

**Γονίδια *KRE9/KNH1*
Μηχανισμοί αντοχής των *Candida glabrata*
μη φονικού φαινότυπου
και νέοι στόχοι αντιμυκητιακών φαρμάκων**

ΣΚΟΠΟΣ Να προσδιοριστεί η κατανομή και διασπορά των κλινικών στελεχών *Candida glabrata* που παρουσιάζουν αποδιοργάνωση ή τροποποίηση του συστήματος βιοσύνθεσης της β-1,6-γλυκάνης, για να εξηγηθεί το φαινόμενο αντοχής τους στις αζόλες. Να αναπτυχθεί μεθοδολογία έλεγχου της παρουσίας των γονιδίων *KRE9* και *KNH1*, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για τη βιοσύνθεση β-1,6-γλυκάνης, και να ελεγχθεί η έκφραση αυτών μέσω φαινοτυπικών δοκιμασιών. Να διερευνηθεί, τέλος, το ενδεχόμενο φυλογενετικής συγγένειας της *Clavispora* (ανάμορφο στάδιο: *Candida*) *lusitaniae* με την *C. glabrata*.

ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ Μελετήθηκε τυχαίο δείγμα κλινικών στελεχών *C. glabrata* και *Cl. lusitaniae* από βλάβες βλεννογόνου του στόματος ασθενών υπό ακτινο-χημειοθεραπεία και από ασθενείς μονάδων εντατικής θεραπείας με καντινταιμία ή σηπαιμία. Τα στελέχη ελέγχθηκαν με PCR για την παρουσία των δύο γονιδίων *KRE9* και *KNH1*. Ο έλεγχος έκφρασης των γονιδίων έγινε με τη μελέτη αντοχής στην τοξίνη K1 του *Saccharomyces cerevisiae* και με προσδιορισμό αντοχής στην τετρακυκλίνη. Ο φαινότυπος αντοχής στους αντιμυκητιακούς παράγοντες προσδιορίστηκε με μέθοδο μικροαραιώσεων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η αντοχή των *C. glabrata* στους αντιμυκητιακούς παράγοντες είναι β-1,6-γλυκανοεξαρτώμενη. Εντοπίστηκε αυξημένη συχνότητα στελεχών με μερική αποδιοργάνωση του συστήματος βιοσύνθεσης της β-1,6-γλυκάνης, γεγονός που ερμηνεύει την αυξημένη κλινική αντοχή τους στις αζόλες.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ Προτείνεται μεθοδολογία ανίχνευσης αλληλοουσιών των γονιδίων *KRE9* και *KNH1* με PCR για την πρώιμη διαφορική διάγνωση λοιμώξεων από *C. glabrata* και *Cl. lusitaniae*, ώστε να ρυθμίζεται έγκαιρα το σχήμα αντιμυκητιακής χημειοθεραπείας. Τέλος, προτείνεται η αναθεώρηση της φυλογενετικής θέσης των *Cl. lusitaniae*.

Επί τρεις περίπου δεκαετίες, οι μύκητες αποκτούν προοδευτικά αυξημένη ιατρική σημασία ως ευκαιριακά παθογόνοι οργανισμοί και εμπίπτουν στη σφαίρα ενδιαφέροντος όλων των ιατρικών ειδικοτήτων. Οι μυκη-

τιακές λοιμώξεις πλήττουν πλέον πολλές ομάδες ασθενών με προδιαθεσικούς παράγοντες, όπως χαμηλό βάρος κατά τη γέννηση, αιματολογικά κακοήθη νοσήματα, καρκίνο συμπαγών οργάνων, εσωτερική αιμορραγία,

Ο. Κωστούλα,¹
Κ. Κόλλια,¹
Μ. Αραμπατζής,¹
Δ. Τούκας,¹
Ο. Νικολάτου,²
Κ. Δαρδούφας,³
Β. Κίτρα,⁴
Α. Σωτηροπούλου-Λόντου,⁵
Α. Βεηεγράκη¹

¹Κέντρο Αναφοράς Μυκητιάσεων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

²Εργαστήριο Παθολογίας Στόματος, Οδοντιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

³Εργαστήριο Ακτινοθεραπευτικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Νοσοκομείο Αρεταίειο

⁴Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Νοσοκομείο Παίδων «Αγ. Σοφία»

⁵Β' Ακτινοθεραπευτικό Τμήμα, Νοσοκομείο «Αγ. Σάββας», Αθήνα

Detection of the *KRE9/KNH1* genes in *Candida glabrata* of non-killer phenotype. Mechanisms of resistance to antifungals and new drug targets

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

C. glabrata
Γονίδια *KRE9/KNH1*
Μηχανισμοί αντοχής

Α' Βραβείο

Έπαθλο «Σωτήρης Παπασταμάτης» 2001

βρογχοπνευμονική δυσπλασία, συγγενείς καρδιοπάθειες, νεκρωτική εντεροκολίτιδα, πολλαπλού μυελώμα, αυτοάνοσα νοσήματα, ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών ουσιών, μεταμόσχευση μυελού και συμπαγών οργάνων, ολική παρεντερική σίτιση, ύπαρξη χειρουργικής ή μη χειρουργικής τοποθετημένων ενδοφλεβίων γραμμών και ποικίλης αιτιολογίας πρωτοπαθή ή επίκτητη ανοσοανεπάρκεια.¹ Συχνότερα αίτια λοιμώξεων στο χώρο εντός και εκτός του νοσοκομείου είναι οι ζυμομύκητες του γένους *Candida*. Η επίπτωση των «σπάνιων» ή «αναδυσόμενων» παθογόνων ειδών παρατηρείται αυξημένη κατά την τελευταία δεκαετία.² Μεταξύ αυτών, οι τελειόμορφοι απλοειδείς ζυμομύκητες *C. glabrata* και *Cl. lusitaniae* αποτελούν συχνά αίτια κακής πρόγνωσης συστηματικών λοιμώξεων, που οφείλεται στην αυξημένη κλινική αντοχή τους έναντι των αζολών.² Εξαιτίας αυτού, αναγνωρίζεται διεθνώς η ανάγκη ανακάλυψης νέων αντιμυκητιακών παραγόντων με εναλλακτικούς στόχους πρόσδεσης στο μυκητιακό κύτταρο.³

