

Έγκαιρη διαφορική διάγνωση  
γενών μυκηλιακών μυκήτων  
με περιοριστικές πέψεις  
επί προϊόντος αλυσιδωτής αντίδρασης  
πολυμεράσης ειδικού για μύκητες

Μ.Ε. Καμπούρης,  
Α. Βελεγράκη,  
Ν.Ι. Λεγάκης

Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Κέντρο  
Αναφοράς Μυκητιάσεων,  
Κλινικοεργαστηριακός Τομέας,  
Ιατρική Σχολή, Εθνικό  
και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**ΣΚΟΠΟΣ** Η αυξητική τάση των μυκητιάσεων που οφείλονται σε νηματοειδείς μύκητες και η δυσχέρεια στην αντιμετώπισή τους δημιουργούν την ανάγκη για έγκαιρη και ακριβή μεθοδολογία διαφορικής διάγνωσης αυτών σε πρώιμα στάδια. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Εξελήχθη, κατόπιν τούτου, μοριακή μεθοδολογία διαφορικής διάγνωσης βασισμένη σε υπάρχοντα πρωτόκολλα απομόνωσης μυκητιακού DNA από κλινικά υλικά, η οποία έκανε χρήση ειδικής PCR με εναρκτές ITS-1, ITS-4 και περιοριστικών πέψεων στο προκύπτον προϊόν ενίσχυσης. Χρησιμοποιήθηκαν κλινικής και περιβαλλοντικής προέλευσης στελέχη από τα είδη *A. fumigatus*, *A. carneus*, *A. terreus*, *P. viridicatum*, *F. oxysporum*, *F. solanii* και από τα γένη *Acremonium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Βρέθηκε ότι συνδυασμένες αλλά όχι ταυτόχρονες πέψεις του προϊόντος ITS-1/4 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Eco RI*, *Msp I*, *Hinf I*, *Hae III* διαχώριζαν αξιόπιστα τους εξετασθέντες μύκητες, με βάση τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα, στο επίπεδο του γένους και σπανιότερα στο επίπεδο του είδους. Ακολούθως, προσδιορίστηκε η ειδική ευαισθησία της μεθόδου σε 20 κονίδια ανά mL ολικού αίματος με ενοφθαλμισμό προτυποποιημένου εναιωρήματος κονιδίων *A. fumigatus* σε συγκεκριμένο όγκο ολικού αίματος και πέψη του προϊόντος PCR ITS-1/4 (που προέκυψε μετά την απομόνωση του μυκητιακού DNA) με την ενδονουκλεάση *Eco RI*.

Differential diagnosis  
of filamentous fungi by unitary  
digestion of polymerase  
chain reaction products

Abstract at the end of the article

**Λέξεις ευρητηρίου**

Διαγνωστική PCR  
Μυκηλιακοί μύκητες  
Περιοριστικές πέψεις

Η αύξηση του αριθμού των ατόμων με ανοσολογικό έλλειμμα οφείλεται τόσο σε επιβαρυντικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, όσο και σε προόδους της ιατρικής πράξης, που έχουν αυξήσει αισθητά το προσδόκιμο ζωής των ατόμων αυτών. Το αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση νέων μικροοργανισμών, που παλαιότερα δεν είχαν ανιχνευθεί ως παθογόνοι, και η αύξηση της συχνότητας παθογόνων παραγόντων που μέχρι πρότινος θεωρούνταν σπάνιοι.<sup>1-10</sup> Οι νηματοειδείς μύκητες είναι γενικά προαιρετικά παράσιτα με ιδιαίτερη προτίμηση σε

ανοσοανεπαρκή άτομα,<sup>11,12</sup> χωρίς να εξαιρούνται και πρωτοπαθώς παθογόνα είδη, όπως το *P. marneffeii*.<sup>13</sup> Τα διάφορα είδη και γένη μυκηλιακών μυκήτων επιδεικνύουν επιμέρους διαφορές ως προς την κινητική της λοίμωξης, αλλά και εξαιρετική επιθετικότητα, που οδηγεί σε εν τω βάθει και διάχυτες λοιμώξεις με ταχύτατη πρόοδο και γενικά κακή πρόγνωση.<sup>11</sup> Επίσης, λόγω των παχέων και ανθεκτικών κυτταρικών τοιχωμάτων τους η χημειοθεραπευτική αντιμετώπισή τους είναι αρκετά δυσχερής και καθίσταται ακόμα δυσχερέστερη από το

Έπαινος  
Έπαθλο «Σωτήρης Παπασταμάτης» 2000

γεγονός ότι μερικά γένη και είδη παρουσιάζουν απρόβλεπτα ισχυρές αντοχές σε αντιμυκητιακά σκευάσματα αλλά και παράγοντες.<sup>14-16</sup> Για τους λόγους αυτούς, απαιτείται η ταχύτατη ανίχνευση της μυκητιακής παρουσίας στον ασθενή, αλλά και η ακριβέστερη δυνατή ταυτοποίηση του μύκητα, προκειμένου να χορηγηθεί εξαρκής το πλέον κατάλληλο σχήμα σε δόση εφόδου, πρακτική που περιορίζει τον απαιτούμενο χρόνο θεραπείας, εξοικονομεί οικονομικούς πόρους και επιβαρύνει λιγότερο τον πάσχοντα.<sup>17,18</sup>

Η ταυτοποίηση με μοριακές μεθόδους έχει το πλεονέκτημα της έγκαιρης και ταχείας ανίχνευσης, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας που τις διακρίνει και του σχετικά μικρού χρόνου που απαιτείται για τις αντίστοιχες αντιδράσεις, σε σύγκριση με τις καλλιέργειες. Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ακόμα η δυνατότητα διαφορικής ερμηνείας, με σκοπό την επίτευξη ταυτοποίησης, του σήματος που προκύπτει από την τεχνική η οποία διαγιγνώσκει τη μυκητιακή παρουσία. Καθώς παλαιότερα αναπτύχθηκε παρόμοια τεχνική,<sup>19</sup> για αξιόπιστη διαφορική ανίχνευση του γένους *Aspergillus* σε βιολογικά υγρά, επιχειρήθηκε η εξέλιξή της ώστε να διαφοροποιεί μυκηλιακούς μύκητες που ανήκουν σε διάφορες ταξινομικές βαθμίδες, με τους ελάχιστους δυνατούς κινδύνους διασταυρούμενων αποτελεσμάτων και με έμφαση στη διακριτική ικανότητα και στην ευαισθησία. Προκειμένου να μην υπάρξουν αυτοπαρεμβολές στη μέθοδο από πιθανά ίχνη εποικιστών μικροοργανισμών, τα πειράματα έγιναν με καθαρά καλλιιεργήματα μυκήτων και με δεδομένη την άποψη απόδοση πρωτοκόλλων και μεθόδων<sup>19,20</sup> που έχουν ήδη αναπτυχθεί και μπορούν να εφαρμοστούν για απομό-

