meeste ziekenhuizen. Hoofdstuk 5 beschrijft de toepasbaarheid van C-reactief proteïne (CRP) en procalcitonine (PCT) in het voorspellen van VAP. Zowel CRP als PCT werden bepaald in BAL-vloeistof en serum van patiënten met microbiologisch bewezen VAP. Als eerste werden de testen voor hoog gevoelige CRP (CRPH) en hoog gevoelige PCT (ProCa-S) gevalideerd voor gebruik op BAL-vloeistof, aangezien beide testen ontworpen

werden voor gebruik op serum. Beide testen presteerden goed met betrekking tot matrix-effect, lineariteit en reproduceerbaarheid en werden toepasbaar geacht voor gebruik op BAL-vloeistof. Helaas was er een grote overlap tussen ProCa-S and CRPH concentraties in BAL-vloeistof monsters, maar ook in serum, van patiënten met en zonder VAP. Dit resulteerde in een klein gebied onder de curve bij de ROC curve. De voornaamste conclusie uit dit onderzoek was dan ook dat beide parameters, zowel in BAL-vloeistof als in serum, niet geschikt waren als voorspeller voor VAP. Echter, andere a-cellulaire parameters zijn wel nuttig gebleken in de diagnostiek van longziekten. Een snelle methode ter bevestiging of uitsluiting van VAP blijft noodzakelijk, deze dient beschikbaar te zijn in de meeste ziekenhuizen op elk moment van de dag. Een van de acellulaire parameters die in recente studies waardevol bleken is TREM-1. TREM-1 behoort tot de groep immunoglobuline superfamilie, een groep van celoppervlakte- en oplosbare eiwitten die betrokken zijn bij herkenning, binding of aanhechting van cellen²³. Expressie van TREM-1 is aanwezig op neutrofielen en monocyten²⁴, maar ook op alveolaire macrofagen²⁵. De expressie van deze receptor wordt verhoogd in aanwezigheid van bacteriën en schimmels²⁶, waardoor de acute inflammatoire respons op deze organismen in gang wordt gezet²⁶. Voor de detectie van de oplosbare variant van dit eiwit, sTREM-1, in bloed en sputum is er een enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) op de markt, strikt voor onderzoeksdoeleinden (Human TREM-1 Quantikine kit, R&D systems inc, Minneapolis, U.S.A.). Met behulp van deze kit kan in ongeveer 4 uur een resultaat gegenereerd worden. Enkele studies hebben gekeken naar de bruikbaarheid van sTREM-1 bij de diagnostiek naar pneumonieën^{27,28}. Onderzoek uitgevoerd door Gibot *et al.*²⁷ liet zien dat de aanwezigheid van sTREM-1 de beste voorspeller van pneumonie was in een groep van 148 patiënten. In deze studie waren 46 patiënten met een VAP geïncludeerd die een mini-BAL hadden ondergaan²⁷. Zij vonden dat een afkappunt van 5 pg/ml de beste voorspeller was voor de aanwezigheid van een pneumonie. Helaas hielden zij er geen rekening mee dat BAL-vloeistof 10-100 keer verdund is ten opzichte van de situatie in de alveoli. Richeldi *et al.* onderzochten de bruikbaarheid van sTREM-1 als een mogelijke marker voor community-acquired pneumonie en tuberculose²⁸. Deze laatste studie liet zien dat sTREM-1 werd teruggevonden in BAL-vloeistof van patiënten met community-acquired pneumonie, maar niet bij patiënten met tuberculose. Zowel Gibot *et al.*²⁷ als Richeldi *et al.*²⁸ gebruikten een andere methode dan de boven beschreven ELISA. Tot nu toe is deze ELISA slechts in een studie gebruikt met een gering aantal patiënten verdacht van VAP (n=28)²⁹. Uit deze studie bleek sTREM-1 een uitstekende voorspeller van VAP te zijn, indien een afkappunt van 200 pg/ml werd gebruikt. Helaas hebben Determann *et al.*²⁹ de kit niet gevalideerd voor gebruik op BAL-vloeistof en hebben ook zij geen rekening

gehouden met de verdunningsfactor. Een validatie van de Humane TREM-1 Quantikine kit op BAL-vloeistof zou moeten gebeuren. Hierna zou de kit dan gebruikt kunnen worden in een prospectieve studie van intensive care patiënten verdacht van VAP. Het doel van deze nieuw op te zetten studie zou kunnen zijn de voorspellende waarde van sTREM-1 bij het diagnosticeren van VAP te evalueren en uiteindelijk een afkappunt te definiëren dat een onderscheid maakt tussen VAP en non-VAP.

Moleculaire technieken toegepast op BAL-vloeistof

In het verleden was de standaard methode voor het aantonen van infectieuze oorzaken gebaseerd op kweek en serologie. Tegenwoordig wordt de detectie van veel micro-organismen gedaan met behulp van nucleïnezuur amplificatie methodes. Deze methodes zijn vaak superieur in vergelijking met conventionele methodes op het gebied van sensitiviteit en specificiteit. Deze moleculaire methodes, zoals de polymerase ketting reactie (PCR) kan ook een bijdrage leveren aan de opwerking van BAL bij verdenking op een infectieuze longaandoening. Hoofdstuk 6 en 7 beschrijven twee studies die betrekking hebben op de implementatie en interpretatie van PCR technieken op BAL-vloeistof.