Το κυτταρικό τοίχωμα των ζυμομυκήτων διασφαλίζει τη βιολογική ακεραιότητα του κυττάρου. Αποτελείται δε κατά 90% από πολυσακχαρίτες και κατά 5–10% από πρωτεΐνες, πολυμερή (β-1,3- και β-1,6-γλυκάνες), χιτίνη και μαννανοπρωτεΐνες, ενώ τα λιπίδια και τα ανόργανα συστατικά ανευρίσκονται σε μικρές αναλογίες. Οι β-γλυκάνες αποτελούν το 50–60% του ξηρού βάρους του κυττάρου και, συνεπώς, ελκυστικό στόχο αντιμυκητιακών παραγόντων. Στην προσέγγιση αυτού του αντικειμενικού σκοπού συνέβαλε η ταυτοποίηση των γονιδίων *KRE* (killer-toxin resistant) 9–11 και *KNH1*, που κωδικοποιούν εκκριτικές πρωτεΐνες απαραίτητες για τη βιοσύνθεση της β-1,6-γλυκάνης, αρχικά στο *S. cerevisiae*, κατόπιν στην *C. albicans* και πολύ αργότερα στην *C. glabrata*.^{3,4} Η φυσική ή προκλητή, μερική ή ολική, αποδιοργάνωση της κασέτας γονιδίων *KRE9-11* και *KNH1* στην *C. glabrata* μπορεί να αναγνωριστεί φαινοτυπικά ως αντοχή στη φορική τοξίνη (μυκοτοξίνη) K1 του *S. cerevisiae* και ως αντοχή στην τετρακυκλίνη. Αυτό συμβαίνει λόγω της ατελούς βιοσύνθεσης β-1,6-γλυκάνης, που αποστερεί το κυτταρικό τοίχωμα από τους κατάλληλους υποδοχείς για τη σύνδεση της τοξίνης και της τετρακυκλίνης.⁴

Η συμβολή των γονιδίων *KRE9* και *KNH1* στην αντοχή των *C. glabrata* έναντι των παραγόντων των τριαζολών και των *Cl. lusitaniae* έναντι των πολυενίων δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, ίσως επειδή η έρευνα έχει εστιαστεί στους μηχανισμούς αναστολής της βιοσύνθεσης της β-1,3-γλυκάνης, που εκλεκτικά προκαλούν οι περισσότερες ομάδες αντιμυκητιακών φαρμάκων. Παρόλα αυτά, δεν έχει διερευνηθεί το πιθανό ποσοστό συμμετοχής της β-1,6-γλυκάνης, καθώς και η αλληλεπίδραση των δύο πολυμερών γλυκάνης στη διαθεσιμότητα των υποδοχέων φονικών ή αντιμυκητιακών παραγόντων του κυτταρικού τοιχώματος.

Θα ήταν παράλειψη όμως να αγνοηθεί αυτή η πλευρά της μελέτης, εφόσον τα δύο πολυμερή έχουν κοινές αρχικές βιοχημικές οδούς βιοσύνθεσης και συνδέονται με τη χιτίνη και μαννανοπρωτεΐνη του κυτταρικού τοιχώματος, αποδίδοντας από κοινού βιωσιμότητα στο μυκητιακό κύτταρο.

Δυστυχώς, παρά την κατά τα τελευταία χρόνια στροφή της βασικής έρευνας στα «αναδυσόμενα» είδη κλινικής σημασίας, παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστη η συγγένεια (ταξινόμική θέση) της *Cl. lusitaniae* με τα άλλα είδη *Candida*. Αυτό θα αποσαφηνίσει τους μηχανισμούς λοιμογόνου δραστηριότητας, τη γονοτυπική ποικιλομορφία των κλινικών στελεχών και την αντοχή πολλών από αυτά στα κημιοθεραπευτικά μέσα.^{4,5}

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε έτσι, ώστε, σε πρόδρομο στάδιο, να προσεγγίσει πολυπαραγοντικά τα ερωτήματα που προκύπτουν από τα έως σήμερα αποτελέσματα των ερευνών: (α) την κατανομή και διασπορά των *C. glabrata* στο περιβάλλον (νοσοκομειακό και μη), που διαθέτοντας μερική αποδιοργάνωση των γονιδίων *KRE9* και *KNH1* εμφανίζουν αντοχή σε τοξίνες και φάρμακα, (β) το φαινόμενο κλινικής αντοχής των *C. glabrata* και *Cl. lusitaniae* στην αντιμυκητιακή αγωγή, (γ) τον εντοπισμό των γονιδίων *KRE9* και *KNH1*, τα οποία θεωρούνται ότι έχουν «μοναδικές» αλληλουχίες για κάθε γένος μυκήτων, (δ) τη μεσοπρόθεσμη εφαρμογή της μεθοδολογίας ανίχνευσης των γονιδίων σε κλινικά δείγματα για την έγκαιρη ταυτοποίηση στελεχών με αντοχή σε ορισμένες ομάδες φαρμάκων, (ε) την πιστοποίηση της ακεραιότητας ή μερικής αποδιοργάνωσης των γονιδίων *KRE9* και *KNH1* με φαινοτυπικές δοκιμασίες και (στ) την πιθανή φυλογενετική συγγένεια των *C. glabrata* και *Cl. lusitaniae*, για να ερμηνευθούν οι φαινοτυπικές ομοιοτητές τους.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Στελέχη

Χρησιμοποιήθηκαν καθαρά καλλιέργηματα μυκήτων κλινικής και περιβαλλοντικής προέλευσης, καθώς και πρότυπα στελέχη (πίν. 1). Τα κλινικά στελέχη *C. glabrata*, *Cl. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. dubliniensis* και *C. guilliermondii* απομονώθηκαν από καντινιακές βλάβες του στόματος ασθενών υπό ακτινοθεραπεία για κακοήθεις όγκους κεφαλής-τραχήλου (24),⁶ από αιμοκαλλιέργειες και βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με κατά μέσο όρο νοσηλεία (mean length of stay, LOS) στη μονάδα εντατικής θεραπείας 16,8 ημέρες (9)⁷ και ο *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (1)⁸ από οσφυονωτιαία παρακέντηση ασθενούς με κρυπτοκοκκική μηνιγγοεγκεφαλίτιδα και σταδιοποιημένο (C3) AIDS. Τα πρότυπα στελέχη προέρχονταν από διεθνείς συλλογές μυκήτων (πίν. 1). Όλα τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν με συμβατικές βιοχημικές δοκιμασίες με API 32 ID (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Συμπληρωματικές βιοχημικές δοκιμασίες και μελέτη της φυσιολογίας κρίθηκαν απαραίτητες για την ταυτοποίηση των *Cl. lusitaniae*, οι οποίες πιστοποιήθηκαν μέσω κλειδας ζυμομυκήτων.⁹

Πίνακας 1. Προέλευση και αριθμός μελετηθέντων στελεχών.