νωση μυκητιακού DNA από βιολογικά υγρά, ώστε να χρησιμοποιηθεί σε παρόμοια μεθοδολογία.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Χρησιμοποιήθηκαν καθαρά καλλιιεργήματα μυκήτων κλινικής και περιβαλλοντικής προέλευσης, αλλά και πρότυπα στελέχη, όπως αναφέρονται στον πίνακα 1. Οι μύκητες επωάστηκαν στους 37 °C για 3 ημέρες σε ζωμό YEPD [10 g εκχύλισμα Ζύμης (Yeast Extract-Difco, Mi, USA), 20 g μυκητολογικής πεπτόνης (Mycoreptone-Oxoid, UK), 20 g D-γλυκόζης (Serva, Germany)]. Τα μυκήλια σε μορφή τάπητα συλλέχθηκαν, τοποθετήθηκαν σε σωλήνες μικροφυγοκέντρου, λυοφιλοποιήθηκαν και φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος, μέχρι την κατεργασία.<sup>19</sup> Η κατεργασία και απομόνωση του DNA ακολουθήθηκε από αλυσιδωπή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) με εναρκτές ITS-1/2, ITS-3/4, ITS-1/4, όπως έχει ήδη περιγραφεί.<sup>19</sup> Όλα τα ζεύγη χρησιμοποιήθηκαν με την αυτή ποσότητα DNA-στόχου και στις ίδιες συνθήκες αντίδρασης. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 2% κεχρωσμένο με βρωμιούχο αιθίδιο και σε περίπτωση ύπαρξης επαρκούς οπτικού σήματος, ποσότητες του προϊόντος επωάζονταν με περιοριστικές ενδονουκλεάσες *Msp* I, *Hae* III, *Hinf* I και *Eco* RI, σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή.<sup>19</sup> Κάθε αντίδραση περιοριστικής πέψης γινόταν μόνο με ένα ένζυμο. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% ή 3% για αξιολόγηση των προτύπων πέψης σε σύγκριση με μάρτυρα μεγεθών (πλασμιδίο pBR-322 που έχει επωαστεί με ενδονουκλεάση *Msp* I).

Για τον καθορισμό της ευαισθησίας της μεθόδου ενοφθαλμίστηκαν σε ολικό αίμα υγιούς δότη κονίδια *A. fumigatus* σε μορφή προτυποποιημένου εναιωρήματος (ποσοτικός προσδιορισμός με καταμέτρηση μονάδων σχηματισμού

**Πίνακας 1.** Προέλευση και αριθμός χρησιμοποιηθέντων στελεχών.

Είδος	Αριθμός στελεχών	Περιβαλλοντικά	Κλινικά	Πρότυπα	Συλλογή	Κωδικοί
<i>A. fumigatus</i>	10	2	6	2	IMI	016030, 048340
<i>A. carneus</i>	2	1		1	IMI	343705
<i>A. terreus</i>	1	1				
<i>P. viridicatum</i>	1	1				
<i>Penicillium</i> sp	3	3				
<i>F. oxysporum</i>	1		1			
<i>F. solanii</i>	1		1			
<i>Mucor</i> sp	1	1				
<i>Rhizopus</i> sp	1	1				
<i>Acremonium</i> sp	1	1				
<i>Trichoderma</i> sp	2	2				
<i>Paecilomyces</i> sp	1	1				

αποικιών σε τρυβλία SDA [10 g μυκητολογικής πεπτόνης (Mycoreptone-Oxoid, UK), 20 g D-γλυκόζη (Serva, Germany), 10 g άγαρ (Serva, Germany)] επωασμένα για 24–36 ώρες στους 37 °C. Σε τρία διαφορετικά σωληνάρια μικροφυγοκέντρου, έκαστο με 250 mL ολικού αίματος, ενοφθαλμίστηκαν, αντίστοιχα, 5, 10 και 20 κονίδια. Το DNA εκχυλίστηκε με τη μέθοδο της CTAB, όπως έχει ήδη δημοσιευθεί,<sup>20</sup> για να ακολουθήσει η διαδικασία ενίσχυσης με PCR ITS-1/4 και επώαση με ενδονουκλεάση *Eco* RI, που δίνει ευκρινές και χαρακτηριστικό πρότυπο για τον εν λόγω μύκητα.<sup>19</sup> Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης, κατά τα προηγούμενα.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι εναρκτές ITS-1/4 αποδείχθηκαν αξιόπιστοι, καθώς ενίσχυαν το DNA όλων των χρησιμοποιηθέντων μυκήτων. Αντίθετα, είναι γνωστό<sup>19</sup> ότι δεν ενίσχυαν DNA ανθρώπου ούτε βακτηρίων. Υπήρξε μία και μοναδική περίπτωση όπου μύκητας δεν έδινε προϊόν με τους εναρκτές ITS-1/4. Ήταν το πρότυπο στέλεχος του *A. carneus* (IMI-343705), το οποίο σε επανειλημμένες

απομονώσεις δεν έδωσε προϊόν ενίσχυσης με εναρκτές ITS-1/4 (εικ. 1). Καθώς αλληλουχίες αυτού του είδους είναι αδύνατο να μην υπάρχουν (βρίσκονται στο μείζον σύμπλεγμα του ριβοσωμικού DNA), έγιναν αντιδράσεις με ζεύγη εναρκτών ITS-1/2 και ITS-3/4. Το πρώτο ζεύγος έδωσε προϊόν ενίσχυσης περίπου του μεγέθους του αντίστοιχου περιβαλλοντικού στελέχους (εικ. 1), ενώ το δεύτερο ζεύγος δεν έδωσε κανένα διακριτό προϊόν, αλλά ένα νεφέλωμα περίπου στη θέση όπου το περιβαλλοντικό στέλεχος *A. carneus* παρουσίαζε προϊόν ITS-3/4.

