

Metody molekularne i immunologiczne stosowane w diagnostyce grzybic

Molecular and immunological methods applied in diagnosis of mycoses

Katarzyna Kuba

Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Katedra Biologii i Genetyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny, Pl. Gen. J. Hallera 1, 90-647 Łódź; E-mail: katarzynakuba@wp.pl

ABSTRACT. The diagnosis of fungal infections remains a problem for the management of fungal diseases, particularly in the immunocompromised patients. Systemic *Candida* infections and invasive aspergillosis can be a serious problem for individuals who need intensive care. Traditional methods used for the identification and typing of medically important fungi, such as morphological and biochemical analysis, are time-consuming. For the diagnosis of mycoses caused by pathogenic fungi faster and more specific methods, especially after the dramatic increase in nosocomial invasive mycoses are needed. New diagnostic tools to detect circulating fungal antigens in biological fluids and PCR-based methods to detect species or genus-specific DNA or RNA have been developed. Antigen detection is limited to searching only one genus. Molecular genetic methods, especially PCR analysis, are becoming increasingly important as a part of diagnostics in the clinical mycology laboratory. Various modifications of the PCR method are used to detect DNA in clinical material, particularly multiple, nested and real-time PCR. Molecular methods may be used to detection of nucleic acids of fungi in clinical samples, to identify fungal cultures at the species level or to evaluate strain heterogeneity differences within the species. This article reviews some of the recent advances in the possibility of molecular diagnosis of fungal infections.

Key words: PCR, fungal infections, identification, *Aspergillus*, *Candida*

W ciągu ostatnich kilkadziesiąt lat znacznie wzrosła liczba infekcji wywołanych przez grzyby chorobotwórcze. Grzybice powierzchniowe i układowe stały się zjawiskiem powszechnym. Według danych statystycznych prewalencja zarażeń grzybami u pacjentów po transplantacji szpiku kostnego zwiększyła się z 15% do 25% przypadków, a u pacjentów po transplantacji narządów wewnętrznych z 5% aż do 42% [1, 2].

Spośród szeregu czynników sprzyjających rozwojowi grzybic istotne znaczenie mają niedobory immunologiczne, wynikające zarówno z uwarunkowań genetycznych, jaki i wywołane przez różne czynniki etiologiczne. Szczególnie narażoną grupę na tego typu infekcje, stanowią pacjenci z chorobami autoimmunologicznymi, AIDS, białaczką limfo-

blastyczną lub szpikową [3–6]. Ponadto czynnikami sprzyjającymi powstawaniu grzybic są również: powszechne stosowanie antybiotyków o szerokim zakresie działania i leków steroidowych, obecność cewników w żyłę centralnej, żywienie pozajelitowe, ostra niewydolność nerek, cukrzyca i długotrwała hospitalizacja [7].

Grzybice uogólnione i układowe to zakażenia o szczególnie ciężkim przebiegu. Czynnikiem etiologicznymi tych infekcji są najczęściej grzyby z rodzajów *Candida* i *Aspergillus*, a także *Cryptococcus*, *Mucor*, *Rhizopus* i *Fusarium* [7–13]; grzyby te odgrywają również dużą rolę w zakażeniach wewnątrzszpitalnych i wywołują grzybice o szczególnie ciężkim przebiegu, zagrażające nie tylko zdrowiu, ale i życiu chorego. Dotyczą pacjentów ze

znacznie obniżoną odpornością, znajdujących się w stanie neutropenii, po zabiegach operacyjnych, przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych, transplantacji narządów wewnętrznych, czy chemioterapii. Oportunistyczne zarażenia grzybami cechuje wysoka śmiertelność, obejmująca nawet do 95–100% przypadków. Na podstawie danych statystycznych wykazano, że śmiertelność u pacjentów po transplantacji szpiku kostnego zakażonych grzybami z rodzaju *Candida* wynosi około 50%, a u pacjentów zakażonych *Aspergillus* – aż 90%. W przypadku grzybic inwazyjnych szybka diagnoza i rozpoczęcie leczenia przeciwgrzybiczego są czynnikami decydującymi o powodzeniu terapii.

Ciągłemu wzrostowi częstości zachorowań na grzybicę układową powinien towarzyszyć dynamiczny rozwój metod diagnostycznych, pozwalających na wczesne wykrycie i jednoznaczny identyfikację patogenu. Tradycyjne metody diagnostyczne, oparte głównie na analizie cech fenotypowych grzybów chorobotwórczych, nie zawsze spełniają stawiane przed nimi zadania i wymagają czasu. Skrócenie czasu oczekiwania na wyniki badania pozwoliłoby na wcześniejsze rozpoczęcie skutecznej i odpowiedniej terapii. Dlatego też, alternatywą dla tradycyjnych metod laboratoryjnej diagnostyki grzybic, powinny być metody molekularne, analizujące genotyp patogenów, co pozwala na dokładną identyfikację gatunków o dużej zmienności fenotypowej oraz umożliwia prowadzenie badań filogenetycznych i epidemiologicznych.

Techniki serologiczne, pozwalające na wykrycie antygenów i specyficznych przeciwciał w płynach ustrojowych, odgrywają niezwykle istotną rolę w badaniach laboratoryjnych i często wspomagają nowoczesne metody molekularne.

Metody immunologiczne

W diagnozowaniu grzybic pomocne są testy serologiczne, szczególnie wykrywające antygeny grzybów, np. we krwi, w surowicy, w popłuczynach płęcherzykowo-oskrzelikowych – BAL (ang. bronchoalveolar lavage) lub w płynie mózgowo-rdzeniowym, w ostrym okresie zakażenia. Idealny marker antygenowy, stosowany w tego typu badaniach, powinien być trwały, swoisty tylko dla grzybów i pozwalać na odróżnienie zakażenia od kolonizacji, która często ma miejsce w przypadku grzybów z rodzaju *Candida* [7].

Galaktomannan – polisacharydowy antygen, składnik ściany komórkowej grzybów z rodzaju

Aspergillus służy jako marker stosowany do diagnozowania grzybic układowych wywołanych przez ten patogen. Wykryto go po raz pierwszy w roku 1979 w surowicy i moczu pacjentów z inwazyjną aspergilozą. Jest on uwalniany podczas wzrostu grzyba [14]. Poziom galaktomannanu można określić już przy bardzo niskim stężeniu w surowicy, moczu, popłuczynach oskrzelowo-płęcherzykowych pacjentów z zakażeniami narządowymi i/lub fungemią. Galaktomannan jest wykrywany w znacznie niższym stężeniu w moczu (0,5 ng/ml) niż w surowicy (1,0 ng/ml). Powstało wiele testów komercyjnych do wykrywania tego antygeny, np. test aglutynacji lateksowej, radioimmunologiczny (RIA) i immunoenzymatyczny ELISA, których czułość waha się między 65–100%, a specyficzność wynosi od 81% do 100% [15–17].

