

Ιεράρχηση ερευνητικών μεθόδων για τον καθορισμό μυκητολογικών δεικτών λοίμωξης

Κατά τα τελευταία χρόνια, μια ποικιλία ανοσο-ορολογικών και μοριακών μεθόδων, σχεδιασμένων αρχικά για τις ανάγκες της βασικής έρευνας στη Μυκητολογία, έχουν τεθεί στην υπηρεσία της Ιατρικής. Οι ταχύτατες εξελίξεις στον τομέα της λεγόμενης «μοριακής διάγνωσης των μυκητιάσεων», εφόσον επήλθαν μέσω της μελέτης της μοριακής γενετικής και γονιδωματικής των μυκήτων, είναι σήμερα άρρηκτα συνδεδεμένες με την ιατρική πράξη. Οι εργαστηριακές αναλύσεις που βασίζονται σε μη καλλιεργητικές μεθόδους, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, δεν έχουν μέχρι στιγμής επιφέρει την αναμενόμενη επανάσταση στο χώρο των λοιμώξεων γενικότερα και συνεπώς ούτε στο χώρο των μυκητιάσεων. Εξαιτίας αυτού, η πλέον αξιόπιστη προσέγγιση για την έγκαιρη αναγνώριση των μυκητιάσεων εστιάζεται στη χρήση συμβατικών μεθόδων χαρακτηρισμού του αιτιολογικού παράγοντα της μυκητίασης, όπως μικροσκόπηση, καλλιέργεια, βιοχημικές δοκιμασίες, ανοσο-ορολογικοί προσδιορισμοί σε συνδυασμό με αναλύσεις βασισμένες στη μοριακή βιολογία. Προοδευτικά όμως πολλαπλασιάζεται η αποτελεσματικότητα των αρχικών συστημάτων ανίχνευσης DNA μυκήτων σε κλινικά δείγματα, μέσω βελτίωσης της ανάληψης, της επεξεργασίας και της αξιολόγησης των αποτελεσμάτων. Αυτό καταδεικνύεται από την αυξανόμενη χρήση αυτών των αναλύσεων στη διερεύνηση των λοιμώξεων από μύκητες και επιβεβαιώνει ότι οι βιοϊατρικές ειδικότητες, που ασκούν εργαστηριακό και κλινικό έργο, και έχουν ειδικό ενδιαφέρον για τη Μυκητολογία, διαδραματίζουν παράλληλους και συνεργιστικούς ρόλους ως προς τον έλεγχο των μυκητιάσεων.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Παρά το αυξανόμενο γενικό ενδιαφέρον για τις μυκητιάσεις, παρατηρείται έως ένα βαθμό έλλειψη επικοινωνίας όσων ασχολούνται με τη φροντίδα του ασθενούς και αυτών που μελετούν τους παθογόνους μύκητες, είτε σε μοριακό επίπεδο, είτε σε επίπεδο γενετικής πληθυσμών ή διερεύνησης των μηχανισμών παθογόνου δράσης ή χαρακτηρισμού στελεχών που απομονώνονται από κλινικά δείγματα. Η μεθοδολογία που βασίζεται στην ανάλυση του DNA έχει μέχρι αυτή τη στιγμή συμβάλει σημαντικά στην αναβάθμιση της φροντίδας των πασχόντων από μυκητίαση, εφόσον έχει θέσει στη διάθεση της κλινικής πράξης ακριβείς μεθόδους για το χαρακτηρισμό και την τυποποίηση των μυκήτων που απομονώνονται από κλινικό υλικό. Στο διεθνή χώρο, αυτές οι μέθοδοι συχνά ενέχουν θέση δοκιμασιών ρουτίνας. Επιπλέον, η ενδεδειγμένη συμβατική και μοριακή μελέτη των μηχανισμών αλληλεπίδρασης του ξενιστή

με το μύκητα, που εκ πρώτης όψεως δεν φαίνεται να έχει άμεση κλινική αξία, έχει ήδη συμβάλει στην εύρεση αποτελεσματικότερων τρόπων ελέγχου των λοιμώξεων από μύκητες. Αντίθετα, η ανίχνευση DNA μυκήτων σε κλινικά υλικά, παρότι ευρέως χρησιμοποιούμενη, δεν αποτελεί ακόμη γενικώς αποδεκτή δοκιμασία ρουτίνας λόγω των απαιτούμενων βελτιώσεων για την προτυποποίηση της μεθοδολογίας ελέγχου κλινικών δειγμάτων.

