

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

METODY I TECHNIKI MOLEKULARNE STOSOWANE W DIAGNOSTYCE I EPIDEMIOLOGII ZAKAŻEŃ GRZYBAMI CHOROBOTWÓRCZYMI

ANITA DOBROWOLSKA, ŁUKASZ BOJARSKI I PAWEŁ STĄCZEK

Zakład Genetyki Drobnoustrojów, Instytut Mikrobiologii i Immunologii, Uniwersytet Łódzki,
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

ABSTRACT. *Molecular methods and techniques used in diagnosis and epidemiology of infections caused by pathogenic fungi.* In this paper we reviewed the latest literature on molecular techniques used in diagnosis and epidemiology of infections caused by pathogenic fungi. Traditional methods used for the identification and typing of medically relevant fungi include morphological and biochemical analysis. These methods are time-consuming and base on phenotypic features what makes them unreliable. We described the usefulness in mycological studies of fast and very sensitive molecular methods which rely on PCR and hybridization techniques.

Key words: diagnostic methods, pathogenic fungi.

WSTĘP

Grzybicze zakażenia ludzi stają się zjawiskiem coraz bardziej powszechnym. Rozwojowi grzybic sprzyjają niedobory immunologiczne pierwotne – wynikające z uwarunkowań genetycznych oraz wtórne o zróżnicowanej etiologii – powodowane przez niedożywienie, choroby autoimmunologiczne, AIDS, choroby nowotworowe, a także przez uzależnienie od leków, narkotyków i alkoholu oraz zabiegi chirurgiczne (Kurnatowska 1995).

Grzybice dzieli się na trzy główne typy: (i) grzybice powierzchniowe, (ii) grzybice podskórne, (iii) grzybice układowe (Szepietowski 2001). Grzybice powierzchniowe to infekcje obejmujące warstwy naskórka i skóry właściwej oraz wytwory naskórka. Najczęściej izolowanymi czynnikami etiologicznymi tych schorzeń są dermatofity z widoczną dominacją gatunków *Microsporum canis* i *Trichophyton mentagrophytes* var. *granulosum* w przypadkach grzybicy skóry gładkiej (Jeske i wsp. 1999), *Trichophyton rubrum* w grzybicy paznokci (Lupa i wsp. 1999) oraz *Microsporum audouinii*, *M. canis*, *Trichophyton verrucosum* i *T. mentagrophytes* w przypadkach grzybicy skóry owłosionej (Baran

2001). Jako czynniki etiologiczne grzybic powierzchniowych niebagatelne znaczenie mają także drożdżaki (głównie z rodzaju *Candida*) oraz grzyby pleśniowe (Seneczko i wsp. 1999). Grzybnice podskórne obejmują zakażenie tkanki podskórnej i mają charakter endemiczny. W Polsce występują niezwykle rzadko (Szepietowski 2001). Grzybnice układowe to infekcje obejmujące narządy wewnętrzne, najczęściej płuca, ale także przewód pokarmowy, narządy płciowe i moczowe. Wywołują je drożdżaki (na czele z *Candida albicans*) oraz grzyby pleśniowe (*Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*) (Kurnatowski 1995). Są to często zachorowania o ciężkim przebiegu, niekiedy kończące się śmiercią. Mają one duże znaczenie w zakażeniach wewnątrzszpitalnych i dotyczą w szczególności pacjentów po zabiegach operacyjnych (z rozległymi ranami pooperacyjnymi) i pacjentów o obniżonej odporności. Analiza piśmiennictwa z lat 1995–2000 dotyczącego grzybiczych zakażeń szpitalnych, przeprowadzona przez zespół Krajewskiej-Kułak (2000), pozwoliła ustalić, że infekcje te występują w polskich szpitalach z częstością 5–10 na 100 przyjęć, a 29% pacjentów z fungemią umiera w trakcie hospitalizacji. Grzybnice są bezpośrednią przyczyną zgonów u 3%, a pośrednią u 8,3% chorych. W ostatnich latach stwierdzono podwojenie liczby zakażeń grzybiczych u osób hospitalizowanych. Patogenem który jest najczęściej izolowany z zakażeń szpitalnych jest *C. albicans*.

Obserwowanemu w ostatnich latach wzrostowi częstości zachorowań na grzybnice powinien towarzyszyć dynamiczny rozwój metod stosowanych w diagnostyce i epidemiologii tych chorób. Metody tradycyjnej diagnostyki mikologicznej obejmują badania cech morfologicznych i biochemicznych grzybów izolowanych od pacjentów. Jako techniki czasochłonne i oparte na cechach fenotypowych (co w wielu przypadkach powoduje postawienie błędnej diagnozy) wymagają one uzupełnienia poprzez nowoczesne metody diagnostyki grzybów na podstawie ich genotypu. „Złotym standardem” w tradycyjnej diagnostyce mikologicznej jest uzyskanie czystej hodowli grzyba wyizolowanego od pacjenta. Jest to czasochłonny i (w przypadku niektórych szczepów opornie rosnących na podłożach sztucznych) trudny do realizacji etap postępowania diagnostycznego. Co więcej powszechnie stosowane obecnie metody typowania szczepów grzybów chorobotwórczych (np. z zastosowaniem testów asymilacji) nie zapewniają ich wystarczająco „głębokiego” zróżnicowania do celów epidemiologicznych. Metody i techniki genetyczne, stosowane zarówno w trakcie postępowania diagnostycznego, jak i dochodzeń epidemiologicznych, mogą być niezwykle pomocne w rozwiązywaniu wątpliwości wynikających z niedoskonałości tradycyjnej diagnostyki mikologicznej.

W niniejszej pracy przedstawiono najnowocześniejsze osiągnięcia molekularnej diagnostyki i epidemiologii grzybów chorobotwórczych, odnotowane w literaturze przedmiotu w przeciągu minionych dwóch lat. Pragniemy, aby stała się ona uaktualnieniem naszych poprzednich publikacji o podobnej tematyce.

MARKERY MOLEKULARNE WYKORZYSTYWANE W DIAGNOSTYCE
I EPIDEMIOLOGII MIKOLOGICZNEJ

Metody molekularne oparte są na genotypie badanych patogenów. Dzięki temu pozwalają one na prawidłową identyfikację gatunków charakteryzujących się dużą zmiennością fenotypową oraz na precyzyjne badania epidemiologiczne i filogenetyczne, jak chociażby przeprowadzona przez zespół Nishio (1992) identyfikacja różnych odmian teleomorficznych dermatofitów.