Rogers i wsp. [18] wykorzystali dwa różne testy ELISA do badań pacjentów z neutropenią, która była następstwem leczenia białaczki lub przeszczepu szpiku. U 18-stu z 19-stu pacjentów z płucną, inwazyjną aspergilozą, wykryto obecność galaktomannanu w surowicy i moczu. Pozytywne wyniki potwierdzające obecność tego antygeny otrzymano u 11-stu z 13-stu pacjentów, zanim na podstawie testów klinicznych potwierdzono u nich infekcje grzybicze. Na podstawie uzyskanych rezultatów czułość powyższych testów immunoenzymatycznych oszacowano na 95%, a ich specyficzność na 99–100%.

Mannan jest powierzchniowym polimerem mannozy, obecnym w ścianie grzybów z rodzaju *Candida* sp. uwalnianym podczas wzrostu grzyba. Może on być wykrywany w płynach ustrojowych pacjentów, w ilościach kilku ng/ml. Jest to antygen wysoce immunogeny dla człowieka [19–21]. Do jego wykrywania służą między innymi testy: radioimmunologiczny, aglutynacji lateksowej, immunoenzymatyczny i immunoelektroforetyczny [22–24]. Inne antygeny grzybicze wykrywane w przypadku inwazyjnej kandydozy to: 1,3-β-D-glukan, chityna oraz enolaza [7].

Enolaza jest wysoce immunogenym białkiem grzybów, o masie 48-kDa wykrywany zarówno w cytoplazmie, jak i ścianie komórkowej *C. albicans* [25, 26]. Walsh i wsp. [27] wykorzystali z powodzeniem test immunoenzymatyczny, stwierdzający obecność tego antygeny w surowicy pacjentów, u których wcześniej potwierdzono inwazyjną kandydozę. Czulość tej metody wynosiła 54%.

Do poszukiwania krążących antygenów grzybów z rodzaju *Candida*, *Aspergillus* i *Cryptococcus* obecnie używane są komercyjnie dostępne testy:

Pastorex® Candida, *Pastorex® Aspergillus* i *Pastorex® Krypto-Plus*. Wszystkie one oparte są na teście aglutynacji lateksowej i wykrywają antygeny powierzchniowe grzybów chorobotwórczych w zakresie od 2,5 ng/ml do 50 ng/ml. Testy immunoenzymatyczne o większej czułości (*Platelia® Candida* i *Platelia® Aspergillus*) pozwalają na oznaczenie odpowiednio mannanu w ilości 0,5 ng/ml i galaktomannanu w ilości 1 ng/ml.

W diagnostyce inwazyjnej kandydozy wykorzystywane są różne przeciwciała monoklonalne, takie jak np.: AF1, które rozpoznają oligosacharyd wspólny dla wielu mannoprotein różnych grzybów z rodzaju *Candida*, z wyjątkiem *C. krusei* [28], a także 3H8, które rozpoznają tylko mannoproteinę dla *C. albicans* [29] i EBCA1 wykrywające mannan i mannoproteiny różnych gatunków *Candida* – wykorzystywane w testach *Pastorex® Candida* i *Platelia® Candida* (Bio-Rad, France) [30].

Pastorex® Aspergillus – test aglutynacji lateksowej pozwala na wykrywanie galaktomannanu, wykorzystując do tego celu przeciwciała monoklonalne EB-A2. Jednakże przy oznaczeniu antygeny w surowicy pobranej od 79 pacjentów z neutropenią, z nowotworami układu krwiotwórczego, w 18 przypadkach inwazyjnej aspergilozy zdiagnozowanej metodami tradycyjnymi, test *Pastorex* miał czułość tylko około 39% i specyficzność 95% [31]. W innych badaniach porównano dwa testy *Pastorex® Aspergillus* i test ELISA *Platelia® Aspergillus* badając próbki surowicy uzyskane od 22 pacjentów po transplantacji szpiku kostnego. Otrzymane wyniki potwierdziły, że czułość i specyficzność testów wynosiła odpowiednio 40 i 94% dla *Pastorex® Aspergillus* oraz 60 i 82% dla *Platelia® Aspergillus* [32].

Przeciwciała przeciwko antygenom grzybów chorobotwórczych wykrywane są u pacjentów, u których choroba ma przebieg przewlekły. W celu wykrycia przeciwciał przeciw antygenom grzybów z rodzaju *Candida* i *Aspergillus* stosowane są między innymi testy: aglutynacji lateksowej, wiązania dopełniacza, immunoenzymatyczne.

Warto pamiętać, że metody serologiczne dają często wyniki fałszywie ujemne, spowodowane niedoskonałością stosowanych testów, a także diagnozowaniem osób z obniżoną odpornością, które nie wytwarzają wykrywalnej ilości przeciwciał; wówczas wynik negatywny nie zawsze wyklucza rozpoznanie zakażenia grzybiczego. Częsty kontakt z grzybami chorobotwórczymi powoduje, że wielu pacjentów ma wcześniej wytworzone przeciwciała

przeciw antygenom niektórych grzybów. Pokrewieństwo antygenowe nie tylko między grzybami, ale także między bakteriami i grzybami powoduje, że uzyskane wyniki mogą być fałszywie dodatnie. Niestabilność antygenów obecnych w płynach ustrojowych stwarza konieczność kilkukrotnego powtórzenia badania (pojedynczy test jest niewystarczający i nie daje pełnego obrazu przebiegu choroby). Wartość diagnostyczna metod opartych na wykrywaniu antygenów lub przeciwciał w badaniach mikologicznych jest stale kwestionowana. Techniki serologiczne ze względu na częste wyniki fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne są tylko pomocne w diagnostyce inwazyjnych zakażeń grzybiczych i powinny być wykonywane równoległe z innymi badaniami.

Obecnie metody wdrażane do codziennej diagnostyki inwazyjnych zakażeń grzybiczych oparte są na wykrywaniu i analizie DNA i RNA grzybów w materiale klinicznym lub służą do identyfikacji wyhodowanych z materiałów grzybów.

Markery molekularne wykorzystywane w diagnostyce mikologicznej

Techniki takie, jak np. hybrydyzacja kwasów nukleinowych z zastosowaniem znakowanych sond genetycznych i metody amplifikacji materiału genetycznego są fundamentalne dla diagnostyki molekularnej. Bazą dla metod diagnostycznych jest reakcja łańcuchowa polimerazy PCR, opisana po raz pierwszy w 1983 roku. Metody te charakteryzują się względną prostotą wykonania, wysoką czułością i specyficznością, w przeciwieństwie do metod serologicznych, umożliwiają wykrycie i również identyfikację czynnika etiologicznego choroby, niezależnie od stanu odporności chorego. Technika PCR, prowadzona w warunkach *in vitro*, wzorowana jest na procesie replikacji odbywającej się w żywych komórkach. W metodzie tej próbki mogą być testowane bezpośrednio i w porównaniu do tradycyjnych metod identyfikacji, grzyby nie wymagają wcześniejszej izolacji i hodowli. W zależności od wybranej pary starterów można amplifikować dowolny fragment DNA mikroorganizmu. Wydajność samej reakcji uzależniona jest od różnych warunków, w jakich przebiega cały proces, takich jak składniki mieszaniny reakcyjnej, temperatura i czas. Różnorodne metody genotypowania wykorzystywane do scharakteryzowania różnych gatunków grzybów opierają się na technice amplifikacji materiałów genetycznych grzybów. Klasyczna metoda PCR doczekała się wielu modyfikacji [7, 33, 34].

