

Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* και *A. niger
Λοιμογόνοι παράγοντες αεροδυναμικής,
ανοσολογικής και μεταβολικής φύσης

Μ.Ε. Καμπούρης,
Α. Βεληγράκη

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

Aspergillus fumigatus,
A. flavus and *A. niger*.
Aerodynamic, immunological and
metabolic virulence determinants

Abstract at the end of the article

Οι «λοιμογόνοι παράγοντες» που αφορούν ευκαιριακά παθογόνους οργανισμούς, όπως οι μύκητες, κατ' ουσία περιγράφουν την ιδιαίτερη ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε οποιοδήποτε ξενιστή. Η μελέτη των γονοτυπικών χαρακτήρων των ασπεργίλλων επιβεβαιώνει ότι η πλειοψηφία αυτών διαθέτει τον κατάλληλο ενζυμικό εξοπλισμό για την εγκατάσταση και πρόκληση λοίμωξης στον άνθρωπο, ενώ μερικά είδη ασπεργίλλων παραμένουν εξαιρετικά επιθετικά ακόμη και κατόπιν αυθόρμητης ή προκλητής έκλειψης γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα, στα οποία αποδίδεται λοιμογόνος δραστηριότητα. Έτσι, οι ασπεργίλλοι αποτελούν διεθνώς μια επίφοβη ομάδα επιμολυτών, ειδικά σε ανοσοανεπαρκή άτομα, εξαιτίας μιας σειράς παραγόντων που τους καθιστούν εξαιρετικά επιτυχείς και επικίνδυνους, σε συνδυασμό με το γεγονός της ευρύτατης διάδοσής τους ανά την υδρόγειο. Οι παράγοντες αυτοί ξεκινούν από τη μορφή των πλανητών μορφών του μύκητα, δηλαδή των κονιδίων, που έχουν αποκτήσει εξελικτικά τις απαραίτητες ιδιότητες και ποιότητες για διασπορά σε μεγάλες αποστάσεις και επιβίωση –ως σαπρόφυτα– σε εξαιρετικά αντίξοα περιβάλλοντα. Αυτές οι αεροδυναμικές και μεταβολικές ιδιότητες επιτρέπουν την προσέγγιση, την είσοδο και την εγκατάσταση του κονιδίου στον ξενιστή, την –υπό συνθήκες– επιβίωσή του στο αντίξοο μικροπεριβάλλον που αποτελεί το εν ζωή ανθρώπινο σώμα και τη βλάστηση, ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό του, με αποτέλεσμα την πρόκληση δυνητικώς θανατηφόρων λοιμώξεων. Μια άλλη σειρά ιδιοτήτων, που πιθανότατα αποκτήθηκε και κληροδοτήθηκε εξελικτικά, φαίνεται ότι είναι προανατολισμένη στην αντιμετώπιση των εξελιγμένων μηχανισμών άμυνας έναντι παθογόνων μικροοργανισμών που έχει αποκτήσει ο ανθρώπινος οργανισμός. Αυτοί οι μηχανισμοί περιστρέφονται κατά βάση γύρω από την κυτταρική ανοσία και κάνουν κυρίως χρήση, σε διαφορετικούς βαθμούς, φαγοκυττάρων διαφόρων τύπων και με διαφορετικό χρονισμό και αποτελεσματικότητα και υπό διαφορετικές προϋποθέσεις. Αυτό όμως δεν σημαίνει μη χρησιμοποίηση και διαφόρων άλλων, κατάλληλων εναλλακτικών λύσεων, σε κυτταρικό, υποκυτταρικό ή ακόμη και ακυτταρικό επίπεδο, με παραδείγματα που περιλαμβάνουν το συμπλήρωμα, τα κύτταρα-φονείς, τις δραστικές ελεύθερες ρίζες και διάφορα αντιμικροβιακά μεταβολικά προϊόντα και μηχανισμούς. Συνεπώς, η μορφοματικότητα των μυκήτων και των ασπεργίλλων ειδικότερα, δεν μπορεί παρά να είναι ένα πολυγενές και πολύτροπο φαινόμενο. Ίσως γι' αυτόν το λόγο οι προσπάθειες εντοπισμού γονιδίου ή ομάδας γονιδίων υπεύθυνων για τη μορφοματικότητά τους, σε αντίθεση με ό,τι συμβαίνει στα βακτήρια, δεν έχουν καρποφορήσει.

Λέξεις ευρετηρίου

Αεροδυναμική διερεύνηση
Ασπεργίλλοι
Καταστολή ανοσοαπόκρισης

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περίπου 72.000 είδη μυκήτων, που βρίσκονται στο χώμα, στο νερό, στα φυτά και στον αέρα. Μερικά είδη είχαν αναγνωρισθεί ως παθογόνα για τον άνθρωπο από τον Ιπποκράτη (460–377

π.Χ.). Ονομάστηκαν μύκητες από την αρχαία ελληνική λέξη *μύκης*, που σημαίνει αμανίτης (μανιτάρι) και περιγράφει κάθε στρογγυλό, κομβοειδές σώμα.^{1,2} Η δε λατινική λέξη *fungus*, που αποδόθηκε από τον Βιργίλιο (70–19 π.Χ.), προέρχεται επίσης από την ελληνική λέξη

της Απικής διαλέκτου *σφόγγιον*, που σημαίνει σπόγγος.^{1,2} Η ελληνική και λατινική ονοματολογία αυτών των ευκαρυωτικών οργανισμών είναι ακριβής, τόσο ως προς τη μορφολογία τους επί θρεπτικών υποστρωμάτων στο εργαστήριο, όσο και ως προς τη μακροσκοπική μορφολογία των βλαβών που προκαλούν σε ποικιλία οργάνων, στα οποία παρατηρείται φυγόκεντρη ανάπτυξη του μύκητα και συχνά σπογγώδης υφή του ιστού.

Η συσχέτιση των μυκήτων με το άσθμα και τον αλλεργικό κατάρρου περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Floyer το 1726 και αφορούσε ασθενή που υπέστη οξύ αλλεργικό επεισόδιο μετά την επίσκεψή του σε υπόγειο κελάρι με κρασί.³ Αντίθετα, η ύπαρξη πλανήτων μορφών ζυμομυκήτων και νηματοειδών (μυκηλιακών) μυκήτων στον αέρα τεκμηριώθηκε πολύ αργότερα, το 1861, από τον L. Pasteur, που μετά τη συλλογή σπορίων μυκήτων από τον αέρα του Παρισιού σε φιάλες με «λαιμό κύκνου» και τον εμβολιασμό του υλικού συλλογής σε τρυβλία, καταμέτρησε και ταυτοποίησε τις αποικίες που αναπτύχθηκαν. Έκτοτε, και επί πολλές δεκαετίες, η συλλογή και αποτίμηση του φόρτου των μυκήτων στον αέρα γινόταν με τη μέθοδο του ανοικτού τρυβλίου, κατά την οποία τα τρυβλία τοποθετούνταν ανοικτά επί 20–30 min στον υπό έλεγχο χώρο, επωάζονταν και ακολουθούσε καταμέτρηση και ταυτοποίηση των αναπτυχθεισών αποικιών. Κατά τη δεκαετία 1950–1960 βελτιώθηκαν σημαντικά οι μέθοδοι δειγματοληψίας, που δεν στηρίζονταν πλέον στην «παθητική» συλλογή σπορίων, αλλά στην ενεργό δειγματοληψία με την αναρρόφηση συγκεκριμένων κυβικών μέτρων αέρα από τον υπό έλεγχο χώρο. Όμως, κάθε μέθοδος δειγματοληψίας –παλαιότερη ή νεότερη– υφίσταται περιορισμούς, κυρίως λόγω της αεροδυναμικής διαμόρφωσης των κονιδίων κάθε γένους, αλλά και είδους μύκητα. Συνεπώς, ακόμη και σήμερα είναι ιδιαίτερα δύσκολο να αποτιμηθεί ο μυκητιακός φόρτος του αέρα νοσοκομειακών χώρων και ακόμη δυσκολότερο να εκτιμηθεί η συμμετοχή συγκεκριμένων μυκήτων, των οποίων τα κονίδια συλλαμβάνονται μετά από κάθε δειγματοληψία, στις λοιμώξεις ασθενών υψηλού κινδύνου, καθώς η πρόκληση λοίμωξης είναι φαινόμενο πολυπαραγοντικό. Σημαντικότερος δε παράγοντας είναι ο τρόπος και η συχνότητα της δειγματοληψίας. Εξαιτίας αυτού, υφίσταται μια ποικιλία συσκευών ή παγίδων σπορίων. Από τις αρχές τις δεκαετίας 1950 εκτιμάται,⁴⁻⁶ από τους μελετητές της αεροβιολογίας των μυκήτων, ότι η συνδυαστική χρήση αυτών μπορεί να δώσει σχετικά αξιόπιστο υπολογισμό του μυκητιακού φόρτου του αέρα, ώστε να γίνει εφικτή η συσχέτιση τόσο με τη συχνότητα λοιμώξεων στο νοσοκομειακό χώρο, όσο και με τη συχνότητα μυκητιακής αιτιολογίας αλλεργίας στο γενικό πληθυσμό ορισμένες εποχές του έτους, λόγω της αύξησης των σπορίων μυκήτων του περιβάλλοντος. Έως τα μέσα

της δεκαετίας 1980, η διεθνής βιβλιογραφία και οι αναγνώστες της υποστήριζαν τη θετική συσχέτιση της παρουσίας κονιδίων (σπορίων) ειδών *ασπεργίλλου* στο νοσοκομειακό περιβάλλον και της συχνότητας των λοιμώξεων από *ασπεργίλλο* σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή.⁷⁻⁹ Κατ' αυτό το χρονικό διάστημα μαθηματικοποιήθηκαν οι πιθανότητες λοιμώξεων με αερομεταφερόμενους μύκητες στο νοσοκομειακό χώρο, λαμβάνοντας υπόψη το φορτίο κονιδίων στον αέρα, τα επίπεδα κυτταρικής ανοσίας και τον αριθμό των ασθενών σε κάθε θάλαμο, καθώς και την αποτελεσματικότητα των φίλτρων (HEPA, high-efficiency particulate air) για την παροχή υψηλής καθαρότητας αέρα στους θαλάμους νοσηλείας ασθενών υψηλού κινδύνου. Επί δύο δεκαετίες περίπου, τα αποτελέσματα των λογιστικών μαθηματικών μοντέλων συνέθεσαν την άποψη ότι ο αποτελεσματικός έλεγχος της ποιότητας του αέρα συντελεί στη μηδενική συχνότητα «Π» των *ασπεργίλλωσεων* ασθενών νοσηλευόμενων σε μονάδες μεταμόσχευσης μυελού των οστών με βάση το ακόλουθο γινόμενο:¹⁰ $\Pi(1-p_i)$, όπου n =αριθμός ασθενών στη μονάδα και $p_i = \text{logit}^{-1}(B_0 + B_i X_i)$. Το B_0 συμβολίζει τον αριθμό των κλινικά και εργαστηριακά επιβεβαιωμένων *ασπεργίλλωσεων* και το B_i τα περιστατικά πυρετού λόγω του μοσχεύματος. Η παράμετρος X_i συμβολίζει την προβλεπόμενη συχνότητα *ασπεργίλλωσης* στους νοσηλευόμενους στη μονάδα μεταμόσχευσης. Είναι γεγονός ότι ενώ όλες οι μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι ο υψηλής καθαρότητας αέρας, κυρίως στις μονάδες μεταμόσχευσης μυελού των οστών, μειώνει σημαντικά τις *ασπεργίλλωσεις*^{9,11-13} ($P < 0,001$), περιγραφόμενα προγράμματα δειγματοληψίας αδυνατούν να αποδείξουν την καθαρότητα ή τον κόρο του αέρα, κυρίως με κονίδια *A. fumigatus*, δεδομένου ότι αδυνατούν να καταγράψουν θετική συσχέτιση παρουσίας κονιδίων στον αέρα θαλάμων ή ειδικών μονάδων νοσηλείας και συχνότητας λοιμώξεων. Κοινό χαρακτηριστικό της πλειοψηφίας των παλαιότερων και νεότερων μελετών στο χώρο του νοσοκομείου είναι η χρήση ενός μόνο τύπου συσκευής-παγίδας σπορίων αερομεταφερόμενων μυκήτων, οι εβδομαδιαίες μόνο δειγματοληψίες κατά τη διάρκεια έργων στο χώρο του νοσοκομείου ή πλησίον των μονάδων εντατικής θεραπείας νεογνών και μονάδων μεταμόσχευσης μυελού των οστών, καθώς και οι παράλληλες εβδομαδιαίες λήψεις ρινοφαρυγγικών επιχρισμάτων για τον έλεγχο πιθανής παρουσίας *ασπεργίλλου* στους βλεννογόνους των ασθενών.¹¹⁻¹³

Σε καμία μελέτη δεν λαμβάνεται υπόψη η αεροδυναμική δομή των κονιδίων του *ασπεργίλλου*, η οποία πιθανώς ευθύνεται για την επιτυχή ή όχι παγίδευσή του από τα διάφορα συστήματα δειγματοληψίας του αέρα και ίσως να ευθύνεται για την αρνητική συσχέτιση παρουσίας σπορίων στον αέρα και *ασπεργίλλωσεων*.