Rzadko w diagnostyce molekularnej analizuje się całkowity materiał genetyczny wyizolowany z komórki patogena. Całość genomu wykorzystuje się w przypadku badania zmienności genetycznej organizmów na drodze elektroforezy całkowitego komórkowego DNA w polu elektrycznym o zmiennym natężeniu (PFGE, ang. Pulse Field Gel Electrophoresis), a także w klasycznej odmianie techniki RFLP (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism). Znacznie częściej analizuje się zmienność sekwencji nukleotydowych wybranych regionów markerowych genomu, charakteryzujących się wysokim tempem ewolucji. Markery takie, jak: niekodujące sekwencje transkrybowane należące do operonów rDNA (ITS 1 i ITS 2, ang. Internal Transcribed Spacer Region) oraz mitochondrialny DNA (mtDNA) zostały przez nas szczegółowo opisane w poprzedniej pracy przeglądowej (Bojarski i wsp. 2001).

W ostatnich latach obserwuje się znaczący wzrost poziomu wiedzy z zakresu genomiki organizmów patogennych, w tym także grzybów. Sekwencjonowanie genomowego DNA mikroorganizmów zaowocowało odkryciem wielu nowych markerów genetycznych przydatnych do identyfikacji gatunków i typowania szczepów. Okeke i wsp. (2001) wyizolowali z komórek dermatofitów i zsekwencjonowali część genu kodującego aktynę – białko konserwatywne ewolucyjnie, będące elementem cytoszkieletu komórek grzybów, wykazujące wysoką homologię z aktyną mięśni ludzkich. W obrębie zsekwencjonowanego fragmentu genu *act* zlokalizowano intron, którego sekwencja nukleotydowa wykazywała specyficzność gatunkową. Udowodniona została przydatność tego markera do identyfikacji kilkunastu gatunków dermatofitów.

Przeprowadzona w ostatnim czasie analiza mtDNA izolowanego z komórek drożdży wykazała znaczne różnice w strukturze tych cząsteczek nawet u blisko ze sobą spokrewnionych gatunków. U przeważającej większości eukariontów mtDNA występuje w postaci kuliście zamkniętej, dwuniciowej cząsteczki. Badania przeprowadzone przez zespoły Fukuhara (1993) i Nosek (1995) wykazały obecność liniowych form mtDNA u niektórych gatunków *Pichia*, *Williopsis* i *Candida*. Podobnie jak chromosomy eukariotyczne liniowe cząsteczki mtDNA zakończone są sekwencjami telomerowymi, które u *Candida parapsilosis* utworzone są przez wielokrotne powtórzenia nukleotydowe o długości monomeru 738 pz. Na końcu telomerów znajduje się jednoniciowy odcinek DNA zawierający wolny koniec 5'P. Taka struktura jest specyficznie rozpoznawana przez mitochondrialne białko wiążące telomery (mtTMP, ang.

mitochondrial Telomere Binding Protein), które zabezpiecza odcinek jednociowy przed degradacją enzymatyczną (Nosek i wsp. 1999). Sekwencje telomerowe mtDNA zostały po raz pierwszy wykorzystane jako marker genetyczny do identyfikacji drożdżaków z gatunku *C. parpsilosis* przez Nosek i wsp. w 2002 roku.

W najnowszej literaturze spotyka się także prace dotyczące identyfikacji gatunków i typowania szczepów grzybów chorobotwórczych na podstawie polimorfizmu sekwencji nukleotydowych genów kodujących: syntazę chitynową 1 (Kano i wsp. 2001), zasadowe proteazy (Hayette i wsp. 2001), enolazę grzybową (Postlethwait i wsp. 1996) i rRNA o współczynniku sedymentacji 18 S i 26 S (Kappe i wsp. 1998, Oliveira i wsp. 2001). Oprócz genów, wśród markerów molekularnych wykorzystywanych w mikologii, znajdują się także niekodujące fragmenty genomu, takie jak wspomniane już sekwencje ITS1 i ITS2 oraz niekodujące i nieulegające transkrypcji sekwencje rozdzielające poszczególne operony rDNA (NTS, ang. Non-Transcribed Spacer Region), (Jackson i wsp. 2000).

METODY MOLEKULARNEJ DIAGNOSTYKI GRZYBÓW OPARTE NA KLASYCZNEJ REAKCJI ŁAŃCUCHOWEJ POLIMERYZACJI (PCR)

Metody genetyczne wykorzystywane w diagnostyce grzybów chorobotwórczych w olbrzymiej większości opierają się na reakcji łańcuchowej polimeryzacji PCR (ang. Polymerase Chain Reaction). Teoretyczne podstawy reakcji PCR, w tym jej różne modyfikacje, są opisane w wielu dostępnych w Polsce podręcznikach, skryptach i publikacjach, dlatego nie będą omawiane w niniejszym artykule.

Zastosowanie klasycznej odmiany reakcji PCR w diagnostyce grzybów chorobotwórczych opisano w licznych publikacjach naukowych. Między innymi Bock i wsp. (1994) podjęli próbę opracowania techniki pozwalającej na identyfikację dermatofitów bezpośrednio w materiale klinicznym. Zaprojektowano parę starterów komplementarnych do fragmentu genu kodującego 18S rRNA. Po przeprowadzeniu reakcji PCR uzyskano produkty o wspólnej wielkości dla gatunków: *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *T. terrestre*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* i *Epidermophyton floccosum*. Produkty amplifikacji otrzymano również dla *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisiae*. Reakcji PCR z tą samą parą starterów poddano próby kontrolne, tj. DNA wyizolowany z komórek bakteryjnych, roślinnych (kapusta, pszenica), zwierzęcych (myszy) i z ludzkich komórek naskórka, nie otrzymując żadnych produktów amplifikacji. Wyniki reakcji kontrolnych dowiodły, że zaprojektowane przez badaczy startery są specyficzne jedynie dla DNA grzybów, natomiast nie zapewniają amplifikacji DNA innych eukariontów, łącznie z DNA ludzkim, co sprawia, że z powodzeniem mogą być wykorzystywane do wykrywania obecności dermatofitów bezpośrednio w materiale klinicznym.

Markerem molekularnym, który w ostatnich latach cieszy się dużym zainteresowaniem mikologów jest gen syntazy chitynowej (*chs1*). Kano i wsp.