Ζυμομύκητες	Αριθμός στελεχών	Περιβαλλοντικά	Κλινικά	Πρότυπα	Κωδικοί
<i>Candida glabrata</i>	18		18		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	1 (οινολογία)		3	K1(V116)-Lallemand, K1-Davenstar, Davis 522-Uvaform
<i>Cryptococcus laurentii</i>	2			2	CBS 139, NCPF 3832
<i>Cryptococcus albidus</i>	1	1 (οινολογία)			
<i>Clavispora lusitanae</i>	4		4		
<i>Candida tropicalis</i>	4		4		
<i>Candida albicans</i>	2		2		
<i>Candida guilliermondii</i>	2		2		
<i>Candida dubliniensis</i>	2		2		
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i>	3		2	1	IP 962.67
Σύνολο	42		34	6	

Γονοτυπικοί προσδιορισμοί

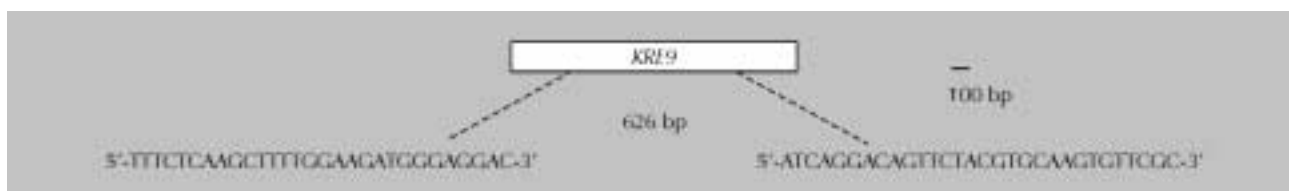
Ανίχνευση των γονιδίων β-1,6-γλυκάνης *KRE9* και *KNH1*. Για την ανίχνευση των δύο γονιδίων, των οποίων η μερική ή ολική αποδιοργάνωση αποτελεί δείκτη πλημμελούς βιοσύνησης β-1,6-γλυκάνης, χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Επιλογή εκκινητών και προσδιορισμός αναμενόμενων περιοριστικών θέσεων ενδονουκλεασών. Οι αλληλουχίες των γονιδίων *KRE9* και *KNH1* αναζητήθηκαν στην τράπεζα γενετικών δεδομένων (GenBank) με αριθμούς καταχώρησης AF064251 και AF064252, για το *KRE9* και το *KNH1*, αντίστοιχα. Τα αντίστοιχα ζεύγη εκκινητών (εικόνες 1, 2) επιλέχθηκαν με τα εξής κριτήρια: (α) να ορίζουν αλληλουχίες του κάθε γονιδίου, του οποίου κωδικοποιούν το λειτουργικό τμήμα του προϊόντος μετάφρασης, (β) τα προϊόντα ενίσχυσης κάθε ζεύγους να έχουν διακριτό μέγεθος, προκειμένου να είναι εφικτή η ταυτόχρονη ανίχνευσή τους με μία PCR και (γ) το μέγεθος των προϊόντων ενίσχυσης να ε-

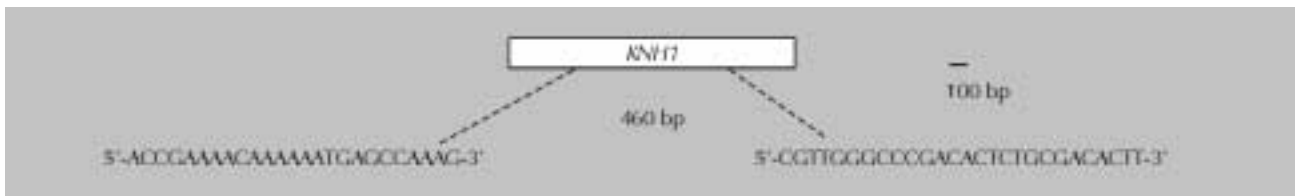
πιπρέπει ορατά και μετρήσιμα προϊόντα περιοριστικών πέψεων σε κοινό πήκτωμα αгарόζης. Οι επιλεγέντες εκκινητές κατασκευάστηκαν από την Interactiva GmbH (Ulm, Germany).

Η αναζήτηση των περιοριστικών θέσεων ενδονουκλεασών επί των προϊόντων ενίσχυσης έγινε σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (GenBank, BLAST/FASTA function) (πίν. 2). Θεωρήθηκε δε αναγκαίο, προκειμένου να επιλεγούν τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα για τον έλεγχο πιθανού πολυμορφισμού, που θα αποστερούσε το ενισχυμένο τμήμα του γονιδίου από τις αναμενόμενες περιοριστικές θέσεις των συγκεκριμένων ενδονουκλεασών.

Εκκύλιση DNA και συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Από κάθε μονοκαλλιέργεια στελέχους ελήφθησαν κύτταρα, ποσότητας «ενός κρικοφόρου στειλεού», μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωληνάριο μικροφυγοκέντρου και διαλύθηκαν σε 150 μL διαλύματος Chelex [15% chelex 100 resin (w/v), 0,1% Nonidet P40 (v/v), 1% Tween 80 (v/v)]. Σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν 7–8 σείρα γυάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 1,1–1,2 mm



Εικόνα 1. Απεικόνιση του γονιδίου *KRE9*, αποτελούμενου από 1.321 βάσεις. Εμφαίνονται οι αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και το μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης.



Εικόνα 2. Απεικόνιση του γονιδίου *KNH1*, αποτελούμενου από 1.441 βάσεις. Εμφαίνονται οι αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και το μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης.

Πίνακας 2. Αναμενόμενες περιοριστικές θέσεις επί των προϊόντων ενίσχυσης αλληλουχιών των γονιδίων *KRE9* και *KNH1*.

Ενδονουκλεάση	<i>KRE9</i>			<i>KNH1</i>		
	<i>Hinf I</i>	<i>Msp I</i>	<i>Alu I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Msp I</i>	<i>Alu I</i>
Περιοριστικά τμήματα (bp)	251, 174, 127, 74	Καμία	244, 214, 168	Καμία	Καμία	405, 31, 24

(Sherwood) και έγινε ανάδευση των σωληναρίων σε vortex επί 4 min. Ακολούθησε θέρμανση των δειγμάτων στους 95 °C επί 30 min, επαναφορά τους στη θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη 500 µL στείρου HPLC H₂O στο καθένα και φυγοκέντρωσή τους σε 8.000 g επί 8 min. Τα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε καθαρά σωληνάρια και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C.

Το γενετικό υλικό που απομονώθηκε κατά το προηγούμενο στάδιο, ελέγχθηκε με PCR για την παρουσία μυκητιακού DNA με τους εναρκτές ITS-1/ITS-4, όπως έχει περιγραφεί.¹⁰

Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν 5 µL DNA-στόχου, 2,5 u Taq-πολυμεράσης και 100 pmol καθενός από τους τέσσερις εναρκτές, 6 µL MgCl₂ (25 mM), 10 µL διαλύματος ελεύθερου Mg (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl και 1% Triton-X), 0,08 mM από κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο, σε τελικό όγκο 50 µL. Ο προσδιορισμός της άριστης μοριακής αναλογίας των εκκινητών και των αντιδραστηρίων για την PCR, της θερμοκρασίας πρόσδεσης των εναρκτών και των απαιτούμενων κύκλων για τη βέλτιστη σύγχρονη ενίσχυση αλληλουχιών και των δύο γονιδίων, προσδιορίστηκε μετά από δοκιμή σε διαπιστευμένο για PCR θερμικό κυκλοποιητή (Robocycler, Gradient 40, Stratagene, USA). Οι συνθήκες εργασίας, οι οποίες προσδιορίστηκαν για 40 κύκλους, είχαν ως εξής: 1 min στους 95 °C, 1 min στους 55 °C και 1 min στους 72 °C. Ο τελικός κύκλος περιελάμβανε 1 min στους 95 °C, 1 min στους 55 °C και 1 min στους 72 °C.