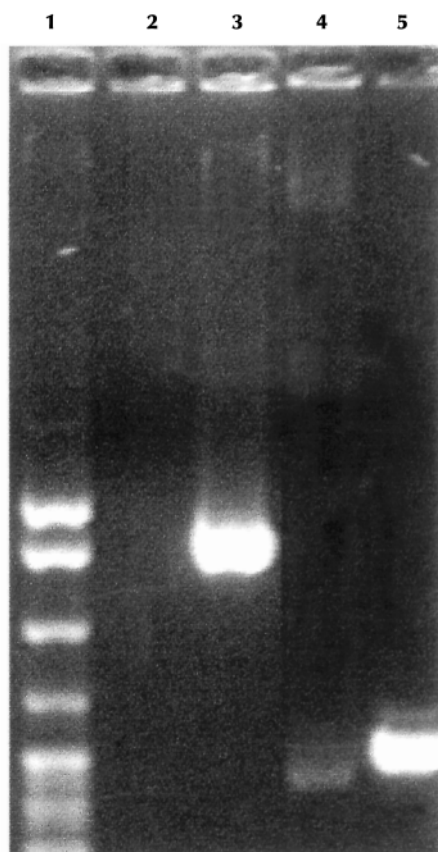
Το μέγεθος των προϊόντων της PCR με τους εναρκτές ITS-1/ITS-4 δεν ήταν δυνατό να διαχωρίσει μεταξύ γενών ή ειδών, επειδή οι διαφορές ήταν πολύ μικρές, καθιστώντας τη διάκριση επισφαλή. Σημειώνεται πάντως ότι ορισμένοι μύκητες παρουσίασαν προϊόντα ιδιάζοντος μεγέθους. Τέτοιοι είναι ο *Paecilomyces* (εικ. 2) και ο *Rhizopus* (εικ. 3), με προϊόν ενίσχυσης πολύ μεγαλύτερο από 622 ζεύγη βάσεων. Περιέργως, το *Mucor*, που εξελικτικά βρίσκεται σχετικά κοντά στον *Rhizopus*, αφού και τα δύο ανήκουν στην τάξη Mucorales, είχε προϊόν ενίσχυσης πολύ πλησιέστερα σε αυτό των περισσότερων υφομυκήτων (εικ. 3).

Κατόπιν αυτού, διερευνήθηκε η δυνατότητα περιοριστικών πέψεων στα προϊόντα ενίσχυσης.<sup>19</sup> Βασικά, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα ένζυμα, τα *Msp* I, *Hae* III, *Hinf* I και *Eco* RI. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται, όσον αφορά την ποιοτική παράμετρο (παρατήρηση πέψης ή όχι), στον πίνακα 2. Στις περιπτώσεις όπου η ποιοτική σύγκριση δεν επαρκεί, χρειάζεται ερμηνεία των αποτελεσμάτων κατά πρότυπο. Για παράδειγμα, οι Ασπέργιλλοι και τα *F. oxysporum*, *F. solanii*, *Acremonium*, *Trichoderma* πέπτονται και από τα τέσσερα ένζυμα. Όμως, παρουσιάζουν διακριτά πρότυπα, που επιτρέπουν την ασφαλή –κατά το δυνατό– διάκρισή τους. Το ίδιο ισχύει και με τα στελέχη του γένους *Penicillium*, που πέπτονται με τα 3 ένζυμα με τα οποία πέπτεται και το είδος *P. viridicatum*.

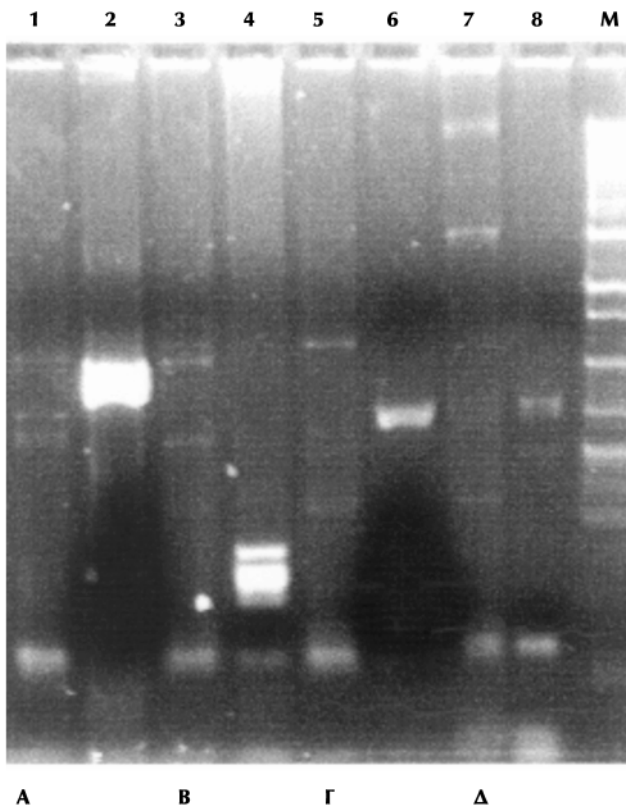
Μια από τις πλέον ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις είναι η αξιόπιστη και ταχεία δυνατότητα διαχωρισμού του Ασπέργιλλου από τα Πενικίλλια.

Τα διάφορα ένζυμα δεν είχαν πάντα σταθερή συμπεριφορά επί όλων των μυκήτων. Η *Eco* RI πέπτει το προϊόν ενίσχυσης ITS-1/4 όλων των Ασπέργιλλων,<sup>19</sup> το προϊόν των *Acremonium*, *Trichoderma* (εικ. 4), *F. oxysporum*, *F. solanii*, *Mucor*, ενώ, αντίθετα, δεν πέπτει τα προϊόντα των *Rhizopus*, *Paecilomyces* (εικ. 2) και *Penicillium* (εικ. 4).

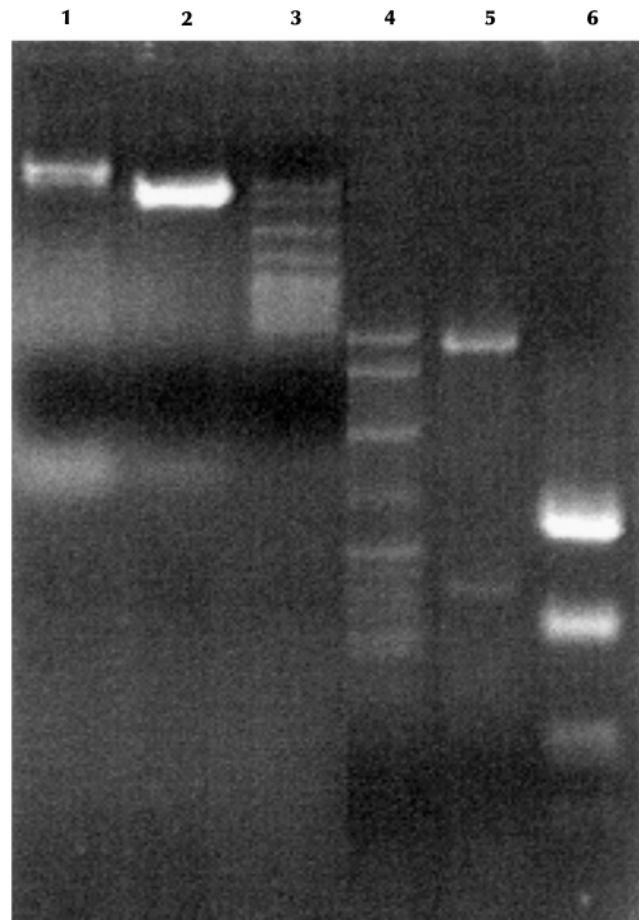
Αντίθετα, το *Msp* I δίνει ίδιο πρότυπο με τους Ασπέργιλλους και τα Πενικίλλια. Επιπλέον, γενικά, όλοι οι νηματοειδείς μύκητες –παρά τις όποιες διαφορές στα



**Εικόνα 1.** Προϊόντα PCR (2-3: ITS-1/4, 4-5: ITS-1/2) σε πήκτωμα 2,5%. 2, 4: *A. carneus* (IMI-343705). 3: *Acremonium* sp. 5: *A. carneus* (περιβαλλοντικό στέλεχος). 1: pBR-322 X *Msp* I.