(2001) przeprowadzili badania dotyczące możliwości identyfikacji *Sporothrix schenckii*, w materiale pochodzącym bezpośrednio od pacjenta. Zaprojektowano dwie pary starterów zapewniających amplifikację genu *chs1*. Amplikony uzyskane w reakcjach z zastosowaniem pary starterów S1-R1 i S2-R2 miały podobną wielkość, jednak odmienna była czułość detekcji DNA. Reakcja PCR z wykorzystaniem starterów S1-R1 i S2-R2 pozwoliła wykryć odpowiednio 100pg i 10pg DNA (co odpowiada od 1 do 200 komórek grzyba). Obie pary starterów nie dawały natomiast produktów amplifikacji w przypadku kontrolnego DNA wyizolowanego z innych grzybów patogennych, bakterii czy komórek ludzkich.

Grupa badawcza pod kierownictwem Jacksona (2000) wykorzystwała klasyczną reakcję PCR do typowania szczepów *Trichophyton rubrum*. Jako marker genetyczny posłużył region NTS rozdzielający operony rDNA, zawierający dwa typy tandemowych sekwencji powtórzonych, oznaczonych jako TRS-1 i TRS-2 (ang. Tandemly Repetitive Subelements). Badania wstępne polegały na amplifikacji całego regionu NTS (2486pz) z użyciem pary starterów, dla których sekwencje docelowe znajdowały się w obrębie genów 25 S rDNA i 18 S rDNA należących do odrębnych, sąsiadujących ze sobą operonów rDNA. Następnie, na podstawie analizy sekwencji nukleotydowej uzyskanego produktu, zaprojektowano dwie pary starterów komplementarnych do regionów flankujących elementy powtórzone TRS-1 i TRS-2. Analizując wyniki amplifikacji, odzwierciedlające liczbę powtórzeń sekwencji TRS-1, udało się podzielić 101 klinicznych izolatów *T. rubrum* na 21 typów genetycznych. 75% szczepów zawierało od 1 do 4 kopii TRS-1. Amplifikacja regionu bogatego w elementy TRS-2 umożliwiła wyróżnienie 11 typów, natomiast wyniki uzyskane po jednoczesnej amplifikacji obu regionów pozwoliły na rozróżnienie 23 szczepów badanego gatunku. Typowanie genetyczne szczepów *T. rubrum* na podstawie różnej zawartości w genomie sekwencji powtórzonych, z pewnością może zostać wykorzystane w badaniach epidemiologicznych.

Podstawową zaletą metod mikologicznej diagnostyki molekularnej, opartych na klasycznej postaci reakcji PCR, jest skrócony czas oczekiwania na wyniki w porównaniu z metodami diagnostyki tradycyjnej i z niektórymi metodami molekularnymi, takimi jak „zagnieżdżony” PCR (nested PCR) czy PCR-RFLP. Zastosowanie w reakcji PCR starterów wysoce specyficznych dla poszczególnych rodzajów lub gatunków sprawia, że nie jest konieczne zakładanie czystych hodowli grzybów, a postępowanie diagnostyczne może być prowadzone bezpośrednio w materiale klinicznym.

„ZAGNIEŻDŻONY PCR” (ANG. NESTED PCR) JAKO METODA DIAGNOSTYCZNA O WYSOKIEJ CZUŁOŚCI

Technika nested PCR polega na wykonaniu dwuetapowej reakcji PCR. W pierwszym etapie reakcji stosuje się parę starterów zewnętrznych, zazwyczaj o niskiej specyficzności gatunkowej, co zapewnia amplifikację wybranego

regionu markerowego genomu patogena. Następnie przeprowadza się drugi etap reakcji, w którym jako matrycę wykorzystuje się amplikony uzyskane w etapie pierwszym. Zastosowanie wysoce specyficznej gatunkowo lub nawet szczepowo pary starterów wewnętrznych pozwala na wybiórczą amplifikację DNA patogena, co świadczy o jego obecności w badanym materiale. Reakcja nested PCR charakteryzuje się bardzo wysoką czułością. Yamakami i wsp. (1996) dowiedli, że tą techniką można wykryć zaledwie 50 pg grzybowego DNA w materiale klinicznym, podczas gdy klasyczna reakcja PCR wymaga obecności 50 pg matrycowego DNA. Wysoka czułość metody nested PCR sprawia, że często wykorzystywana jest ona do identyfikacji gatunków grzybów chorobotwórczych bezpośrednio w materiale pobranym od pacjenta. Takie zastosowanie reakcja nested PCR znalazła w badaniach Hayette i wsp. (2001), którzy przebadali 177 próbek popłuczyn bronchoalweolarnych (BAL) pozyskanych od pacjentów cierpiących na postać płucną aspergillozy. Za pomocą dwóch par starterów zapewniających amplifikację zespołu genów kodujących zasadowe proteazy *Aspergillus* (Alp), udało się wykryć obecność grzybów z tego rodzaju w materiałach klinicznych, dla których nie uzyskano jednoznacznych wyników w hodowli. Obecność DNA patogena stwierdzono także w przypadku sześciu próbek pobranych od pacjentów, u których nie zaobserwowano występowania objawów chorobowych właściwych dla aspergillozy płucnej (3,4% wszystkich prób). Autorzy eksperymentu zwracają uwagę na fakt, że trzy spośród sześciu błędnie zdiagnozowanych osób, cierpiały na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc, która sprzyja wzmoczonej kolonizacji przez drobnoustroje górnych dróg oddechowych. Wysoka czułość testu sprawiła, że wykrywano nawet niewielkie inoculum grzybów z rodzaju *Aspergillus*, które okazało się niewystarczające do wywołania pełnoobjawowej aspergillozy.

Technika nested PCR nie pozwoliła także na rozróżnienie pomiędzy przypadkami infekcji i kolonizacji *Pneumocystis carinii*, badanymi przez grupę polskich naukowców (Gołąb i wsp. 2001). Przebadano 51 pacjentów chorych na AIDS. Gatunkowo specyficzne dla *Pneumocystis carinii* regiony markerowe rDNA wykryto u 16 z 17 pacjentów cierpiących na pneumocystozowe zapalenie płuc (PCP, ang. *Pneumocystis carinii* Pneumonia). Pozytywny wynik reakcji PCR uzyskano także dla 20 z 34 próbek pochodzących od pacjentów, u których nie stwierdzono objawów klinicznych PCP. Wykluczając możliwość kontaminacji próbek w trakcie preparatyki, przyjęto, że wysoka czułość reakcji nested PCR pozwoliła na wykrycie niewielkiej liczby komórek patogena, zbyt małej do wywołania PCP.