Περιοριστικές πέψεις. Οι περιοριστικές πέψεις έγιναν σε τελικό όγκο 30 µL προϊόντος ενίσχυσης με 30 u του κάθε ενζύμου και επώαση επί 2–16 ώρες στους 37 °C, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα προϊόντα των πέψεων διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πλάκωμα αгарόζης 3% κεχρωσμένης με βρωμιούχο αιθίδιο και συγκρίθηκαν με μάρτυρα μεγεθών (πλάσμιδιο pBR-322, που είχε επώαστεί με ενδονουκλεάση *Msp I*).

Μελέτη φαινοτυπικών χαρακτήρων

Για την ανίχνευση της μερικής ή ολικής αποδιοργάνωσης των γονιδίων *KRE9* και *KNH1* χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες δοκιμασίες προσδιορισμού φαινοτυπικών χαρακτήρων, που προσ-

διορίζουν την πλημμελή ή μη βιοσύνθεση β-1,6-γλυκάνης, η οποία διασφαλίζει την ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος και, συνεπώς, τη βιωσιμότητα του μυκητιακού κυττάρου.

Ευαισθησία των στελεχών στη μυκοτοξίνη K1 του *S. cerevisiae*. Για την ανίχνευση ευαισθησίας ή όχι στη μυκοτοξίνη K1, τα υπό εξέταση στελέχη αναπτύχθηκαν αρχικά σε ζωμό YEPD [10 g yeast extract (Difco, Mi, USA), 20 g μυκητολογική πεπτόνη (Oxoid, UK), 20 g D-γλυκόζης (Serva, Germany), 1 L διασπασταγμένου ύδατος] με επώαση στους 25 °C επί 24 ώρες, έτσι ώστε τα κύτταρα του υπό έλεγχο ζυμομύκητα να περιέλθουν σε εκθετική φάση ανάπτυξης. Τα μυκοτοξινογόνα στελέχη αναπτύχθηκαν σε άγαρ YEPD [1 L ζωμού YEPD, 18 g άγαρ (Serva)] στους 25 °C για 48 ώρες.

Στη συνέχεια, έγινε πρώτη αραιώση 1:10 του εναιωρήματος των υπό έλεγχο στελεχών σε ζωμό YEPD και δεύτερη αραιώση 1:20 σε αποστειρωμένο άγαρ YEPD θερμοκρασίας 45–50 °C (pH 4,3) και ακολούθησε απόχωση του εμβολιασμένου υποστρώματος σε τρυβλία. Μετά τη στερεοποίηση του υλικού, που περιείχε ενσωματωμένο τον κάθε υπό έλεγχο ζυμομύκητα, τα υποστρώματα εμβολιάστηκαν σε συγκεκριμένο σημείο με τα μυκοτοξινογόνα στελέχη, στην τοξίνη των οποίων ανιχνεύθηκε η ευαισθησία τους. Η επώαση έγινε στους 18 °C για 5 ημέρες. Η ευαισθησία του κάθε στελέχους στην τοξίνη πιστοποιήθηκε με την ύπαρξη ζώνης αναστολής ανάπτυξης γύρω από το σημείο ανάπτυξης του μυκοτοξινογόνου στελέχους. Το πρότυπο στέλεχος *S. cerevisiae* (Davis-522), με γνωστή ευαισθησία στην τοξίνη K1 του *S. cerevisiae* (K1V116), χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας.

Έλεγχος έκφρασης γονιδίων *KRE9* και *KNH1* που κωδικοποιούν για τη βιοσύνθεση της β-1,6-γλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος (προσδιορισμός φαινοτύπων *Tel^R*). Για την αναγνώριση των ανθεκτικών στην τετρακυκλίνη στελεχών, οι υπό εξέταση ζυμομύκητες καλλιεργήθηκαν αρχικά σε άγαρ Sabouraud-SDA (Difco) και επώαστηκαν στους 30 °C επί 2 ημέρες. Από τα αρχικά καλλιεργήματα, ετοιμάστηκε εμβόλιο πυ-

κνότητας 0,5 της κλίμακας MacFarland (MF), ποσότητα του οποίου εμβολιάστηκε σε Mueller Hinton agar (Difco) με στείρο στείλεό, καλύπτοντας ομοιόμορφα όλη την επιφάνεια του υποστρώματος. Στη συνέχεια και αφού τοποθετήθηκε στην επιφάνεια του υποστρώματος ο 30 µg/mL δίσκος τετρακυκλίνης (BBL, Becton-Dickinson, Cockeysville, USA), ακολούθησε επώαση των καλλιεργημάτων στους 35 °C επί 3 ημέρες. Η ευαισθησία στην τετρακυκλίνη πιστοποιήθηκε με την ύπαρξη ζώνης αναστολής ανάπτυξης του εξεταζόμενου στελέχους στην περιφέρεια του δίσκου.

Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας (ΕΑΠ) των αντιμυκητιακών παραγόντων. Η μελέτη της ευαισθησίας των στελεχών στους πέντε μέχρι σήμερα αντιμυκητιακούς παράγοντες που χορηγούνται για τη θεραπεία συστηματικών μυκητιάσεων (αμφοτερικίνη Β, φλουκοναζόλη, ιτρακοναζόλη, κετοκοναζόλη και 5-φθοριοκυτοσίνη) έγινε με το σύστημα μικροαραιώσεων SENSITITRE[®], πιστοποιημένο από την Εθνική Επιτροπή Κλινικών Προτύπων των ΗΠΑ (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και της NCCLS M27-A, 1997.¹¹

Παράλληλα, μελετήθηκε η ευαισθησία σε ένα νέο παράγωγο των τριαζολών, τη βορικοναζόλη (UK-109,496), που σύντομα θα κυκλοφορήσει στην Ελλάδα, για τον έλεγχο της οποίας εφαρμόστηκε μια τροποποίηση της κατά NCCLS μεθόδου μικροαραιώσεων. Συγκεκριμένα, ο εμβολιασμός των πλακών μικροπιλοποίησης έγινε με εναιώρημα σε αποστειρωμένο διασπασταγμένο νερό κυτάρων ληφθέντων από άγαρ SDA (Difco) μετά από 24ωρη επώαση σε θερμοκρασία 30 °C. Η συγκέντρωση των κυτάρων ρυθμίστηκε μετά από καταμέτρησή τους σε ειδική πλάκα σε 0,5–2,5×10³ κύτταρα/mL, που ισοδυναμούσε με τη θολερότητα 0,5 της κλίμακας MF. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε μετά από επώαση των πλακών μικροπιλοποίησης στους 35 °C για 48 ώρες. Για την αμφοτερικίνη Β, ως μυκητοκτόνο αντιμυκητιακό, μετρήθηκε ΕΑΠ₁₀₀ και για τις αζόλες, λόγω της μυκητοστατικής τους δράσης, ΕΑΠ₈₀.¹²