Τέλος, ως προς την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των μη καλλιεργητικών μεθόδων διάγνωσης, απαιτείται διενέργεια εκτεταμένων και καλά σχεδιασμένων κλινικών μελετών, όπου η επικοινωνία μεταξύ κλινικών ειδικοτήτων και των εργαστηριακών μυκητολόγων είναι απαραίτητη, προκειμένου να προκύψει κλινικά αξιολογούμενη ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Παρουσιάζεται η ελληνική και η διεθνής εμπειρία ενσωμάτωσης των συμβατικών και μοριακών δεδομένων βασικής και εφαρμοσμένης έρευνας στην κλινική

A. Βελλεγράκη

Ειδικό Εργαστήριο Μυκητολογίας,
Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική
Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Role of research in mycology in the introduction of fungal infection determinants

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Διαγνωστική προσέγγιση
Μοριακή Μυκητολογία
Μυκητολογία

Υποβλήθηκε 26.7.2005

Εγκρίθηκε 28.11.2005

πράξη, με στόχο την απαραίτητη διαμόρφωσης μυκητολογικών δεικτών λοίμωξης για τις συχνότερες, αλλά και για τις σπανιότερες μυκητιάσεις. Αναμφισβήτητα, η μυκητίαση στοιχειοθετείται από τη συνεκτίμηση εργαστηριακών, κλινικών και απεικονιστικών δεδομένων, με τα πρώτα να ενέχουν πολύ μεγαλύτερη σημασία από αυτή που συνήθως τους αποδίδεται.

2. ΜΥΚΗΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ

2.1. Ασπεργίλλωση

Η επιβεβαιωμένη ασπεργίλλωση τεκμηριώνεται όταν υπάρχει (α) θετική μικροσκοπική εξέταση κλινικού υλικού (εξέταση απαραίτητη),^{1,2} (β) θετική καλλιέργεια *Aspergillus* από κλινικό υλικό, όπως αίμα, βρογχοκυψελιδικό υγρό, εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ), βιοψικό υλικό, ούρα,¹ όπου η ταυτοποίηση κατά είδος είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της αντιμυκητιασικής χημειοθεραπείας,¹⁻⁶ και (γ) θετική ιστολογική εξέταση (βιοψία λεπτής βελόνας, βιοψία).^{1-3,7} Απαραίτητος είναι ο προσδιορισμός της *in vitro* ευαισθησίας στα αντιμυκητιακά φάρμακα.^{2,6}

Η πιθανή ασπεργίλλωση τεκμηριώνεται όταν υπάρχει (α) θετική εξέταση αντιγόνων (Ag) γαλακτομαννάνης (έλεγχος με ELISA, τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα λόγω της διαλείπουσας αντιγοναιμίας, αλλά και για την ελαχιστοποίηση πιθανότητας διασταυρούμενων αντιδράσεων).^{1,2,5} Τα χαρακτηριστικά της εξέτασης αυτής είναι: ευαισθησία 0,55–1, ειδικότητα 0,93, θετική προγνωστική αξία 0,55–0,40, αρνητική προγνωστική αξία 0,90–1^{2,7,8} και η (β) επανειλημμένη θετική PCR, απλή και πολυπλεκτική, ποσοτική πραγματικού χρόνου ανάγνωσης (real time PCR). Η PCR ενδείκνυται όταν οι καλλιέργειες είναι αρνητικές, για την επιτήρηση ασθενών υψηλού κινδύνου και για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στην αντιμυκητιασική χημειοθεραπεία.⁹⁻¹² Τα χαρακτηριστικά της εξέτασης αυτής είναι: ευαισθησία 0,55–0,94, ειδικότητα 0,93–0,95, θετική προγνωστική αξία 0,55–0,95, αρνητική προγνωστική αξία 0,96–0,99.^{10,12}