Bialek i wsp. (2001) zastosowali metodę nested PCR do badania zwierzęcego modelu histoplazmozy. Badania dotyczące chorobotwórczości oraz lekooporności szczepów *Histoplasma capsulatum*, prowadzone są zazwyczaj z wykorzystaniem sztucznie zakażanych szczepów wsobnych myszy ICR i BALB/c. Po okresie inkubacji choroby, zwierzęta usypia się, a liczbę komórek *H. capsulatum* w tkankach określa się metodami hodowli na podłożach

mikrobiologicznych. Biorąc pod uwagę wysoką zakaźność grzybów z gatunku *H. capsulatum*, a także wysokie inoculum uzyskiwane w trakcie hodowli, można stwierdzić, że metoda ta wiąże się ze znacznym ryzykiem zakażenia pracowników laboratorium. Zastosowanie techniki nested PCR znacznie minimalizuje to ryzyko poprzez eliminację hodowli drobnoustroju. Bialek i wsp. (2001) zaprojektowali dwie pary starterów gatunkowo specyficznych, pozwalających na amplifikację fragmentu genu 18S rDNA *H. capsulatum*. Przeanalizowano 319 próbek. Pozytywny wynik reakcji PCR, potwierdzający obecność patogena w tkankach zwierząt uzyskano dla 312 prób (97.8%), w tym dla 47 próbek, które wykazywały negatywny wynik w hodowli. Pozostałe 7 prób (2.2%) dawało obserwowalny wzrost drobnoustrojów w hodowli, ale negatywny wynik w reakcji nested PCR. Autorzy wysunęli hipotezę, że pomimo ponad trzykrotnie wyższej niż metody klasyczne czułości, reakcja nested PCR pozwala na wykrycie DNA pochodzącego tylko z żywych komórek grzyba. DNA uwolniony z zabitych komórek patogena szybko ulega enzymatycznej degradacji w tkankach myszy. Udowodniono, że negatywne wyniki diagnostyki molekularnej dotyczyły próbek pobranych od zwierząt poddanych leczeniu lub samoistnych ozdrowieńców.

Okeke i wsp. (2001) zastosowali metodę nested RT-PCR w badaniach zmienności genetycznej dermatofitów. Technika nested RT-PCR (ang. Reverse Transcription PCR) polega na przeprowadzeniu reakcji nested PCR z zastosowaniem par starterów, które są komplementarne do mRNA. Reakcja katalizowana jest przez odwrotną transkryptazę (RT), która na matrycy mRNA syntetyzuje cDNA. Zamplifikowany tą metodą fragment genu kodującego grzybową aktynę, zawierał sekwencje nukleotydowe, które były unikalne dla 12 gatunków dermatofitów. Istnieje więc możliwość wykorzystania w przyszłości genu kodującego aktynę, jako markera genetycznego, pozwalającego na identyfikację gatunków grzybów chorobotwórczych. Zastosowanie metody nested PCR w odmianie nested RT-PCR pozwala na wykrywanie tylko żywych komórek patogena, w których zachodzi proces transkrypcji genów. Ma to szczególne znaczenie w przypadku grzybic powierzchniowych, których czynnikami etiologicznymi są najczęściej dermatofity. DNA pochodzący z zabitych komórek grzyba, znacznie wolniej ulega degradacji w płytce paznokciowej lub naskórku niż w tkankach głębokich, jak miało to miejsce w przypadku opisanego powyżej mysiego modelu służącego do badania histoplazmozy. Pozostający na powierzchni tkanek pacjenta DNA grzybów może być przyczyną błędów w badaniach dotyczących chociażby oceny skuteczności farmakoterapii, prowadzonych technikami innymi niż RT-PCR.

ZASTOSOWANIE TECHNIKI BADANIA POLIMORFIZMU FRAGMENTÓW UZYSKANYCH W WYNIKU ANALIZY RESTRYKCYJNEJ DNA (RFLP) W BADANIACH MIKOLOGICZNYCH

Technika badania polimorfizmu fragmentów uzyskanych w wyniku analizy restrykcyjnej DNA (RFLP, ang. Restriction Fragment Length Polymorphism)

wykorzystuje unikalną właściwość enzymów endonukleolitycznych do wprowadzania nacięć na obu niciach helisy DNA w obrębie specyficznie rozpoznawanej sekwencji nukleotydu. Rozmieszczenie w genomie sekwencji rozpoznawanych przez endonukleazy jest cechą właściwą dla gatunku lub szczepu. Metoda RFLP polega więc na analizie restrykcyjnej amplikonów uzyskanych w wyniku reakcji PCR (PCR-RFLP) lub całości DNA wyizolowanego z komórek. Metodę RFLP w jej klasycznej odmianie zastosował Vanittanakom i wsp. (1996) w badaniach dotyczących zróżnicowania gatunku *Penicillium marneffeii*, który jest częstą przyczyną oportunistycznych zakażeń u osób chorych na AIDS. Do badań wykorzystano 46 izolatów, z czego 22 pochodziły z tkanek ludzkich, a 24 były pozyskane od szczurów należących do rodzaju *Rhizomys*, które są naturalnym rezerwuarem tego grzyba. Genomowy DNA *P. marneffeii* poddano analizie restrykcyjnej z wykorzystaniem 2 enzymów restrykcyjnych: *CfoI* i *HaeIII*. Największe zróżnicowanie wielkości fragmentów restrykcyjnych uzyskano po zastosowaniu enzymu *HaeIII*. Analiza restrykcyjna genomu pozwoliła na wyróżnienie dwóch odmiennych grup szczepów *P. marneffeii*. Spośród 22 izolatów pochodzących od ludzi, 16 zakwalifikowano do grupy I, a 6 do grupy II. 20 spośród 23 izolatów pozyskanych od szczurów zaliczono do grupy I, 3 do grupy II. Do II grupy szczepów należały także wszystkie dodatkowo analizowane izolaty pochodzące z gleby.