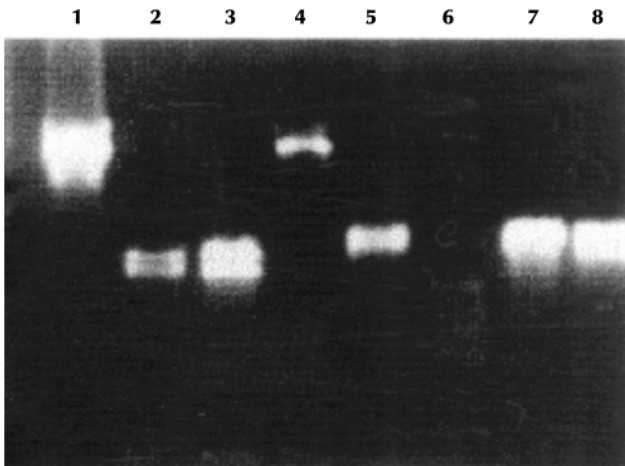
**Εικόνα 2.** Αντιπαραβολή πέψων προϊόντων ITS-1/4 (Α-Δ) από *Paecilomyces* sp (μονοί αριθμοί διαδρομών) και διάφορα είδη *Aspergillus* (ζυγοί αριθμοί διαδρομών) σε πύκτωμα 2,5%. Α: Ένζυμο *Hae* III, Β: *Msp* I, Γ: *Hinf* I, Δ: *Eco* RI. 2: *A. fumigatus* (κλινικό στέλεχος), 4: *A. flavus* (κλινικό στέλεχος), 6: *A. niger* (περιβαλλοντικό στέλεχος), 8: *A. carneus* (περιβαλλοντικό στέλεχος), Μ: pBR-322 X *Msp* I.



**Εικόνα 3.** 1: Προϊόν ITS-1/4 από *Rhizopus* sp. 2: Προϊόν ITS-1/4 από *Mucor* sp. 3, 4: pBR-322 X *Msp* I. 5: Προϊόν ITS-1/4 από *Rhizopus* sp μετά από πέψη με *Hae* III. 6: Προϊόν ITS-1/4 από *Mucor* sp μετά από πέψη με *Hae* III.

**Πίνακας 2.** Ποιοτικά αποτελέσματα περιοριστικών πέψων επί προϊόντων ενίσχυσης ITS-1/4 στα εξετασθέντα στελέχη.

Είδος	Αριθμός στελεχών	Ένζυμο <i>Msp</i> I	Ένζυμο <i>Hinf</i> I	Ένζυμο <i>Eco</i> RI	Ένζυμο <i>Hae</i> III
<i>A. fumigatus</i>	10	+	+	+	+
<i>A. carneus</i>	1	+	+	+	+
<i>A. terreus</i>	1	+	+	+	+
<i>P. viridicatum</i>	1	+	+	-	+
<i>Penicillium</i> sp	3	+	+	-	+
<i>F. oxysporum</i>	1	+	+	+	+
<i>F. solanii</i>	1	+	+	+	+
<i>Mucor</i> sp	1	-	+	+	+
<i>Rhizopus</i> sp	1	+	+	-	+
<i>Acremonium</i> sp	1	+	+	+	+
<i>Trichoderma</i> sp	2	+	+	+	+
<i>Paecilomyces</i> sp	1	+	+	-	+

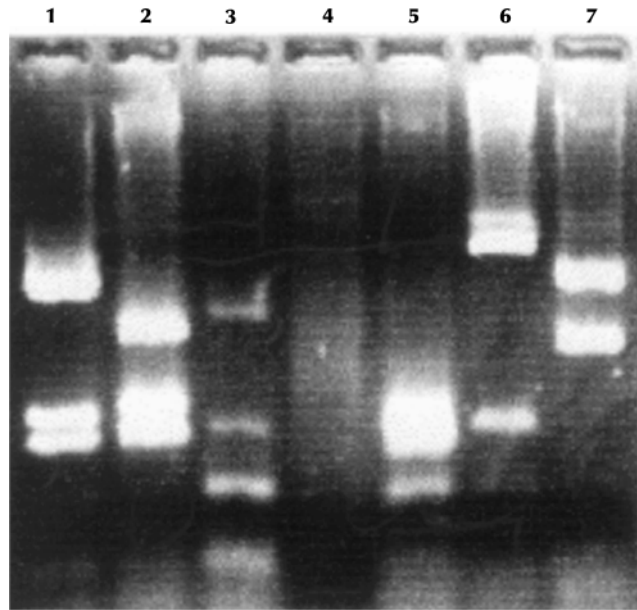


**Εικόνα 4.** Πέψη προϊόντων ITS-1/4 με *Eco* RI σε πύκτωμα 2,5%. 1, 4: *Penicillium* spp (άπεπτα, περιβαλλοντικά στελέχη). 2, 5: *Trichoderma* spp (περιβαλλοντικά στελέχη). 3: *Acremonium* sp (περιβαλλοντικό στέλεχος). 6: pBR-322 X *Msp* I. 7: *A. fumigatus* (περιβαλλοντικό στέλεχος). 8: *A. carneus* (περιβαλλοντικό στέλεχος).

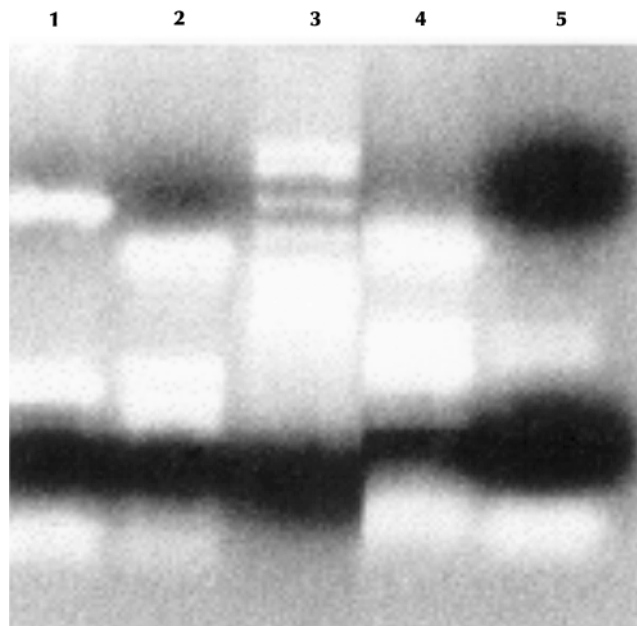
πρότυπα πέψης– εμφανίζουν πολλαπλές περιοριστικές θέσεις για *Msp* I στο προϊόν ITS-1/4 που παράγουν, με εξαίρεση τα *Fusarium solanii*, *F. oxysporum*, που με αυτόν τον τρόπο διαφοροποιούνται σαφώς από τους υπόλοιπους εξετασθέντες νηματοειδείς μύκητες (εικόνες 5, 6). Επίσης, διαφοροποιείται και το *Trichoderma*, καθώς δίνει ένα χαρακτηριστικό πρότυπο με μία ζώνη μέσου μεγέθους (307 <> 245 z.β.) και μια πληθώρα ζωνών μικρού μεγέθους (εικ. 7).