W badaniach molekularnych niewiele technik pozwala na analizowanie całego materiału genetycznego wyizolowanego z komórek patogenu. Analiza całego genomu wykorzystywana jest w badaniach nad zmiennością genetyczną grzybów chorobotwórczych, techniką RFLP (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism) lub RAPD – (ang. Random Amplification Polymorphism DNA). Natomiast częściej analizuje się zmienność poszczególnych sekwencji nukleotydowych wybranych regionów markerowych genomu. W genomie grzybów znajdują się regiony konserwatywne oraz zmienne odznaczające się wysokim zróżnicowaniem pomiędzy poszczególnymi gatunkami, a nawet szczepami. W badaniach mających na celu ustalenie taksonomicznych i filogenetycznych powiązań grzybów, oceniane są sekwencje dla rybosomalnego DNA (rDNA), które występują we wszystkich organizmach w dużej ilości kopii, co ułatwia ich wykrywanie techniką PCR i zwiększa czułość samej reakcji.

Do najczęściej stosowanych markerów molekularnych należą operony rDNA, a także niektóre regiony mitochondrialnego DNA (mtDNA). W rDNA występują zarówno regiony wysoce konserwatywne i sekwencje o wysokiej zmienności genetycznej jak np. rozdzielające regiony niekodujące ITS (ang. Internal Transcribed Spacer Regions). Zarówno jedne, jak i drugie, wykorzystywane są w diagnostyce i typowaniu grzybów chorobotwórczych i są obecnie molekularnym standardem do typowania genetycznego grzybów [35]. Fragmenty genomu mitochondrialnego – 16S rDNA – wykorzystywane są również jako markery genetyczne do identyfikowania poszczególnych gatunków. Mitochondrialne DNA jest niewielkie, łatwe do izolacji, wysoce konserwatywne i nie podlega rekombinacji genetycznej. Dziedziczy się w prosty sposób co sprawia, że jest doskonałym markerem do określenia wzajemnego pokrewieństwa między grzybami chorobotwórczymi [36]. Dodatkowo w diagnostyce układowej kandydozy lub aspergilozy jako matryca często stosowana jest sekwencja kodująca białka szoku termicznego HSP 90. Inne fragmenty genomu stosowane jako markery to sekwencje kodujące dla aktyny, demetylasy lanosterolu C19, podjednostki dehydrogenazy NADH i oksydazy cytochromowej – oraz geny dla: syntazy chitynowej, zasadowej proteazy, enolazy [7, 37].

Multiplex PCR

Kolejną odmianą techniki PCR wykorzystywa-

ną w diagnostyce grzybic układowych jest niezwykle obiecujący multiplex PCR. Bardzo korzystną właściwością tej reakcji jest możliwość zastosowania nie jednej, a kilku par starterów jednocześnie, co pozwala na amplifikację różnych odcinków DNA. Amplifikacja równoczesna PCR skraca czas wymagany do przebadania większych obszarów genomu. Umożliwia jednoczesne zastosowanie kilku par starterów dla różnych gatunków grzybów chorobotwórczych w jednej próbce, co pozwala na lepszą i szybszą identyfikację. Warunkiem tej metody jest zastosowanie starterów o wysokiej specyficzności gatunkowej. Startery takie można opracować w oparciu o niekodujące regiony genomu o wysokim polimorfizmie i z wysoką swoistością identyfikować grzyby chorobotwórcze. Opracowano startery uniwersalne dla DNA wszystkich grzybów. Dzięki temu możliwe jest odróżnienie zakażeń grzybiczych od zakażeń wywołanych przez wirusy i bakterie. Z powodzeniem wykonano multiplex PCR z wykorzystaniem w jednej próbce jednocześnie trzech par specyficznych gatunkowo starterów dla *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* oraz *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* i *Cryptococcus neoformans*. Dzięki multiplex PCR, można zidentyfikować w dwóch reakcjach amplifikacji sześć różnych gatunków grzybów patogennych (klasyczna reakcja PCR pozwala na wykrywanie najczęściej tylko jednego gatunku). Często jednak wynik wymaga potwierdzenia hybrydyzacją z sondą genetyczną, co dodatkowo wydłuża czas oczekiwania na wynik i zwiększa koszty badania [38]. Metoda ta wykorzystywana jest do identyfikacji zakażeń grzybiczych. Multiplex PCR pozwala swoiście i znacznie szybciej niż klasyczny PCR identyfikować czynnik etiologiczny.

Nested PCR

W metodzie nested PCR – zagnieżdżony, zlokalizowany lub zazębiony PCR – analiza PCR przeprowadzona jest w dwóch następujących po sobie amplifikacjach. W pierwszym etapie reakcji stosuje się parę starterów zewnętrznych, najczęściej o niskiej specyficzności gatunkowej, pozwalających na powielenie fragmentu markerowego DNA patogenu. Następnie produkt PCR z pierwszego etapu jest poddawany kolejnej rundzie amplifikacji z drugą parą starterów oligonukleotydowych, o dużej specyficzności gatunkowej, które przyłączają się do miejsc wewnątrz fragmentu amplifikowanego przez pierwszą parę starterów. Jeśli podczas pierwszej

rundy PCR powstają pewne niespecyficzne produkty, zastosowanie „nested” PCR powinno zapewnić amplifikację z tylko pożądanego produktu. Technika ta znacznie podwyższa czułość i swoistość badania [39]. Dla przykładu w badaniach prowadzonych przez Burgener-Kairuz i wsp., czułość wykrywania infekcji grzybiczych techniką nested PCR była 1000 razy wyższa niż czułość reakcji PCR z zastosowaniem pojedynczej pary starterów [37]. Dzięki nested PCR możliwa jest amplifikacja wybranego fragmentu DNA patogenu, co pozwala na różnicowanie gatunków, a nawet szczepów grzybów chorobotwórczych obecnych w badanym materiale. Technikę tę wykorzystano do testu o wysokiej czułości, służącego do wykrywania *Cryptococcus neoformans* w płynie mózgowo-rdzeniowym [40]. Nested PCR zastosowano też do zbadania 175 próbek surowicy pobranych od 37 pacjentów po transplantacji szpiku kostnego, z podejrzeniem inwazyjnej aspergilozy. Jako marker wybrano region D1-D2 dużej podjednostki rybosomalnej *Aspergillus*. Pozytywne wyniki testu uzyskano w 18 przypadkach [41]. Biorąc pod uwagę zwiększoną czułość, metodę nested PCR stosuje się do wykrywania i identyfikacji patogenu bezpośrednio w materiale klinicznym. Dzięki zastosowaniu dla pierwszej pary starterów jako markera sekwencji genu dla topoizomerazy II, wspólnej dla grzybów z rodzaju *Candida*, *Aspergillus* i *Penicillium*, a następnie specyficznych gatunkowo starterów dla tejże topoizomerazy, udało się zróżnicować różne gatunki *Aspergillus* [42].