Jackson i wsp. (1999) wykorzystali technikę RFLP do badania zróżnicowania szczepów *Trichophyton rubrum* na podstawie polimorfizmu sekwencji nukleotydu operonu rDNA. Metodę RFLP uzupełniono techniką hybrydyzacji Southern blot. Rozdzielone w żelu agarozowym, a następnie przeniesione na nitrocelulozę zdenaturowane produkty analizy restrykcyjnej genomu *T. rubrum* hybrydyzowały z sondą komplementarną do genu 18 S rDNA i sąsiadującego z nim fragmentu regionu ITS1. Zastosowanie sondy pozwoliło precyzyjnie zidentyfikować produkty analizy restrykcyjnej zawierające sekwencje do niej komplementarne. Na podstawie oceny ich wielkości u poszczególnych szczepów grzyba 50 izolatów klinicznych *T. rubrum* podzielono na 14 typów (A-D). Wśród analizowanych izolatów najczęściej występował typ A (u 19 z 50 izolatów). 39 izolatów podzielono na 4 typy (od A do D), pozostałe typy (od E do N) reprezentowane były tylko przez jeden lub dwa izolaty. Ta sama grupa badaczy w swojej publikacji opisuje metodę pozwalającą na identyfikację 17 najczęściej występujących gatunków dermatofitów techniką PCR-RFLP. Analiza restrykcyjna produktu amplifikacji fragmentów sekwencji ITS1, ITS2 i genu 5,8 S rDNA ujawniła odrębne profile restrykcyjne dla: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium audouinii*, *M. canis*, *M. gypseum*, *M. persicolor*, *Trichophyton concentricum*, *T. erinacei*, *T. quinckeanum*, *T. schoenleinii*, *T. verrucosum*, *T. rubrum*, *T. soudanense*, *T. violaceum*, *T. mentagrophytes*, *T. equinum*, *T. tonsurans*, *T. terrestre*.

ZASTOSOWANIE REAKCJI RAPD DO TYPOWANIA SZCZEPÓW GRZYBÓW
PATOGENNYCH

Technika RAPD (ang. Randomly Amplified Polymorphic DNA) została po raz pierwszy opisana przez Williamsa i wsp. w 1990 roku. Oparta jest na reakcji PCR, przeprowadzanej z zastosowaniem pojedynczego, krótkiego startera (9–10pz), który jest przyłączany do matrycy w temperaturze ok. 36°C. Zastosowanie tylko jednego startera wynika z założenia, że w genomie badanego organizmu występują powtórzone sekwencje odwrócone. Oznacza to, że w odległości pozwalającej na wydajną amplifikację, znajdują się kolejne, identyczne kopie docelowej sekwencji, ale zorientowane w przeciwnych kierunkach. Omawiana metoda znalazła zastosowanie w identyfikacji gatunków i typowaniu szczepów grzybów z rodzajów *Aspergillus*, *Candida* i *Trichophyton*.

Liu i wsp. (2000) zastosowali technikę RAPD do identyfikacji gatunków dermatofitów. Zaprojektowano cztery dziesięcionukleotydowe startery, oznaczone jako OPAA11, OPAA17, OPD18, OPU15, które stosowane w skojarzeniu pozwalają na identyfikację 25 gatunków dermatofitów. Startery stosowane pojedynczo wykazują mniejszą zdolność dyskryminacyjną, która była najwyższa w przypadku OPAA17 (20 gatunków). Wykazano, że zaprojektowane oligonukleotydy można wykorzystać także do identyfikacji gatunków grzybów niedermatofitowych, należących do rodzajów: *Fusarium*, *Scytalidium*, *Aspergillus* i *Candida*.

Rath (2001) przeprowadził porównanie kilku metod wykorzystywanych w diagnostyce grzybów chorobotwórczych, które obejmowało także technikę RAPD. Do badań wykorzystano kolekcję 25 izolatów należących do 4 gatunków rodzaju *Aspergillus* (*A. fumigatus* n = 8, *A. flavus* n = 8, *A. niger* n = 4, *A. nidulans* n = 5). Podjęto próbę zróżnicowania badanych szczepów poprzez: (i) określenie wzorów asymilacji (API 20 C AUX, API BioMerieux France), (ii) określenie całkowitego składu białkowego lizatu komórek grzybni metodą SDS-PAGE (rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, ang. Polyacrylamide Gel Electrophoresis), (iii) określenie reaktywności lizatów grzybni z surowicą pacjentów cierpiących na mukowisycydozę metodą immunoblotu, (iv) metodę RAPD z wykorzystaniem 8 krótkich starterów. Szczepy *A. fumigatus* wykazywały identyczne wzory asymilacyjne w teście API w przeciwieństwie do pozostałych badanych gatunków, w których w każdym rozróżniono cztery szczepy. Metoda SDS-PAGE również nie pozwoliła na zróżnicowanie szczepów w obrębie *A. fumigatus*. Podobne wyniki uzyskano w przypadku zastosowania techniki immunoblotu. Największe zróżnicowanie w obrębie badanych izolatów uzyskano dzięki metodzie RAPD. Cztery z ośmiu krótkich starterów dały wzory składające się z 3–20 prążków. Żaden ze starterów wykorzystany pojedynczo nie miał wystarczającej siły różnicującej dla badanych szczepów. Jednak kiedy połączono wyniki uzyskane po zastosowaniu wybranych dwóch starterów, rozróżniono wszystkie szczepy z wyjątkiem dwóch z gatunku *A. fumigatus*.

Bardzo często technika RAPD jest wykorzystywana jako uzupełnienie innych badań molekularnych lub jako badanie pozwalające na postawienie wstępnej diagnozy, która powinna być potwierdzona za pomocą innych metod diagnostycznych (Anderson i wsp. 1996).

TECHNIKI HYBRYDYZACYJNE STOSOWANE W DIAGNOSTYCE I EPIDEMIOLOGII GRZYBÓW CHOROBOTWÓRCZYCH

Techniki hybrydyzacyjne są szeroko stosowane w diagnostyce mikrobiologicznej, zarówno w bakteriologii jak i w mikologii. Hybrydyzacja kwasów nukleinowych umożliwia wykrywanie gatunkowo lub szczepowo specyficznych sekwencji nukleotydowych w genomowym DNA patogenów. W tym celu wykorzystuje się sondy molekularne, które są jednoniciowymi oligonukleotydami DNA lub RNA. Sekwencja nukleotydowa sondy jest homologiczna do sekwencji poszukiwanej, co jest warunkiem specyficznej hybrydyzacji. Dzięki odpowiedniemu wyznakowaniu sondy (immunochemicznie, enzymatycznie, fluorescencyjnie lub radioaktywnie) możliwa jest łatwa interpretacja wyników, także w sposób ilościowy. W wielu przypadkach metody hybrydyzacyjne wymagają wstępnego trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi. Jednak pomimo to, są to jedne z najszybszych testów genetycznych, stosunkowo łatwe do wykonania i charakteryzujące się wysoką wiarygodnością i powtarzalnością uzyskiwanych wyników.