Το *Hae* III ήταν το ένζυμο που έπεπε όλα τα προϊόντα ITS-1/4 (εικόνες 2, 3, 5, 6). Όμως, τα πρότυπα που προέκυπταν δεν είχαν σχεδόν καμία αξία για την ταυτοποίηση. Τα στελέχη Ασπέργιλλων και Πενικιλίων παρουσίαζαν πολλαπλές θέσεις (εικ. 5), ενώ ακόμη και τα Φουζάρια παρουσίαζαν δύο θέσεις, διαφοροποιούμενα έτσι από τους Ασπέργιλλους (εικ. 5). Απόκλιση έδειξαν μεταξύ τους και σε αυτό το ένζυμο οι δύο ζυγομύκητες, ο *Rhizopus* και το *Mucor*, με τον πρώτο να έχει μόνο μία περιοριστική θέση, σε αντίθεση με το δεύτερο (εικ. 3).

Η *Hinf* I έπεπε όλα τα προϊόντα ITS-1/4. Στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρείτο μόνο μία περιοριστική θέση. Εξαίρεση αποτελούσαν τα *P. viridicatum*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Paecilomyces* (εικ. 2), *F. solanii*, σε αντίθεση με το *F. oxysporum*. Το πρότυπο πέψης του *P. viridicatum* έδειχνε δύο περιοριστικές θέσεις (εικ. 8), αντί της μίας που έδειχναν τα λοιπά στελέχη *Penicillium* και, συνεπώς, το εν λόγω ένζυμο διαχωρίζει μεταξύ του συγκεκριμένου είδους και των υπόλοιπων στελεχών του γένους.

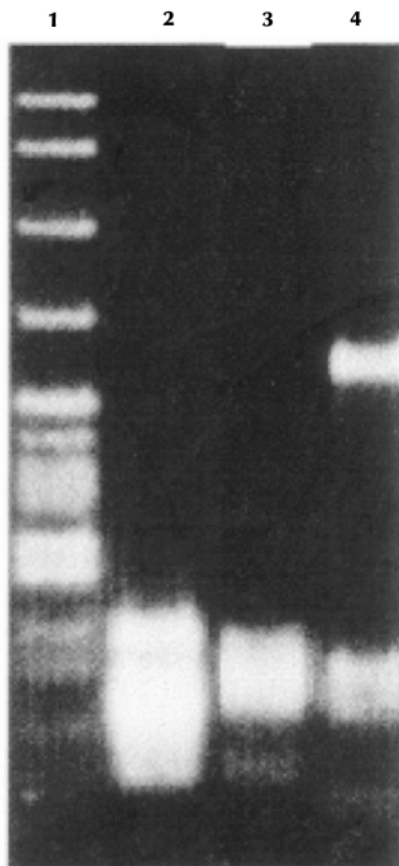


**Εικόνα 5.** Αντιπαραβολή πέψεων προϊόντων ITS-1/4 με *Hae* III (1, 2, 3) και *Msp* I (5, 6, 7) από *Fusarium* sp και είδη *Aspergillus* σε πύκτωμα 2,5%. 1, 6: *F. solanii*. 2, 7: *F. oxysporum*. 3: *A. carneus*. 4: pBR-322 X *Msp* I. 5: *Aspergillus* sp.



**Εικόνα 6.** Πέψεις προϊόντων ITS-1/4 (1, 2: *Hae* III. 4, 5: *Msp* I) σε πύκτωμα 3%. 1, 4: *Acremonium* sp. 2: *A. fumigatus* (κλινικό στέλεχος). 3: pBR-322 X *Msp* I. 5: *A. carneus* (περιβαλλοντικό στέλεχος).

Κατόπιν, για να βρεθεί η μέγιστη ευαισθησία της μεθόδου απομόνωσης, ενοφθαλμίστηκε σε ολικό αίμα γνωστός αριθμός κοιιδίων *A. fumigatus*. Για την PCR με εναρκτές ITS-1/4 η απόλυτη ευαισθησία (ΑΕ) ήταν 2,5

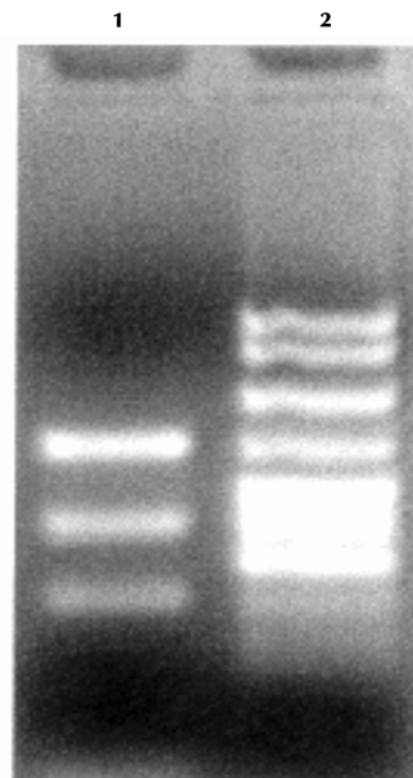


**Εικόνα 7.** Πέψεις προϊόντος ITS-1/4 σε πήκτωμα αγαρόζης Metaphor 3% με *Msp* I. 2: *A. flavus* (κλινικό στέλεχος). 3: *A. fumigatus* (περιβαλλοντικό στέλεχος). 4: *Trichoderma* sp (περιβαλλοντικό στέλεχος). 1: pBR-322 X *Msp* I.