Detectie van *P. jiroveci* door middel van real-time PCR

De implementatie van een nieuwe diagnostische methode vergt altijd uitgebreide standaardisatie en validatie voordat een test in de dagelijkse praktijk kan worden geïntroduceerd. Een additioneel instrument dat gebruikt kan worden om een goede kwaliteit te waarborgen en dat bovendien eventuele gebreken van een test aan het licht kan brengen is een kwaliteitscontrole panel gedistribueerd door een coördinerende organisatie. Deze kwaliteitscontroles zijn echter niet voor alle micro-organismen voorradig, een voorbeeld is *P. jiroveci*. Real-time PCR methodes voor de detectie van *P. jiroveci* in respiratoire monsters zijn recent verschoven van onderzoeksdoeleinden naar de dagelijkse diagnostiek^{30,31}. Aangezien een kwaliteitscontrole (nog) niet bestaat is de validatie, implementatie en vergelijking van resultaten tussen de laboratoria moeilijk. In hoofdstuk 6 wordt derhalve een studie beschreven die geïnitieerd werd om drie onafhankelijke in-huis ontwikkelde PCR testen voor de detectie van *P. jiroveci* vanuit drie verschillende academische ziekenhuizen in Nederland te vergelijken. Hiertoe werd een samenwerkingsverband opgezet tussen de academische ziekenhuizen van Nijmegen, Leiden en Maastricht. In

de periode augustus 1999 tot april 2004 werden in totaal 124 BAL-vloeistof monsters geïncubeerd. Dit waren monsters verkregen van HIV-positieve of HIV-negatieve patiënten met een bekende risicofactor voor PCP, zoals een onderliggende (hematologische) maligniteit, status na beenmerg- of orgaan transplantatie, ziekte van Wegener, en immunosuppressieve en/of corticosteroïden therapie (n=84). Daarnaast werden een aantal BAL-vloeistof monsters van patiënten zonder bekende risicofactoren voor PCP, maar met of een VAP of een recent gediagnosticeerde sarcoïdose geïncubeerd (n=40). In 41 van de 124 BAL-vloeistof monsters waren *P. jiroveci* cysten en trophozoïten microscopisch zichtbaar. Van 114 monsters kwamen de PCR resultaten vanuit de drie verschillende laboratoria overeen. Veertig van de 41 microscopie-positieve monsters werden door de drie verschillende laboratoria met behulp van PCR positief bevonden. Van de 83 microscopie-negatieve monsters waren er 69 ook negatief met behulp van de PCRs. Van de andere 14 microscopie-negatieve monsters, waren vijf positief in de drie ziekenhuizen. Er werd een hoge overeenkomst gevonden tussen de drie real-time PCR methodes voor *P. jiroveci* variërend van 94.4% (Kappa value: 0.88) tot 96.8% (Kappa value: 0.93). Aangezien *P. jiroveci* in lage hoeveelheden aanwezig kan zijn in de luchtwegen zonder dat er sprake is van ziekte (dragerschap) is het essentieel om onderscheid te maken tussen dragerschap en ziekte. De verwachting was dat bij een klinische PCP *P. jiroveci* in veel hogere hoeveelheden aanwezig zou zijn dan bij dragers. Helaas bleek er een overlap te bestaan tussen patiënten met microscopisch bevestigde PCP en patiënten zonder (microscopisch bevestigde) PCP in termen van gevonden hoeveelheid *P. jiroveci* per ml BAL-vloeistof. Het was niet mogelijk om met behulp van deze retrospectieve studie een absoluut afkappunt te bepalen tussen ziekte en dragerschap.

Verbetering klinische toepasbaarheid *P. jiroveci* PCR op BAL

Verskillende strategieën zouden gebruikt kunnen worden om dit zogenaamde grijze gebied in de PCR te verkleinen. Een mogelijke strategie is het combineren van PCR resultaten met serologische indicatoren. Een tweetal bruikbare indicatoren zijn: serum lactate dehydrogenase (LDH) en β -D-glucan. LDH in BAL-vloeistof is zinvol gebleken in de differentiatie tussen infectieuze en niet-infectieuze aandoeningen³². Met name bij patiënten met PCP is LDH vaak verhoogd³³⁻³⁶. De studie van Zaman *et al.*³⁵ liet zien dat een serum LDH concentratie van 450 international units (IU) de aanwezigheid van PCP voorspelde in hun populatie. Quist *et al.*³³ onderzocht 42 patiënten met PCP, 71 met gedissemineerde tuberculose, 40 met longtuberculose en 37 met een