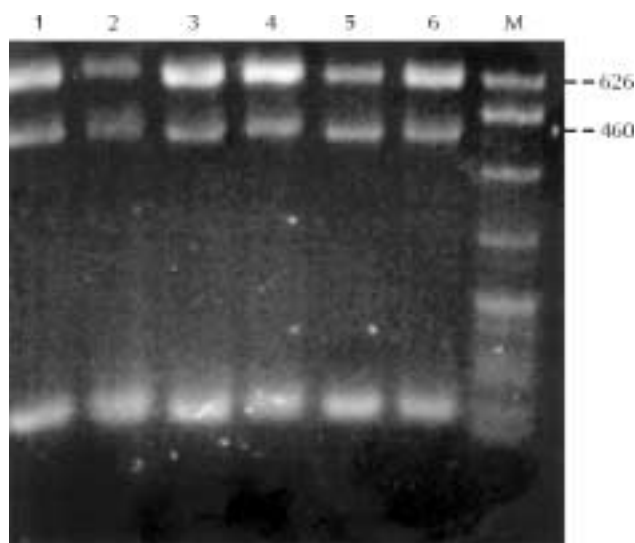
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στελέχη

Κανένα στέλεχος δεν παρουσίασε αμφίβολο βιοχημικό πρότυπο ή συγκεκριμένο πρότυπο μορφολογικών και φυσιολογικών ιδιοτήτων.

Ανίχνευση γονιδίων *KRE9* και *KNH1* με PCR και περιοριστικά πρότυπα προϊόντων ενίσχυσης

Τα προϊόντα ενίσχυσης είχαν το αναμενόμενο, από τη μελέτη των γονιδίων, μέγεθος και ανιχνεύθηκαν και στα 18 κλινικά στελέχη *C. glabrata* (εικ. 3). Αλληλουχίες των γονιδίων αυτών δεν ανιχνεύθηκαν στους παθογόνους ζυμομύκητες *S. cerevisiae*, *C. laurentii*, *C. albidus*, *C. neoformans*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*



Εικόνα 3. Προϊόντα ενίσχυσης *KRE9* και *KNH1* στελεχών *C. glabrata* σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5%. Διαδρομές 1 έως 6: *C. glabrata*, M: Μοριακός δείκτης μεγέθους ζευγών βάσεων pBR322×*Msp* I.

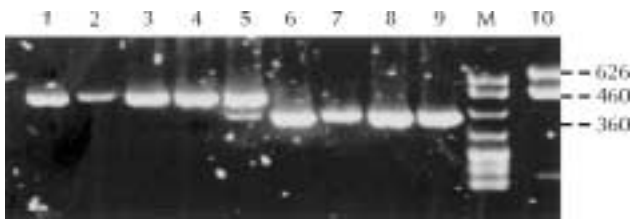
και *C. guilliermondii*. Αντίθετα, παρουσία ομόλογων, πλην μικρότερου μεγέθους, αλληλουχιών και των δύο γονιδίων ανιχνεύθηκαν σε όλα τα στελέχη *Cl. lusitaniae* (εικ. 4). Συγκεκριμένα, το προϊόν *KRE9* των *Cl. lusitaniae* ήταν 460 bp, ενώ το προϊόν *KNH1* περίπου 360 bp.

Κανένα στέλεχος *C. glabrata* δεν παρουσίασε διαφορετικό από το αναμενόμενο περιοριστικό πρότυπο με *Hinf* I ή *Msp* I για κανένα από τα δύο γονίδια (πίν. 2, εικ. 5), ενώ τα ακριβή περιοριστικά πρότυπα με *Alu* I είναι υπό μελέτη. Οι μη ειδικές ζώνες μεγέθους 160 ζευγών βάσεων (εικ. 5, διαδρομές 5 και 6) δεν απεικονίζουν προϊόντα πέψης, δεδομένου ότι εμφανίζονταν και κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR. Ο καθορισμός του περιοριστικού προτύπου των προϊόντων *KRE9* και *KNH1* με τις ενδονουκλεάσες *Hinf* I και *Msp* I των *Cl. lusitaniae* δεν κρίθηκε απαραίτητος, εφόσον η διαφοροποίηση των δύο ζυμομυκήτων ήταν εφικτή λόγω των διακριτού μεγέθους προϊόντων ενίσχυσης.

Μελέτη φαινοτυπικών χαρακτήρων

Η αξιολόγηση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των στελεχών συνέβαλε στην εκτίμηση της συχνότητας αποδιοργάνωσης των γονιδίων *KRE9* και *KNH1* στον πληθυσμό των κλινικών στελεχών που εξετάστηκε.

Ευαισθησία στη μυκοτοξίνη K1 του S. cerevisiae. Τα στελέχη μυκοτοξινογόνων (φονέων) και ευαίσθητων μαρτύρων εμφάνισαν την αναμενόμενη φαινοτυπική εικόνα (εικ. 6). Όλα τα στελέχη *C. glabrata* εμφάνισαν ανοχή στην τοξίνη K1, πλην ενός στελέχους ασθενούς



Εικόνα 4. Προϊόντα ενίσχυσης *KRE9* και *KNH1* στελεχών *Clavispora lusitaniae* και *C. glabrata*. Διαδρομές 1–4: *KRE9* στελεχών *Cl. lusitaniae*, 5: *KRE9* και *KNH1* στελεχών *Cl. lusitaniae*, 6–9: *KNH1* στελεχών *Cl. lusitaniae*, M: Μοριακός δείκτης μεγέθους ζευγών βάσεων pBR322×*Msp* I, 10: *KRE9* και *KNH1* στελεχών της *C. glabrata*.

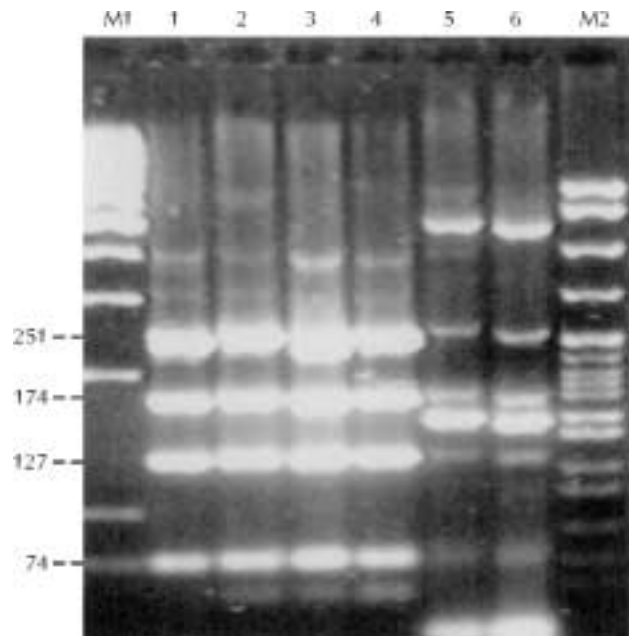
με καντινιακή σπυραιμία, το οποίο επέδειξε μέτρια ευαισθησία (εικ. 7).