κονίδια, όπως και για την πέψη του εν λόγω προϊόντος με *Eco* RI (εικ. 9).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

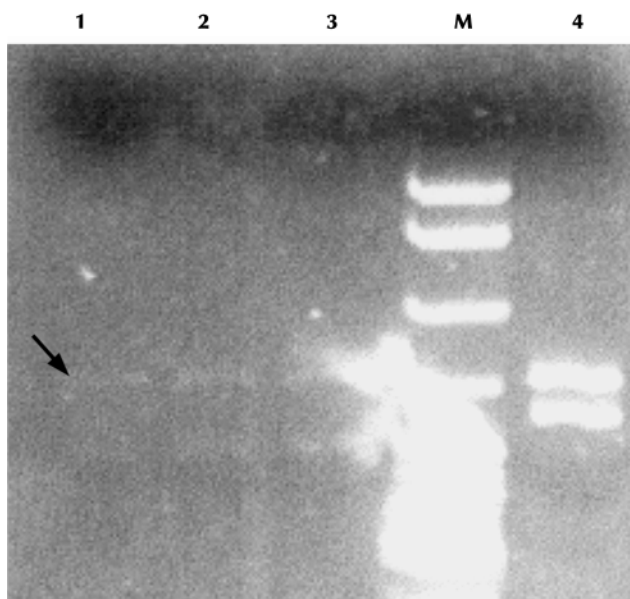
Επιλέχθηκαν οι εναρκτές ITS-1/4<sup>18</sup> και δοκιμάστηκαν σε εκχύλισμα DNA από καθαρό καλλιέργημα διαφόρων μυκητιακών ειδών αλλά και βακτηρίων. Το ζεύγος ITS-1/4 επιλέχθηκε για αναλυτική περαιτέρω εξέταση, καθώς συνέτρεχαν τρεις λόγοι: Πρώτον, έφερε δύο μη κωδικές περιοχές, τις ITS-1 και ITS-2, που επιτρέπουν μεγάλη ποικιλότητα και ως εκ τούτου αυξάνουν τις πιθανότητες ανεύρεσης διαφοροποιήσεων. Δεύτερον, λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους, σε περίπτωση ανεύρεσης διαφορετικών περιοριστικών θέσεων θα προκύπτουν θραύσματα, που επιτρέπουν αυξημένη δυνατότητα διαφοροποίησης, και μεγαλύτερα μεγέθη θραυσμάτων, που επιτρέπουν ευχερέστερη και περισσότερο αξιόπιστη



**Εικόνα 8.** 1: Προϊόν ITS-1/4 από *P. viridicatum* μετά από επώαση με *Hinf* I. 2: pBR-322 X *Msp* I.

παρατήρηση. Τρίτον, οι αλληλουχίες-στόχοι των εναρκτών βρίσκονται επί συντηρημένων περιοχών του συμπλέγματος του ριβοσωμικού DNA και, επομένως, η εύρεσή τους σε μεγάλο φάσμα μυκήτων διαφόρων φυλογενετικών αποκλίσεων ήταν πολύ πιθανή.<sup>19</sup> Ένα ακόμη πλεονέκτημα, που ίσχυε για όλους τους εναρκτές ITS, είναι το ότι οι ακολουθίες-στόχοι υπάρχουν σε πολλαπλά αντίγραφα στο γονιδίωμα κάθε κυτάρου και, συνεπώς, η αποτελεσματικότητα και η ευαισθησία της PCR πολλαπλασιάζονται σε σχέση με ακολουθίες-στόχους που αντιπροσωπεύονται μόνο μία φορά.

Τα προϊόντα της PCR επιτύχαναν διαφορετικά αποτελέσματα σε διάφορα γένη μυκήτων, ενώ δεν έδωσαν κανένα προϊόν ενίσχυσης με τα είδη και τους ορότυπους βακτηρίων και με τα στείρα κλινικά υλικά, με τα οποία ελέγχθηκαν για διασταυρούμενες αντιδράσεις. Επομένως, η ειδικότητα για μύκητες ήταν καλή. Η χρήση των ζευγών ITS-1/2 και ITS-3/4 έδειξε ίδια ή και μικρότερη ικανότητα διαχωρισμού. Τελικά, τα εξετασθέντα γένη *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Mucor* δεν είχαν αισθητή διαφορά από τα προϊόντα των διαφόρων ειδών του γένους. Στον αντίποδα, ο *Rhizopus* και ο *Paecilomyces* έδωσαν σαφώς διακριτά



**Εικόνα 9.** Έλεγχος ευαισθησίας μεθόδου πέψεων με *Eco* RI επί προϊόντος ITS-1/4 από τιτλοδοτημένα ενοφθαλμίσματα κονιδίων κλινικού στελέχους *A. fumigatus* σε ολικό αίμα μετά από απομόνωση νουκλεϊνικών οξέων με CTAB (1–3) σε πήκτωμα 2,5%. 1: 5 κονίδια/250  $\mu$ L ολικού αίματος, 2: 10 κονίδια/250  $\mu$ L ολικού αίματος, 3: 15 κονίδια/250  $\mu$ L ολικού αίματος, 4: μάρτυρας, πέψη προϊόντος ITS-1/4 με *Eco* RI από καθαρό καλλιέργημα κλινικού στελέχους *A. fumigatus*. M: pBR-322 X *Msp* I.

προϊόντα. Με μία μόνο εξαίρεση, το πρότυπο στέλεχος *A. carneus* (IMI 343705), που έδινε προϊόν ITS-1/2 αλλά όχι -1/4 και -3/4, όλοι οι μύκητες έδωσαν προϊόν ενίσχυσης. Η ερμηνεία στην περίπτωση του εν λόγω *A. carneus* είναι κάποια μετάλλαξη στην περιοχική πρόσδεσης του εναρκτη ITS-4, με αποτέλεσμα τα δύο ζεύγη στα οποία συμμετέχει να μην μπορούν να δώσουν προϊόν.

Οι περιοριστικές πέψεις ήταν μια προσέγγιση που θα μπορούσε να αυξήσει το διαχωρισμό,<sup>19</sup> αφού η φυλογενετική συγγένεια δεν είχε αντίκρουσμα στα μεγέθη των προϊόντων. Χρησιμοποιήθηκαν αρκετοί νηματοειδείς μύκητες, που επιλέχθηκαν επειδή είναι ήδη παθογόνοι ή έχουν αρχίσει τελευταία να εμφανίζονται ως τέτοιοι.

Τουλάχιστον στα γένη που ελέγχθηκαν, δεν βρέθηκαν δύο με το ίδιο πρότυπο πέψεων και στα τέσσερα ένζυμα, που σημαίνει ότι είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους μετά από PCR. Η μέθοδος αυτή δείχνει ευθέως την πολυδυναμία της σε σύγκριση με τις ανοσολογικές, καθώς είναι δυνατός ο διαχωρισμός γενών ή και ειδών (ανάλογα με την περίπτωση) με την εφαρμογή της αυτής διαδικασίας. Αντιθέτως, με τις άλλες προσεγγίσεις (ανοσομέθοδοι, χρήση ιχνηθετών), επειδή επιτρέπουν ανίχνευση ενός είδους ή γένους, εφόσον δώσουν

αρνητικό αποτέλεσμα είναι αδύνατη η εξαγωγή συμπερασμάτων όχι μόνο για την ταυτότητα του μύκητα, αλλά και για την ίδια την ύπαρξή του, προκειμένου περί κλινικών υλικών. Ο ασφαλέστερος τρόπος, φυσικά, είναι η δημιουργία μιας όσο το δυνατό μεγαλύτερης και περισσότερο εκτεταμένης βιβλιοθήκης, όπου διάφορα είδη θα έχουν δοκιμαστεί και διαχωριστεί σύμφωνα με το περιοριστικό τους πρότυπο, που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί και ως κλείδα. Βέβαια, σε καμία περίπτωση δεν μπορεί η μέθοδος να θεωρηθεί ως πανάκεια. Τα παραδείγματα του *A. carneus* (IMI-343705), που δεν ήταν δυνατό να δώσει προϊόν ενίσχυσης, δείχνουν καθαρά ότι μερικά σημεία δεν μπορούν να θεωρούνται σταθερά, όταν αναφερόμαστε σε ζώντες οργανισμούς.