bacteriële pneumonie. De LDH concentraties waren significant hoger bij patiënten met PCP vergeleken met andere groepen. Helaas bleek er een overlap te zijn in het gemeten LDH bij patiënten met PCP en de andere drie groepen, waardoor de specificiteit gelimiteerd werd³³. Een recente retrospectieve studie uitgevoerd door Tasaka *et al.*³⁶ betrof 295 patiënten die een BAL ondergingen specifiek voor de diagnose PCP. Bij 57 patiënten werd PCP bevestigd op basis van microscopische bevindingen van gesedimenteerde BAL-vloeistof. Zij vonden dat serum LDH concentraties significant hoger waren bij patiënten met PCP in vergelijking met patiënten met andere longaandoeningen. Een tweede serologische marker die interessant zou kunnen zijn is β -D-glucan, een onderdeel van de celwand van schimmels. Deze marker wordt al gebruikt in de diagnostiek naar invasieve schimmelinfectie zoals candidemie en invasieve aspergillose (IA). Tasaka *et al.*³⁶ evalueerde het gebruik van β -D-glucan in serum in de diagnostiek naar PCP. Zij vonden dat bij gebruik van een afkappunt van 31.1 pg/ml β -D-glucan in serum, deze bepaling een sensitiviteit van 92.3% had met een specificiteit van 83.1%. In die populatie leidde dit tot een positief voorspellende waarde (PPV) van 0.61 en een negatief voorspellende (NPV) waarde van 0.98 voor de diagnose PCP. De relatief lage NPV zou verklaard kunnen worden door andere invasieve schimmels zoals *Candida* species of *Aspergillus* species. Een tekortkoming van deze studie is het feit dat ze een minder gevoelige methode (microscopie van gesedimenteerde BAL-vloeistof) als gouden standaard gebruiken. Vooral het gebruik van cytospin preparaten kan de gevoeligheid verbeteren. Zij gebruiken als argument dat microscopie een PPV en een NPV boven de 90% heeft. Echter, onze ervaring leert dat dit alleen bereikt kan worden door ervaren laboratoriummedewerkers. Tasaka *et al.*³⁶ geven aan dat ze geen PCR gebruiken om PCP te diagnosticeren in verband met het mogelijk detecteren van dragers. De combinatie van PCR en β -D-glucan zou juist erg interessant kunnen zijn. Onze hypothese is dat, aangezien er geen weefselschade is bij dragerschap, er waarschijnlijk geen (of slechts een lage concentratie) β -D-glucan aantoonbaar is in het perifere bloed. Een studie die kijkt naar de combinatie van β -D-glucan in serum (and BAL-vloeistof) en de PCR in BAL van patiënten met bewezen PCP, dragers en patiënten met een PCR resultaat binnen de grijze zone en patiënten zonder klachten is wenselijk. Deze studie zou bij kunnen dragen aan het verkleinen van de grijze zone van de PCR en de waarde van β -D-glucan binnen de diagnostiek naar PCP bevestigen.

Detectie van HSV-1 in BAL-vloeistof

In hoofdstuk 7 hebben we de klinische relevantie van een hoge herpes simplex virus lading proberen te ontrafelen. De twee subtypes van humaan herpes simplex virus, HSV-1 en HSV-2, hebben een hoge prevalentie en zijn alomtegenwoordig. HSV-1 is beschreven als een (zeldzame) oorzaak van een pneumonie bij immunogecompromitteerde patiënten^{37, 38}. Echter, de klinische relevantie van HSV-1 en -2 detectie in BAL-vloeistof is tot op heden onduidelijk. Een mogelijke relatie tussen de HSV-1 and -2 hoeveelheid in BAL-vloeistof en de klinische uitkomst is onderzocht. Onze data laten zien dat HSV-1 in ongeveer een derde van alle BAL-vloeistof monsters afgenomen bij intensive care patiënten aanwezig is. Bovendien laat onze studie zien dat een hoeveelheid HSV-1 in BAL-vloeistof $>10^5$ ge/ml een onafhankelijke voorspeller is van een slechte prognose bij intensive care patiënten, weergegeven in een toegenomen mortaliteit met 21%. De vraag is of hier een causaal verband is of dat er slechts sprake is van een marker van een ernstig verstoord immuunsysteem. Doordat de studie retrospectief werd uitgevoerd was het niet mogelijk om de invloed van aciclovir op de mortaliteit en morbiditeit te evalueren. De benodigde data voor het aantonen van een causaal verband zouden eventueel gegenereerd kunnen worden door middel van een prospectieve interventie studie die gebruik maakt van het afkappunt van 10^5 ge/ml BAL-vloeistof. Als er werkelijk een causaal verband is tussen de hoeveelheid HSV-1 en de prognose van de patiënt, is het de verwachting dat behandeling met aciclovir van patiënten met een hoeveelheid HSV-1 boven de 10^5 op zijn minst een reductie van de mortaliteit tot gevolg zou hebben.

Virale pneumonie

Natuurlijk is HSV niet het enige virus dat een pneumonie kan veroorzaken. Andere virussen die eenzelfde ziektebeeld kunnen veroorzaken^{3,39} zijn onder andere influenza virus A, B, para-influenza virus 1,2,3,4, cytomegalovirus, varicella zoster virus, coronavirus, human respiratory syncytial virus (RSV) en rhinovirus. De laatste jaren is er met name veel aandacht geweest voor het humaan metapneumovirus (hMPV) als oorzaak voor een pneumonie. hMPV is een paramyxovirus dat in 2001 werd ontdekt in Nederland⁴⁰. Een studie uitgevoerd door van den Hoogen *et al.*⁴⁰ omvatte monsters afgenomen via nasopharyngeale aspiratie bij 28 jonge kinderen (<5 jaar). Deze kinderen hadden allemaal symptomen van luchtweginfecties die sterk leken op de symptomen veroorzaakt door RSV. Epidemiologisch gezien was er geen verband tussen deze kinderen⁴⁰. De infectie lijkt een seizoensgebonden cyclus te volgen waarbij de meeste infecties gedurende de wintermaanden optreden