RT-PCR Reverse Transcription (odwrotna reakcja PCR)

Reakcje PCR zaadoptowano również do amplifikacji sekwencji RNA, takich jak mRNA poprzez RT-PCR (reverse transcription). Oryginalnie procedura ta opiera się na przepisywaniu wyjściowego RNA na cDNA, prowadzonej przez enzym odwrotną transkryptazę i poprzedza amplifikację przez polimerazę *Taq*. Obecnie wykonuje się bezpośrednią amplifikację RNA, w obecności jonów magnezu, przez pojedynczy enzym polimerazy (*Tht*) z *Thermus thermophilus*, mającej jednocześnie aktywność odwrotnej transkryptazy i polimerazy DNA. Produktem reakcji są dwuniciowe odcinki cDNA, kopie RNA. RT-PCR jest wysoce czułą metodą, pozwalającą na wykrywanie i przybliżone analizowanie bardzo małych ilości specyficznego RNA, takich jak wcześniej niewykrywalne rzadkie transkrypty. Po-

nadto, ilościową odmianę RT-PCR stosuje się do mierzenia ekspresji genu. Przy pomocy RT-PCR z zastosowaniem jako markerów sekwencji ALS (ang. agglutinin-like sequence), potwierdzono kandydozę jamy ustnej spowodowaną przez *Candida albicans* u pacjentów HIV-pozytywnych. Zaobserwowano ekspresję wszystkich genów ALS swoich dla *C. albicans* w materiale klinicznym pobranym z jamy ustnej zbadanych [43].

Metoda analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA (RFLP; ang. Restriction Fragment Length Polymorphism)

Metody molekularnej diagnostyki i epidemiologii w większości opierają się na analizie polimorfizmu wyznaczonych markerów genetycznych. W technice tej uzyskane w czasie reakcji PCR amplicony są poddawane działaniu enzymów restrykcyjnych, które posiadają zdolność rozpoznawania i cięcia DNA w punktach o określonej sekwencji nukleotydowej. W następstwie po rozdziale elektroforetycznym uzyskujemy tzw. wzór restrykcyjny. Technika RFLP pozwala na analizę sekwencji polimorficznych i swoiste mapowanie genetyczne, w zależności od konserwatywności lub zmienności wybranego do amplifikacji fragmentu DNA. Jest przydatna w typowaniu wewnątrzgatunkowym grzybów, lub odróżnieniu od siebie gatunków blisko spokrewnionych, u których występują jedynie subtelne różnice fenotypowe. Przykładem takich gatunków są *Candida albicans* i *Candida dubliniensis*, które można odróżnić przy pomocy techniki RFLP z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego *BlnI*. Wcześniej zamplifikowany region ITS *Candida dubliniensis* jest poddawany trawieniu enzymem restrykcyjnym *BlnI*, natomiast region ITS *Candida albicans* nie ulega trawieniu przez ten enzym. Metoda ta pozwala w łatwy sposób odróżnić patogeny nie różniące się znacznie cechami genotypowymi, a jednak należące do różnych gatunków i posiadających różną wrażliwość na leki (np. flukonazol) [44]. Także inne gatunki grzybów z rodzaju *Candida* mogą być rozróżniane techniką RFLP, na podstawie różnic w budowie i wielkości regionów niekodujących w obrębie rDNA. Dla *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* i *C. stellatoidea* amplicony poddawane były trawieniu endonukleazami *Dde I* i *Bfa I*. Na podstawie otrzymanego wzoru RFLP możliwa była klasyfikacja grzybów do poziomu gatunku. *C. glabrata*, *C. guilliermondii* i *C.*

pseudotropicalis zidentyfikowano na podstawie wielkości amplikonu po reakcji PCR. W przypadku tych grzybów, nie wymagana była dalsza analiza enzymami restrykcyjnymi [45].

Technika RAPD (ang. Randomly Amplified Polymorphic DNA) lub AD-PCR Losowy – random PCR. Analiza losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA (RAPD)

W przeciwieństwie do klasycznej metody PCR technika ta umożliwia amplifikowanie fragmentów DNA, które mają niezdefiniowaną długość i sekwencję; pozwala ona na amplifikację PCR genomowego DNA z pojedynczą, krótką, arbitralną sekwencją nukleotydową, najczęściej o długości 10–20 nukleotydów. Zastosowanie jednego startera, zamiast dwóch, opiera się na założeniu, że w genomie występują odwrócone sekwencje powtórzone. Zakłada się występowanie sekwencji typu odwróconych powtórzeń w takiej odległości od siebie (300 do 1500 par zasad) w genomie, która pozwoli na wydajną amplifikację. Sekwencja starterowa przyłączana jest do matrycy w niskiej temperaturze annelingu (około 36°C) co umożliwia hybrydizację starterów do sekwencji o niepełnej homologii i doprowadza do wytworzenia wielu produktów PCR. Po rozdiale elektroforetycznym uwidaczniane są w postaci wzoru prążków charakterystycznych dla każdego badanego szczepu. Przed wykonaniem samego oznaczenia nie wymagana jest dokładna znajomość genomu lub poszukiwanej sekwencji DNA, co jest zaletą tej metody. Znalazła ona zastosowanie w określaniu stopnia pokrewieństwa między organizmami [39]. Trzyście szczepów grzybów z rodzaju *Candida*, wyizolowanych z cewników, moczu i ran operacyjnych pacjentów, oznaczano przy pomocy RAPD-PCR z wykorzystaniem 15 starterów. Wcześniej szczepy zidentyfikowano metodami tradycyjnymi; testem na wytwarzanie chlamydospor i filamentów. Z powodzeniem, przy pomocy obydwu metod – tradycyjnej i molekularnej, oznaczane grzyby zaliczono do: *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. parapsilosis*. Dodatkowo analiza genomowego DNA z wykorzystaniem RAPD-PCR wykazała niewielki polimorfizm analizowanych fragmentów, wystarczający do odróżnienia poszczególnych szczepów tego samego gatunku, otrzymanych z różnych materiałów klinicznych [46].