2.2. Καντινταιμία

Μία θετική αιμοκαλλιέργεια την τεκμηριώνει,^{1,2,7} προκειμένου για ασθενείς με ουδετεροπενία ή και με κεντρικό φλεβοκαθετήρα. Απαραίτητη είναι η ταυτοποίηση του είδους *Candida* για τη ρύθμιση της αντιμυκητιασικής χημειοθεραπείας^{1,2,13,14} και ο προσδιορισμός της *in vitro* ευαισθησίας στα αντιμυκητιακά φάρμακα.^{2,7,15-21}

Θετική εξέταση αντισωμάτων (Ab) έναντι μαννάνης *Candida*⁷ (έλεγχος με ELISA, τουλάχιστον δύο δείγμα-

τα εβδομαδιαία) τεκμηριώνει ενδεχόμενη καντινταιμία, αλλά δεν συνιστάται σε ουδετεροπενία. Θετικά αντισώματα ανιχνεύονται και επί αποικισμού των βλεννογόνων ή μετά από λύση της συνέχειας των αποικισμένων βλεννογόνων λόγω χορήγησης κυτταροτοξικών παραγόντων. Θετική εξέταση αντιγόνων (Ag) μαννάνης, σε συνδυασμό με την προηγούμενη, τεκμηριώνει, λόγω έλλειψης θετικής καλλιέργειας, πιθανή καντινταιμία. Ο έλεγχος γίνεται με ELISA, τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα.^{7,22} Η συνδυασμένη εξέταση Ab/Ag έχει ευαισθησία 0,8 και ειδικότητα 0,93.²²

Επανειλημμένη θετική PCR, απλή και πολυπλεκτική, ποσοτική πραγματικού χρόνου ανάγνωσης (real time PCR) τεκμηριώνει πιθανή καντινταιμία και ενδείκνυται όταν οι καλλιέργειες είναι αρνητικές, για την επιτήρηση ασθενών υψηλού κινδύνου και για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στην αντιμυκητιασική χημειοθεραπεία.^{11,23,27} Τα χαρακτηριστικά της είναι: ευαισθησία 0,55–0,94, ειδικότητα 0,93–0,95, θετική προγνωστική αξία 0,55–0,95, αρνητική προγνωστική αξία 0,96–0,99.^{10,26}

2.3. Καντιντουρία σε βαρέως πάσχοντες (μονάδες εντατικής θεραπείας νεογνών, παιδιατρικών ασθενών και ενηλίκων)

Η θετική μικροσκοπική εξέταση κλινικού υλικού είναι απαραίτητη,^{1,2,7,28-33} επειδή, συνδυασμένη με θετική καλλιέργεια ούρων για *Candida*^{2,33,34} [$>10^4$ cfu *Candida*/mL, συσχετίζεται με υψηλό δείκτη αποικισμού Pittet ($\geq 0,5$)], υποδηλώνει υψηλό κίνδυνο για καντινταιμία.^{33,34} Η ταυτοποίηση κατά είδος είναι απαραίτητη για τη χορήγηση προφυλακτικής αντιμυκητιασικής χημειοθεραπείας.^{2,7,28,31-34} Εξίσου απαραίτητος είναι ο προσδιορισμός της *in vitro* ευαισθησίας στα αντιμυκητιακά φάρμακα.^{2,7,15-21}

2.4. Κρυπτοκόκκωση

Για να τεκμηριωθεί η λοίμωξη αρκεί μία από τις παρακάτω συνθήκες: (α) Θετική μικροσκοπική εξέταση κλινικού υλικού (βρογχοκυψελιδικό υγρό, πλευριτικό υγρό, ΕΝΥ, υλικό από δερματικές βλάβες, ούρα).^{1,7,35-38} Η εξέταση αυτή είναι απαραίτητη. (β) Θετική καλλιέργεια αίματος,^{1,7,37-39} ΕΝΥ³⁶⁻³⁸ ή ούρων^{40,41} (σημειώνεται ότι, σπάνια, οι καλλιέργειες ΕΝΥ και ούρων είναι ψευδώς αρνητικές).³⁹⁻⁴² Η ταυτοποίηση κατά είδος και η οροτυποποίηση είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση της αντιμυκητιασικής χημειοθεραπείας.^{37,42-44} Επιπλέον, απαραίτητος είναι ο προσδιορισμός της *in vitro* ευαισθησίας στα αντιμυκητιακά φάρμακα, λόγω στελεχών ανθεκτικών στην αμφοτερικίνη Β και τη φλουκοναζόλη.^{44,45} (γ) Θετική εξέταση αντιγόνων (Ag) *Cryptococcus*^{1,7,37,39,41} (σε ασθενείς