(vergelijkbaar met infecties veroorzaakt door RSV⁴¹). In de meeste studies wordt gebruik gemaakt van een reverse transcriptase PCR (RT-PCR) voor de detectie van hMPV RNA in respiratoire monsters⁴²⁻⁴⁵. Het is mogelijk om het virus te kweken, het groeit langzaam op tertiaire apeniercellen^{40, 43} en laat een slechte groei zien in Vero cellen en A549 cellen waarbij het cytopathogeen effect sterk lijkt op dat van RSV⁴⁰. Sinds de ontdekking van het virus zijn er verschillende publicaties verschenen betreffende zijn rol in luchtweginfecties bij jonge kinderen^{39,40,44,46}, ouderen⁴² en immuungecompromitteerde patiënten^{42,45}. Aangezien het virus in verschillende patiëntengroepen beschreven is, speelt het mogelijk ook een rol bij geïntubeerde patiënten op de intensive care. Tot nu toe is er slechts een studie gepubliceerd waarbij volwassen intensive care patiënten tot de studiepopulatie behoorden⁴³. De studie van Gray *et al.*⁴³ omvatte 1500 respiratoire monsters (75% afgenomen door middel van nasale lavage, slechts 10% was BAL-vloeistof) van 1294 patiënten. Met behulp van RT-PCR vonden ze 34 hMPV positieve patiënten. Tussen deze 34 patiënten waren ook 9 volwassen patiënten met verschillende onderliggende aandoeningen zoals maligniteiten (n=2), obstructieve bronchitis (n=2), bacteriële pneumonie (n=1), influenza (n=1) en respiratoir falen van onbekende origine (n=3). Een aantal patiënten opgenomen op onze intensive care afdeling ontwikkelden bijkomende respiratoire problemen tijdens beademing. Aangezien slechts 25-33% verklaard kon worden door een bacteriële infectie was onze hypothese dat een aantal gevallen geassocieerd zijn met een virale infectie. Om deze hypothese te toetsen zou gebruik gemaakt kunnen worden van een respiratoire multiplex PCR (inclusief hMPV) voor de opsporing van bijkomende virale oorzaken van de verslechtering van patiënten tijdens intensive care opname. Bovenstaande zou ook van toepassing kunnen zijn voor patiënten opgenomen op de hematologie-oncologie afdeling met tekenen van een luchtweginfectie. De analyse van BAL-vloeistof monsters afgenomen bij deze patiënten leidt vaak niet tot de identificatie van een oorzakelijk micro-organisme. Door hun onderliggende aandoening en bijbehorende therapie (chemotherapie) hebben deze patiënten vaak geen (functionele) granulocyten. Dit maakt ze extra vatbaar voor allerlei (long) infecties. Naast bacteriële en virale verwekkers en schimmels moet bij deze patiënten ook gedacht worden aan parasitaire infecties³. Het voordeel van een snelle en gevoelige methode voor de opsporing van deze micro-organismen is vooral duidelijk indien een behandeling voorhanden is. Een voorbeeld is *Aspergillus fumigatus*, deze schimmel is berucht vanwege het veroorzaken van levensbedreigende longinfecties bij immuungecompromitteerde patiënten⁴⁷ en zeldzaam ook in immunocompetente patiënten⁴⁸. Invasieve aspergillose (IA) wordt geassocieerd met een hoge mortaliteit die varieert van 30-80%^{49,50}. Dit is afhankelijk van de snelheid waarmee de diagnose gesteld wordt en de start van therapie. De diagnose IA is moeilijk aangezien klinische symptomen en radiologische

beelden vaak aspecifiek zijn. Tot op heden wordt de uiteindelijke diagnose histologisch gesteld⁵¹. Kweek van BAL-vloeistof of longbiopten is erg specifiek voor het aantonen van *Aspergillus* in de long, echter de gevoeligheid is erg laag (30-50%)⁵². De laatste jaren heeft de detectie van galactomannan, een onderdeel van de celwand van *A. fumigatus*, in BAL-vloeistof en serum een bijdrage geleverd aan een vroege diagnose van IA⁵³. PCR methodes voor de detectie van *A. fumigatus* in respiratoire monsters zijn ook beschreven in de literatuur^{54,55}. Tot op heden hebben studies die de *A. fumigatus* PCR vergelijken met de bepaling van galactomannan geleid tot tegenstrijdige resultaten. Becker *et al.*⁵⁶ maakte gebruik van een diermodel om IA te bestuderen. In hun studie bleek de kwantitatieve galactomannan superieur boven de PCR in zowel serum als BAL-vloeistof. Een studie uitgevoerd door Costa *et al.*⁵⁷ waarin de detectie van galactomannan vergeleken werd met de PCR in serum van patiënten liet vergelijkbare resultaten zien. De studie van Kami *et al.*⁵⁸ liet een hogere sensitiviteit en specificiteit zien voor de PCR in vergelijking met de galactomannan in serum van patiënten met IA. Elk van deze drie studies gebruikte dezelfde ELISA voor de detectie van galactomannan in hun monsters. De PCR methodes waren echter zeer verschillend. In een studie werd een conventionele PCR gebruikt⁵⁶, terwijl in de anderen gebruik werd gemaakt van een real-time PCR^{57,58}. De DNA isolatie, het target en de gebruikte apparatuur verschilden tussen de drie studies. Voor een deel zou dit de verschillende uitkomsten kunnen verklaren. De combinatie van een real-time PCR en de ELISA voor de detectie van galactomannan zou een toegevoegde waarde kunnen hebben in de IA diagnostiek.