Metoda nazywana jest także arbitralną (samowolną) metodą PCR (AP-PCR – ang. Arbitrarily Primed PCR) i amplifikacją DNA odcisku palca

(DAF; ang. DNA Amplification Fingerprinting). Wykorzystywana jest ona w badaniach epidemiologicznych stosowanych w przypadkach szpitalnych infekcji grzybiczych, w celu określenia ich transmisji. Prowadzone są również badania pozwalające na wskazanie nowo powstających opornych szczepów grzybów podczas terapii przeciwgrzybiczej, a także ocenę ich mikroewolucji wewnątrz poszczególnych gatunków.

AFLP (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism)

Inną techniką PCR służącą do oznaczania śladowych ilości DNA i mapowania genetycznego jest technika AFLP łącząca trawienie enzymami restrykcyjnymi z reakcją PCR. Procedura ta pozwala na wysoce skuteczną amplifikację fragmentów DNA wybieranych losowo z fragmentów restrykcyjnych. W tej technologii, genomowy DNA jest najpierw trawiony restrykcyjnymi endonukleazami, a następnie olinukleotydy adaptorowe są wiązane do końców fragmentów restrykcyjnych. Częsteczki te służą jako miejsca wiązania staterów podczas amplifikacji PCR. Dopiero wówczas przeprowadzana jest amplifikacja PCR z użyciem staterów, które obejmują sekwencje adaptora. Ilość amplikonów w profilu AFLP może być zmieniana poprzez wykorzystywanie różnych kombinacji endonukleaz. Zamplifikowane fragmenty są analizowane poprzez elektroforezę w żelu poliakrylamidowym, tworząc określony wzór. Na podstawie oceny pokrewieństwa szczepów można wykreślić dendrogram. Technika AFLP pozwala na ocenianie różnorodności genetycznej na różnych etapach taksonomii.

Badania przeprowadzone tą metodą objęły 77 szczepów pochodzących z rodzajów: *Candida*, *Geotrichum*, *Rhodoturula* i *Cryptococcus*, wyizolowanych z jamy ustnej, pochwy, okrężnicy, krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego pacjentów, a także z prób środowiskowych, pobranych z wody i gleby. Szczepy identyfikowano biochemicznie (API32), oznaczano techniką AFLP, poprzez trawienie genomowego DNA przez dwa enzymy restrykcyjne (BamHI i PstI). Do otrzymanych po trawieniu fragmentów restrykcyjnych wiązano fragmenty adaptorowe, służące jako miejsce wiązania dla staterów w czasie dalszych etapów amplifikacji PCR. Jeden z wiązanych starterów znakowany był poprzez barwnik fluorescencyjny. Dalsza analiza przeprowadzana była na żelu poliakrylamidowym z użyciem komputerowego programu narzędziowego – GelCompar II

(Applied Matys, Sint-Martens-Latem, Belgium). Badanie metodą AFLP wykazało różnice między różnymi grzybami (zarówno gatunkami, jak i rodzajami). Analiza metodą AFLP wydaje się być dobrym narzędziem do identyfikacji i typowania drożdży [47].

Technika PCR-EIA (ang. Enzyme Immunoassay)

Jest to metoda trójetapowa, immunoenzymatyczna, obejmująca również amplifikację PCR, hybrydyzację z komplementarną wyznakowaną sondą i wykrywanie produktu przy pomocy metod kolorymetrycznych lub fluorescencyjnych. Czułość PCR-EIA w wykrywaniu kandydemii i aspergilozy była wyższa, gdy wykorzystywano do znakowania bromek etydyny [48]. Ostatnio do znakowania używa się znakowanych biotyną swoistych gatunkowo sond oligonukleotydowych dla *C. albicans* [49]. W innych badaniach, wykorzystano PCR-EIA do różnicowania i identyfikacji grzybów z rodzaju *Aspergillus*. Zastosowano startery dla regionu ITS2 rDNA i sondy znakowane digoksygeniną lub biotyną. W badaniach laboratoryjnych udało się z powodzeniem zidentyfikować i odróżnić od siebie siedem najczęściej występujących u pacjentów i ważnych z medycznego punktu widzenia gatunków *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. ustus* i *A. versicolor*). Dodatkowo oznaczono tą metodą DNA grzybów, wyizolowane z tkanek eksperymentalnie zakażonego królika. Metoda jest szybka i prosta w wykonaniu, co sprawia, że może być stosowana do wykrywania inwazyjnej aspergilozy w materiałach klinicznych [50].

Reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (ang. Real-time PCR)

Przełomowym wydarzeniem w dziedzinie ilościowego PCR było opracowanie w roku 1992 przez Higuchiego i wsp. [51] reakcji PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym; jest ona najbardziej obiecującą z obecnie stosowanych odmian PCR. Służy do pomiaru ilościowego kopii genu w genomie wirusów, bakterii oraz grzybów lub poziomu ekspresji RNA w komórkach i tkankach [51]. Ilość kopii badanej cząsteczki jest monitorowana w każdym cyklu reakcji amplifikacji. W reakcji tej do środowiska wprowadza się startery lub sondy oligonukleotydowe znakowane cząsteczkami

zdolnymi do fluorescencji (fluorochromami). W amplikonach fluorochrom uwolniony z sondy, w wyniku jej degradacji enzymatycznej polimerazą endonukleazową, daje emisję światła. Podstawą do obliczenia ilości badanych cząsteczek obecnych na początku reakcji jest liczba cykli reakcji PCR, po których poziom fluorescencji przekroczy określony próg (moment wejścia kinetyki reakcji w fazę logarytmicznego przyrostu ilości produktu). Technika ta, bazując na konwencjonalnej metodzie PCR, pozwala na monitorowanie ilości produktu reakcji w każdym cyklu prowadzonej reakcji PCR, dzięki czemu cała procedura analizy jest bardzo szybka i pozwala wyeliminować etap szacowania produktu po zakończeniu reakcji. Umożliwia ona także wgląd w kinetykę reakcji, a co za tym idzie pozwala na oszacowanie ilości produktu na starcie reakcji, co jest niemożliwe w konwencjonalnej metodzie PCR. Ponadto dzięki temu, że amplifikacja kwasów nukleinowych i detekcja produktu odbywa się w jednym zamkniętym naczyniu, ryzyko zanieczyszczenia badanej próby jest minimalne. Technika Real-time PCR wymaga zastosowania specjalnie przystosowanego do tego celu termocyklera, który sprzężony jest z spektrofluorymetrem umożliwiającym pomiar fluorescencji w trakcie trwania reakcji. Do wzbudzania fluorochromów używa się lampy, diody elektroluminescencyjnej lub lasera. Lampy emitują światło o szerokim zakresie długości fal, podczas gdy laser o wąskim spektrum. Detektory mogą posiadać filtry, dzięki którym wykrywana i mierzona jest tylko jedna długość fali. Teoretyczne zasady techniki PCR zakładają, że ilość produktu po zakończeniu reakcji powinna być wykładniczo proporcjonalna do początkowej puli analizowanej sekwencji w badanej próbce przed reakcją (podwajana w każdym cyklu reakcji PCR). W praktyce obserwuje się niewielkie różnice w ilościach powstałych produktów końcowych ze względu na osiągnięcie plateau w kinetyce reakcji. Spowodowane jest to zużyciem starterów i nukleotydów, spadkiem aktywności polimerazy oraz konkurencją pomiędzy starterami a produktem o matrycę [39, 52].