νείς με HIV/AIDS, καταγράφονται τίτλοι στο ENY $\geq 1:1.000.000$, στον ορό και στα ούρα $\geq 1:100.000$). Μπορεί να παρατηρηθούν διασταυρούμενες αντιδράσεις στη συγκεκριμένη εξέταση λόγω των ακόλουθων παραγόντων: Ρευματοειδής παράγοντας, κακοήθεια, παρουσία *Trichosporon* spp, *Stomatococcus mucilaginosus*, *Caryophaga canimorsus* και παρουσία απορρυπαντικών και απολυμαντικών ή αμυλούχων πολυμερών επένδυσης κοίλων φλεβοκαθετήρων στο κλινικό δείγμα.^{1,46-48} (δ) Θετική ιστολογική εξέταση (βιοψία λεπτής βελόνας, βιοψία).^{1,2,7} (ε) Θετική PCR (όταν οι καλλιέργειες είναι αρνητικές).³⁷⁻³⁹

2.5. Ζυγομυκητιάσεις και σπάνιες μυκητιάσεις

Οι σπάνιες μυκητιάσεις που οφείλονται στα γένη *Scedosporium* (*Pseudallescheria*), *Fusarium*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Geotrichum*, *Acremonium*, *Exophiala* (*Wangiella*), *Blastoschizomyces*, *Schizophyllum* τεκμηριώνονται από θετική μικροσκοπική εξέταση κλινικού υλικού (η εξέταση είναι απαραίτητη), συνοδευόμενη και από θετική ιστολογική εξέταση (βιοψία λεπτής βελόνας, βιοψία)^{1,7,49-51} και από θετικές καλλιέργειες.^{1,7}

Η ταυτοποίηση κατά είδος είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της αντιμυκητιασικής χημειοθεραπείας,^{1,7,53,54} ενώ εξίσου απαραίτητος είναι ο προσδιορισμός της *in vitro* ευαισθησίας στα αντιμυκητιακά φάρμακα.⁵⁵⁻⁵⁷

Επανελημμένες αρνητικές καλλιέργειες επιτήρησης^{7,53-57} (11-15 ημέρες μετά από την έναρξη της αντιμυκητιασικής χημειοθεραπείας αλλά και μετά από το πέρας αυτής) επιβεβαιώνουν τη μυκητολογική ίαση.

2.6. Πρωτοπαθείς υποδόριες και συστηματικές μυκητιάσεις

Οι λοιμώξεις που οφείλονται στα γένη *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Blastomyces*, *Fonsecaea*,

Cladophialophora, *Phialophora* και στο είδος *Penicillium marneffeii* επιβεβαιώνονται από (α) θετική μικροσκοπική εξέταση κλινικού υλικού (εξέταση απαραίτητη),^{1,2} ακολουθούμενη από (β) θετική καλλιέργεια αίματος, ENY, ούρων, βιοπτικού υλικού, όπου η ταυτοποίηση κατά είδος είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση της αντιμυκητιασικής χημειοθεραπείας,^{1,2} ενώ και ο προσδιορισμός της *in vitro* ευαισθησίας στα αντιμυκητιακά φάρμακα είναι απαραίτητος, λόγω της ύπαρξης στελεχών ανθεκτικών στην αμφοτερικίνη Β,^{1,2} και (γ) θετική ιστολογική εξέταση (βιοψία λεπτής βελόνας, βιοψία).^{1,7} Η πρώτη μόνον συνθήκη (α) τεκμαίρει πιθανή λοίμωξη.