BAL diagnostiek bij immuungecompromitteerde patiënten

Zoals eerder al gesteld werd, horen ook parasitaire aandoeningen van de luchtwegen in de differentiaal diagnose van luchtweginfecties bij immuungecompromitteerde patiënten. Een van de mogelijke verwekkers is *Toxoplasma gondii*. *T. gondii* is een intracellulaire parasiet die alomtegenwoordig is. Na de acute, bij immuuncompetente gastheren vaak asymptomatische, fase van infectie, blijven bradyzoïten aanwezig in het menselijk lichaam. Bij immuungecompromitteerde patiënten heeft de parasiet de neiging om te reacteren en een gedissemineerde ziekte te veroorzaken^{59,60}. Een longinfectie met *T. gondii* wordt geassocieerd met een mortaliteit boven de 50%⁶¹. De diagnose kan worden gesteld op een manier die vergelijkbaar is met de diagnostiek van *P. jiroveci*, namelijk door microscopische analyse van BAL-vloeistof⁶². Echter, aangezien de patiënten die risico lopen op een *T. gondii* infectie dezelfde zijn als de patiënten die tot de risicogroep voor PCP

behoren, hebben deze patiënten vaak al PCP profylaxe (co-trimoxazol). Co-trimoxazol is ook effectief tegen *T. gondii*, waardoor de hoeveelheid *T. gondii* aanwezig in BAL-vloeistof beïnvloed kan worden, net zoals de hoeveelheid *P. jiroveci* in BAL-vloeistof beïnvloed wordt. Deze invloed zou net voldoende kunnen zijn om de parasiet niet te kunnen detecteren door middel van microscopie, maar net onvoldoende om te beschermen tegen een gedissemineerde *T. gondii* infectie⁶³. Om de detectie van *T. gondii* in BAL-vloeistof te verbeteren zou het gebruik van een PCR nuttig kunnen zijn⁶⁴. Petersen *et al.*⁶³ bestudeerden 332 BAL-vloeistof monsters van 290 HIV positieve patiënten door middel van een real-time PCR. Zij vonden *T. gondii* DNA bij 7 patiënten, resulterend in een prevalentie van 2%. Aangezien toxoplasmosis niet alleen geschreven wordt bij HIV positieve patiënten, maar ook bij andere immuungecompromitteerde patiënten⁶⁵, zou de toevoeging van een *T. gondii* PCR in het diagnostische traject van BAL-vloeistof zinvol kunnen zijn. Om dit te evalueren zouden BAL-vloeistof monsters van immuuncompetente en immuungecompromitteerde patiënten (zowel HIV-positief als -negatief) onderzocht moeten worden op de aanwezigheid van *T. gondii* DNA door middel van een real-time PCR. Dit zou kunnen leiden tot een toename van gediagnosticeerde *T. gondii* longinfecties en daaropvolgende behandeling met hoge dosis co-trimoxazol.

Samenvattend

1. Object glaasjes gecoat met polylysine zijn niet superieur in vergelijking met conventionele niet-gecoate glaasjes in de opwerking van bronchoalveolaire lavage vloeistof.
2. Onder normale omstandigheden zijn reactieve pneumocyten type II niet aanwezig in bronchoalveolaire lavage vloeistof.
3. De aanwezigheid van reactieve pneumocyten type II is geassocieerd met aandoeningen waarbij er sprake is van een acute alveolaire schade zoals bij extrinsiek allergische alveolitis en drug-induced longaandoeningen, pneumocysten pneumonie en beademingspneumonie.
4. Antibioticatherapie gedurende de 72 uur voor afname van bronchoalveolaire lavage vloeistof beïnvloedt de voorspellende waarde van de cytologische parameters voor de microscopisch gestelde diagnose beademingspneumonie niet.
5. Van de cellen aanwezig in bronchoalveolaire lavage vloeistof is het percentage geïnfecteerde cellen de belangrijkste parameter voor de differentiatie tussen de aan- en afwezigheid van een beademingspneumonie.
6. Het beste afkappunt voor het percentage geïnfecteerde cellen is 2% indien gebruik wordt gemaakt van een gestandaardiseerde methode. Het combineren van het percentage geïnfecteerde cellen met andere parameters leverde geen verbetering op van de voorspellende waarden.
7. De drie verschillende in-house real-time polymerase ketting reactie testen voor de detectie van *P. jiroveci* ontwikkeld in de academische ziekenhuizen van Leiden, Nijmegen en Maastricht laten een uitstekende overeenkomst zien.
8. *P. jiroveci* kwantitatief bepaald door middel van real-time polymerase ketting reactie en microscopische kwantificatie leveren vergelijkbare resultaten op.
9. Op dit moment is een absoluut afkappunt voor differentiatie tussen ziekte en dragerschap van *P. jiroveci* niet te geven door aanwezigheid van een grijs gebied.
10. In 32% van alle bronchoalveolaire lavage vloeistof monsters afgenomen bij intensive care patiënten, wordt herpes simplex type 1 teruggevonden in de bronchoalveolaire lavage vloeistof met behulp van polymerase ketting reactie.
11. Een hoeveelheid herpes simplex type 1 in bronchoalveolaire lavage vloeistof boven 105 ge/ml is een onafhankelijke voorspeller voor een slechte prognose bij intensive care patiënten.