Obecnie prowadzone są liczne badania zmierzające do opracowania gatunkowo specyficznych sond DNA, które mogłyby posłużyć do identyfikacji gatunków grzybów chorobotwórczych. W diagnostyce mikologicznej znalazła zastosowanie wyznakowana fluorescencyjnie sonda DNA specyficzna dla *Trichophyton rubrum* (El Fari i wsp. 1999). Niezwykle interesujące i nowatorskie są prace Oliveiry i wsp. (2001) dotyczące identyfikacji *Candida albicans* i *Candida dubliniensis* technikami hybrydyzacyjnymi.

Molekularne badania epidemiologiczne byłyby znacznie ułatwione poprzez dostęp do sond molekularnych, które pozwoliłyby na podział badanych szczepów na grupy o małej liczebności. Postlethwait i wsp. (1996) zaprojektowali sondy molekularne do typowania szczepów *Candida albicans*. Sondy były homologiczne do wybranych sekwencji genu kodującego enolazę i pozwoliły zróżnicować szczepy *C. albicans* na 9 grup. Do badań wykorzystano 23 izolaty *Candida albicans*, których genomowy DNA poddano wstępnie działaniu enzymów restrykcyjnych: *AvaI*, *ClaI* i *MnII*. Uzyskane fragmenty restrykcyjne analizowano metodą Southern blot, która polega na rozdzieleniu fragmentów restrykcyjnych DNA w żelu agarozowym i po ich denaturacji *in situ* – przeniesieniu na bibułę nitrocelulozową. Związany z bibułą, jednoniciowy DNA hybryduje z komplementarną, wyznakowaną sondą DNA.

Opracowanie sond genetycznych, które mogą być wykorzystywane jako narzędzia diagnostyczne musi być poprzedzone gruntownymi badaniami

poznawczymi z zakresu genetyki organizmów patogennych. Gatunkowo specyficzną sondę można zaprojektować dopiero wówczas, kiedy zostanie poznana unikalna dla badanego gatunku sekwencja nukleotydowa. Poszukiwanie takiej sekwencji odbywa się poprzez fragmentację genomów drobnoustrojów i tworzenie w oparciu o uzyskane fragmenty bibliotek genowych, których przeszukiwanie jest żmudne i pracochłonne, ale przynosi doskonale efekty w postaci wysoce skutecznej metody identyfikacji patogenów. Niezwykle pomocne dla badaczy zajmujących się opracowywaniem sond genetycznych, są najnowsze zdobycze genomiki, pozwalające na łatwiejszą i szybszą identyfikację specyficznych gatunkowo sekwencji nukleotydowych genomu.

NAJNOWSZE TECHNIKI STOSOWANE W IDENTYFIKACJI I TYPOWANIU SZCZEPÓW GRZYBÓW CHOROBOTWÓRCZYCH METODAMI MOLEKULARNYMI

Rozwój metod molekularnej diagnostyki i epidemiologii mikrobiologicznej jest wielokierunkowy. Prowadzone są badania mające na celu zwiększenie czułości i specyficzności testów diagnostycznych, ułatwienie przeprowadzenia postępowania diagnostycznego, identyfikację patogenów bezpośrednio w materiale klinicznym oraz znaczne skrócenie czasu oczekiwania na wyniki. Odkryto nowe regiony markerowe umożliwiające bardziej precyzyjną diagnostykę. Coraz częściej do identyfikacji gatunków wykorzystuje się różne metody biologii molekularnej, stosowane niejednokrotnie w skojarzeniu. Nosek i wsp. (2002) opracowali parę starterów komplementarnych do specyficznych gatunkowo sekwencji telomerowych mtDNA *Candida parapsilosis*. Po przeprowadzeniu reakcji PCR z zastosowaniem tej pary starterów otrzymano produkty o wielkości 141 pz dla wszystkich analizowanych szczepów *C. parapsilosis*. Nie uzyskano produktu amplifikacji dla 114 szczepów należących do 83 gatunków drożdży, które stanowiły grupę kontrolną. Diagnoza uzyskana tą metodą została dodatkowo potwierdzona poprzez wykrycie techniką Western blot białka mtTBP, specyficznie wiążącego sekwencje telomerowe mtDNA *C. parapsilosis*. Surowica skierowana przeciwko temu białku reagowała z frakcją białkową o masie 15 kDa obecną w lizatach komórek wszystkich szczepów, dających pozytywny wynik w reakcji PCR.

Identyfikacja gatunków bardzo blisko ze sobą spokrewnionych patogenów wymaga zastosowania najnowocześniejszych osiągnięć biologii molekularnej. Oliveira i wsp. (2001) opracowali gatunkowo specyficzne sondy dla *Candida albicans* i *Candida dubliniensis*, który to gatunek przez szereg lat był identyfikowany jako *C. Albicans*. *C. dubliniensis* ma niebagatelne znaczenie kliniczne. Jest izolowany od pacjentów z obniżoną odpornością i charakteryzuje się zdolnością do szybkiego rozwoju oporności na flukonazol. Zsyntetyzowane chemicznie sondy mają charakter kwasu peptydowo-nukleinowego (PNA, ang. Peptide Nucleic Acid). PNA jest analogiem DNA, posiadającym zrzęb poliamidowy, z którym związane są poszczególne nukleotydy. Sondy

specyficzne gatunkowo dla *C. albicans* i *C. dubliniensis* są komplementarne do genów kodujących rRNA o współczynnikach sedymentacji odpowiednio 26 S i 18S i zostały wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym – fluoresceiną. Identyfikację gatunków przeprowadzono techniką hybrydyzacji *in situ* (FISH, ang. Fluorescent In Situ Hybridization) wykorzystując szkiełkowe rozmazy komórek drożdży uzyskanych po dwunastogodzinnej hodowli. Hydrofobowy charakter sond PNA umożliwia ich dyfuzję do wnętrza komórki, gdzie hybrydują z docelowymi sekwencjami genomu, co w przypadku dodatniego wyniku reakcji powoduje obserwowaną w mikroskopie fluorescencyjnym luminescencję komórek. Tą metodą przebadano 79 szczepów *C. dubliniensis* i 70 szczepów *C. albicans*. Uzyskane wyniki świadczyły o 100% czułości i 100% specyficzności metody, bowiem nie zaobserwowano wyników fałszywie dodatnich, fałszywie ujemnych ani reakcji krzyżowych.