Έλεγχος έκφρασης των γονιδίων KRE9 και KNH1. Προσδιορισμός φαινοτύπων Tet^R. Όλα τα στελέχη μαρτύρων και η πλειοψηφία αυτών κλινικής προέλευσης, εμφάνισαν αντοχή στην τετρακυκλίνη. Εξαίρεση αποτέλεσαν τρία στελέχη, δύο από ασθενείς με καντινιαίμια και ένα ασθενούς υπό ακτινο-χημειοθεραπεία για κακοήγη όγκο τραχήλου, που εμφάνισαν ελάχιστης διαμέτρου ζώνη αναστολής, περίπου 2–2,5 mm (εικ. 8). Καθένα από τα τρία αυτά στελέχη δεν εμφάνισε παράλληλη ευαισθησία στη μυκοτοξίνη K1.

Ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα σε αντιμυκητιακούς παράγοντες. Όλα τα στελέχη *C. glabrata* εμφάνισαν ευαισθησία σε αμφοτερικίνη Β, με ΕΑΠ κυμαινόμενη από 0,03–0,5 µg/mL. Για δύο στελέχη *Cl. lusitaniae* καταγράφηκε ΕΑΠ 1,0 µg/mL. Εξαιρετική ευαισθησία των *C. glabrata* καταγράφηκε στην 5-φθοριοκυτοσίνη (ΕΑΠ < 0,03–0,125 µg/mL). Αντίθετα, στην κετοκοναζόλη και την ιπρακοναζόλη μετρήθηκε σε 17/18 ΕΑΠ ≥ 2 µg/mL, όριο ευαισθησίας των ζυμομυκήτων έναντι αυτών. Αντοχή και των 18 στελεχών *C. glabrata* καταγράφηκε και έναντι της φλουκοναζόλης (ΕΑΠ > 32 µg/mL). Αυξημένες τιμές ΕΑΠ (≥ 2 µg/mL) έναντι των *C. glabrata* (15/18) παρατηρήθηκαν και στη βορικοκοναζόλη, χωρίς όμως να είναι δυνατή η άμεση αξιολόγησή τους, επειδή δεν έχουν τεθεί ακόμη τα όρια ευαισθησίας γι' αυτή την τριαζόλη.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο παλαιότερος αφορισμός ότι «το κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί το μεγαλύτερο οργανύλλιο των φυτικών και μυκητιακών κυττάρων» επιβεβαιώθηκε, κυρίως με τη διευκρίνιση του ρόλου των πολυμερών γλυκάνης στη διατήρηση της βιολογικής ακεραιότητας του τοιχώματος, της σημασίας τους ως υποδοχέων αντιμυκητιακών ουσιών και της συμμετοχής τους στη δημιουργία προσκολλητι-



Εικόνα 5. Περιοριστικός χάρτης των προϊόντων ενίσχυσης *KRE9* και *KNH1* μετά από πέψη με *Hinf* I. Διαδρομή M1: Μοριακός δείκτης 100 bp. Διαδρομές 1–4: Περιοριστικό πρότυπο *KRE9* στελεχών *C. glabrata* με *Hinf* I. Διαδρομές 5–6: Περιοριστικό πρότυπο των *KRE9* και *KNH1* στελεχών της *C. glabrata* με *Hinf* I. Στις διαδρομές 5 και 6 διακρίνονται μη ειδικά προϊόντα ενίσχυσης, μεγέθους περίπου 160 ζευγών βάσεων. Διαδρομή M2: pBR322×*Msp* I.

τών, λόγω των πολλαπλών δεσμών τους με τη χιτίνη, τη μαννόζη και τα ολιγομαννανοτίδια.¹³

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι, σε ένα τυχαίο δείγμα πληθυσμού κλινικών και μη στελεχών *C. glabrata*, οι αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν το λειτουργικό τμήμα της πρωτεΐνης για τη βιοσύνθεση της β-1,6-γλυκάνης είναι καλά συντηρημένες. Αυτό, πάντως, δεν διασφαλίζει πλήρως τη δομική ακεραιότητα της πρωτεΐνης, καθώς πιστοποιείται από την καταγραφή αντοχής στη μυκοτοξίνη K1 του *S. cerevisiae* για την πλειοψηφία των στελεχών (17/18) που ελέγχθηκαν. Το ένα στέλεχος, που εμφάνισε μειωμένη αντοχή στη μυκοτοξίνη K1, παρουσίασε επίσης μειωμένες τιμές ΕΑΠ έναντι όλων των αντιμυκητιακών παραγόντων πλην της φλουκοναζόλης, εφόσον ο μηχανισμός αντοχής έναντι αυτής ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη ενεργού μεταφοράς (Candida Drug Resistance, CDR), η οποία χρησιμοποιεί για τη λειτουργία της ενέργεια που προκύπτει από διάσπαση ATP σε ειδικές υπομονάδες της και ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών ABC (ATP-Binding Cassette-4).¹⁴

Επιπλέον, τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι στελέχη με μειωμένους υποδοχείς για την τοξίνη K1 ή για τα αντι-



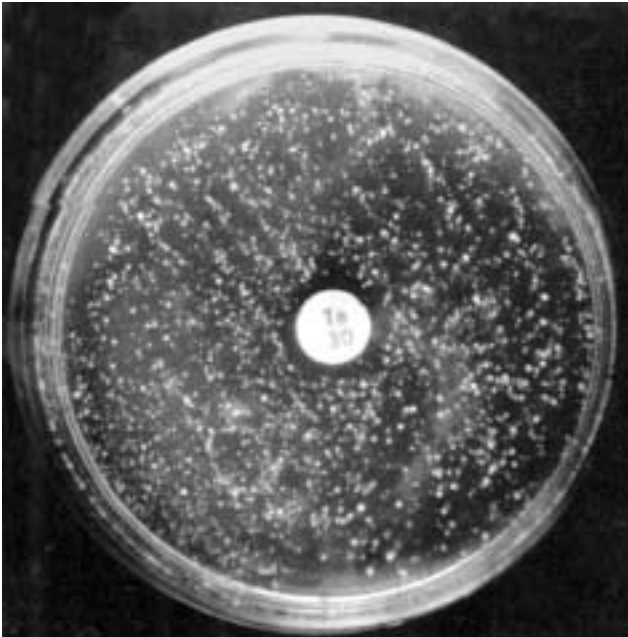
Εικόνα 6. Προσδιορισμός ευαισθησίας πρότυπου στελέχους μάρτυρα *S. cerevisiae* Davis-522 σε μυκοτοξινογόνα στελεχών *S. cerevisiae* K1V116, K1 (δύο οινολογικά στελεχών) και *C. laurentii* NCPF3832, CBS139.