Voorstellen voor toekomstig onderzoek:

Dit proefschrift onderstreept de waarde van BAL-vloeistof in het diagnostisch traject van infectieuze longinfecties. Vooral de toevoeging van moleculaire methoden zal de diagnostische mogelijkheden en de sensitiviteit van BAL in de diagnostiek naar infectieziektes doen toenemen. Toekomstige studies zijn nodig om:

1. de bruikbaarheid van de humane TREM-1 Quantikine kit op bronchoalveolaire lavage vloeistof te valideren
2. de bruikbaarheid van de humane TREM-1 Quantikine kit te evalueren als voorspeller voor aan- of afwezigheid van een beademingspneumonie.
3. nieuw geïntroduceerde technieken te verfijnen zoals de *P. jiroveci* PCR, door het grijze gebied te verkleinen. Dit zou namelijk een verbetering van de klinische toepasbaarheid betekenen. Twee mogelijke strategieën zouden kunnen zijn:
 - a. de detectie van LDH in zowel bronchoalveolaire lavage vloeistof en serum.
 - b. de detectie van β -D-glucan in zowel bronchoalveolaire lavage vloeistof en serum
4. evaluatie van het herpes simplex type 1 polymerase ketting reactie afkappunt van 10^5 ge/ml in een prospectieve interventie studie.
5. evaluatie van de klinische toepasbaarheid van een respiratoire multiplex PCR (inclusief humaan metapneumovirus) bij patiënten met een respiratoire achteruitgang terwijl ze beademd worden op de intensive care.
6. evaluatie van de klinische toepasbaarheid van een respiratoire multiplex PCR (inclusief humaan metapneumovirus) bij patiënten opgenomen op de hematologie/oncologie afdeling met tekenen van een luchtweginfectie.
7. evaluatie van de combinatie van een *Aspergillus fumigatus* specifieke real-time polymerase ketting reactie en de enzyme-linked immuno sorbent assay voor de detectie van circulerende galactomannan in zowel BAL-vloeistof en serum van patiënten verdacht van een invasieve Aspergillose.
8. evaluatie van de klinische waarde van een *T. gondii* real-time polymerase ketting reactie op bronchoalveolaire lavage vloeistof van immuungecompromitteerde patiënten verdacht van een luchtweginfectie.

Concluderend, onderzoek van BAL-vloeistof is zeer waardevol in het diagnostisch traject van luchtweginfecties. Met name de toevoeging van moleculaire technieken voor virale pathogenen, schimmels en parasieten zal een toename opleveren van aangetoonde infecties. Dit zal vervolgens leiden een toename van de kosteneffectiviteit en een verbetering van de patiëntenzorg door gerichte therapie.

Referenties

1. Klech H, Hutter C. Side-effects and safety of BAL. *Eur Respir J.* 1990;3:939-40, 961-9.
2. Goldstein RA, Rohatgi PK, Bergofsky EH, Block ER, Daniele RP, Dantzker DR, Davis GS, Hunninghake GW, King TE, Metzger WJ. Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142:481-6.
3. Joos L, Chhajed PN, Wallner J, Battegay M, Steiger J, Gratwohl A, Tamm M. Pulmonary infections diagnosed by BAL: A 12-year experience in 1066 immunocompromised patients. *Respiratory medicine.* 2007;101:93-7.
4. Allaouchiche B, Jaumain H, Dumontet C, Motin J. Early diagnosis of ventilator-associated pneumonia. Is it possible to define a cutoff value of infected cells in BAL fluid? *Chest.* 1996;110:1558-65.
5. Baselski V. Microbiologic diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Infect Dis Clin North Am.* 1993;7:331-57.
6. Kirtland SH, Corley DE, Winterbauer RH, Springmeyer SC, Casey KR, Hampson NB, Dreis DF. The diagnosis of ventilator-associated pneumonia: a comparison of histologic, microbiologic, and clinical criteria. *Chest.* 1997;112:445-57.
7. Armbruster C, Pokieser L, Hassl A. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by bronchoalveolar lavage in AIDS patients. Comparison of Diff-Quik, fungifluor stain, direct immunofluorescence test and polymerase chain reaction. *Acta Cytol.* 1995;39:1089-93.
8. Baughman RP. Current Methods of Diagnosis. In: Walzer PD, editor. *Pneumocystis carinii pneumonia.* New York: Marcel Dekker, Inc. 1994:381-401.
9. Bigby TD, Margolskee D, Curtis JL, Michael PF, Sheppard D, Hadley WK, Hopewell PC. The usefulness of induced sputum in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1986;133:515-8.
10. Kovacs JA, Ng VL, Masur H, Leoung G, Hadley WK, Evans G, Lane HC, Ognibene FP, Shelhamer J, Parrillo JE. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *N Engl J Med.* 1988;318:589-93.
11. Turner D, Schwartz Y, Yust I. Induced sputum for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV patients: new data, new issues. *Eur Respir J.* 2003;21:204-8.
12. Fagon JY, Chastre J, Rouby JJ. Is bronchoalveolar lavage with quantitative cultures a useful tool for diagnosing ventilator-associated pneumonia? *Crit Care.* 2007;11:123.
13. A randomized trial of diagnostic techniques for ventilator-associated pneumonia. *N Engl J Med.* 2006;355:2619-30.
14. Jacobs JA, De Brauwier EI, Ramsay G, Cobben NA, Wagenaar SS, van der Ven AJ, Bruggeman CA, Drent M. Detection of non-infectious conditions mimicking pneumonia in the intensive care setting: usefulness of bronchoalveolar fluid cytology. *Respir Med.* 1999;93:571-8.
15. van Oostenbrugge RJ, Arends JW, Buchholtz R, Twijnstra A. Cytology of cerebrospinal fluid. Are polylysine-coated slides useful? *Acta Cytol.* 1997;41:1510-2.
16. Husain OA, Millett JA, Grainger JM. Use of polylysine-coated slides in preparation of cell samples for diagnostic cytology with special reference to urine sample. *J Clin Pathol.* 1980;33:309-11.
17. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:867-903.
18. Rello J, Ollendorf DA, Oster G, Vera-Llonch M, Bellm L, Redman R, Kollef MH. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. *Chest.* 2002;122:2115-21.
19. Timsit JF, Misset B, Goldstein FW, Vaury P, Carlet J. Reappraisal of distal diagnostic testing in the diagnosis of ICU-acquired pneumonia. *Chest.* 1995;108:1632-9.
20. Sirvent JM, Vidaur L, Gonzalez S, Castro P, de Batlle J, Castro A, Bonet A. Microscopic examination of intracellular organisms in protected bronchoalveolar mini-lavage fluid for the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Chest.* 2003;123:518-23.