Οι ασπεργίλλοι, όπως όλοι οι μύκητες, είναι κατά βάση σαπρόφυτα και έχουν αναπτύξει εξαιρετικούς μηχανισμούς διάδοσης σε μεγάλες αποστάσεις και επιβίωσης σε δυσμενή περιβάλλοντα. Βρίσκονται σχεδόν παντού και αυτό δείχνει όχι μόνο την εξαιρετική προσαρμοστικότητά τους σε διάφορα περιβάλλοντα, αλλά και τη δυνατότητά τους για μετακινήσεις σε πρακτικά τεράστιες αποστάσεις. Η μορφή του μύκητα που είναι επιφορτισμένη με την εξάπλωση σε διαφορετικά και μακρινά περιβάλλοντα είναι το κονίδιο (γνωστό και ως σπόριο), το οποίο έχει μια σειρά ιδιοτήτων που διευκολύνουν τη μετακίνηση σε μεγάλες αποστάσεις. Μερικές από αυτές τις ιδιότητες επιφέρουν και την αύξηση της αεροτομής του, σε σχέση με τα κύτταρα υφών, ένεκα των αναγκών και των δυσχερειών της παθητικής μεταφοράς των τελευταίων σε μεγάλες αποστάσεις. Όμως, δεν πρέπει να λησμονείται ότι τα κονίδια είναι πλάνητες μορφές και όχι εξειδικευμένες ανθεκτικές μορφές, όπως, αντίθετα, είναι τα χλαμυδοκονίδια* και τα σκληρώτια.**

Λόγω των ιδιοτήτων των πλάνητων μορφών (κονιδίων) των ασπεργίλλων, είναι σαφές ότι μία και μόνη μέθοδος δειγματοληψίας αυτών δεν επαρκεί για να δώσει σαφείς πληροφορίες για την παρουσία τους στον αέρα εξωτερικών και εσωτερικών χώρων.

2. ΑΕΡΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

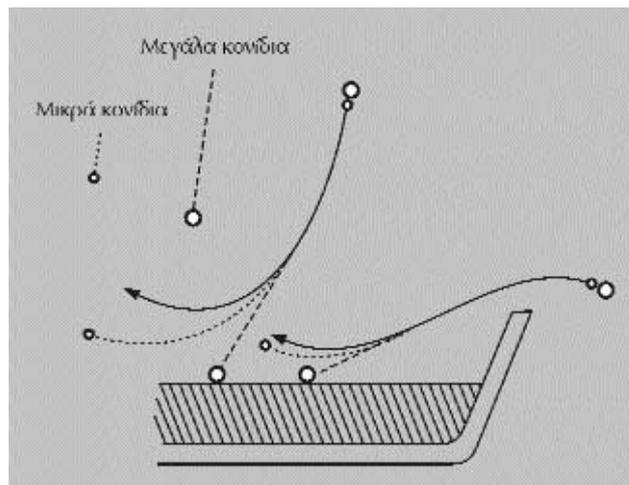
2.1. Πτήση και ενσφήνωση κονιδίων σε τεχνητά και φυσικά υποστρώματα

Η αεροδυναμική διαμόρφωση των κονιδίων του ασπεργίλλου είναι συστατικό στοιχείο της αυξημένης μολυσματικότητάς του. Με δεδομένο ότι το κονίδιο είναι η πλάνης μορφή του μύκητα, που αποσκοπεί στη μετάδοση αυτού σε γεωγραφικώς και τοπογραφικώς διαφορετικούς θώκους, έχει χαρακτηριστικά που διευκολύνουν την πτήση και επιτρέπουν επιβίωση στις δυσχερείς συνθήκες που ελλοχεύουν κατά την άγρυσσα σε άγνωστων οικολογικών χαρακτηριστικών περιβάλλοντα. Το σημειοσυμμετρικό σχήμα (σφαιρικό) σημαίνει απλότητα κατασκευής, αφού ειδικές μιτωτικές πολώσεις για πρόσδοση διαφοροποίησης δεν είναι αναγκαίες. Με τον τρόπο αυτόν, το μεταβολικό κόστος για το σχηματισμό του κονιδίου διατηρείται μικρό, που σημαίνει ότι διευκολύνεται η μαζική

παραγωγή αυτών για συγκεκριμένη κατανάλωση ενέργειας. Το μικρό μέγεθος ($\sim 1-2 \mu\text{m}$) μειώνει το βάρος και κάνει λιγότερο πιθανή τη σύγκρουση με σωματίδια του αέρα, που θα μπορούσαν να επιφέρουν απώλεια κινητικής ενέργειας και συνεπώς πώση του κονιδίου (εικ. 1), ενώ αυτή η ίδια η ύπαρξη σφαιρικού σχήματος βοηθά στην έλλειψη ανάγκης δυναμικού προσανατολισμού, που θα ήταν απαραίτητη προκειμένου το κονίδιο να πετύχει τα βέλτιστα χαρακτηριστικά ενσφήνωσης αλλά και πτήσης, αν το σχήμα του είχε κάποια πολικότητα (εικ. 2). Η αδυναμία δυναμικής κίνησης και ενεργού προσανατολισμού καθιστά το σφαιρικό σχήμα το πλέον κατάλληλο, ώστε να γίνει πλήρης εκμετάλλευση των όποιων ευκαιριακών δυνατοτήτων μετάδοσης, όπως μικρής διάρκειας αναταράξεις και ρεύματα αέρα.^{14,15}

Η σφαιρική μορφή του κονιδίου του προσδίδει στατική άνωση (αεροστατική άνωση), σύμφωνα με την αρχή του Αρχιμήδους, της οποίας το μέτρο δίνεται από τον τύπο: $A = \epsilon V$, όπου ϵ το ειδικό βάρος του εκτοπιζόμενου ρευστού (στην περίπτωση αυτή αέρας) και V ο εκτοπιζόμενος όγκος αυτού, που στην περίπτωσή μας ισούται με τον όγκο του κονιδίου. Επειδή το ειδικό βάρος του κονιδίου είναι μεγαλύτερο από αυτό του αέρα, είναι προφανές ότι μόνο με την αεροστατική άνωση δεν μπορεί να ίπταται. Όμως, ο ρόλος της είναι σημαντικός, καθώς επιβραδύνει την πώση του κονιδίου, λειτουργώντας ως δύναμη αντίθετη στο βάρος (B) αυτού (εικ. 2).

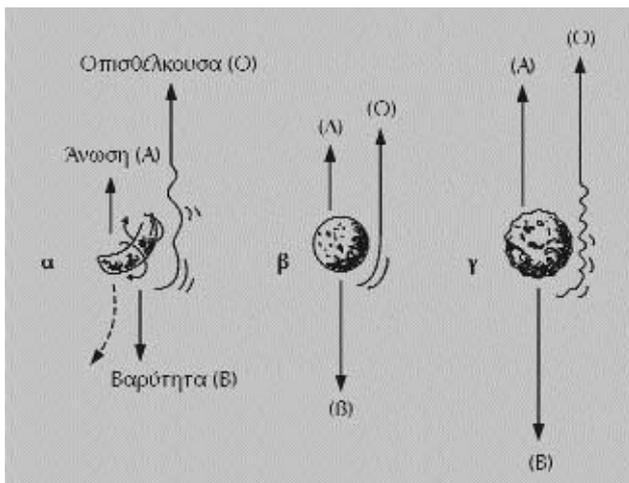
Προκειμένου για ελεύθερη πώση, που προκύπτει στην ιδεατή περίπτωση όπου το κονίδιο, λόγω του βάρους του, αποκοπεί από τις παραγόμενες από έκαστη φιαλίδα αλύσεις κονιδίων, εκτός από την άνωση και το βάρος επιδρά και μια τρίτη δύναμη, η αντίσταση του α-



Εικόνα 1. Δειγματοληψία με τη μέθοδο ανοικτού τρυβλίου. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση ρεύματος αέρα. Η μέθοδος ευνοεί τη συλλογή μεγαλύτερων και βαρύτερων κονιδίων.

* Παχύτοικα ανθεκτικά μορφώματα πρωτοπλασματικής δομής, πλήρη γλυκογόνου. Παράγονται υπό δυσμενείς συνθήκες για την ανάπτυξη του μύκητα, όπως περιορισμένο οξυγόνο ή μείωση της επιφανειακής τάσης του φυσικού ή τεχνητού υποστρώματος όπου αναπτύσσονται.

** Ανθεκτικά συμπαγή μορφώματα αποτελούμενα από υφές και με αποθέματα υδατανθράκων και λιπιδίων.



Εικόνα 2. Δυνάμεις που ασκούνται κατά την «παθητική πώση» των κοινιδίων απουσία ρεύματος αέρα. Η επιτάχυνση λόγω βαρύτητας ανά μονάδα μάζας του κάθε κοινιδίου είναι σταθερή και η άνωση είναι ανάλογη του όγκου αυτού. Η οπισθέλκουσα είναι αμελητέα για σφαιρικά λεία κοινίδια (β), αλλά αυξάνεται σημαντικά όταν τα κοινίδια διαθέτουν μεγαλύτερη επιφάνεια λόγω εξαρμάτων (γ). Η οπισθέλκουσα είναι ιδιαίτερα αυξημένη για τα ασύμμετρα κοινίδια, η δε ελεύθερη πώση τους παρεκκλίνει της καθέτου, όπως δείχνει το βέλος με τη διακεκομμένη γραμμή (α).

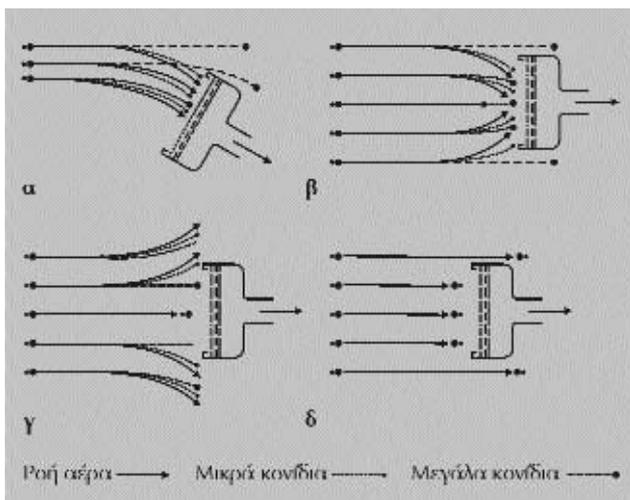
έρα με τη μορφή τριβών. Το άνυσμα αυτής είναι επίσης αντίθετο από το βάρος του κοινιδίου και επιβραδύνει την πώση του ακόμη περισσότερο. Το μέτρο αυτής της πώσης είναι, σύμφωνα με τους τύπους της αεροδυναμικής για την αεροδυναμική αντίσταση, $F_D = 1/2 \rho u^2 S$, όπου S η επιφάνεια του κοινιδίου και u η ταχύτητα πώσης. Αυτή η επιβράδυνση επιτρέπει τη βέλτιστη αξιοποίηση οποιασδήποτε οριζόντιας ώσης, δηλαδή για δεδομένη οριζόντια ώση, όσο αργότερα πέφτει (από συγκεκριμένο ύψος) το κοινίδιο, συγκεκριμένων διαστάσεων και βάρους, τόσο μεγαλύτερο οριζόντιο διάστημα θα διανύσει, δηλαδή τόσο περισσότερο απομακρυσμένες θα είναι οι αποικίες που πιθανόν να σχηματίσει σε σχέση με το υπάρχον μυκήλιο από το οποίο παρήχθη.