Zastosowanie najnowszych zdobyczy techniki pozwala na znaczne skrócenie czasu oczekiwania na wyniki postępowania diagnostycznego. Specjaliści z firmy Roche Molecular Biochemicals zaprojektowali zestaw do zautomatyzowanej ekstrakcji całkowitego DNA z komórek eukariotycznych (MagNA Pure LC) oraz termocykler (LightCycler), w którym mieszaninę reakcyjną umieszcza się w szklanej kapilarze o wysokim współczynniku transmisji ciepła, co zapewnia niezwykle szybkie zmiany temperatury w trakcie poszczególnych etapów reakcji PCR. Przydatność tego zestawu do szybkiej identyfikacji gatunków z rodzaju *Candida* została udowodniona przez Schmidta i wsp. (2001). W reakcji PCR zastosowano startery specyficzne dla grzybów z rodzaju *Candida*, komplementarne do genu kodującego rRNA o współczynniku sedymentacji 18S. Czas potrzebny na izolację i oczyszczenie DNA oraz ocenę jego jakości wyniósł zaledwie 2 godziny. Jest to wynik niezwykle interesujący w porównaniu z izolacją DNA metodą klasyczną, po której następuje ocena jakości izolatów techniką elektroforetyczną, co wymaga co najmniej 8 godzin pracy. Całkowity czas niezbędny do postawienia diagnozy oceniono na 4 godziny. Postępowanie diagnostyczne prowadzone z zastosowaniem tradycyjnych technik molekularnych zamyka się w 16 godzinach pracy.

Zespół japońskich uczonych (Fujita i wsp. 2001) przeprowadził porównanie techniki elektroforezy w żelu agarozowym (AGE, ang. Agarose Gel Electrophoresis) z elektroforezą z zastosowaniem mikrochipa (ME, ang. Microchip Electrophoresis) oraz ocenił przydatność tych dwóch technik w identyfikacji gatunków grzybów z rodzaju *Candida*. Badanie obejmowało 45 szczepów grzybów wzorcowych oraz 75 izolatów klinicznych. Przeprowadzono reakcję multipleks PCR z zastosowaniem trzech starterów, które zapewniały amplifikację dwóch produktów na matrycy sekwencji zlokalizowanych w obrębie rDNA. Na podstawie wielkości uzyskanych produktów udało się określić przynależność systematyczną wszystkich izolatów klinicznych, w tym pięciu, których nie udało się sklasyfikować w wyniku tradycyjnej diagnostyki mikologicznej. Zasada elektroforezy z zastosowaniem mikrochipa jest identyczna jak

w przypadku elektroforezy żelowej i polega na migracji cząstek posiadających ładunek elektryczny w polu elektrycznym. Szybkość migracji jest zależna m.in. od masy rozdzielanych cząstek. W pracy Fujita i wsp. (2001) opisany został model mikrochipa wyprodukowany przez firmę Hitachi. Mikrochip posiada 3 studzienki połączone ze sobą kanałami o szerokości 0.1 mm, głębokości 0,03 mm i długości 45 mm. Po wypełnieniu kanałów 0,6% roztworem hydroksypropylometylocelulozy z dodatkiem bromku etydy, do jednej ze studzienek nakłada się próbkę DNA wraz z buforem obciążającym, zawierającym wewnętrzne wzorce mas. Elektroforezę produktów reakcji PCR przeprowadzono stosując napięcie 300V przez 1 minutę, celem wprowadzenia próbek w złożę (ang. injection), a następnie 750V przez 3 minuty (rozdziół próbek). ME trwa więc znacznie krócej niż AGE, która wymaga ok. 2 godzin czasu. Obydwie techniki charakteryzują się tą samą czułością i rozdzielczością.

PODSUMOWANIE

Duża zmienność fenotypowa grzybów chorobotwórczych, może być przyczyną ich błędnej identyfikacji metodami tradycyjnej diagnostyki mikologicznej (Soll 1992) oraz sprawia, że postępowanie diagnostyczne jest żmudne i czasochłonne. Ogromną zaletą mikologicznej diagnostyki molekularnej jest skrócony czas oczekiwania na wyniki, które pozwalają na jednoznaczną klasyfikację badanych patogenów. Wysoka swoistość i czułość technik genetycznych stwarza możliwość identyfikacji gatunków grzybów bezpośrednio w materiale klinicznym – bez konieczności zakładania hodowli. Eliminacja etapu hodowli czyni postępowanie diagnostyczne szybszym oraz mniej niebezpiecznym dla pracowników pracowni mikologicznych.

Metody diagnostyki molekularnej nie pozostają bez wad. Niezwykle wysoka czułość reakcji PCR (szczególnie nested PCR) nie pozwala na rozróżnienie pomiędzy przypadkami kolonizacji i infekcji (Hayette i wsp. 2001, Gołąb i wsp. 2002) oraz może leżeć u podstaw fałszywie dodatnich wyników w przypadkach kontaminacji prób niepożądanym DNA. Oparte na reakcji PCR techniki diagnostyczne narzucają niezwykle wysoki rygor sterylności laboratorium, co znacznie podwyższa (i tak już znaczne) koszty diagnostyki molekularnej. Wreszcie, reakcja PCR nie pozwala na określenie żywotności komórek grzybów w analizowanym materiale. Ta niedogodność może jednak zostać wyeliminowana poprzez zastosowanie techniki RT-PCR (Okeke i wsp. 2001).

Wady metod diagnostyki molekularnej są w pełni rekompensowane poprzez jakość otrzymywanych wyników, a techniki genetyczne są stale udoskonalane i wykorzystywane do coraz to nowych celów, jak chociażby badanie mikroewolucji i związanej z nią lekooporności gatunków grzybów o dużym znaczeniu medycznym (Gee i wsp. 2002). Metody te, chociaż już w swojej obecnej postaci stanowią ważną alternatywę dla tradycyjnej diagnostyki mikologicznej, z pewnością będą wciąż wzbogacane i upowszechniane, podobnie, jak miało to miejsce w mikrobiologii i wirusologii klinicznej.