Θετική εξέταση για ειδικά αντιγόνα (Ag) (*Histoplasma*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Blastomyces*, *Penicillium marneffeii*)^{1,2,58} ή θετική PCR (*Histoplasma*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Blastomyces*, *Penicillium marneffeii*)⁵⁹⁻⁶¹ τεκμαίρουν λοίμωξη, ενεργό ή σε αποδρομή.

Τέλος, όλοι οι μύκητες που απομονώνονται από τα κατά φύση στείρα κλινικά υλικά, από υγρό περιτοναϊκής κάθαρσης και από φλεβοκαθετήρες πρέπει να χαρακτηρίζονται κατά είδος.^{1,2,7}

3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η βασική έρευνα στη Μυκητολογία, συγχωνευόμενη με τις τεχνολογικές εξελίξεις, έχει δημιουργήσει τις προϋποθέσεις για την ανάπτυξη μεθοδολογίας για τον ταχύ και αξιόπιστο χαρακτηρισμό και την τυποποίηση των μυκήτων που απομονώνονται από κλινικό υλικό και είναι σαφώς επωφελής για τον ασθενή. Όμως, η άμεση ανίχνευση γενετικού υλικού μυκήτων σε κλινικά δείγματα απαιτεί προς το παρόν εξαιρετικά προσεκτική ερμηνεία εκ μέρους του εργαστηρίου, ενώ παράλληλα χρήζει ενδελεχούς αξιολόγησης μέσω αναδρομικών και προοπτικών κλινικοεργαστηριακών μελετών.

ABSTRACT

Role of research in mycology in the introduction of fungal infection determinants

A. VELEGRAKI

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

Archives of Hellenic Medicine 2006, 23(6):579-584

In recent years a multitude of molecular and immuno-serological methods have been introduced in the field of diagnostic mycology. Rapid developments in the area referred to as "molecular diagnosis of fungal diseases", generated by studies in fungal molecular genetics and fungal genomics, are not irrelevant to the management

of fungal infections. It is inevitable that certain components of molecular mycology research have become integrated into the practice of caring for patients with mycoses. Non-culture-based assays, such as PCR, although available for almost 10 years, have not yet revolutionized the field of infectious diseases as a whole, nor that of fungal diseases. The current approach for diagnosing mycoses remains equally based on microscopy, culture and an array of traditional identification methods of the fungal isolate, as well as on non-culture-based assays. Gradually, however, procedures allowing rapid and dependable sample processing, analysis of data and interpretation of results assist in the detection and identification of fungal pathogens in clinical specimens. This progress is highlighted by the increasing exploitation of non-culture diagnostic assays in clinical practice worldwide and proves that laboratory and clinical professionals with an interest in mycology have parallel, rather than opposed, roles to play in the management and control of fungal infections.