2.2. Δειγματοληψία αερομεταφερόμενων κοινιδίων σε κλειστούς χώρους

Η αποτυχία αξιοπιστων δειγματοληψιών με τη μέθοδο του ανοικτού τρυβλίου για την ποσοτική καταγραφή των κοινιδίων σε ένα περιβάλλον (εικ. 1) οφείλεται στο ότι κοινίδια μικρών διαστάσεων και μικρού βάρους, υπό δεδομένες συνθήκες οριζόντιας ώσης, διανύουν μεγαλύτερες αποστάσεις και έτσι έχουν μειωμένες πιθανότητες παθητικής ενσφίνωσης σε στερεά υποστρώματα. Συνεπώς, ο μυκητιακός φόρτος που θα καταγραφεί σε ένα

χώρο δεν θα είναι αντιπροσωπευτικός της ποικιλίας των μυκήτων, αλλά αντιπροσωπευτικός των σπορίων των μυκήτων εκείνων με τις αεροδυναμικές ιδιότητες που ευνοούν τη σύλληψή τους υπό τις συνθήκες συγκεκριμένων ρευμάτων αέρα που επικρατούν σε ένα χώρο.

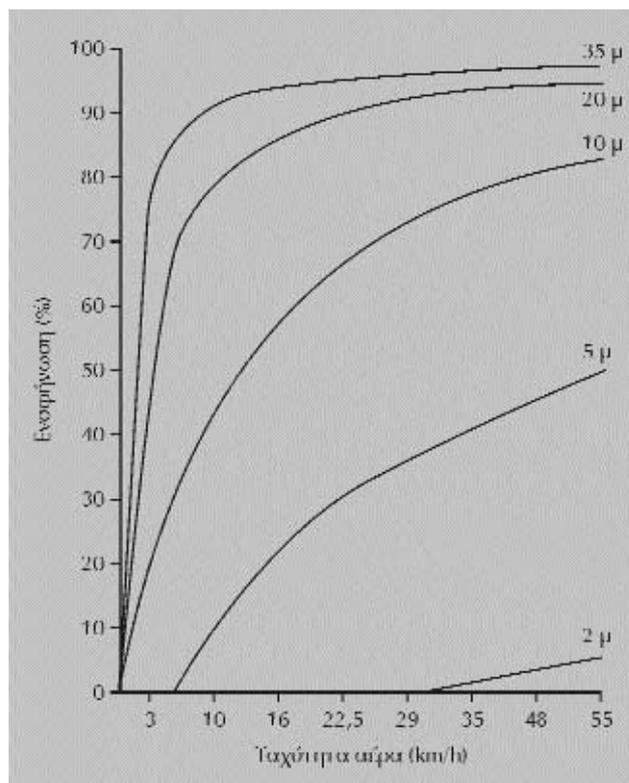
Είναι σαφές ότι, αφού δεν διαθέτει κανένα μηχανισμό ενεργού κίνησης, για την οριζόντια μετατόπισή του το κοινίδιο εξαρτάται από εξωτερικούς παράγοντες, όπως ρεύματα αέρα, για να εκτελέσει δυναμική πτήση. Σε αυτή την περίπτωση, το ρεύμα αέρα δίνει μέσω του φαινομένου της κρούσης των μορίων του με τη μάζα του κοινιδίου μια προωστήρια δύναμη, της οποίας το μέτρο εξαρτάται από την ένταση του αέρα (ταχύτητα των μορίων του), την πυκνότητα αυτού (αριθμός μορίων ανά μονάδα όγκου) και φυσικά από τον όγκο του κοινιδίου ή, ακριβέστερα, από την επιφάνεια που αυτό προβάλλει στα επερχόμενα μόρια. Συνεπώς, όσο μεγαλύτερη είναι η επιφάνειά του, τόσο περισσότερη κινητική ενέργεια μεταβιβάζεται από το ρεύμα αέρα στο κοινίδιο. Σε αυτό το φαινόμενο οφείλεται η αυξημένη συχνότητα απομόνωσης μυκήτων κυρίως των γενών *Alternaria*, *Curvularia*, *Penicillium*, που διαθέτουν μεγάλης επιφάνειας κοινίδια, καθώς και ειδών *Aspergillus*, των οποίων τα κοινίδια φέρουν εξάρματα (εικ. 2γ). Η «παγίδευση» αυξημένου αριθμού κοινιδίων με μεγαλύτερη επιφάνεια επιτυγχάνεται με οποιαδήποτε συσκευή δειγματοληψίας αερομεταφερόμενων κοινιδίων μυκήτων σε κλειστούς ή ανοικτούς χώρους (εικόνες 3, 4). Τα μικρά κοινίδια, όπως αυτά του *A. fumigatus*, συλλαμβάνονται μάλλον τυχαία, συμπαρασυρόμενα από τα μεγαλύτερα κοινίδια άλλων μυκήτων, ιδιαίτερα όταν το στόμιο του φορητού δειγματολήπτη αέρα βρίσκεται σε κλίση κατά τη δειγματοληψία (εικ. 3α). Αντίθετα, μικρό ποσοστό κοινιδίων μικρής επιφάνειας διαφεύγουν όταν ο φορητός δειγματολήπτης είναι παράλληλος προς το έδαφος. Δεδομένου όμως ότι τα κοινίδια υφίστανται οπίσθια ώση από το ρεύμα αέρα και ότι η ταχύτητα αναρρόφησης αέρα της συσκευής είναι μεγαλύτερη της ταχύτητας του ρεύματος αέρα που προκαλεί την οπίσθια ώση των κοινιδίων προς το στόμιο του δειγματολήπτη (εικ. 3β), παρατηρούνται απώλειες δειγματοληψίας των μεγαλύτερων κοινιδίων. Μεγάλες απώλειες δειγματοληψίας μικρών κυρίως κοινιδίων υφίστανται όταν η ταχύτητα αναρρόφησης του αέρα της συσκευής είναι μικρότερη της ταχύτητας του περιβάλλοντος αέρα (εικ. 3γ). Η άριστη δειγματοληψία με τις φορητές συσκευές δειγματοληψίας αέρα κλειστών χώρων μπορεί να επιτευχθεί μόνον όταν η ταχύτητα αναρρόφησης της συσκευής είναι ίση με την ταχύτητα του ρεύματος του περιβάλλοντος αέρα (ισοκινητική), οπότε αναμένονται εξίσου απώλειες μικρών και μεγάλων κοινιδίων (εικ. 3δ). Με αυτές τις συνθήκες δειγματοληψίας



Εικόνα 3. Συμπεριφορά μικρών και μεγαλύτερων κοκκίων κατά τη διάρκεια δειγματοληψιών με φορητούς δειγματολήπτες αναρρόφησης αέρα, υπό διαφορετικές συνθήκες ρύθμισης της ταχύτητας αναρρόφησης σωματιδίων και κοκκίων. (α) Ο δειγματολήπτης δεν είναι ευθυγραμμισμένος με την κατεύθυνση του ρεύματος αέρα. (β) Ο δειγματολήπτης είναι ευθυγραμμισμένος με την κατεύθυνση του αέρα, αλλά η ταχύτητα αναρρόφησης είναι μεγαλύτερη από αυτή του ρεύματος αέρα του περιβάλλοντος. (γ) Η ταχύτητα αναρρόφησης είναι μικρότερη του ρεύματος του περιβάλλοντος αέρα. (δ) Δειγματοληψία υπό ισοκινητικές συνθήκες, κατά τις οποίες η ταχύτητα αναρρόφησης ισούται με την ταχύτητα του περιβάλλοντος αέρα.

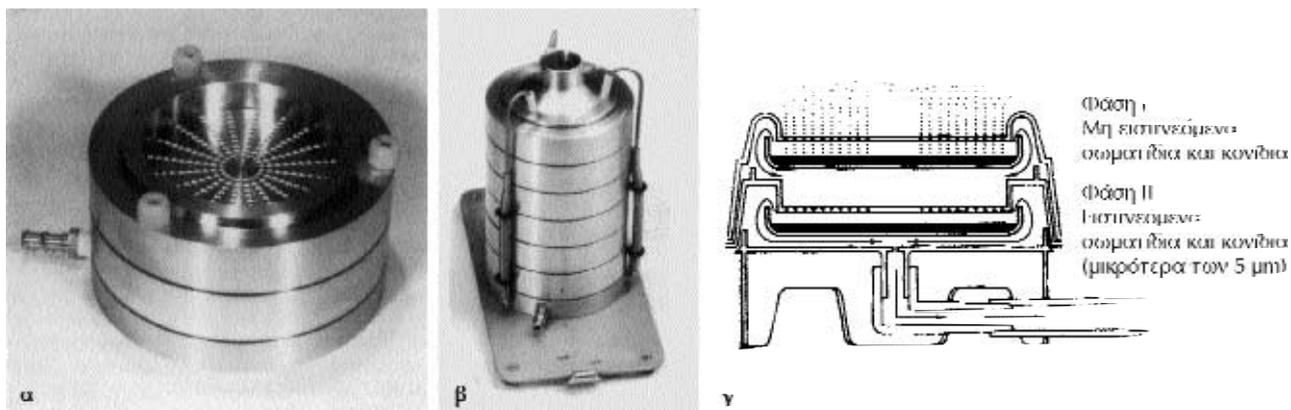
μπορεί να υπολογιστεί ακριβέστερα ο φόρτος κοκκίων του αέρα κλειστών χώρων.

Συνεπώς, είναι εμφανές ότι οι παράμετροι που επηρεάζουν τη δειγματοληψία κλειστών χώρων με τους φορητούς δειγματολήπτες, με τους οποίους είναι εφοδιασμένα τα περισσότερα νοσοκομεία στο διεθνή και ελληνικό χώρο, είναι πολλοί και συνήθως εκφεύγουν της προσοχής κατά το σχεδιασμό του προγράμματος δειγματοληψιών στο νοσοκομείο. Αυτό επιβεβαιώνεται αποτιμώντας τα αποτελέσματα των μελετών που αναφέρονται στο φόρτο κοκκίων του αέρα θαλάμων ή μονάδων νοσοκομείων, όπου, ανεξάρτητα από την ύπαρξη δομικών έργων εντός του νοσοκομείου ή στον περιβάλλοντα χώρο αυτού, η αυξημένη συχνότητα απομόνωσης *A. fumigatus* από τον αέρα δεν συσχετίζεται πάντα με τη συχνότητα απομόνωσης *A. fumigatus* από τους βλεννογόνους των ασθενών. Αλλά και αυτή η επίπτωση των λοιμώξεων δεν είναι ανάλογη της μειωμένης ή αυξημένης παρουσίας *A. fumigatus* στον αέρα θαλάμων όπου νοσηλεύονται μεταμοσχευμένοι ασθενείς.^{11,16} Η ασάφεια που επικρατεί στη βιβλιογραφία, ως προς την παρουσία κοκκίων ασπεργίλλων στον αέρα του νοσοκομείου ή θαλάμων νοσηλείας ασθενών υψηλού κινδύνου, οφείλεται και στο γεγονός ότι συχνά δεν υπολογίζονται είτε η αεροδυναμική διαμόρφωση των κοκκίων και το μέγεθός τους, είτε η



Εικόνα 4. Επιτυχής ενσφίνωση διαφορετικής διαμέτρου κοκκίων σε θρεπτικά υποστρώματα φορητών και σταθερών δειγματοληπτών υπό ποικίλη ταχύτητα του περιβάλλοντος ρεύματος αέρα. Η πιθανότητα ενσφίνωσης κοκκίων διαμέτρου μικρότερης των 5 μm είναι απειροελάχιστη. Αντίθετα, αυξάνεται σημαντικά για κοκκία μεγαλύτερα των 5 μm.