21. Dotson RG, Pingleton SK. The effect of antibiotic therapy on recovery of intracellular bacteria from bronchoalveolar lavage in suspected ventilator-associated nosocomial pneumonia. *Chest*. 1993;103:541-6.
22. Duflo F, Debon R, Goudable J, Chassard D, Allaouchiche B. Alveolar and serum oxidative stress in ventilator-associated pneumonia. *Br J Anaesth*. 2002;89:231-6.
23. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol*. 2000;164:4991-5.
24. Gingras MC, Lapillonne H, Margolin JF. TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. *Mol Immunol*. 2002;38:817-24.
25. Colonna M, Facchetti F. Triggering receptor expressed on myeloid cells: role in the diagnosis of lung infections. *Eur Respir J*. 2004;24:247-50.
26. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature*. 2001;410:1103-7.
27. Gibot S, Cravoisy A, Levy B, Bene MC, Faure G, Bollaert PE. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. *N Engl J Med*. 2004;350:451-8.
28. Richeldi L, Mariani M, Losi M, Maselli F, Corbetta L, Buonsanti C, Colonna M, Sinigaglia F, Panina-Bordignon P, Fabbri LM. Triggering receptor expressed on myeloid cells: role in the diagnosis of lung infections. *Eur Respir J*. 2004;24:247-50.
29. Determann RM, Millo JL, Gibot S, Korevaar JC, Vroom MB, van der Poll T, Garrard CS, Schultz MJ. Serial changes in soluble triggering receptor expressed on myeloid cells in the lung during development of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med*. 2005;31:1495-1500.
30. Flori P, Belleste B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, Lucht F, Sung RT. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jiroveci* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *J Med Microbiol*. 2004;53:603-7.
31. Larsen HH, Huang L, Kovacs JA, Crothers K, Silcott VA, Morris A, Turner JR, Beard CB, Masur H, Fischer SH. A prospective, blinded study of quantitative touch-down polymerase chain reaction using oral-wash samples for diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in HIV-infected patients. *J Infect Dis*. 2004;189:1679-83.
32. Cobben NA, Jacobs JA, van Dieijen-Visser MP, Mulder PG, Wouters EF, Drent M. Diagnostic value of BAL fluid cellular profile and enzymes in infectious pulmonary disorders. *Eur Respir J*. 1999;14:496-502.
33. Quist J, Hill AR. Serum lactate dehydrogenase (LDH) in *Pneumocystis carinii* pneumonia, tuberculosis and bacterial pneumonia. *Chest*. 1995;108:415-8.
34. Silverman BA, Rubinstein A. Serum lactate dehydrogenase levels in adults and children with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex: possible indicator of B cell lymphoproliferation and disease activity. *Am J Med*. 1985;78:728-36.
35. Zaman MK, White DA. Serum lactate dehydrogenase levels and *Pneumocystis carinii* pneumonia. Diagnostic and prognostic significance. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137:796-800.
36. Tasaka S, Hasegawa N, Kobayashi S, Yamada W, Nishimura T, Takeuchi T, Ischizaka A. Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *Chest*. 2007;131:1173-80.
37. Byers RJ, Hasleton PS, Quigley A, Dennett C, Klapper PE, Cleator GM, Faragher EB. Pulmonary herpes simplex in burns patients. *Eur Respir J*. 1996;9:2313-7.
38. Arata K, Sakata R, Iguro Y, Toda R, Watanabe S, Eitsuru Y. Herpes simplex viral pneumonia after coronary artery bypass grafting. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;51:158-9.
39. Pierangeli A, Gentile M, Di Marco P, Pagnotti P, Scagnolari C, Trombetti S, Lo Russo L, Tromba V, Moretti C, Midulla F, Antonelli G. Detection and typing by molecular techniques of respiratory viruses in children hospitalized for acute respiratory infection in Rome, Italy. *J Med Virol*. 2007;79:463-8.
40. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RAM, Osterhaus ADME. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nature Medicine*. 2001;7:719-24.