Εικόνα 7. Προσδιορισμός ευαισθησίας κλινικού στελέχους *C. glabrata* σε μυκοτοξίνες στελεχών *S. cerevisiae* K1V116, K1 και *C. laurentii* NCPF3832, CBS139.

μυκητιακά φάρμακα και συνεπώς με μειωμένη ποσότητα β-1,6-γλυκάνης, απομονώνονται από νοσοκομειακούς και μη νοσηλεύμενους ασθενείς. Η μελέτη στελεχών με μειωμένη β-1,6-γλυκάνη κυτταρικού τοιχώματος έχει δείξει ότι, για να διευκολυνθεί η ανάπτυξή τους, είναι απαραίτητη η προσθήκη περίσσειας γλυκόζης.⁴ Αυτός είναι πιθανώς ο λόγος που η πλειοψηφία κλινικών στελεχών *C. glabrata* αναπτύσσεται αργά σε κοινά κλινικά υγρά και στερεά θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν πρότυπη ποσότητα 6–8 g γλυκόζης. Χαρακτηριστικά, αναφέρεται ότι η ανάπτυξη του αντιμυκητογράμματος σε στερεά και υγρά υποστρώματα για την *C. glabrata* απαιτεί 48–72 ώρες επώασης (προσωπική παρατήρηση), ενώ τα άλλα είδη *Candida* αναγιγνώσκονται εντός 24 ωρών. Σε αντίθεση, δηλαδή, με όσα υποστηρίζονται από τη βιβλιογραφία,^{3,4} μικρής έκτασης τροποποιήσεις των δύο αυτών γονιδίων (εξαιτίας κάποιων μεταλλάξεων), όπως αυτές εκφράζονται με την αντοχή στη μυκοτοξίνη K1 και την αντοχή στην τετρακυκλίνη, φαίνεται να είναι διαδεδομένες στη φύση. Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι τα επιλεγμένα προς ενίσχυση τμήματα των γονιδίων *KRE9* και *KNH1* φαίνεται να συντηρούνται, αποτελεί ισχυρό κριτήριο επιλογής της περιγραφόμενης μεθοδολογίας ως διαγνωστικού εργαλείου για την πρώιμη ανίχνευση των *C. glabrata* σε κλινικά υλικά, επειδή αυτό θα οδηγούσε έγκαιρα στην επιλογή μη αζολικού σχήματος χημειοθεραπείας.

Η σχεδόν ενιαία αντοχή στην τετρακυκλίνη, την οποία επέδειξε το τυχαίο δείγμα πληθυσμού κλινικών στελεχών (Tet^R) που ελέγχθηκε (14/17), είναι δηλωτική της έκφρασης των δύο γονιδίων, δεδομένου ότι μεταλλαγμένα στελεχά με απόντα τα γονίδια *KRE9* και *KNH1* είναι ευαίσθητα στην τετρακυκλίνη (Tet^S).^{3,4,15} Η προκαταρκτική μελέτη άλλων ειδών *Candida* έδειξε ότι οι ελεγχόμενες αλληλουχίες των γονιδίων *KRE9* και *KNH1* δεν είναι κοινές για το Γένος. Αυτό όμως θα πιστοποιηθεί με τον έλεγχο μεγαλύτερου δείγματος ποικιλίας ειδών *Candida* και άλλων μυκήτων. Οι ενδείξεις, όμως, μέχρι στιγμής συνηγορούν υπέρ της μοναδικότητας των αλληλουχιών για την *C. glabrata*. Παρόμοιες *KRE9* και *KNH1* αλληλουχίες, όπως έδειξαν τα προϊόντα ενίσχυσης, ανιχνεύθηκαν στα στελεχά του επίσης απλοειδούς παθογόνου ζυμομύκητα *Cl. lusitaniae*. Τα προϊόντα όμως ενίσχυσης, συγκρινόμενα με αυτά της *C. glabrata*, είναι μικρότερα για το *KRE9* κατά περίπου 166 ζεύγη βάσεων και για το *KNH1* κατά 100 ζεύγη βάσεων. Η σημασία αυτής της ορατής σε κοινή αγαρόζη διαφοράς είναι διπλή: ενθαρρύνεται η χρήση των εκκινητών που προτείνονται για τη διαφοροποίηση αυτών των απαιτητικών ως προς τη χημειοθεραπεία μυκήτων και προσφέρεται η πρώτη απόδειξη στενότερης φυλογενετικής συγγένειας της *Cl. lusitaniae* με την *C. glabrata*. Η ανεύρεση ομολογίας των γονιδίων *KRE9* και *KNH1* μεταξύ των *S. cerevisiae* και *C. glabrata*^{3,15} αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη για την τοποθέτηση της δεύτερης σε πλησιέστερη στο *S. cerevisiae* θέση στο φυλογενετικό δένδρο. Έτσι,



Εικόνα 8. Προσδιορισμός ευαισθησίας κλινικού στελέχους *C. glabrata* στην τετρακυκλίνη. Διακρίνεται η ζώνη αναστολής ανάπτυξης του υπό έλεγχο στελέχους.

σήμερα είναι αποδεκτό ότι η *C. glabrata* αποσχίστηκε από το γένος *Saccharomyces*.^{3,4,9,15} Προς το παρόν, η *Cl. lusitaniae*, με βάση τη μελέτη αλληλουχιών του rRNA, τοποθετείται πλησιέστερα στις *C. tropicalis* και *C. para-*

psilosis,¹⁶ γεγονός παράδοξο, επειδή διαφέρουν σημαντικά ως προς τις φαινοτυπικές τους ιδιότητες.