Pierwszymi znakowanymi fluorescencyjnie sondami użytymi w Real-time PCR były sondy TaqMan (ang. TaqMan probes, 5'-nuclease probes; Perkin-Elmer Corp., Applied Biosystem, Foster City, California). Są to krótkie oligonukleotydy zawierające na końcu 5' reporter fluorescencji (np. FAM, NED), a na końcu 3' cząsteczkę wygaszającą fluorescencję (np. TAMRA, DABCYL). Wielkość sondy (odpowiednia odległość między reporterem na

jednym jej końcu, a wygaszaczem na drugim) umożliwia przekazywanie energii między fluorochromami. Sonda taka po związaniu się z komplementarną sekwencją na etapie wydłużania jest degradowana przez polimerazę Taq posiadającą aktywność 5'-egzonukleazową, przez co fluorochrom ulega oddzieleniu od wygaszacza. Rozdział obu cząsteczek indukuje emisję światła fluorescencyjnego. Udowodniono, że TaqMan PCR jest techniką detekcji dziesięciokrotnie czulszą niż tradycyjna metoda elektroforezy agarozowej z użyciem bromku etydyny. TaqMan PCR pozwala na oznaczenie różnych gatunków grzybów, w tym z rodzaju *Candida*, a także *A. fumigatus* [53, 54].

Inną techniką służącą do pomiarów ilościowych kopii genu jest LightCycler (Roch Diagnostics, Germany). Technologia ta wykorzystywana jest w diagnostyce zakażeń wywołanych przez drobnoustroje, w tym również grzyby chorobotwórcze i umożliwia wykrywanie dwóch lub więcej niezależnych produktów w tym samym czasie w jednej próbce. Technika ta wykorzystuje znakowane fluorescencyjnie pojedyncze lub podwójne sondy do wykrycia amplifikowanej sekwencji w genomie patogenu. Znako- wane sondy przyłączane są do komplementarnych sekwencji DNA i dzięki emitowanemu przez cząsteczki fluorochromu światłu można, w danym momencie, kontrolować ilość powstałych kopii poszukiwanych sekwencji DNA genomu grzybów. Natężenie światła jest proporcjonalne do ilości badanych sekwencji na końcu poprzedniego cyklu reakcji. Przykładem zastosowania tej metody jest jednogodzinny test wykrywania *Candida albicans* i *Candida dubliniensis* w próbkach krwi z wykorzystaniem Smart Cyklera. Technika ta pozwala na odróżnienie występujących u pacjentów z obniżoną odpornością dwóch oportunistycznych patogenów, które trudno jest zróżnicować tradycyjnymi metodami biochemicznymi, ponieważ posiadają one prawie identyczny fenotyp. Przeprowadzono więc Real-time PCR z wykorzystaniem gatunkowo specyficznych sond i Smart Cyklera. Mierzono sygnał fluorescencji emitowany przez sondę w momencie rozpoczęcia każdego z etapu przyłączania. Specyficzność state- rów wykazano testując DNA z 67 szczepów *Candida* należących do 24 gatunków. Amplifikacje obserwowano tylko dla DNA z *C. albicans* i *C. dubliniensis*. Czulość testu Real-time PCR wynosiła około 10 kopii genomu dla wszystkich szczepów *Candida*. Obydwa gatunki grzybów z rodzaju *Candida* można łatwo różnicować już na poziomie detekcji, odpowiadającej w przybliżeniu 20 CFU/ml (Colony For-

ming Units – Liczba Jednostek Tworzących Kolo- nie) [55]. Ilościowy PCR jest metodą szybką, nie- zwykle czułą i specyficzną oraz w pełni zautomaty- zowaną, charakteryzującą się dużą swoistością; za- pewnia specyficzne gatunkowo wykrywanie grzy- bów, np. *C. albicans* i *A. fumigatus*. Reakcja PCR przeprowadzana jest w zamkniętych, szklanych ka- pilarach, co znacznie minimalizuje możliwość prze- niesienia zanieczyszczeń. Czas wystarczający do przeprowadzenia całego procesu to 45 minut. Wszy- stkie te cechy pozwalają na wykorzystanie tej tech- niki w przyszłych badaniach klinicznych [56].

Grzyby z rodzaju *Candida* i *Aspergillus* identyfi- kowano za pomocą Real-time LightCycler. Zastoso- wano sekwencje starterowe i sondy komplementar- ne do sekwencji DNA dla genu 18S rRNA różnych patogenów. Przeanalizowano 1650 prób pobranych od pacjentów, głównie krew i materiał uzyskany z biopsji od pacjentów z podejrzeniem grzybicy in- wazyjnej. W 144 (6,9%) przypadkach uzyskano wy- niki pozytywne; w tym 5,3% stanowiły grzyby z ro- dzaju *Candida*, a 1,7% – *Aspergillus* (wszystkie próbki kliniczne oznaczano tą techniką do poziomu gatunku). Większość grzybów chorobotwórczych wykrywano z czułością 2 CFU/ml krwi, natomiast specyficzność testów wynosiła 100%. Real-time PCR pozwala na wykrywanie i identyfikację grzy- bów chorobotwórczych w warunkach *in vivo* i *in vitro* [57].

Podsumowanie

Wzrastającą częstość zakażeń układowych grzy- bami chorobotwórczymi u pacjentów ze znacznie obniżoną odpornością skłania badaczy do poszuki- wania nowych technik diagnostycznych opartych o biologię molekularną. Liczne badania naukowe udowodniły przydatność metod, takich jak techniki PCR oraz badań serologicznych w diagnostyce in- wazyjnych zakażeń grzybiczych. Techniki te stwa- rzają możliwość wykorzystania różnego materiału, co zwiększa możliwość prawidłowej diagnozy. Obok surowicy i krwi badany jest mocz, płyn mózgowo-rdzeniowy, płwocina i popłuczyny pę- cherzykowo-oskrzelowe, a także inne materiały bio- logiczne. Dodatkową zaletą tych metod jest niewiel- ka ilość materiału potrzebna do badań. Coraz czę- ściej w laboratoriach mikologicznych do rutynowej diagnostyki grzybic układowych wprowadzane są metody molekularne, które charakteryzują się więk- szą czułością w porównaniu z metodami konwen- cjonalnymi oraz znacznie skracają czas oczekiwania

na rozpoznanie. Należy jednak pamiętać, że metody te posiadają również wady i ograniczenia. Często PCR daje wyniki fałszywie ujemne, mimo przypisywanej jej wysokiej czułości. Wykorzystanie tych technik znacznie ogranicza ciągły brak standaryzacji metod i mała ich dostępność. Nie ma do tej pory ustalonych jasnych i wspólnych kryteriów diagnostycznych w zakresie wyboru najlepszej metody molekularnej stosowanej powszechnie w laboratoriach diagnostycznych. Brak jest również ujednoczenia metody izolacji DNA grzybów wykorzystywanej w diagnostycznych badaniach rutynowych. Nie bez znaczenia pozostaje źródło z jakiego pochodzi materiał pobrany do badania i jego rodzaj. Przykładem mogą być badania Bougnouxa i wsp. [58], przeprowadzone na próbkach krwi i surowicy, porównujące w nich czułość reakcji PCR. Okazało się, że częściej wykrywano tą metody kandydemie w surowicy, niż w pełnej krwi.