Key words: Diagnostic approach, Molecular mycology, Mycology

Βιβλιογραφία

- DENNING DW, KIBBLER CC, BARNES RA. British Society of Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect Dis* 2003, 3:230–240
- ASCIUGLU S, REX JH, De PAUW B, BENNETT JE, BILLE J, CROKAERT F ET AL. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: An international consensus. *Clin Infect Dis* 2002, 34:7–14
- HAYES-JORDAN A, BENAÏM E, RICHARDSON S, JOGLAR J, SRIVASTAVA DK, BOWMAN L ET AL. Open lung biopsy in pediatric bone marrow transplant patients. *J Pediatr Surg* 2002, 37:446–452
- HERBRECHT R, DENNING DW, PATTERSON TF. Randomized comparison of voriconazole and amphotericin B in primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002, 347:408
- SEGAL BH, DeCARLO ES, KWON-CHUNG KJ, MALECH HL, GALLIN JI, HOLLAND SM. *Aspergillus nidulans* infection in chronic granulomatous disease. *Medicine* 1998, 77:345–354
- BALAJEE SA, WEAVER M, IMHOF A, GRIBSKOV J, MARR KA. *Aspergillus fumigatus* variant with decreased susceptibility to multiple antifungals. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48:1197–1203
- BOHME A, RUHNKE M, BUCHHEIDT D, KARTHANUS M, EINSELE H, HEUSSEL SGG ET AL. Treatment of fungal infections in hematology and oncology. *Ann Hematol* 2003, 82(Suppl 2):S133–S140
- ERJAVEC Z, VERWEIJ PE. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. *Drug Resist Updat* 2002, 5:3–10
- VERWEIJ PE, LATGE JP, RIJS AJMM, MELCHERS WJC, De PAW BE, HOOBKAMP-KORSTANJE JAA ET AL. Comparison of antigen detection and PCR assay using bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in patients receiving treatment for hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1995, 33:3150–3153
- KAWAZU M, KANDA Y, NANNYA Y, AOKI K, KUOKAWA M, CHIBA A ET AL. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich ELISA for galactomannan and a (1–3)-β-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol* 2004, 42:2733–2741
- SAMBATAKOU H, GUIVER M, DENNING D. Pulmonary aspergillosis in a patient with chronic granulomatous disease: Confirmation by PCR and serological tests and successful treatment with voriconazole. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003, 22:681–685
- KAMBOURIS ME, REICHARD U, LEGAKIS NJ, VELEGRAKI A. Sequences from the aspergillopepsin PEP gene of *Aspergillus fumigatus*: Evidence on their use in selective PCR identification of *Aspergillus* species in infected clinical samples. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999, 25:255–264
- FINKELSTEIN R, REINHERTZ G, HASHMAN N, MERZBACH D. Outbreak of *Candida tropicalis* fungemia in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993, 14:587–590
- ZAOUTIS T, GREVES M, LAUTENBACH E, BILKER WB, COFFIN SE. Risk factors for disseminated candidiasis in children with candidemia. *Pediatr Infect Dis J* 2004, 23:635–641
- ROILIDES E, FARMAKI E, EVDORIDOU J, FRANCHESCONI A, KASAI M, FILIOTI M ET AL. *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: Epidemiological and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen. *J Clin Microbiol* 2003, 41:735–741
- KOLLIA K, ARABATZIS M, KOSTOULA O, BELESSIOTOU E, KOSTOUROU A, LAZOU A ET AL. *Clavispora (Candida) lusitanae* susceptibility profiles and genetic diversity in three tertiary hospitals (1998–2001). *Int J Antimicrob Agents* 2003, 22:458–460
- MAGIORAKOS AP, HADLEY S. Impact of real-time fungal susceptibility on clinical practices. *Curr Opin Infect Dis* 2004, 17:511–515