ταχύτητα και η πυκνότητα του περιβάλλοντος αέρα, είτε η διάρκεια της δειγματοληψίας, που μεμονωμένα ή σε συνδυασμό επηρεάζουν την ενσφίνωσή τους σε τεχνητά υποστρώματα (ταινίες ή τρυβλία δειγματοληπτών αέρα), αλλά και σε φυσικά υποστρώματα (βλεννογόνοι ξενιστή). Η πιθανότητα ενσφίνωσης ενός συγκεκριμένου μεγέθους και αεροδυναμικής κατασκευής κοκκίου εξαρτάται απόλυτα από την ταχύτητα των ρευμάτων αέρα που επικρατούν σε ένα χώρο και από την ένταση αναρρόφησης αέρα της συσκευής δειγματοληψίας (εικ. 4).¹⁷ Η υψηλή ταχύτητα των ρευμάτων αέρα μειώνει τις πιθανότητες ενσφίνωσης των κοκκίων διαμέτρου κάτω των 5 μm. Το γεγονός, δηλαδή, ότι οι ασπεργίλλοι με κοκκία μικρής διαμέτρου, όπως ο *A. fumigatus*, δεν ανευρίσκονται κατά τις δειγματοληψίες με φορητές ή σταθερές συσκευές αναρρόφησης συγκεκριμένου όγκου αέρα (εικόνες 3, 5), δεν σημαίνει ότι δεν υφίστανται σε ένα χώρο. Επιπλέον, από τη στιγμή που υπάρχει πρόσθια ώση λόγω των ρευμάτων του αέρα, το κοκκίο υφίσταται την επίδραση της αεροδυναμικής αντίστασης, η οποία αναλύεται σε δύο κάθετες μεταξύ τους συνιστώσες, την αεροδυναμική ή δυναμική άνωση, που αντιτίθεται στο βά-



Εικόνα 5. Δειγματολήπτης Andersen (Andersen Instruments Inc, Atlanta, Georgia) με δυνατότητα αναρρόφησης (άνιλησης) 28,3 L αέρα ανά λεπτό. (α) Συσκευή δύο φάσεων δειγματοληψίας και (β) έξι φάσεων δειγματοληψίας επί στερεού θρεπτικού υποστρώματος. Σωματίδια και κονίδια μικρότερα των 5 μm έως 2 μm μπορούν να συλλεγούν με δειγματολήπτη δύο φάσεων. Σωματίδια και κονίδια 0,65–1,5 μm συλλαμβάνονται με τη συσκευή έξι φάσεων. (γ) Μηχανισμός συλλογής εισπνεόμενων και μη σωματιδίων και κονιδίων σε δύο φάσεις κατά τη λειτουργία του δειγματολήπτη.

ρος (γνωστή ως άνωση “L”) και την οπισθέλκουσα “D”, η οποία αντιτίθεται στην κίνηση. Και οι δύο δίνονται από ένα βασικό τύπο, τον $F=1/2 c\rho v^2S$, που διαφοροποιείται σε $F_L=c_L\rho v^2S/2$ στην περίπτωση της άνωσης και σε $F_D=c_D\rho v^2S/2$ για την οπισθέλκουσα. Είναι σαφές λοιπόν ότι και οι δύο συνιστώσες εξαρτώνται από τους ίδιους παράγοντες, δηλαδή (α) την πυκνότητα του αέρα, (β) την ταχύτητα πτήσης και (γ) την επιφάνεια του κονιδίου, όπου εφαρμόζεται καθεμία από αυτές. Διαφοροποιούνται μόνο στη μορφή του ιδιαίτερου τους συντελεστή. Επομένως, αν ένα κονίδιο είχε οποιοδήποτε άλλο σχήμα πλην του σημειοσυμμετρικού, προκειμένου να εκμεταλλευτεί τη διαφορά στην αεροδυναμική αντίσταση που θα παρουσίαζαν οι διάφορες όψεις του, θα ήταν απαραίτητο να έχει μηχανισμό ενεργού προσανατολισμού, ενώ με το σφαιρικό σχήμα μια τέτοια ανάγκη εκλείπει, αφού κάθε όψη προσφέρει την ίδια αντίστοιχη επιφάνεια.

Σημαντική είναι επίσης η παρατήρηση ότι η κινητήρια δύναμη της πτήσης του κονιδίου είναι η μεταβιβαζόμενη μέσω του φαινομένου της κρούσης-ορμής από τα μόρια του αέρα. Η μεταβολή της ορμής του κονιδίου ΔJ ισούται με τη συνολική μάζα των μορίων αέρα που το έκρουσαν τη στιγμή της κρούσης επί τη μεταβολή της ταχύτητας αυτών ($\Delta J=m\Delta v$), αλλά η μάζα του αέρα είναι συνάρτηση του όγκου και της πυκνότητας αυτού ($m=\rho V$). Αυτό σημαίνει ότι όσο μεγαλύτερος όγκος αέρα έρθει σε επαφή με την ενεργό επιφάνεια του κονιδίου σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, τόσο μεγαλύτερη ορμή θα μεταδώσει στο κονίδιο. Είναι σαφές ότι ο όγκος του αέρα που μπορεί να έρθει σε επαφή με το κονίδιο σε απειροστό χρόνο εξαρτάται μόνο από τον όγκο του ίδιου του κονιδίου. Επομένως, η αρχική σχέση γίνεται $\Delta J=\rho V\Delta v$. Από την παραδοχή ότι ο όγκος είναι επιφάνεια επί διάστημα και από τον τύπο ορισμού της ταχύτητας, για το

στοιχειώδη χρόνο Δt που διαρκεί η κρούση, βρίσκουμε ότι η μεταβολή της ορμής εξαρτάται από το τετράγωνο της ταχύτητας του αέρα, από την εκτεθειμένη επιφάνεια του κονιδίου και από την πυκνότητα του αέρα ($\Delta J/\Delta t=\rho S\Delta v^2$). Επομένως, όσο μεγαλύτερη επιφάνεια εκθέτει το κονίδιο, τόσο μεγαλύτερη ώθηση υφίσταται σε συγκεκριμένο χρόνο. Αν λοιπόν είχε ατρακτοειδές σχήμα, θα παρουσίαζε μικρή επιφάνεια, άρα και οπισθέλκουσα μορφή, κατά την κίνησή του συγγραμμικά με τον άξονά του (εικ. 2α), αλλά θα παρουσίαζε και ελάχιστη επιφάνεια, επί της οποίας κρούοντας τα μόρια του αέρα θα μπορούσαν να εφαρμόσουν προωστική δύναμη. Επί του κονιδίου του *A. fumigatus* αξίζει να σημειωθεί ότι εμφανίζονται εξάρματα μικρού ύψους, αλλά αρκετά μεγάλης έκτασης, που περιτρέχουν δακτυλιοειδώς το κονίδιο και λειτουργούν ως αεροδυναμικές επιφάνειες, προσφέροντας αυξημένη άντωση, τόση ώστε μικρά ρεύματα αέρα, όπως αυτά που επικρατούν λόγω της αυξημένης κινητικότητας σε περιοχές δομικών κατασκευών, σε θαλάμους ασθενών όπου επικρατούν διακυμάνσεις στα ρεύματα αέρα ή όπου λειτουργούν κοινές οικιακού τύπου συσκευές κλιματισμού, να προκαλούν απογείωση, αιώρηση και ανεμοπορία μεγάλου αριθμού κονιδίων. Η εμφάνισή τους παρουσιάζει σφαιρική συμμετρία και εκτός από καλύτερα χαρακτηρισικά μηχανικής ενσφίνωσης σε υπόστρωμα ξηριστή (σε σχέση, π.χ., με τα επίσης διάσπαρτα και διαδομένα λείας επιφάνειας κονίδια του *A. flavus*), λειτουργούν ως αεροδυναμικές επιφάνειες αυξάνοντας, με την προβολή τους σε επίπεδα κάθετα στις εφαρμοζόμενες δυνάμεις (B, L, D, F ωστική), την ενεργό επιφάνεια S, που παρουσιάζει το κονίδιο βάσει της «Αρχής του Τριπλάνου». Η τελευταία αναφέρει ότι παράλληλοι πτερυγιακοί σχηματισμοί δίνουν πτερυγιακή επιφάνεια ίση με το άθροισμα των εμβαδών τους σε αντίστοιχη απλή πτέρυγα, γεγονός που ε-

πιρέπει τη δραστική μείωση του εκπετάσματος για δεδομένη περυγική επιφάνεια. Το χαρακτηριστικό αυτό συμβάλλει στη μείωση της ολικής διαμέτρου του κονιδίου σε <5 μm, που, ως μέγεθος-κλειδί, επιτρέπει τη διέλευση αυτού από το κροσσώτο επιθήλιο της ανώτερης αναπνευστικής οδού. Έτσι, ενώ σε ασθενείς μονάδων μεταμόσχευσης μυελού των οστών ανιχνεύεται *A. fumigatus* σε ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα, δεν ανιχνεύεται στον αέρα των θαλάμων,^{11,12} γεγονός που θέτει υπό αμφισβήτηση την επιδημιολογική αξία των δειγματοληψιών. Επίσης, η μείωση του εκπετάσματος δυσχεραίνει τις συγκρούσεις με σωματίδια που ίπτανται στον αέρα. Η μάζα του κονιδίου είναι, από την άλλη μεριά, επαρκής, ώστε να διατηρεί αρκετή κινητική ενέργεια και έτσι να μην εκτρέπεται ή ακόμη και να υποπίπτει σε απώλεια στήριξης και να καταπίπτει από μια τυχαία σύγκρουση με σωματίδια του αέρα. Αντίθετα, τα εξαρτήματα, που δίνουν εχινοειδή όψη στα κονίδια του *A. niger*, παρέχουν ανώτερα χαρακτηριστικά ενσφίνωσης επί υποστρωμάτων –με αποτέλεσμα να εμφανίζεται συχνότατα σε δερματικές ασπεργιλώσεις ανοσοανεπαρκών ασθενών και σε αυτές του έξω ωτός ανοσοεπαρκών ατόμων– αλλά αυξάνουν την ολική διάμετρο τόσο, ώστε να αδυνατεί να διέλθει από το κροσσώτο επιθήλιο υγιών ατόμων.¹⁸ Για το λόγο αυτό δεν αναφέρεται συχνά διεθνώς ο συγκεκριμένος ασπεργίλλος ως αίτιο πνευμονικών ασπεργιλώσεων, παρά το ότι είναι πολύ διαδεδομένος.¹⁵ Αντίθετα, η συμμετοχή του *A. flavus*, αν και μικρότερη από αυτή του *A. fumigatus*, ερμηνεύεται άριστα από το ότι ο πρώτος έχει δύο ειδών κονίδια. Τα πρώτα, όπως αναφέρθηκε, έχουν λεία επιφάνεια, ενώ τα δεύτερα έχουν αδρή, γεγονός που βελτιώνει τα χαρακτηριστικά ενσφίνωσης. Με βάση αυτό και την ευρύτατη διάδοσή του, δεν είναι τυχαίο το ότι ο *A. flavus* αποτελεί το δεύτερο περισσότερο διαδεδομένο ασπεργίλλο σε πνευμονικές ασπεργιλώσεις, μετά τον *A. fumigatus*.¹⁵

Προκειμένου να διατηρηθεί κατά το δυνατόν αδιάτακτη η ικανότητα του κονιδίου να ανεμοπορεί, εξωτερικά επικαλύπτεται από στρώμα υδρόφοβων ουσιών, που επιτελούν διπλή λειτουργία.^{19,20} Αφενός εμποδίζουν την απορρόφηση της υγρασίας του αέρα από τους υδρόφιλους ιστούς αυτού, που θα αύξανε το βάρος και θα μείωνε την πτητικότητα του κονιδίου, και αφετέρου περιορίζουν τις ανταλλαγές ύδατος μεταξύ κονιδίου και περιβάλλοντος, γεγονός που παρέχει σημαντικότερη προστασία από την ξήρανση σε ξηρά και θερμά περιβάλλοντα.

Παρόμοια φυσική προσέγγιση υφίσταται σε ξηρόφιλα φυτά, όπου η παραγωγή αιθέριων ελαίων δημιουργεί ένα μονωτικό στρώμα που δυσχεραίνει την επικοινωνία αέρα-υδατοφόρων ιστών, με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της προκύπτουσας εξάτμισης και ως εκ τούτου

της απώλειας ύδατος από το φυτό. Ο μηχανισμός αυτός επιτρέπει σε ξηρόφιλα φυτά την επιβίωση σε περιβάλλον ιδιαιτέρως χαμηλής υγρασίας, ενώ, αντίθετα, θα μείωνε την ανακύκλωση ύδατος διά της διαπνοής σε περιβάλλοντα υψηλής υγρασίας, κάτι που θα περιόριζε το μεταβολικό ρεύμα σε υγρόφιλα φυτά. Ανάλογος της παραγωγής αιθέριων ελαίων των φυτών είναι και ο μηχανισμός προστασίας απώλειας υγρασίας από τα κονίδια και τα σκληρώτια που παράγουν γλίσχροσμα (βλ. παράγραφο 3.1.) ή και μελανίνη. Επιπλέον, η υψηλή συγκέντρωση τρεχαλόζης και μανιτόλης των κονιδίων ενισχύει την κατακράτηση ύδατος, ενώ η μελανίνη παρέχει φυσική προστασία στη χίτινη και τη γλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος έναντι των λυτικών ενζύμων αυτών, όπως τη χιτινάση και τη γλυκανάση, τα οποία παράγονται από πολλούς προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς που συνυπάρχουν με τους μύκητες.