Η παρούσα μελέτη, αν και χειρίστηκε μικρό πληθυσμό στελεχών, στοιχειοθέτησε την ύπαρξη αυξημένης συχνότητας στη φύση στελεχών με μερική αποδιοργάνωση ή τροποποίηση του συστήματος βιοσύνθεσης της β-1,6-γλυκάνης και προσέφερε ενδείξεις περί της γλυκανοεξαρτώμενης αντοχής των *C. glabrata* στα αντιμυκητιακά φάρμακα. Επίσης, υπέδειξε τη χρησιμότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας ανίχνευσης αλληλουχιών των γονιδίων *KRE9* και *KNH1* με PCR για την πρόωπη διαφορική διάγνωση των αυξανόμενης συχνότητας λοιμώξεων¹⁷ από *C. glabrata* και *Cl. lusitaniae* και την αναθεώρηση της φυλογενετικής θέσης των *Cl. lusitaniae*.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία υποστηρίχθηκε από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (Έργο ΠΕΝΕΔ 99 ΕΔ 39-70/5062) και από την Ευρωπαϊκή Ένωση. Οι συγγραφείς ευχαριστούν θερμώς το Κέντρο Ελέγχου Ειδικών Λοιμώξεων (ΚΕ-ΕΛ), που παρέχει τα τεχνικά μέσα για την εκπόνηση της εργασίας, τον τελειόφοιτο Ιατρικής Θ. Καλαμπόκα για την ανεκτίμητη βοήθειά του στην αναζήτηση βιβλιογραφίας και τις Μ. Λογοθέτη, Α. Μηλιώνη και Σ. Κρητικού για την αμέριστη τεχνική βοήθεια.

ABSTRACT

Detection of the *KRE9/KNH1* genes in *Candida glabrata* of non-killer phenotype. Mechanisms of resistance to antifungals and new drug targets

O. KOSTOULA,¹ K. KOLLIA,¹ M. ARABATZIS,¹ D. TOUKAS,¹ O. NIKOLATOU,² K. DARDOUFAS,³ V. KITRA,⁴ A. SOTIROPOULOU-LONTOU,⁵ A. VELEGRAKI¹

¹*Mycology Reference Laboratory, Department of Microbiology, Medical School, University of Athens*
²*Department of Oral Pathology, School of Dentistry, University of Athens,* ³*Department of Radiotherapy, Medical School, University of Athens,* ⁴*Bone Marrow Transplant Unit, "Agia Sophia" Pediatric Hospital*
⁵*2nd Department of Radiotherapy, "Agios Savvas" Oncology Hospital, Athens, Greece*

Archives of Hellenic Medicine 2001, 18(4):354-362

OBJECTIVE To determine the distribution and abundance of wild-type *Candida glabrata* with disrupted *KRE9/KNH1* genes encoding for cell surface O glycoproteins required for β-1,6-glucan biosynthesis, to determine whether such strains are resistant *in vitro* to the azole drugs and to develop a PCR system for detecting the presence of these genes in conjunction with screening for their expression using phenotypic tests. An additional aim was to seek evidence for, or against, the phylogenetic relationship between *C. glabrata* and *Clavispora (Candida) lusitaniae* based upon identification of identical sequences in their homologous *KRE9/KNH1* genes. **METHOD** The strains were randomly selected among cases of oral candidiasis from patients receiving radio-chemotherapy for head and neck tumors, and those with candidemia episodes and from bronchopulmonary candidiasis. Primers were selected on studying each gene sequence, as published in the GenBank, and

a construction of the amplicon restriction map was computer assisted. All strains were tested by duplex PCR for the simultaneous amplification of sequences from both genes. Expression and partial disruption of the genes was tested by killer tests using the type *Saccharomyces cerevisiae* killer strain K1V116 and by performing tetracycline resistance tests. Phenotypic resistance tests to antifungal drugs including voriconazole (UK-109,496) were performed by the NCCLS proposed microdilution method. **RESULTS** Evidence was produced that one of the mechanisms involved in azole resistance of *C. glabrata* could be due to the disruption of the *KRE9/KNH1* genes. The tested strains also showed azole resistance. **CONCLUSIONS** The proposed PCR system is of potential clinical use as a tool for rapid differential diagnosis of *C. glabrata* and *C. lusitanae*. Finally, the results provide evidence of the close phylogenetic relationship of the two yeasts.

Key words: *C. glabrata*, *KRE9/KNH1* genes, Resistance mechanisms

Βιβλιογραφία

- FRIDKIN SK, JARVIS WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996, 9:499–511
- HAZEN KC. New emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995, 4:462–478
- NAGAHASHI S, LUSSIER M, BUSSEY H. Isolation of *Candida glabrata* homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* *KRE9* and *KNH1* genes and their involvement in cell wall β -1,6-glucan synthesis. *J Bacteriol* 1998, 19:5020–5029
- BROWN JL, KOSSACZKA Z, JIANG B, BUSSEY H. A mutational analysis of killer toxin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* identifies new genes involved in cell wall β -1,6-glucan synthesis. *Genetics* 1993, 133:837–849
- MERZ WG, KHAZAN U, JABRA-RIZK MA, WU LC, OSTERHOUT GJ, LEHMAN PF. Strain delineation and epidemiology of *Candida (Clavispora) lusitanae*. *J Clin Microbiol* 1993, 30:449–454
- NIKOLATOU-GALITIS O, DARDOUFAS K, SOTIROPOULOU-LONTOU A, KYPRIANOU K, KOLITSI G, PISSAKAS G ET AL. Oral pseudomembranous candidiasis and oral mucositis in head and neck cancer patients receiving radiation therapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mouthwash. *J Oral Med Pathol* 2001, 30:471–480
- KOLLIA K, BELESIOU E, LAZOU A, PLATSOUKA E, TOUKAS D, KOSTOULA O ET AL. Insight into the DNA types and etiologic agents of candidemia. Susceptibility to voriconazole (UK-109 496) and other triazole derivatives. *Curr Anti-infect Ther* 2001, 21:1–6
- 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 (in print)
- KURTZMAN CP, FELL JW. *The Yeasts, a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, 1998
- VELEGRAKI A, KAMBOURIS ME, SKINIOTIS G, SAVALA M, MITROUSSIA-ZIOUVA A, LEGAKIS NJ. Identification of medically significant fungal genera with PCR followed by enzyme restriction analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999, 23:303–312
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa, 1997
- REX JH, PFALLER MA, GALGANI JN, BARRLETT MS, ESPINEL-INGROFF A, GHANNOUM MA ET AL. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. *Clin Infect Dis* 1997, 24:235–247
- TIMPEL C, STRAHL-BOLSNGER S, ZIEGELBAUER K, ERNST JF. Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1998, 273:20837–20846
- IWATA K. Mechanisms of azole resistance. In: Jacobs PH, Nail J (eds) *Fungal Disease. Biology, Immunology and Diagnosis*. Marcel Dekker Inc, New York, 1997, 1:473–482
- AL-AIDROOS K, BUSSEY H. Chromosomal mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the cell wall binding site for killer factor. *Can J Microbiol* 1978, 24:228–237
- BARNES SM, LANE DJ, SOGIN ML, BIBEAU C, WEISBURG WG. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J Bacteriol* 1991, 173:2250–2255
- KANELLOPOULOU M, STAMOS G, PETINELLI I, SAVALA M, TZIMOGIANNI A, FOUSTOUKOU M ET AL. Subtyping and antifungal susceptibilities of *Candida* spp in the intensive care unit of a Greek general hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2001, 18:179–183

Corresponding author:

O. Kostoula, 85 Skyrou street, GR-113 63 Athens, Greece
e-mail: okostoula@med.uoa.gr