18. ANTONIADOU A, TORRES HA, LEWIS RE, THORNB Y, BODEY GP, TARRAND J ET AL. Candidemia in a tertiary care cancer center: *In vitro* susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy. *Medicine* 2003, 82:309–321
19. HAJJEH RA, SOFAIR AN, HARRISON LH, LION GM, ARTHINGTON-SKAGGS BA, MIRZA SA ET AL. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* 2004, 42:1519–1527
20. VELEGRAKI A, PAPALAMBROU D, SOREMI S, LEGAKIS NJ. Variable antifungal susceptibility of wild-type *Candida albicans* phenotypes from neutropenic hosts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996, 15:854–860
21. HOSPENTHAL DR, MURRAY CK, RINALDI MG. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004, 48:153–158
22. SENDID B, TABOURET M, MATHIEU D, FRUIT J, POULAIN D, POIRROT JL. New enzyme immunoassays for sensitivity detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: Useful combined test for diagnosis of systematic candidiasis. *J Clin Microbiol* 1999, 37:1510–1517
23. ODDS FC. Reflections on the question; what has molecular mycology to do with the clinician treating the patient? *Med Mycol* 2003, 41:1–6
24. IWEN PC, FREIFELD AG, BRUENING TA, HINRICHS SH. Use of a panfungal PCR assay for detection of fungal pathogens in a commercial blood culture system. *J Clin Microbiol* 2004, 42:2292–2293
25. VELEGRAKI A, KAMBOURIS M, KOSTOUROU A, CHALEVELAKIS G, LEGAKIS NJ. Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification. *Med Mycol* 1999, 37:69–75
26. KOSTOUROU A, MENOUNOS P, ARABATZIS M, VELEGRAKI A. A real time PCR-SSCP for rapid identification of *Candida* species in blood of febrile neutropenic patients. San Antonio Tx, 15th ISHAM Congress, Book of Abstracts, 2003:441
27. ARABATZIS M, KOLLIA K, MENOUNOS P, LOGOTHETI M, VELEGRAKI A. Delineation of *Clavispora lusitaniae* clinical isolates by PCR-SSCP analysis of the ITS 1 region. A retrospective study comparing five typing methods. *Med Mycol* 2004, 42:27–34
28. FARR BM. Catheters, microbes, time and gold standards. *Ann Intern Med* 2004, 140:62–63
29. DUPONT H. Infections fongiques en reanimation. Enquete transversale. *Ann Fr Anesth Reanim* 2001, 20:413–417
30. GIAMARELLOU H, ANTONIADOU A. Epidemiology, diagnosis and therapy of fungal infections in surgery. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996, 17:558–564
31. HENNEQUIN C. Role du laboratoire dans le diagnostic et la prevention des infections fongiques. *Ann Fr Anesth Reanim* 2001, 20:407–412
32. FISCHER JE, BACHMANN LM, JAESCHKE R. A readers' guide to the interpretation of diagnostic test properties: Clinical example of sepsis. *Intensive Care Med* 2003, 29:1043–1051
33. CHABASSE D. Interet de la numeration des levures dans les urines. Revue de la litterature et resultats preliminaires d'une enquete multicentrique realisee dans 15 centres ospitaliers universitaires. *Ann Fr Anesth Reanim* 2001, 20:400–406
34. DUBAU B, TRIBOULET C, WINNOCK S. Utilisation pratique de l'index de colonisation. *Ann Fr Anesth Reanim* 2001, 20:418–420
35. LISS HP, RIMLAND D. Asymptomatic cryptococcal meningitis. *Am Rev Respir Dis* 1981, 124:88–89
36. MOFENSON LM, OLESKE J, SERCHUCK L, VAN DYKE R, WILFERT C, THE CDC, THE NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH AND THE INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. Treating opportunistic infections among HIV-exposed and infected children: Recommendations from CDC, the NIH and the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep* 2004, 53:(RR-14):1–92
37. VELEGRAKI A, KIOSSES VG, KANSOUZIDOU A, SMILAKOU S, MITROUSSIA-ZIOUVA A, LEGAKIS NJ. Prospective use of RFLP analysis on amplified *Cryptococcus neoformans* URA5 gene sequences for rapid identification of varieties and serotypes in clinical samples. *Med Mycol* 2001, 39:409–417
38. BARENFANGER J, LAWHORN J, DRAKE C. Non-value of culturing cerebrospinal fluid for fungi. *J Clin Microbiol* 2004, 42:236–238
39. ATHANASSIADOU F, PAPAGEORGIOU T, TRAGIANNIDIS A, LEVKOPOULOS A, VELEGRAKI A. Cryptococcoma in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Haema* 2004, 7:531–533
40. KIERTIBURANAKUL S, SUNGKANUPARPH S, BUABUT B, PRACHARTAM R. Cryptococcuria as a manifestation of disseminated cryptococcosis and isolated urinary tract infection. *Jpn J Infect Dis* 2004, 57:203–205
41. CHAPIN-ROBERTSON K, BECHTEL C, WAYCOTT S, KONTNICK C, EDGER SC. Cryptococcal antigen detection from the urine of AIDS patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993, 17:197–201
42. KORDOSSIS T, AVLAMI A, VELEGRAKI A, STEFANOI I, GEORGAKOPOULOS G, PAPALAMBROU C ET AL. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococemia in AIDS patients. *Med Mycol* 1998, 36:335–339
43. VELEGRAKI A, KIOSSES VG, PITSOUNI H, TOUKAS D, DANILIDIS VD, LEGAKIS NJ. First report of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B from Greece. *Med Mycol* 2001, 39:419–422
44. XU J, ONYEWU C, YOELL HJ, ALI RY, VILGALYS RJ, MITCHELL TG. Dynamic and heterogeneous mutations to fluconazole resistance *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001, 45:420–427
45. YAMAZUMI T, PFALLER MA, MESSER SA, HOUSTON AK, BOYKEN L, HOLLIS RJ ET AL. Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 2003, 41:267–272