Η συμπεριφορά του ενζύμου *Hae* III ήταν αξιοπρόσεκτη, καθώς σε πολλές περιπτώσεις εμφανίστηκαν κοινά πρότυπα μεταξύ διαφορετικών ειδών, ενώ σε άλλες, στελέχη του ίδιου είδους είχαν διαφορετικά πρότυπα. Παράδειγμα είναι ο *A. fumigatus*. Πιθανότητα, αυτή η διαφορά να οφείλεται στο ότι τα στελέχη με διαφορετικό πρότυπο ανήκουν σε διαφορετικές ποικιλίες, κάτι που δεν διερευνήθηκε. [Η ομάδα *Fumigati* περιλαμβάνει εννέα διαφορετικές ποικιλίες και είδη των γενών *Aspergillus* (ανάμορφο) και *Neosartorya* (τελειόμορφο)]. Άλλωστε, η καθοριζόμενη από τέσσερις βάσεις θέση του δεν προδιαθέτει για σπανιότητα. Παρά τη συγγενεία της με την αντίστοιχη θέση του *Msp* I (ίδιος αριθμός και είδη βάσεων, ανάστροφη φορά), έχει μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στα περισσότερα προϊόντα. Το γεγονός όμως ότι σχεδόν όλα τα προϊόντα PCR παρουσίαζαν τουλάχιστον μία περιοριστική θέση, δείχνει ότι αυτή η μία περιοριστική θέση πρέπει να βρίσκεται σε ισχυρά συντηρημένη περιοχή. Το ένζυμο μπορεί να διακρίνει μεταξύ των γενών *Acremonium* και *Fusarium*, καθώς στην πρώτη περίπτωση εμφανίζεται μία περιοριστική θέση, ενώ στη δεύτερη εμφανίζονται δύο. Παρόμοια συμπεράσματα εξαγονται και με την *Msp* I, που έδειξε εξαιρετικά σταθερή συμπεριφορά στους *Aspergillus*. Τα Πενικίλλια εμφάνισαν πρότυπο απαράλλακτο με αυτό των *Aspergillus*, δηλαδή πολλαπλές περιοριστικές θέσεις. Αντίθετα, μερικοί μυκηλιακοί μύκητες εμφάνισαν περιορισμένο αριθμό περιοριστικών θέσεων, ενίοτε μία (*F. oxysporum*, *F. solanii*, εικ. 5) ή δύο (*Acremonium* sp, εικ. 6, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό του γένους από το γένος *Fusarium*). Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει και πάλι ότι η μία θέση περιορισμού βρίσκεται σε ισχυρά συντηρημένη περιοχή, ενώ οι υπόλοιπες σε λιγότερο ισχυρά συντηρημένες περιοχές.

Η συμπεριφορά της *Eco* RI ανά γένος ήταν σταθερή. Το πρότυπο που έδινε ήταν δύο ζώνες με μικρή ή και αμελητέα διαφορά μήκους και αυτή η τοπολογία της περιοριστικής θέσης παραπέμπει, όπως και στην περίπτωση της περιοριστικής θέσης της *Hinf* I, που εμφανίζεται σε όλους τους εξετασθέντες μύκητες, σε αλληλουχίες επί του 5,8 S rDNA. Είναι όμως πιθανός και ο εντοπισμός της περιοριστικής θέσης περίξ του 5,8 S, καθώς υπάρχει τουλάχιστον μία σημειακή μετάλλαξη (π.χ. στην περίπτωση των Πενικιλίων) που έχει εξαλείψει την περιοριστική θέση, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στην *Hinf* I. Αυτή η παρατήρηση, καθώς και η μεγαλύτερη ανισομέρεια που παρατηρείται σε θραύσματα *Eco* RI απ' ό,τι σε θραύσματα *Hinf* I του αυτού στελέχους, υπαινίσσονται τον εντοπισμό των δύο αυτών περιοριστικών θέσεων κοντά μεν αλλά σε διαφορετικά σημεία, καθώς διαφέρουν οι αλληλουχίες και τα θραύσματα. Ακόμη, η συντήρηση της αλληλουχίας της θέσης της *Hinf* I φαίνεται απαραίτητη για την επιβίωση του οργανισμού. Αντίθετα, η θέση της *Eco* RI είναι ισχυρά συντηρημένη εντός των γενών, αλλά όχι μεταξύ αυτών, επομένως πρέπει να βρίσκεται σε περιοχή όπου συμβαίνουν σπανίως σημειακές μεταλλάξεις, αλλά η σημασία τους –όπως, κατά συνεπαγωγή, και της περιοχής– είναι σχετικώς μικρή.

Για τον καθορισμό της ευαισθησίας της τεχνικής, ακολουθήθηκε η προσέγγιση «του χειρίστου ενδεχομένου». Η εύρεση κονιδίων *Aspergillus* σε δείγμα αίματος είναι μια σχεδόν φανταστική περίπτωση. Καθώς όμως είναι εύκολα και με ακρίβεια μετρήσιμα και αποτελούν την πλέον ανθεκτική μορφή του μύκητα, ενοφθαλμίστηκαν σε αίμα, που είναι το δυσκολότερο βιολογικό υλικό (τα δισθενή κατιόντα σιδήρου στην αίμη αναστέλλουν την PCR, δρώντας ανταγωνιστικά ως προς