Nadal nie wybrano określonych i jednakowych markerów molekularnych do wykrywania czynników etiologicznych grzybic. Standardem obecnie jest analiza regionów ITS, choć wciąż poszukuje się także innych markerów. Brak też ogólnych i ujednoczonych zasad sposobu interpretacji uzyskanych wyników u chorych z niedoborami immunologicznym. Ogromna czułość samej metody jest zarówno jej zaletą, jak i wadą. Techniki PCR w badaniach klinicznych daje czasem wynik fałszywie dodatnie, ponieważ często dochodzi do kontaminacji próbek. Dotyczy to szczególnie grzybów z rodzaju *Aspergillus*, których źródłem zarażenia jest często czynnik egzogenny, a zarodniki występują powszechnie w powietrzu.

Techniki molekularne wymagają wciąż poparcia ich wyników klasycznymi metodami, takim jak badania fenotypu patogenu, jego profilu biochemicznego. W wielu doniesieniach autorzy zalecają zastosowanie kilku różnych technik diagnostycznych: morfologicznych, serologicznych i molekularnych w celu potwierdzenia uzyskanych tymi metodami wyników [7, 34].

Literatura

- [1] Paya C.V. 1993. Fungal infection in soil-organ transplantation. *Clinical Infection Diseases* 16: 677–688.
- [2] Viscoli C., Castagnola E. 1999. Emerging fungal pathogens, drug resistance and the role of lipid formulations of amphotericin B in the treatment of fungal infections in cancer patients: a review. *International Journal of Infectious Diseases* 3 (2): 109–118.
- [3] Barnes R.A., Denning D.W., Evans E.G., Hay R.J., Kibbler C.C., Prentice A.G., Richardson M.D., Roberts M.M., Rogers T.R., Speller D.C., Warnock D.W., Warren R.E. 1996. Fungal infections: a survey of laboratory services for diagnosis and treatment. *Communicable Disease Report CDR Review* 26: 69–75.
- [4] Coleman D.C., Rinaldi M.G., Haynes K.A., Rex J.H., Summerbell R.C., Anaissie E.J., Li A., Sullivan D.J. 1998. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Medical Mycology* 36: 156–165.
- [5] Dasbach, E.J., Davies G.M., Teutsch S.M. 2000. Burden of aspergillosis – related hospitalizations in the United States. *Clinical Infection Diseases* 31: 1524–1528.
- [6] Mitchell T.G., Perfect J.R. 1995. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical Microbiology Reviews* 8: 515–548.
- [7] Lee SA, Wong B. 2004. Advances in diagnostic methods for invasive *Candida* and *Aspergillus* infections. In: *The Mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research*. (Eds. J. Dörmel, G. Kobayashi). vol. 12. Springer: 37–64.
- [8] Holmes A.R., Cannon R.D., Shepherd M.G., Jenkinson H.F. 1994. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 228–231.
- [9] Aoki F.H., Imai T., Tanaka R., Mikami Y., Taguchi H., Nishimura N.F., Nishimura K., Miyaji M., Schreiber A.Z., Branchini M.L. 1999. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 315–320.
- [10] Jaeger E.E., Carroll N.M., Choudhury S., Dunlop A.A., Towler H.M., Matheson M.M., Adamson P., Okhravi N., Lightman S. 2000. Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 2902–2908.
- [11] Nagao K., Ota T., Tanikawa A., Takae Y., Mori T., Udagawa S., Nishikawa T. 2005. Genetic identification and detection of human pathogenic *Rhizopus* species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of rRNA gene. *Journal of Dermatological Sciences* 39: 23–31.
- [12] Hope W.W., Walsh T.J., Denning D.W. 2005. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *The Lancet Infectious Diseases* 5: 609–622.
- [13] Machouart M., Larché J., Burton K., Collomb J., Maurer P., Cintrat A., Biava M.F., Greciano S., Kuijpers A.F., Contet-Audonneau N., de Hoog G.S., Gérard A., Fortier B. 2006. Genetic identification of the main opportunistic Mucorales by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Journal of Clinical*