46. KONTOPYANNIS DP. What is the significance of an isolated positive cryptococcal antigen in the cerebrospinal fluid of cancer patients? *Mycoses* 2003, 46:161–163
47. BLEVINS LB, FENN J, SEGAL H, NEWCOMB GAYMAN P, CARROLL KC. False-positive cryptococcal antigen latex agglutination caused by disinfectants and soaps. *J Clin Microbiol* 1995, 33:1674–1675
48. MILLON L, BARALE T, JULLIOT MC, MARTINEZ J, MANTION G. Interference by hydroxyethyl starch used for vascular filling in latex agglutination test for cryptococcal antigen. *J Clin Microbiol* 1995, 33:1917–1919
49. PETRIKKOS G, SKIADA A, SAMBATAKOU H, TOSKAS A, VAIPOULOS G, KATSILAMBROS N. Mucormycosis: Ten year experience at a tertiary-care centre in Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003, 22:753–756
50. NORDEN G, BJORVK S, PERSSON H, SVALANDER C, LI XG, EDEBO L. Cure of zygomycosis caused by a lipase-producing *Rhizopus rhizopodiformis* strain in a renal transplant patient. *Scand J Infect Dis* 1991, 23:337–382
51. HAMMER GS, BOTTONE EJ, HIRSCHMAN SZ. Mucormycosis in a transplant recipient. *Am J Pathol* 1975, 64:389–398
52. WALSH TJ, RENSHAW G, ANDREWS J, KWON-CHUNG J, CUNNION RC, TAUBENBERGER J ET AL. Invasive zygomycosis due to *Coccidiobolus incongruus*. *Clin Infect Dis* 1994, 19:423–430
53. VLASSOPOULOS D, KOUPPARI G, ARVANITIS D, PAPAEFSTATHIOU K, DOUVANIS A, VELEGRAKI A ET AL. *Wangiella dermatitidis* peritonitis in a CAPD patient. *Perit Dial Int* 2001, 21:96–97
54. WALSH TJ, GROLL A, HIEMENZ J, FLEMING R, ROILIDES E, ANAÏSSIE E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin Microbiol Infect* 2004, 10(Suppl 1):48–66
55. DANNAOUI E, MELETIADIS J, MOUTON JW, VERWEIJ PE, THE EUROFUNG NETWORK. *In vitro* susceptibilities of zygomycetes to conventional and new antifungals. *J Antimicrob Chemother* 2003, 51:45–52
56. BARNET J, BEHR W, REICH H. An amphotericin B-resistant case of rhinocerebral mucormycosis. *Infection* 1985, 13:134–136
57. CHRISTAKIS G, PERLORENZOU S, ASLANIDOU M, ASLANIDOU M, MEGALAKAKI A, VELEGRAKI A. Fatal *Blastoschizomyces capitatus* sepsis in a neutropenic patient with acute myeloid leukemia. First documented case from Greece. *Mycoses* 2005, 48:216–220
58. CHAIYAROJ SC, CHAWENGKIRTIKUL R, SIRISINHA S, WATKINS P, SRINOULPASERT Y. Antigen detection assay for identification of *Penicillium marneffeii* infection. *J Clin Microbiol* 2003, 41:432–434
59. IMHOF A, SCHAER C, SCHOEDON G, SCHAER G, WALTER DJ, SCHAFFNER A ET AL. Rapid detection of pathogenic fungi from clinical specimens using LightCycler real-time fluorescence PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003, 22:558–560
60. SEMIGHINI CP, De CAMARGO ZP, PUCCIA R, GOLDMAN MH, GOLDMAN GH. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by 5' nuclease assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002, 44:383–386
61. LoBUGLIO KF, TAYLOR JW. Phylogeny and PCR identification of the human pathogenic fungus *Penicillium marneffeii*. *J Clin Microbiol* 1995, 33:85–89

Corresponding author:

A. Velegraki, 2–4 Vrastovou street, GR-115 24 Athens, Greece
e-mail: aveleg@med.uoa.gr

.....