αυτά του μαγνησίου, που σταθεροποιούν το αντιγραφικό σύμπλοκο). Η προσέγγιση υποστηρίζει ότι αν στο δυσκολότερο υλικό και με την πλέον ανθεκτική μορφή του μύκητα επιδειχθεί ευαισθησία Α, σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η ευαισθησία δεν μπορεί παρά να είναι καλύτερη από «Α». Σε δύο διαφορετικά πειράματα χρονικής απόστασης πέραν του βμήνου επιδείχθηκαν ειδικές ευαισθησίες, αρχικά 28 και κατόπιν 20 κονιδίων ανά mL ολικού αίματος. Οι απόλυτες ευαισθησίες που παρατηρήθηκαν, όπως αναφέρεται στα αποτελέσματα, δεν κυμαίνονταν στα επίπεδα των πλέον εξεζητημένων μεθόδων, που επιτυγχάνουν την ανίχνευση ενός και μόνου αντιγράφου της αλληλουχίας-στόχου. Τέτοιες ευαισθησίες δεν έχουν και μεγάλη διαγνωστική αξία, αφού το λιγότερο που θα υπάρχει σε ένα δείγμα είναι ένα κύτταρο από τον προς ανίχνευση μικροοργανισμό. Φυσικά, σε περιπτώσεις όπου η αλληλουχία-στόχος βρίσκεται σε μοναδικό αντίγραφο (π.χ. απλοειδικός οργανισμός), οι δύο έννοιες συμπίπτουν. Στη δική μας περίπτωση, και χωρίς χρήση μεθόδων επαύξησης της διακριτικής ικανότητας και της ευαισθησίας της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αгарόζης, πετύχαμε μέγιστη απόλυτη ευαισθησία δύο κυττάρων σε ολικό αίμα. Όπως προαναφέρθηκε, η απόλυτη ευαισθησία είναι μια εντυπωσιακή, αλλά όχι εύχρηστη παράμετρος. Αντίθετα, η ειδική ευαισθησία είναι περισσότερο χρήσιμη, καθώς η δυσχέρεια εντοπισμού ενός μυκητιακού κυττάρου σε 1 mL αίματος είναι μεγαλύτερη από αυτή σε 0,25 mL. Τα πειράματα διεξήχθησαν με ενοφθαλμισμό σε 250 μL ολικού αίματος, επειδή αυτή η ποσότητα ήταν οριακή για την επεξεργασία αποαιμοσφαιρινοποίησης.<sup>20</sup>

## ABSTRACT

### Differential diagnosis of filamentous fungi by unitary digestion of polymerase chain reaction products

M.E. KAMBOURIS, A. VELEGRAKI, N.J. LEGAKIS

Department of Microbiology, Mycology Reference Laboratory, Medical School,  
University of Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2000, 17(2):171–179

**OBJECTIVE** The timely and accurate diagnosis of filamentous fungi is of paramount importance in improving the prognosis of the caused fungal infections. **METHOD** Using existing protocols for fungal DNA extraction from clinical samples, a molecular diagnostic method was developed based on the ITS-1/4 specific polymerase chain reaction (PCR) for fungal detection, followed by restriction enzyme analysis of the PCR product by the restriction endonucleases *Msp* I, *Hinf* I, *Hae* III and *Eco* RI. **RESULTS** The electrophoretic patterns readily distin-



guished the examined strains (belonging to the genera *Acremonium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Paecilomyces* and the species *A. fumigatus*, *A. carneus*, *A. terreus*, *P. viridicatum*, *F. oxysporum*, *F. solanii*) down to genus level, and in exceptional cases to the species level. The specific sensitivity of the method was established at 20 *A. fumigatus* conidia per mL of whole blood, by spiking 250  $\mu$ L of whole blood with enumerated conidial suspension, and ultimately by digesting with *Eco* RI the ITS-1/4 product, which resulted from the extraction and amplification procedures.

**Key words:** Diagnostic PCR, Filamentous fungi, Restriction enzyme analysis

## Βιβλιογραφία

- CIMON B, CARRERE J, CHAZALETTE JMP, VINATIER F, CHABASSE D, BOUCHARA JP. Chronic airway colonization by *Penicillium emersonii* in a patient with cystic fibrosis. *Med Mycol* 1999, 37:291–293
- ANAISSE EJ, BODEY GP, KANTARJIAN H. New spectrum of fungal infections in patients with cancer. *Rev Infect Dis* 1989, 11:369–378
- GUARRO J. Comments on recent infections caused by ascomycetes. *Med Mycol* 1998, 36:349–350
- YOSHIDA M, OBAYASHI T, IWAMA A, ITO M, TSUNODA S, SUZUKI T ET AL. Detection of plasma (1-2)- $\beta$ -D-glucan in patients with *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* and *Acremonium* fungaemias. *J Med Veterin Mycol* 1997, 35:371–374
- HENNEQUIN C, LAVBARDE V, POIROT JL, RABODONIRINA M, DATRY A, ARACTINGI S ET AL. Invasive *Fusarium* infections: a retrospective study of 31 cases. *Med Veterin Mycol* 1997, 35:107–114
- BENDOW EW, STODDART RW. Systemic zygomycosis. *Postgrad Med J* 1986, 62:985–989
- MATHEWS MS, RAMAN A, NAIR A. Nosocomial zygomycotic post-surgical necrotizing fasciitis in a healthy adult caused by *Apophysomyces elegans* in South India. *J Med Veterin Mycol* 1997, 35:61–63
- GUARRO J, GENE J. Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur J Clin Microb Infect Dis* 1995, 14:741–754
- MAYAYO E, GUARRO J, PUJOL I. Endogenous endophthalmitis by *Fusarium solanii*: an animal model. *Med Mycol* 1998, 36:249–253
- PERFECT JR, SCHELL WA. The new fungal opportunists are coming. *Clin Infect Dis* 1996, 22(Suppl 2):S112–S118
- SCHELL WA, PERFECT JR. Fatal, disseminated *Acremonium strictum* infection in a neutropenic host. *J Clin Microbiol* 1996, 34:1333–1336
- BOUTARI EI, ANAISSE EJ. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood* 1997, 90:999–1008
- DENG ZL, CONNOR DH. Progressive disseminated penicilliosis caused by *Penicillium marneffeii*. Report of 8 cases and differentiation of the causative organism from *Histoplasma capsulatum*. *Am J Clin Pathol* 1985, 84:323–327
- WARNOCK DW. Current and new azoles: an *in vitro* profile. 4th Congress of ECMM, Glasgow, Sattelite Symposium "Advances in antifungal therapy–voriconazole", 1998:204
- MCGINNIS MR, PASARELL L, SUTTON DA, FOTTHRGILL AW, COOPER CR Jr, RINALDI MG. *In vitro* activity of voriconazole against selected fungi. *Med Mycol* 1998, 36:239
- MCGINNIS MR. Phylogenetic implications of the use of voriconazole. 4th Congress of ECMM, Glasgow, Sattelite Symposium "Advances in antifungal therapy–voriconazole", 1998:203
- VANITTANAKOM N, MERZ WG, SITTISOMBUT N, KHAMWAN C, NELSON KE, SIRISANTHANA T. Specific identification of *Penicillium marneffeii* by a polymerase chain reaction/hybridization technique. *Med Mycol* 1998, 36:169–175
- WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ (eds) *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press Inc, San Diego, 1990:315–322
- VELEGRAKI A, KAMBOURIS ME, SKINIOTIS G, SAVALA M, MITROUSSIAZIOUVA A, LEGAKIS NJ. Identification of medically significant fungal genera by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999, 23:303–312
- VELEGRAKI A, KAMBOURIS ME, KOSTOUROU A, CHALEVELAKIS G, LEGAKIS NJ. Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification. *Med Mycol* 1999, 37:69–73

Corresponding author:

M.E. Kambouris, 89 3 Septemvriou street, GR-104 34 Athens, Greece