2.3. Έλεγχος ποιότητας αέρα και επιτήρηση ασθενών

Οι πρακτικές συνέπειες των αεροδυναμικών σχέσεων που αναλύθηκαν αντικατοπτρίζονται στα μη πειστικά αποτελέσματα των μελετών για τον προσδιορισμό του μυκητιακού φόρτου του αέρα του νοσοκομειακού περιβάλλοντος με οποιεσδήποτε συσκευές δειγματοληψίας. Τόσο οι φορητές όσο και οι σταθερές συσκευές δειγματοληψίας δεν είναι δυνατό να συντελέσουν στον κατά προσέγγιση ποσοτικό προσδιορισμό όλων των τύπων κονιδίων σε θαλάμους ασθενών, εφόσον δεν λαμβάνεται υπόψη (α) η πυκνότητα του αέρα, που ποικίλλει από θάλαμο σε θάλαμο, αλλά και κατά τις διάφορες ώρες της ημέρας, (β) τα ρεύματα αέρα που επικρατούν σε κάθε θάλαμο κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας, (γ) η διάρκεια και η συχνότητα της δειγματοληψίας και (δ) το ύψος από το οποίο αυτή γίνεται. Το σύνηθες ύψος, στο οποίο τοποθετούνται οι φορητές συσκευές, είναι 1,20–1,50 m. Το ύψος αυτό όμως δεν ευνοεί την ενσφίνωση των κονιδίων *A. fumigatus* στα υποστρώματα των συσκευών μέσω της οπής διαμέτρου 1 mm που φέρουν, κυρίως λόγω της ποικίλης πυκνότητας του αέρα σε έναν κλειστό χώρο. Πρόσφατη μελέτη –κατά την οποία οι δειγματοληψίες έγιναν από ύψος 1,20 m– αναφέρεται μόνο σε καταμέτρηση ολικού αριθμού ειδών ασπεργίλλων, ενώ καταγράφει την αυξημένη συχνότητα απομόνωσης *A. niger*,¹⁶ προφανώς λόγω της ιδιόζουσας αεροδυναμικής διαμόρφωσης των κονιδίων του, που ευνοεί τη συλλογή τους από τους δειγματολήπτες. Αντίθετα, οι αεροδυναμικές σχέσεις που διέπουν την πτήση των κονιδίων *A. fumigatus* καθιστούν δύσκολη τη συλλογή τους από αυτό το ύψος, δεδομένου ότι στη μελέτη παραμένουν άγνωστες οι συνθήκες πυκνότητας και η κίνηση ρευμάτων του αέρα κατά τη διάρκεια δειγμα-

τοληψιών και δεν προσδιορίζεται η ταχύτητα αναρρόφησης αέρα της συσκευής. Το γεγονός ότι οι δειγματοληψίες δεν έγιναν υπό ισοκινητικές συνθήκες επιβεβαιώθηκε, παρά το γεγονός ότι δεν σχολιάζεται στη μελέτη, με την απομόνωση *A. fumigatus* από τις κλίνες ασθενών και τις θερμοκοιτίδες νεογνών, όπου προφανώς τα κονίδια αγκιστρώθηκαν ακριβώς εξαιτίας των αεροδυναμικών παραμέτρων που αγνοήθηκαν κατά τη μελέτη. Επιπλέον, οι μεγάλης διάρκειας δειγματοληψίες σε κάθε θάλαμο, αντί να συμβάλλουν στην αξιόπιστη καταμέτρηση των αερομεταφερόμενων κονιδίων όλων των ειδών ασπεργίλλου, συγκαλύπτουν τις μεταβολές του μυκητιακού φόρτου των θαλάμων λόγω των αεροδυναμικών παραγόντων και της μεταβλητότητας της πυκνότητας του αέρα. Συνάγεται λοιπόν ότι οι ακριβέστερες καταμετρήσεις κονιδίων γίνονται με συχνές και μικρής διάρκειας δειγματοληψίες του αέρα κλειστών χώρων.

Κατά τα τελευταία χρόνια, εκτός των δειγματοληπτών αέρα, χρησιμοποιούνται ευρέως στο χώρο του νοσοκομείου τρυβλία με Czapek Dox άγαρ για τη συλλογή κονιδίων μυκήτων από κάθετες και οριζόντιες επιφάνειες, όπως πάγκων χειρουργείων ή θαλάμων ασθενών, περσίδων παραθύρων ή των επιφανειών φίλτρων οικιακού τύπου συσκευών κλιματισμού. Ανεξαρτήτως της υγιεινομικής ακαταλληλότητας περσίδων και του κοινού τύπου συσκευών κλιματισμού για νοσοκομειακούς χώρους και εργαστήρια, θα ήταν παράλειψη να μη σχολιαστεί ότι η δειγματοληψία επιφανειών με στερεά θρεπτικά υποστρώματα για τον υπολογισμό του τύπου και του αριθμού κονιδίων ανά μονάδα επιφάνειας υπόκειται σε περιορισμούς και συστηματικά σφάλματα ανάλογα με αυτά των δειγματοληψιών με ανοικτά τρυβλία. Είναι δε ενδογενής η αδυναμία της μεθόδου να συλλάβει με σχετική ακρίβεια κονίδια *A. fumigatus*, τα οποία βρίσκονται στις επιφάνειες τυχαία και σε μικρούς αριθμούς, χωρίς αυτό να διασφαλίζει την απουσία τους από τον αέρα.²²

Συνεπώς, η επιτήρηση των νοσοκομειακών χώρων, όπου νοσηλεύονται ασθενείς που διατρέχουν κίνδυνο λοίμωξης από ασπεργίλλο, οφείλει να είναι πολυπαραγοντική, περιλαμβάνοντας όχι μόνο τις καταμετρήσεις αερομεταφερόμενων κονιδίων, που συχνά οδηγούν σε εσφαλμένα συμπεράσματα, αλλά την εξασφάλιση ελεγχόμενης ποιότητας αέρα με τοποθέτηση φίλτρων HEPA και ελεγχόμενη θετική εσωτερική πίεση,^{11,16} με παράλληλη επιτήρηση των ασθενών υψηλού κινδύνου, που συμπεριλαμβάνει (α) έλεγχο παρουσίας αντιγόνων γαλακτομανάννης ασπεργίλλου με ανοσοενzymική μέθοδο δύο φορές την εβδομάδα²¹ και (β) ανίχνευση νουκλεϊνικών οξέων ασπεργίλλου σε ορό ή σε ολικό αίμα ασθενών με απλή ή και

εμφωλεασμένη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR),^{23,24} παράλληλα με την ανίχνευση αντιγόνων.²⁵

Στον πίνακα 1 συνοψίζεται η αποτελεσματικότητα των εργαστηριακών μεθόδων που είναι διαθέσιμες σήμερα για τη διάγνωση της πνευμονικής ασπεργίλλωσης. Ο επιτυχής έλεγχος των περιστατικών ασπεργίλλωσης στο χώρο του νοσοκομείου δεν εξαρτάται μόνο από τον υπό αυστηρά πειραματικά και υγειονομικά κριτήρια έλεγχο του περιβάλλοντος των ασθενών, αλλά και από το συγκεκριμένο των εργαστηριακών εξετάσεων είτε για την επιτήρηση των ασθενών, είτε για την παρακολούθηση της πορείας αυτών που υποβάλλονται σε προληπτική αγωγή ή σε θεραπεία.

3. ΑΝΟΣΟΑΠΟΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ

Η πλέον συνηθισμένη πύλη εισόδου των κονιδίων του ασπεργίλλου είναι η πνευμονική οδός. Χωρίς να παραγνωρίζονται παθήσεις όπως ωτίτιδες ή δερματικές ασπεργίλλωσεις, που οφείλονται σε πρόσβαση του μύκητα από άλλη οδευση, η αναπνευστική οδός είναι η πλέον συνηθισμένη και επιφέρει ενίοτε σημαντικότερες βλάβες και σε ανοσοεπαρκή άτομα. Με την είσοδο των κονιδίων στο βρογχικό δένδρο, μετά τη διέλευση από το κροσσώτο επιθήλιο της αναπνευστικής οδού, ο σημαντικότερος παράγοντας άμεσης ανάσχεσής τους είναι τα λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα που εδράζονται στο πνευμονικό επιθήλιο.^{20,26-29} Τα δεύτερα, ακόμη και αν δεν είναι ενεργοποιημένα, φαγοκυττάρωνουν τα κονίδια, αλλά αδυνατούν να τα καταστρέψουν *in vivo*. Η ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων, που είναι καθοριστική για την επιτυχή αντιμετώπιση του παθογόνου παράγοντα, επιτυγχάνεται με τα λεμφοκύτταρα, τα οποία έρχονται σε επαφή με το κονίδιο ευθύς αμέσως μετά την απόθεσή του, προ-

Πίνακας 1. Αποτελεσματικότητα εργαστηριακών μεθόδων για τη διάγνωση πνευμονικής ασπεργίλλωσης σε κλινικά υλικά αναπνευστικής οδού.

Μέθοδος	Αποτελεσματικότητα (%)*
Μικροσκοπική εξέταση νωπού παρασκευάσματος	15
Μικροσκοπική εξέταση με χρώση Gram	10
Μικροσκοπική εξέταση με φθορίζουσα χρώση χιτίνης	25
Μικροσκοπική εξέταση με χρώση Gomori	25
Καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα	40
Καλλιέργεια σε ζωμό	35
Ανίχνευση αντισωμάτων	Δεν εφαρμόζεται
Ανίχνευση αντιγόνου γαλακτομανάννης	25
Ενίσχυση νουκλεϊνικών οξέων ασπεργίλλων (PCR)	35

* Έχει υπολογιστεί σε όλα τα κλινικά δείγματα της αναπνευστικής οδού

τού καν βλαστήσει, και δρομολογούν μια ανοσιακή απόκριση τύπου Th-1 παράγοντας τις αντίστοιχες κυτταροκίνες, όπως IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, οι οποίες ενεργοποιούν τα ίδια τα εκκρίνοντα λεμφοκύτταρα (αυτοκρινής δράση), αλλά και άλλα ενεχόμενα στην κυτταρική ανοσία κύτταρα, όπως τα φαγοκύτταρα (μικροφάγα, μακροφάγα).³³⁻³⁹ Τα λεμφοκύτταρα, μόλις ενεργοποιηθούν, έχουν και την επιπλέον δυνατότητα, ερχόμενα σε επαφή με τα κονίδια του μύκητα, να αποτρέπουν την προσκόλλησή τους επί των τοιχωμάτων του βρογχικού δένδρου, χωρίς όμως να του προκαλούν βλάβες.^{33,39} Αντίθετα, δεν έχουν αυτή τη δυνατότητα όταν αναπτυχθούν οι υφές. Το αντίθετο ισχύει με τα πολυμορφοπύρρηνα, που ανήκουν στα μικροφάγα φαγοκύτταρα και τα οποία προκαλούν αποκόλληση βλαστησάντων κονιδίων και υφών, που στη συνέχεια ή φαγοκυτταρώνουν τα κονίδια ή προσκολλώνται στις υφές και τα καταστρέφουν, καθώς υπολειμματικά μυκητιακά κύτταρα εμφανίζουν δομικές βλάβες στα οργανίδια τους και μεταβολική ανεργότητα. Αντίθετα, δεν επηρεάζουν μη εκβλαστήσαντα κονίδια, πιθανότατα λόγω απουσίας συγκεκριμένων αντιγονοκαθοριστικών μορίων από την επιφάνεια του κονιδίου, τα οποία είναι παρόντα στην επιφάνεια των βλαστηπικών κυττάρων (υφές), άρα και στα εκβλαστήσαντα κονίδια.^{19,32,37,39-41} Τα μη εκβλαστήσαντα κονίδια φαγοκυτταρώνονται και καταστρέφονται από ενεργοποιημένα μακροφάγα,^{40,42} αφού τα επίσης ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα έχουν αποτρέψει την επικόλλησή τους στο επιθήλιο και τα έχουν καταστήσει με αυτόν τον τρόπο μηχανικώς περισσότερο ευπρόσιτα στη φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα. Αυτή η διαφορά στην επιλεκτικότητα και τη δραστικότητα λεμφοκυττάρων-πολυμορφοπυρήνων δεν στερείται σημασίας. Καθώς τα λεμφοκύτταρα βρίσκονται εγγύτερα στην περιοχική έκκριση των κυτταροκινών, ενεργοποιούνται γρηγορότερα σε σχέση με μακρύτερα ευρισκόμενα κύτταρα και το ίδιο ισχύει και για τα μακροφάγα του πνεύμονα (ιστιοκύτταρα). Αυτός ο χρονισμός έχει σημασία, καθώς τα εισδύσαντα κονίδια δεν θα έχουν προλάβει ακόμη να εκβλαστήσουν, αλλά απλώς θα έχουν προσκολληθεί. Η αποκόλληση από ένα σταθερό υπόστρωμα δυσκολεύει την ανάπτυξη του μύκητα και ιδίως τη διάσπαση και πρόσληψη συστατικών από τους ιστούς του ξενιστή και διευκολύνει την εγκόλλησή τους από τα ψευδοπόδια που εκτείνουν τα μακροφάγα. Αντιθέτως, τα πολυμορφοπύρρηνα, καθώς φθάνουν αργότερα, θα αντιμετωπίσουν ήδη εκβλαστημένα κονίδια και υφές, είτε επί των τοιχωμάτων, είτε, λόγω επιτυχούς δράσης των λεμφοκυττάρων, εν αιωρήσει. Επομένως, καθίσταται πλέον σημαντική η αναστολή ανάπτυξης των υφών, που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη διεισδυτικότητα, αλλά και η καταστροφή της βιωσιμότητας των μυκητιακών κυττάρων. Για το λόγο αυτόν, τα πολυμορφοπύ-