41. Wilkesmann A, Schildgen O, Eis-Hubinger AM, Geikowski T, Glatzel T, Lentze MJ, Bode U, Simon A. Human metapneumovirus infections cause similar symptoms and clinical severity as respiratory syncytial virus infections. *Eur J Pediatr*. 2006;165:467-75.
42. Carr MJ, McCormack GP, Crowley B. Human metapneumovirus-associated respiratory tract infections in the Republic of Ireland during the influenza season of 2003-2004. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11:366-71.
43. Gray GC, Capuano AW, Setterquist SF, Erdman DD, Nobbs ND, Abed Y, Doern GV, Starks SE, Boivin G. Multi-year study of human metapneumovirus infection at a large US midwestern medical referral center. *J Clin Virol*. 2006;37:269-76.
44. Esper F, Martinello A, Boucher BA, Weibel C, Ferguson D, Landry ML. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. *J Infect Dis*. 2004;189:1388-96.
45. Englund JA, Broeckh M, Kuypers J, Nichols WG, Hackman RC, Morrow RA, Fredricks SDN, Corey L. Brief communication: fatal human metapneumovirus infection in stem-cell transplant recipients. *Ann Intern Med*. 2006;144:344-9.
46. Esper F, Boucher BA, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS. Human metapneumovirus infection in the United State: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics*. 2003;111:1407-9.
47. Soubani AO, Chandrasekar PH. The clinical spectrum of pulmonary Aspergillosis. *Chest*. 2002;121:1988-99.
48. Dijkman WM, Postma BH. Fatal invasive Aspergillosis in an apparently immunocompetent host. *Netherlands Journal of Critical Care*. 2006;10:536-7.
49. Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA. Epidemiology of Aspergillus infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis*. 1997;175:1459-66.
50. McWinney PH, Kibbler CC, Hamon MD, Smith OP, Gandhi L, Berger LA, Walesby RK, Hoffbrand AV, Prentice HG. Progress in the diagnosis and management of aspergillosis in bone marrow transplantation: 13 years' experience. *Clin Infect Dis*. 1993;17:397-404.
51. Ruhnke M, Bohme A, Buchheidt D, Donhuijsen K, Einsele H, Enzensberger R. Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology—guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). *Ann Hematol*. 2003;82(Suppl 2):S141-8.
52. Kahn FW, Jones JM, England DM. The role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Clin Pathol*. 1986;84:518-23.
53. Verweij PE, Stynen D, Rijs AJ, de Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1912-4.
54. Rantakokko-Jalava K, Laaksonen S, Issakainen J, Vauras J, Nikoskelainen J, Viljanen MK, Salonen J. Semiquantitative detection by real-time PCR of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluids and tissue biopsy specimens from patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4304-11.
55. Spiess B, Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Seifarth W, Zeifelder U, Leib-Mosch C, Morz H, Hehlmann R. Development of a LightCycler PCR assay for detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* DNA in clinical samples from neutropenic patients. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1811-8.
56. Becker MJ, de Marie S, Willemse D, Verbrugh HA, Bakker-Woudenberg IA. Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model. *J Clin Microbiol* 2000;38:1434-8.
57. Costa C, Costa JM, Desterke C, Botterel F, Cordonnier C, Bretagne S. Real-time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2002;40:2224-7.

58. Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, Kanda Y, Kashima, T, Yamazaki Y, Hamaki T, Mori AI, Akiyama H, Mutou Y, Sakamaki H, Osumi K, Kimura S, Hirai H. et al. Use of real-time PCR on blood samples for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 2001;33:1504-12.
59. Montoya JM, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004;363:1965-76.
60. Davis MA, Bottone EJ, Vlachos A, Burroughs MH. Unsuspected *Toxoplasma gondii* empyema in a bone marrow transplant recipient. *Clin Infect Dis*. 2002;34:e37-9.
61. Pomeroy C, Fillice GA. Pulmonary Toxoplasmosis: a review. *Clin Infect Dis*. 1992;14:863-70.
62. Bonilla CA, Rosa UW. *Toxoplasma gondii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: diagnosis by bronchoalveolar lavage. *Southern Medical Journal*. 1994;87:659-63.
63. Petersen E, Edvinsson B, Lundgren B, Benfeld T, Evengard B. Diagnosis of pulmonary infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised HIV-positive patients by real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25:401-4.
64. Aubert D, Foudrinier F, Villena I, Pinon JM, Biava MF, Renoult E. PCR for diagnosis and follow-up of two cases of disseminated toxoplasmosis after kidney grafting. *J Clin Microbiol*. 1996;34:1347.
65. Sing A, Leitritz L, Roggenkamp A, Kolb HJ, Szabados A, Fingerle V, Auterrieth IB, Heesemann J. Pulmonary Toxoplasmosis in bone marrow transplant recipients: report of two cases and review. *Clin Infect Dis*. 1999;29:429-33.