- Microbiology* 44: 805–810.
- [14] Reiss E., Lehmann P.F. 1979. Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. *Infection and Immunity* 25: 357–365.
- [15] Verweij P.E., Latgé J.P., Rijs A.J., Melchers W.J., De Pauw B.E., Hoogkamp-Korstanje J.A., Meis J.F. 1995. Comparison of antigen detection and PCR assay using bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in patients receiving treatment for hematological malignancies. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 3150–3153.
- [16] Rohrlisch P., Sarfati J., Mariani P., Duval M., Carol A., Saint-Martin C., Bingen E., Latge J.P., Vilmer E. 1996. Prospective sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for serum galactomannan: early predictive value and clinical use in invasive aspergillosis. *Pediatric Infectious Disease Journal* 15: 232–237.
- [17] Sulahian A., Tabouret M., Ribaud P., Sarfati J., Gluckman E., Latgé J.P., Derouin F. 1996. Comparison of an enzyme immunoassay and latex agglutination test for detection of galactomannan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15: 139–145.
- [18] Rogers T.R., Haynes K.A., Barnes R.A. 1990. Value of antigen detection in predicting invasive pulmonary aspergillosis. *Lancet* 336: 1210–1213.
- [19] Fukazawa Y. 1989. Antigenic structure of *Candida albicans*. Immunochemical basis of the serologic specificity of the mannans in yeasts. *Immunology Series* 47: 37–62.
- [20] Herent P., Stynen D., Hernando F., Fruit J., Poulain D. 1992. Retrospective evaluation of two latex agglutination tests for detection of circulating antigens during invasive candidosis. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 2158–2164.
- [21] Pfaller M.A., Cabezudo I., Buschelman B., Bale M., Howe T., Vitug M., Linton H.J., Densel M. 1993. Value of the hybritech ICON *Candida* assay in the diagnosis of invasive candidiasis in high-risk patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 16: 53–60.
- [22] Meckstroth K.L., Reiss E., Keller J.W., Kaufman L. 1981. Detection of antibodies and antigenemia in leukemic patients with candidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Infectious Diseases* 144: 24–32.
- [23] Bennett J.E. 1987. Rapid diagnosis of candidiasis and aspergillosis. *Reviews of Infectious Diseases* 9: 398–402.
- [24] De Repentigny L. 1992. Serodiagnosis of candidiasis, aspergillosis, and cryptococcosis. *Clinical Infection Diseases* 14, Suppl 1: 11–22.
- [25] Mason A.B., Brandt M.E., Buckley H.R. 1989. Enolase activity associated with a *C. albicans* cytoplasmic antigen. *Yeast* 5: 231–239.
- [26] Angiolella L., Facchin M., Stringaro A., Maras B., Simonetti N., Cassone A. 1996. Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. *Journal of Infectious Diseases* 173: 684–690.
- [27] Walsh T.J., Hathorn J.W., Sobel J.D., Merz W.G., Sanchez V., Maret S.M., Buckley H.R., Pfaller M.A., Schaufele R., Sliva C. 1991. Detection of circulating *Candida* enolase by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis. *The New England Journal of Medicine* 324: 1026–1031.
- [28] De Bernardis F., Girmenia C., Boccanera M., Adriani D., Martino P., Cassone A. 1993. Use of a monoclonal antibody in a dot immunobinding assay for detection of a circulating mannoprotein of *Candida* spp. in neutropenic patients with invasive candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 3142–3146.
- [29] Marcilla A., Monteagudo C., Mormeneo S., Sentandreu R. 1999. Monoclonal antibody 3H8: a useful tool in the diagnosis of candidiasis. *Microbiology* 145: 695–701.
- [30] Jacquinet P.M., Plancke Y., Sendid B., Strecker G., Poulain D. 1998. Nature of *Candida albicans*-derived carbohydrate antigen recognized by a monoclonal antibody in patient sera and distribution over *Candida* species. *FEMS Microbiology Letters* 169: 131–138.
- [31] Manso E., Montillo M., De Sio G., D'Amico S., Discipoli G., Leoni P. 1994. Value of antigen and antibody detection in the serological diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 13: 756–760.
- [32] Machetti M., Feasi M., Mordini N., Van Lint M.T., Bacigalupo A., Latgé J.P., Sarfati J., Viscoli C. 1998. Comparison of an enzyme immunoassay and a latex agglutination system for the diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation* 21: 917–921.
- [33] Chen S.C., Halliday C.L., Meyer W. 2002. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Medical Mycology* 40: 333–357.
- [34] Atkins S.D., Clark I.M. 2004. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of Applied Genetics* 45: 3–15.
- [35] White, T.J., Bruns T., Lee S., and Taylor J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (Eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White). Academic Press Inc., New York: 315–322.
- [36] Miyakawa Y., Mabuchi T., Kagaya K., Fukazawa Y. 1992. Isolation and characterization of a species-specific DNA fragment for detection of *Candida albicans* by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 894–900.
- [37] Burgener-Kairuz P., Zuber J.P., Jaunin P., Buchman

- T.G., Bille J., Rossier M. 1994. Rapid detection and identification of *Candida albicans* and *Torulopsis (Candida) glabrata* in clinical specimens by species-specific nested PCR amplification of a cytochrome P-450 lanosterol-alpha-demethylase (L1A1) gene fragment. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 1902–1907.
- [38] Luo G., Mitchell T.G. 2002. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 2860–2865.
- [39] Balajee S.A., Sigler L., Brandt M.E. 2007. DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century. *Medical Mycology* 45: 475–490.
- [40] Rappelli P., Are R., Casu G., Fiori P.L., Cappuccinelli P., Aceti A. 1998. Development of a nested PCR for detection of *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 3438–3440.
- [41] Williamson E.C., Leeming J.P., Palmer H.M., Steward C.G., Warnock D., Marks D.I., Millar M.R. 2000. Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. *British Journal of Haematology* 108: 132–139.
- [42] Kanbe T., Yamaki K., Kikuchi A. 2002. Identification of the pathogenic *Aspergillus* species by nested PCR using a mixture of specific primers to DNA topoisomerase II gene. *Microbiology and Immunology* 46: 841–848.
- [43] Green C.B., Marretta S.M., Cheng G, Faddoul F.F., Ehrhart E.J., Hoyer L.L. 2006. RT-PCR analysis of *Candida albicans* ALS gene expression in a hyposalivatory rat model of oral candidiasis and in HIV-positive human patients. *Medical Mycology* 44: 103–111.
- [44] Mirhendi H., Makimura K., Zomorodian K., Maeda N., Ohshima T., Yamaguchi H. 2005. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using a single-enzyme PCR-RFLP method. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 58: 235–237.
- [45] Williams D.W., Wilson M.J., Lewis M.A., Potts A.J. 1995. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2476–2479.
- [46] Valério H.M, Weikert-Oliveira Rde C., Resende M.A. 2006. Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. *The Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39: 174–178.
- [47] Kantardjiev T, Levterova V., Panaiolov S., Ivanov I. 2004. Use of amplified fragment length polymorphism analysis as a tool for identification and typing of yeast isolates. *Mikologia Lekarska* 11: 113–117.
- [48] Fujita S., Lasker B.A., Lott T.J., Reiss E., Morrison C.J. 1995. Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from *Candida* species in blood. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 962–967.
- [49] Wahyuningsih R., Freisleben H.J., Sonntag H.G., Schnitzler P. 2000. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3016–3021.
- [50] Aguirre L., Hurst S.F., Choi J.S., Shin J.H., Hinrikson H.P., Morrison C.J. 2004. Rapid differentiation of *Aspergillus* species from other medically important opportunistic molds and yeasts by PCR-enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 3495–3504.
- [51] Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. 1992 Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 10: 413–417.
- [52] Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömbom L., Stahlberg A., Zoric N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 95–125.
- [53] Brandt M.E., Padhye A.A., Mayer L.W., Holloway B.P. 1998. Utility of random amplified polymorphic DNA PCR and TaqMan automated detection in molecular identification of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 2057–2062.
- [54] Reiss E., Tanaka K., Bruker G., Chazalet V., Coleman D., Debeaupuis J.P., Hanazawa R., Latgé J.P., Lortholary J., Makimura K., Morrison C.J., Murayama S.Y., Naoe S., Paris S., Sarfati J., Shibuya K., Sullivan D., Uchida K., Yamaguchi H. 1998. Utility molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Medical Mycology* 36: 249–257.
- [55] Trépanier H., Jean V., Boily M.J., Clairoux N., Boissinot M., Picard F.J., Roy P.H., Ouellette M., Bergeron M.G. 2001. One-hour detection of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in blood samples using the smart cycler. (Poster; 101st General Meeting, ASM, May 2001, Orlando, FL).
- [56] Loeffler J., Henke N., Hebart H., Schmidt D., Hagemeyer L., Schumacher U., Einsele H., 2000. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 586–590.
- [57] Klingspor L., Jalal S. 2006. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection* 12: 745–753.
- [58] Bougnoux M., Dupont C., Mateo J., Saulnier P., Favre V., Payen D., Nicolas-Chanoine M. 1999. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 925–930.