ρρηνα έχουν τη δυνατότητα καταστροφής και των δύο τύπων. Φαγοκυτταρώνουν και καταστρέφουν εκβλαστήσαντα κονίδια, τα οποία αποκολλούν από το πνευμονικό επιθήλιο, ή τα βρίσκουν ήδη αποκολλημένα λόγω προηγούμενης δράσης των λεμφοκυττάρων, προτού εκβλαστήσουν. Στην περίπτωση των υφών, επειδή είναι αδύνατη η φαγοκυττάρωση, προσκολλώνται επ' αυτών και τις καταστρέφουν με εξωκυττάρωση των δραστικών συστατικών, περιοριζόμενα στο να τις αποκολλήσουν από το επιθήλιο, αν είναι προσκολλημένες σε αυτό.^{26,37,43} Όσον αφορά την ανάπτυξη των υφών, δεν είναι μόνο μηχανικοί οι λόγοι που τις καθιστούν μορφή μεγάλης διεισδυτικότητας σε ιστούς. Ανακαλύφθηκε πρωτεάση, εγκατεστημένη σταθερά επί του κυτταρικού τοιχώματος υφών του *A. fumigatus*, η οποία πιθανολογείται ότι ενέχεται στην πρωτεόλυση του πνευμονικού ιστού και στη διευκόλυνση της διείσδυσης της υφής στους ιστούς.⁴¹

Η διαδικασία αναστολής της ανάπτυξης επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους. Τα πολυμορφοπύρρηνα εκκρίνουν ουσίες, όπως η τρανσφερίνη και η λακτοφερίνη, που δεσμεύουν το σίδηρο και μειώνουν τη διαθεσιμότητά του στο μυκητιακό κύτταρο, που δυσκολεύεται έτσι να τον προσλάβει. Ο σίδηρος είναι στοιχείο-κλειδί στην ανάπτυξη και η μείωση της διαθεσιμότητάς του είναι βέβαιο ότι οδηγεί σε επιβράδυνση της ανάπτυξης και έλεγχο της μόλυνσης.^{19,44} Άλλη προσέγγιση είναι η πρόκληση καταστροφικών βλαβών στο μυκητιακό κύτταρο, ιδίως στην κυτταρική του μεμβράνη, της οποίας η διαπερατότητα μεταβάλλεται και οδηγεί στην απώλεια της ομοιοστασίας και στην αναστολή της ανάπτυξης ή και στο θάνατο του κυττάρου. Δεν είναι τυχαίο ότι μια κατηγορία αντιμυκητιακών, τα πολυένια, αποσκοπούν ακριβώς στην πρόκληση βλαβών στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ οι αζόλες παρεμποδίζουν τη σύνθεση συστατικού αυτής.⁴⁴ Ουσίες που προκαλούν βλάβες στις κυτταρικές μεμβράνες είναι τα οξειδωτικά ένζυμα και τα κατιονικά πεπτιδικά.^{43,44} Και τα δύο είδη συναντώνται στα μακροφάγα, στα πωσινόφιλα, αλλά κυρίως στα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα.⁴³ Οι οξειδωτικές πρωτεΐνες (π.χ. μυελοϋπεροξειδάση των πολυμορφοπυρήνων και μακροφάγων) προκαλούν βλάβες στα λιπίδια της μεμβράνης, οξειδώνοντάς τα (λιπιδική υπεροξειδωση) με την καταλυτική απελευθέρωση ριζών υδροξυλίου από υπεροξειδίο του υδρογόνου.^{34,36,37,44} Τα κατιονικά πεπτιδικά, από την άλλη μεριά, έχοντας βασικό χαρακτήρα λόγω της μεγάλης περιεκτικότητάς τους σε αργινίνη, αντιδρούν με όξινα φωσφολιπίδια και λιποπολυσακχαρίτες της μεμβράνης και της προκαλούν δομικές βλάβες.^{43,44} Άλλα λυτικά ένζυμα, τα οποία ελευθερώνονται και αυτά στο πεπτικό κενότοπιο μετά τη φαγοκυττάρωση του μυκητιακού κυττάρου, όπως η λυσοζύμη, προκαλούν βλάβες στο κυτταρικό τοίχωμα και παύση της

αναπτυξιακής διαδικασίας.^{43,44} Τέλος, τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα (π.χ. από τον παράγοντα G-CSF) απελευθερώνουν στα πεπτικά κενोटόπια (πλην της μυελοϋπεροξειδάσης, των κατιονικών πρωτεϊνών και των λυτικών και κηλικών παραγόντων) ενεργό οξυγόνο και ενεργείς ρίζες NO, οι οποίες προκαλούν βλάβες στα μόρια που χρησιμοποιεί ο μύκητας για πρόσληψη, μεταφορά και αφομοίωση σιδήρου (π.χ. φερικροσίνη του *A. fumigatus*).³⁰ Οι τελευταίες ρίζες είναι ιδιαίτερα δραστικές και προσβάλλουν μεγάλη ποικιλία κυτταρικών στόχων, μεταξύ των οποίων και κύτταρα του ίδιου του ξενιστή, γι' αυτό και χαρακτηρίστηκαν ως «ενδογενής κυτταρικός παράγοντας χάλασης».³⁰ Αυτό σημαίνει ότι απαιτείται ακριβής έλεγχος, όχι μόνο θετικός αλλά και αρνητικός (κατασταλτικός), της παραγωγής τους, που επιτυγχάνεται από την απόκριση τύπου Th-2, η οποία καταστέλλει την κυτταρική ανοσία και επάγει τη χυμική, με χρήση παραγόντων όπως η IL-4 και η IL-10. Έχει παρατηρηθεί ότι λεμφοκύτταρα από ασθενείς με αλλεργική βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση αντιδρούν σε ορισμένα αντιγόνα του ασπεργίλλου με απόκριση τύπου Th-2, γεγονός που μειώνει τις πιθανότητες επιτυχούς αντιμετώπισης της μόλυνσης.^{33,40}

Από τα ανωτέρω εμφανίζεται η μεγάλη σημασία της ενεργοποίησης του συμπληρώματος για την επιτυχή αντιμετώπιση της λοίμωξης. Η κύρια οδός του συμπληρώματος ενεργοποιείται μόνο σε περίπτωση υφών και εκβλαστησάντων κυττάρων και οδηγεί σε οψονισμό, ο οποίος διευκολύνει τη φαγοκυττάρωση, κυρίως από τα πολυμορφοπύρνα.^{30,38} Η εναλλακτική οδός δείχνει μεγαλύτερη ευκαμψία και επάγεται από επιφανειακούς πολυσακχαρίτες του μυκητιακού κυττάρου, προκαλώντας και αυτή οψονισμό και διευκολύνοντας τη φαγοκυττάρωση.¹⁹ Η διαδικασία ενορχηστρώνεται σε όλες τις περιπτώσεις από το Μείζον Σύμπλεγμα Ιστοσυμβατότητας (MHC), αλλά επειδή η όλη διεργασία είναι πολύπλοκη, χρονοβόρα και μπορεί να υποστεί διαφόρων ειδών εκτροπές (π.χ. απόκριση τύπου Th-2, καταστολή της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος από συγκεκριμένα επιφανειακά μόρια του μύκητα, μερική πρωτεόλυση ή μειωμένη συγγένεια συγκεκριμένων στελεχών στα στοιχεία του συμπληρώματος), είναι πολύ σημαντική η ύπαρξη στοιχείων που θα δρουν χωρίς τη μεσολάβηση του MHC, προσφέροντας μια λύση ανάγκης, αλλά και μια ταχύτερη δυνατότητα αντιμετώπισης μέχρι την ολοκλήρωση της ενεργοποίησης των υπόλοιπων στοιχείων της κυτταρικής ανοσίας. Τα κύτταρα-φονείς (NK) έχουν ακριβώς αυτόν το ρόλο, καθώς καθίστανται αποτελεσματικότερα μετά από ενεργοποίηση και μπορούν να καταστρέφουν μυκητιακά κύτταρα, αλλά δρώντας ανεξάρτητα από το MHC μπορούν –επειδή είναι μη ενερ-

γοποιημένα– να σχηματίσουν συμπλέγματα με τα μυκητιακά κύτταρα, εμποδίζοντας έτσι το σχηματισμό υφών. Μια τέτοια εξέλιξη όχι μόνο εμποδίζει τη διείσδυση στους ιστούς, με το βαθμό επιτυχίας που παρουσιάζουν οι υφές, αλλά αποτρέπει την προσκόλληση και διευκολύνει τη φαγοκυττάρωση, αφού είναι σαφώς ευκολότερη η εγκόλπωση ενός κυττάρου ή ενός μικρού τμήματος υφής από μια μεγαλύτερη, πλήρως αναπτυγμένη ή και προσκολλημένη επί ιστού υφή. Επιπλέον, τόσο τα NK-κύτταρα όσο και οποιοδήποτε άλλο κύτταρο, όπως μακροφάγο, πολυμορφοπύρνο, αλλά κυρίως ειδικά κύτταρα (γ/δ TCR) με ρόλο αντίληψης αντιγονικής παρουσίας στην περιοχή όπου εδράζονται, με πρώτη επαφή με το μυκητιακό κύτταρο παράγουν κυτταροκίνες τύπου Th-1 για να δρομολογηθεί η ενεργοποίηση, ενώ ταυτόχρονα, προτού αυτή επισυμβεί, αντιδρούν με τον προσφορότερο δυνατό τρόπο, ώστε να καθυστερήσουν την πρόοδο της μόλυνσης με παρακάλυση του πολλαπλασιασμού των μυκητιακών κυττάρων.^{19,30,32,35} Φαγοκυτταρωμένα από μη ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα (π.χ. μακροφάγα ιστικοκύτταρα του πνευμονικού επιθηλίου, που συναντούν και φαγοκυτταρώνουν μόλις εισπνευσθέντα κονίδια), αλλά βιώσιμα κύτταρα του μύκητα, καθηλώνονται με αυτόν τον τρόπο μέχρι να επισυμβεί η ενεργοποίηση. Έτσι, αποτρέπεται ο άμεσος πολλαπλασιασμός τους και ο σχηματισμός υφών. Η καταστροφή τους επέρχεται μετά το πέρας της ενεργοποίησης, οπότε ειδικά κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα, τα CD8+ (ειδικεύονται στην καταστροφή καρκινικών κυττάρων), λύουν το λειτουργικώς ανεπαρκές φαγοκύτταρο, προκειμένου ο μύκητας να εκτεθεί εκ νέου σε ενεργοποιημένα πλέον και, συνεπώς, ανθεκτικότερα και αποτελεσματικότερα φαγοκύτταρα. Η δράση αυτών των κυττάρων απαιτεί τη διαμεσολάβηση του MHC τάξης I, γεγονός που υποδεικνύει ότι απαιτεί σημαντικό χρόνο για να εκδηλωθεί.^{30,32,43} Η άμεση φαγοκυττάρωση από μη ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα, που αδυνατούν να καταστρέψουν το μυκητιακό κύτταρο, ο σχηματισμός συμπλόκων από τα NK-κύτταρα, που αποτρέπει το σχηματισμό υφών, και η ύπαρξη της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος είναι μέτρα που εξοικονομούν χρόνο στον οργανισμό, περιορίζοντας την ταχύτητα και έκταση της λοίμωξης κατά το πρώτο, κρίσιμο στάδιο, μέχρι να ολοκληρωθεί η αντιγονική ενεργοποίηση και η πλήρης κινητοποίηση της οδού της κυτταρικής ανοσίας.