LITERATURA

- Anderson M.J., Gull K., Denning D.W. 1996. Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA and M13 Southern hybridization of related paired isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 87–93.
- Baran E. 2001. Rozpoznawanie i leczenie zakażeń grzybiczych skóry i paznokci wywołanych przez dermatofity i drożdżaki. *Forum Ekspertów* 7, Biochemie Novartis Poland Sp. z o.o., Warszawa.
- Bialek R., Fisher J., Feucht A., Najvar L.K., Dietz K., Knobloch J., Graybill J.R. 2001. Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by a nested PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1506–1509.
- Bock M., Maiwald M., Kappe R., Nickel P., Naehrer H. 1994. Polymerase chain reaction – based detection of dermatophyte DNA with a fungus – specific primer system. *Mycoses* 37: 79–84.
- Bojarski Ł., Dobrowolska A., Grabowski M., Czarnecki M., Jaworski A. 2001. Molekularna diagnostyka i epidemiologia zakażeń niektórymi gatunkami grzybów chorobotwórczych. *Postępy Mikrobiologii* 40: 311–324.
- El Fari M., Tietz H-J., Presber W., Sterry W., Graeser Y. 1999. Development of an oligonucleotide probe specific for *Trichophyton rubrum*. *British Journal of Dermatology* 141: 240–245.
- Fujita S., Senda Y., Nakaguchi S., Hashimoto T. 2001. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3617–3622.
- Fukuhara H., Sor F., Drissi R., Dinouel N., Miyakawa I., Rosset S., Viola A.M. 1993. Linear mitochondrial DNAs of yeasts: frequency of occurrence and general features. *Molecular Cell Biology* 13: 2309–2314.
- Gee S.F., Joly S., Soll D.R., Meis J.F.G.M., Verweij P.E., Polacheck I., Sullivan D.J., Coleman D.C. 2002. Identification of four distinct genotypes of *Candida dubliniensis* and detection of microevolution *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 556–574.
- Gołąb E., Sobolewska A., Bitkowska E., Bednarska A., Berak H., Dzbeński T.H., Horban A. 2001. „Nested” PCR w diagnostyce przypadków pneumocystozowego zapalenia płuc (PCP) u pacjentów z AIDS. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 521–525.
- Hayette M-P., Vaira D., Susin F., Boland P., Christiansens G., Melin P., De Mol P. 2001. Detection of *Aspergillus* species DNA by PCR in bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2338–2340.
- Jackson C.J., Barton R.C., Evans E. 1999. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal DNA intragenic spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 931–936.
- Jackson C.J., Barton R.C., Kelly S.L., Evans E. 2000. Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 4527–4534.
- Jeske J., Lupa S., Seneczko F., Głowacka A., Ochęcka-Szymańska A. 1999. Epidemiology of dermatomycoses of humans in Central Poland. Part V. *Tinea corporis*. *Mycoses* 42: 661–663.
- Kano R., Nakamura Y., Watanabe S., Tsujimoto H., Hasegawa A. 2001. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. *Mycoses* 44: 261–265.
- Kappe R., Okene C.N., Fauser C., Maiwald M., Sonntag H.G. 1998. Molecular probes for the detection of pathogenic fungi in the presence of human tissue. *Journal of Medical Microbiology* 47: 811–820.
- Kurnatowska A. 1995. Wybrane zagadnienia mikologii medycznej. Wyd. Promedi, Łódź, Wyd. II – rozszerzone.
- Kurnatowski P. 1995. Różnicowanie niektórych klinicznych postaci grzybic człowieka. W: *Wybrane zagadnienia mikologii medycznej*. (Red. A. Kurnatowska). Wyd. Promedi, Łódź, Wyd. II – rozszerzone.

- Krajewska-Kułał E., Lewko J., Rolka H., Łukaszuk C., Karczewski J., Niczyporuk W., Zachowicz A. 2000. Grzybicze zakażenia szpitalne – narastający problem. *Mikologia Lekarska* 7: 159–163.
- Liu D., Coloe S., Baird R., Pedersen J. 2000. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *Journal of Medical Microbiology* 49: 493–497.
- Lupa S., Seneczko F., Jeske J., Głowacka A., Ochęcka-Szymańska A. 1999. Epidemiology of dermatomycoses of humans in Central Poland. Part IV. Onychomycosis due to dermatophytes. *Mycoses* 42: 657–659.
- Nishio K., Kawasaki M., Ischizaki H. 1992. Phylogeny of the genera *Trichophyton* using mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia* 177: 127–132.
- Nosek J., Dinouel N., Kovac L., Fukuhara H. 1995. Linear mitochondrial DNAs from yeasts: telomeres with large tandem repetitions. *Molecular and General Genetics* 247: 61–72.
- Nosek J., Tomaska L., Pagacova B., Fukuhara H. 1999. Mitochondrial telomere-binding protein from *Candida parapsilosis* suggests an evolutionary adaptation of a nonspecific single-stranded DNA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* 274: 8850–8857.
- Nosek J., Tomaska L., Rycovska A., Fukuhara H. 2002. Mitochondrial telomeres as molecular markers for identification of the opportunistic yeast pathogen *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1283–1289.
- Okeke C., Tsuboi R., Kawai M., Hiruma M., Ogawa H. 2001. Isolation of an intron containing partial sequence of the gene encoding dermatophyte actin (ACT) and detection of a fragment of the transcript by reverse transcription-nested PCR as a means of assessing the viability of dermatophytes in skin scales. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 101–106.
- Oliveira K., Haase G., Kurtzman C., Jorgen Hyldig-Nielsen J., Stedner H. 2001. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 4138–4141.
- Postlethwait P., Brian B., Oberle W.T., Sundstrom P. 1996. Molecular probe for typing strains of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 474–476.
- Rath P.M. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of reference strains of the genus *Aspergillus*. *Mycoses* 44: 261–265.
- Schmidt K., Loeffler J., Hebart H., Schumacher U., Einsele H. 2001. Rapid extraction and detection of DNA from *Candida* species in research samples by MagNA Pure LC and the LightCycler System. *Biochemica* 3: 8–10.
- Seneczko F., Lupa S., Jeske J., Głowacka A., Ochęcka-Szymańska A. 1999. Epidemiology of dermatomycoses of humans in Central Poland. Part I – Superficial infections caused by yeasts and moulds. *Mycoses* 42: 297–305.
- Soll D.R. 1992. High frequency switching in *Candida albicans*. *Clinical Microbiology Reviews* 5: 183–20.
- Szepietowski J. 2001. Grzybicze skóry i paznokci. *Vademecum lekarza praktyka*. Wydawnictwo Medycyna Praktyczna. Kraków.
- Vanittankom N., Cooper C., Chariyalertsak S., Youngchim S., Nelson K., Sirisanthana T. 1996. Restriction endonuclease analysis of *Penicillium marneffeii*. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1834–1836.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalsky J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531–6532.
- Yamakami Y., Hashimoto A., Tokimatsu J., Nasu M. 1996. PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 2464–2468.