Προκειμένου να αποφύγει ή να καταστείλει την ανοσοαπόκριση του οργανισμού, ο ασπεργίλλος χρησιμοποιεί μια ποικιλία μεθόδων. Η ύπαρξη αντιγόνων που δρομολογούν απόκριση Th-2 είναι κλασική περίπτωση εκτροπής της ανοσοαπόκρισης.^{32,38,40} Η έλλειψη από την επιφάνεια του κονιδίου πολλών αντιγονικών καθορισμών,

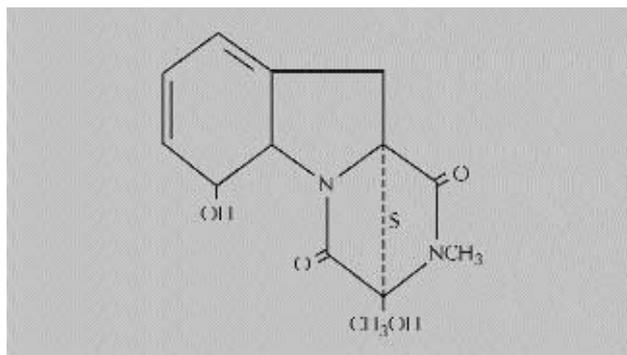
οι οποίοι υπάρχουν στο τοίχωμα της υψής, εξοικονομεί χρόνο στο κονίδιο, ώστε να προσκολληθεί, να βλαστήσει και να δημιουργήσει ευμεγέθη (και δύσκολο να φαγοκυτταρωθεί) υψή, προτού εκδηλωθεί η άνοση απόκριση με την οδό της κυτταρικής ανοσίας.^{19,20,44} Επιπλέον, το ίδιο το κυτταρικό τοίχωμα των ασπεργίλλων τούς δίνει εξ αρχής ένα πλεονέκτημα σε αυτή την προσπάθεια, καθώς προστατεύει από δυνητικά καταστροφικές κυτταροτοξικές ουσίες που εκκρίνουν τα διάφορα κύτταρα του ανοσιακού συστήματος. Η αντοχή στη φαγοκυττάρωση από μη ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα είναι ένα καλό παράδειγμα της προστασίας που εξασφαλίζει το κυτταρικό τοίχωμα έναντι των λυτικών ενζύμων.

3.1. Μεταβολικά προϊόντα ασπεργίλλων ως λοιμογόνοι παράγοντες

Ορισμένα στελέχη *A. fumigatus*, όπως αυτά που παράγουν γλίσχροσμα ή γλοιοτοξίνη, έχουν ακόμη περισσότερες πιθανότητες αποφυγής της ανοσοαπόκρισης του οργανισμού. Το πρώτο είναι υδαρής ουσία, παχύρρευστη, με μεγάλη περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτες, η οποία όχι μόνο βοηθά τη μηχανική προσκόλληση επί του ξενιστή, λόγω της κολλώδους υψής της, αλλά παρακωλύει και την ανταλλαγή νερού και προστατεύει από υδατοδιαλυτά λυτικά ένζυμα και λοιπούς υδροφίλους-υδατοδιαλυτούς παράγοντες, που θα μπορούσαν να θίξουν τα μυκητιακά κύτταρα.⁴⁵⁻⁴⁷

Η χρήση σιδηροφόρων μορίων, όπως η φερικροσίνη, με μεγαλύτερη συγγένεια για το σίδηρο από την τρανσφερίνη και τη λακτοφερίνη, τουλάχιστον στις συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή της λοίμωξης, επιτρέπει την εξεύρεση σιδήρου για τη συνέχιση της αναπτυξιακής διαδικασίας και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η ύπαρξη σχηματισμένων μορίων σιδηροφόρου ήδη μέσα στο κονίδιο επιτρέπει την άμεση πρόσληψη και αφομοίωση του υπάρχοντος σιδήρου, προτού ακόμη η ανοσοαπόκριση οδηγήσει στην έκκριση λακτοφερίνης από τα πολυμορφοπύρρηνα, η οποία θα τον δεσμεύσει.^{19,48}

Ορισμένα στελέχη *A. fumigatus* και η πλειοψηφία των *A. terreus* παράγουν γλοιοτοξίνη, που αποτελείται από δακτύλιο επιπολυδιοξυπιπεραδίνης, ο οποίος φέρει μια διθειογέφυρα (εικ. 6). Η γλοιοτοξίνη διευκολύνει με αρκετούς τρόπους την αποφυγή και καταστολή της ανοσοαπόκρισης. Καταρχήν, μεταβάλλοντας τα επίπεδα του κυκλικού AMP προκαλεί απόπτωση σε πολλά από τα ενεχόμενα στην κυτταρική άνοση κύτταρα. Κατόπιν, προκαλώντας, λόγω της διθειογέφυρας, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, τη δημιουργία ριζών υδροξυλίου, προκαλεί βλάβες στα νουκλεϊνικά οξέα και μετατροπή των κανονικών νουκλεοτιδίων σε άτυπα, γεγονός που αναστέλλει



Εικόνα 6. Χημική δομή γλοιοτοξίνης *A. fumigatus*.

λει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της κυτταρικής ανοσίας. Με τον τρόπο αυτόν, η μόλυνση παρουσιάζει πρόοδο και η πρόγνωση γίνεται βαρύτερη.⁴⁹⁻⁵²

Η ρεσπικτοσίνη ονομάστηκε έτσι επειδή πρωτοαπομονώθηκε από τον *A. restrictus*, αλλά παράγεται και από ορισμένα στελέχη του *A. fumigatus*.⁵³ Είναι εκκριτική, εξωκυττάρια ενδοριβονουκλεάση και καταστρέφει το ριβόσωμα διασπώντας μη αναστρέψιμα το ριβοσωμικό RNA, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Δεν έχει αυτόνομο μηχανισμό εισόδου στο κύτταρο του ξενιστή, στο οποίο εισέρχεται μετά από δομικές βλάβες των κυττάρων από άλλα μεταβολικά παράγωγα του μύκητα ή από φλεγμονώδεις ουσίες. Άλλη μέθοδος εισόδου είναι με τη φαγοκυττάρωση του μύκητα από φαγοκύτταρα. Στην πρώτη περίπτωση είναι εμφανής η τοξική της δράση κατά την πρόοδο της λοίμωξης, ενώ στη δεύτερη η δράση της στην αποτροπή της άνοσης απόκρισης του ξενιστή, καθώς το μυκητιακό κύτταρο που την παράγει όχι μόνο επιβιώνει της φαγοκυττάρωσης, αλλά εξουδετερώνει και τα ενεχόμενα φαγοκύτταρα.^{46,50}

Η σύνθεση καταλάσης από το μύκητα επίσης τον προστατεύει από κυτταροκτονία μετά τη φαγοκυττάρωση ή την προσκόλληση πολυμορφοπυρήνου, με το να διασπά το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο, αποστερώντας έτσι το υπόστρωμα της μυελοϋπεροξειδάσης, η οποία το μετατρέπει σε δραστικές –και ως εκ τούτου κυτταροκτόνες– ρίζες υδροξυλίου.⁴⁵

Η αποφυγή-καταστολή της ανοσοαπόκρισης είναι μια ουσιαστική διαδικασία για τη λοιμογόνο ισχύ του μύκητα και την επιβίωσή του ως παράσιτο, αλλά θα ήταν άνευ ουσίας αν δεν υπήρχε η μεταβολική ποικιλότητα και προσαρμοστικότητα, που του επιτρέπει την επιβίωση και ανάπτυξη σε ένα αρκετά δυσμενές περιβάλλον, όπως είναι ο ανθρώπινος οργανισμός. Στους μύκητες, γενικά, απαντά ένα αρκετά ισορροπημένο καθεστώς γενετικής ποικιλότητας/πολυδυναμίας και συντηρητικότητας/μηχανισμών επιδιόρθωσης, που τους καθιστά επίφοβους επι-

μολυντές, καθότι μπορούν, υπό δυσμενείς συνθήκες (όπως υπεριώδης ακτινοβολία), να διατηρούν κατά το δυνατόν αλώβητες τις γενετικές πληροφορίες βασικών ή και επιτυχημένων συστατικών τους, αλλά ταυτόχρονα μπορούν να αναπτύσσουν κατάλληλα ένζυμα και λοιπά προϊόντα αναβολισμού, ώστε να επιβιώνουν σε αντίξοες συνθήκες και να προσαρμόζονται σε νέους, καταρχάς δυσμενείς θώκους.

Φθάνοντας, χάρη στις ιδιότητες που προαναφέρθηκαν, στις κυψέλες –ή σε οποιοδήποτε άλλο υπόστρωμα– το κονίδιο, μετά τη μηχανική ενσφύνωση, πρέπει να προσκολληθεί και χημικά. Γι' αυτή την αντεπίδραση υπεύθυνες είναι ειδικές πρωτεΐνες, οι «προσκολλητίνες». Υπάρχουν δύο βασικά είδη αντεπίδρασης, η αντεπίδραση μεταξύ πρωτεΐνης και υδατάνθρακα («λεκτινική») και αυτή μεταξύ πρωτεϊνών. Στην πρώτη περίπτωση, ο υδατάνθρακας μπορεί να βρίσκεται είτε στην επιφάνεια του παθολόγου παράγοντα είτε σε αυτή του ξενιστή και, αντίστοιχα, στην αντίθετη επιφάνεια βρίσκεται η πρωτεΐνη.^{20,27,28,41}

Πιστεύεται ότι, λόγω του επιφανειακού εντοπισμού τους, οι προσκολλητίνες έχουν και κάποιο δευτερεύοντα ρόλο. Τέτοιος είναι ο ρόλος καναλιού ανταλλαγής ιόντων ή και αυτός του πρώτου αγγελιοφόρου κυτταρικού σήματος, αφού με την επίτευξη της προσκόλλησης διαφοροποιείται ο μεταβολισμός του κονιδίου, ώστε να επιτευχθεί η βλάστηση. Κατά τη βλάστηση, η επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος του κονιδίου υφίσταται μείζονα αναδιάταξη,²⁸ στην οποία μάλλον συμμετέχει μια δεσμευμένη στον κυτταρικό φάκελο του μύκητα ασπαρτική πρωτεάση ευαίσθητη στην πεπτατίνη.^{41,54} Αυτή πρωτεολύει μερικώς συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, ώστε να είναι εφικτή η αναδόμησή του. Είναι λοιπόν λογικό να υποθεθεί ότι, με την πρόσδεση, οι πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες γι' αυτήν υφίστανται κάποια στερεοχημική τροποποίηση, που κάνει το ενδοκυττάριο τμήμα τους να δρα ως πρώτος αγγελιοφόρος (μηνύτορας), προκειμένου να δρομολογηθούν οι επακολουθούσες κυτταρικές μεταβολές.

Στους ασπεργίλλους έχει αποδειχθεί^{20,29} ότι αναγνωρίζονται συστατικά της εξωκυττάριας σιβάδας του πνευμονικού επιθηλίου. Τα κονίδια του *A. fumigatus* αναγνωρίζουν το D θραύσμα του ινωδογόνου, αλλά δεν αλληλεπιδρούν με την ακολουθία αργινίνης-γλυκίνης-ασπαρτικού ούτε με το καρβοξυτελικό άκρο της γ-αλυσίδας. Επίσης, τα συγκεκριμένα κονίδια αντεπιδρούν με το P1 θραύσμα της ελασματίνης, την οποία αποδομούν σε ρικινικές κυμοθρυψινικού τύπου πρωτεάσες, προκειμένου να δημιουργηθεί χώρος αλλά και προϊόντα προς καταβολισμό. Η ελασματίνη είναι δομική πρωτεΐνη της βασικής μεμβράνης και έχει σταυροειδή δομή δύο διαστάσεων. Επ' αυτής προσδένονται κονίδια *A. fumigatus* μέσω μιας «προσκολλητίνης», που είναι πρωτεΐνη 72 kDa (πιθανόν

γλυκοζυλιωμένη, γεγονός που υπαινίσσεται λεκτινική αλληλεπίδραση) και εντοπίζεται στο κυτταρικό τους τοίχωμα, πάνω από το στρώμα των ραβδίων.²⁹ Η συγκέντρωσή της μειώνεται όταν το κονίδιο αρχίζει τη βλάστηση και αναδιαρθρώνεται το κυτταρικό του τοίχωμα. Τότε, σύμφωνα με ορισμένες ενδείξεις, αντί της ειδικής σύνδεσης με την εν λόγω προσκολλητίνη, η επαφή βλαστήσαντος κονιδίου-ελασματίνης διατηρείται χάρη σε υδρόφοβη αλληλεπίδραση, που επισυμβαίνει λόγω της αύξησης της υδροφοβικότητας του κυτταρικού τοιχώματος του βλαστήσαντος κονιδίου σε σχέση με αυτό του αδρανούς κονιδίου, το οποίο φέρει και την ειδική προσκολλητίνη. Θεωρητικά, η σύνδεση κονιδίου-ελασματίνης επιτυγχάνεται χάρη στην αποκάλυψη και αλλοίωση της βασικής μεμβράνης του πνευμονικού επιθηλίου από εκκρινικές πρωτεάσες του μύκητα.²⁸ Η άποψη αυτή πάσχει στο ότι η σύνθεση και έκκριση πρωτεασών, λογικά, απαιτεί την προηγούμενη βλάστηση του κονιδίου, προκειμένου να ενεργοποιηθούν οι μεταβολικές οδοί, αντί να την υποβοηθεί/επάγει, όπως υπαινίσσεται η ανωτέρω υπόθεση. Άλλωστε, όπως προαναφέρθηκε, θεωρείται πιθανότατος ο ρόλος των προσκολλητίνων σε αυτή την επαγωγή που οδηγεί στη βλάστηση με κάποια λειτουργία πρώτου αγγελιοφόρου, η οποία στηρίζεται σε αλλαγή της στερεοδιάταξής τους κατά την προσκόλληση στο εκάστοτε υπόστρωμα. Πάντως, τουλάχιστο στα αρχικά στάδια, σημαντικό μπορεί να είναι ο ρόλος των πρωτεασών που είναι σταθερά δεσμευμένες επί του κυτταρικού τοιχώματος,^{41,54} μια και η δράση τους είναι ταχύτερη, απλούστερη και μεταβολικώς προσφορότερη, καθώς δεν απαιτούν έκκριση.

Η προσκόλληση είναι μια λεπτή διαδικασία, στην οποία μικρές μεταβολές μπορεί να έχουν μεγάλη σημασία. Πειράματα με *C. albicans* έδειξαν ότι η προσκόλληση των κυττάρων σε κυτταρικές σειρές μειώνεται δραστικά με την απώλεια της μεμβρανικής ασυμμετρίας. Η τελευταία είναι ένα από τα πρώτα στάδια της απόπτωσης και προηγείται της απώλειας της ακεραιότητας της μεμβράνης και της συμπύκνωσης της χρωματίνης. Η απώλεια της ασυμμετρίας της μεμβράνης επηρεάζει το φορτίο, την υδροφοβικότητα και τη συγγένεια αυτής με τους υποδοχείς του κυττάρου του μύκητα. Κατόπιν τούτου, η μη ειδική προσκόλληση αναστέλλεται, ενώ ακόμη και η ειδική δυσχεραίνεται, αφού πολλά επιφανειακά μόρια μπορεί να χάνονται ή να μην είναι προσβάσιμα στους υποδοχείς.²⁷

Με την προσκόλληση και τη βλάστηση δημιουργείται μια νέα σειρά αναγκών για το μύκητα, όπως χώρος για την ανάπτυξή του και πηγές θρεπτικών συστατικών για το μεταβολισμό του. Η σημασία των εξωκυττάριας πρωτεασών σε αυτό το σημείο είναι προφανής και συζητήθηκε προηγουμένως.^{42,54-57} Αξίζει να προστεθεί ότι, σε

πειράματα σε ιστούς με αντιορούς εναντίον της πρωτεΐνης per, βρέθηκε ότι αυτή εντοπιζόταν στις παρυφές του μυκηλιακού σχηματισμού (σφαίρα ή τάπητας), γεγονός που αποδεικνύει τη μεγάλη της σημασία για τη χωροταξική πρόοδο της λοίμωξης και την περαιτέρω διείσδυση στους ιστούς του ξενιστή.^{40,54,58} Είναι πολύ πιθανό ο μύκητας να διαμορφώνει το pH στις παρυφές της αποικίας σε αρκούντως όξινη τιμές, ώστε να δρα ανεμπόδιστα η per⁵⁸ ή, εναλλακτικά, να τη διατηρεί για τις περιπτώσεις που το pH γίνεται όξινο,⁵⁷ ενώ σε διαφορετικές περιοχές του pH χρησιμοποιούνται οι άλλες πρωτεάσες (MER, Alp), που έχουν διαφορετικό βέλτιστο pH δράσης.^{54,59,60} Φυσικά, τίποτε δεν αποκλείει συνύπαρξη, εναλλακτικά, και των δύο δυνατοτήτων. Δηλαδή, να υπάρχει πρωτεάση για κάθε φάσμα pH, αλλά να υπάρχει και η δυνατότητα τροποποίησης αυτού, σε περίπτωση που η αντίστοιχη με το τρέχον pH πρωτεάση για κάποιο λόγο (π.χ. διακοπή γονιδίου) δεν μπορεί να παραχθεί. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει τη διατήρηση της λοιμογόνου ισχύος από στελέχη στα οποία έχει αφαιρεθεί με κάποιο τρόπο (γενικώς, με διακοπή γονιδίου) η δυνατότητα παραγωγής κάποιας από τις πρωτεάσες.⁶¹

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Οι ασπεργίλλοι, αν και είναι ευκαιριακοί παθογόνοι μικροοργανισμοί, διαθέτουν μια πλήρη σειρά χαρακτηριστικών, που τους μετατρέπουν σε επιτυχή παράσιτα. Τα χαρακτηριστικά αυτά εκτείνονται σε μια μεγάλη ποικιλία ιδιοτήτων, που καλύπτουν όλες τις προϋποθέσεις για μια επιτυχημένη παρασιτική διαβίωση. Καθώς η σαπροφυτία είναι ο κανονικός τους τρόπος ζωής, μπορούν κάλλιστα, χωρίς αρνητικές επιπτώσεις για τους ίδιους (το αντίθετο), να προκαλούν το θάνατο του ξενιστή. Συγκεκριμένα, η διεισδυτική ασπεργίλλωση προκαλεί το θάνατο του ξενι-

στή εντός δύο εβδομάδων από την έναρξη των κλινικών σημείων και συμπτωμάτων, εάν δεν χορηγηθεί έγκαιρα θεραπεία. Από την άλλη μεριά, οι ιδιότητές τους, που τους δίνουν αυτές τις δυνατότητες, γενικώς δεν επαρκούν εναντίον ενός πλήρους και ακμαίου ανοσιακού συστήματος, αλλά είναι παραπάνω από επαρκείς σε περίπτωση δυσλειτουργίας και ελλείμματος αυτού. Συνεπώς, χωρίς οι ανοσοεπαρκείς (άνθρωποι και ζώα) να είναι ασφαλείς, οι ανοσοανεπαρκείς αποτελούν σαφώς την ομάδα υψηλού κινδύνου για επικίνδυνες λοιμώξεις από μέλη του γένους αυτού, ειδικά δε από τον πανταχού παρόντα και εξαιρετικά προσαρμοστικό και προσαρμοσμένο *A. fumigatus*. Ο έλεγχος ποιότητας του αέρα θαλάμων νοσηλείας ασθενών που διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο λοιμώξεων, με την εγκατάσταση και συνεπή μηχανολογική συντήρηση φίλτρων HEPA⁶² και με τις συχνές και μικρής διάρκειας δειγματοληψίες του αέρα, σε συνδυασμό με την εργαστηριακή επιτήρηση των ασθενών, μπορεί να συμβάλει στον περιορισμό των θανατηφόρων περιστατικών ασπεργίλλωσεων στο χώρο του νοσοκομείου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστούμε τον καθηγητή Μικροβιολογίας Ν.Ι. Λεγάκη για τα εποικοδομητικά του σχόλια, αλλά κυρίως επειδή, μέσω ερωτήσεων και συζητήσεων, ενεθάρρυνε την άποψη ότι οι αντιλήψεις επί των πολύπτυχων μηχανισμών πρόκλησης μυκητιακών λοιμώξεων δεν είναι ανεπίδεκτες αμφισβήτησης. Αντίθετα, πρέπει να εμπλουτίζονται, να διευρύνονται και να διηθούνται, έως ότου βρεθεί το ακριβές σημείο, από το οποίο θα παρατηρούνται και θα κρίνονται, ώστε οι μέθοδοι πρόληψης, διάγνωσης και θεραπείας των εν λόγω λοιμώξεων να γίνουν αποτελεσματικότερες.

ABSTRACT

Aspergillus fumigatus, A. flavus and A. niger:

Aerodynamic, immunological and metabolic virulence determinants

M.E. KAMBOURIS, A. VELEGRAKI

Mycology Reference Laboratory, Department of Microbiology, Medical School,

National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2001, 18(1):20-34

A pernicious group of pathogens, which especially affect immunocompromised individuals are found in the Genus *Aspergillus*. A series of properties make them extremely successful and dangerous organisms, combined with their worldwide spread. These factors are found primarily in the "peripatetic" form of the fungus, that is in its conidia, which have acquired, through evolution, all the necessary skills and qualities to survive journeys of extra

long distances in harsh environment as saprophytes. Metabolic and aerodynamic properties allow the fungus to approach, enter and adhere to the host tissue, to survive, under certain conditions, in a very harsh microenvironment (as is the living human body) and finally to germinate, grow and multiply, producing lifethreatening infections. Another set of properties, which may well have been acquired and passed on through evolutionary pathways, seems to be oriented towards nullifying the immunologic procedures of the human organism. These processes, with differential timing and diverse degrees of success, mainly concentrate around cellular immunity and use, to a varying extent, the various kinds of phagocytes, exploiting an array of predisposing host factors. This by no means implies an absence of alternative virulence determinants and procedures at cellular, sub-cellular and cell-free levels, such as complement, natural killer cells, free radicals, a variety of mutagenic or co-carcinogenic primary and secondary metabolites.

Key words: *Aspergillus*, Conidial aerodynamics, Immune response suppression, Virulence determinants

Βιβλιογραφία

1. BYZANTIOS ΣΔ. *Λεξικόν της Ελληνικής Γλώσσας*. Α. Κωνσταντινίδης, Αθήνα, 1907
2. ΣΤΑΜΑΤΑΚΟΣ ΙΔ. *Λεξικόν Αρχαίας Ελληνικής Γλώσσας*. Αθήναιον, Αθήνα, 1949
3. FLOYER J. *Violent asthma after visiting a wine cellar. A treatise on asthma*. 3rd ed. London, 1726
4. HIRST JM. An automatic volumetric spore trap. *Ann Appl Biol* 1952, 39:257–265
5. GREGORY PH, HIRST JM. The summer air-spora at Rothamsted in 1952. *J Gen Microbiol* 1957, 17:135–152
6. GREGORY PH. *The Microbiology of the atmosphere*. 2nd ed. New York, John Wiley and Sons, 1973
7. MEYER RD, YOUNG LS, ARMSTRONG D, YU B. Aspergillosis complicating neoplastic disease. *Am J Med* 1973, 54:6–15
8. MAHONEY DH, STEUBER CP, STARLING KA, BARRETT FF, GOLDBERG J, FERNBACH DJ. An outbreak of aspergillosis in children with acute leukemia. *J Pediatr* 1979, 95:70–72
9. SHERERTZ RJ, BELANI A, KRAMER BS, WEINER RS, SULLIVAN ML, THOMAS DG ET AL. Impact of air filtration on nosocomial *Aspergillus* infections. *Am J Med* 1987, 88:709–718
10. Statistical Analysis System, users guide: statistics. Cory, North Carolina, SAS Institute, 1982
11. GOODLEY JM, CLAYTON YM, HAY RJ. Environmental sampling for aspergilli during building construction on a hospital site. *J Hosp Infect* 1994, 26:27–35
12. ANDERSON K, MORRIS G, KENNEDY H, CROALL J, MICHIE J, RICHARDSON MD ET AL. Aspergillosis in immunocompromised paediatric patients: associations with building hygiene design and indoor air. *Thorax* 1996, 51:256–261
13. MAHIEU LM, DE DOOY JJ, VAN LAER H, IEVEN MM. A prospective study on factors influencing *Aspergillus* spore load in the air during renovation works in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2000, 45:191–197
14. BIRCH M, ANDERSON MJ, DENNING DW. Molecular typing of *Aspergillus* species. *J Hosp Infect* 1995, 30(Suppl):339–351
15. COLE GT, SAMSON RA. In: Al-Doory Y, Domson JF (eds) *Mould Allergy*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1984:66–103
16. RATH PM, ANSORG R. Value of environmental sampling and molecular typing of aspergilli to assess nosocomial sources of aspergillosis. *J Hosp Infect* 1997, 37:47–53
17. HARRINGTON JB, GILL GC, WARR BR. High efficiency pollen samples for use in clinical allergy. *J Allergy* 1959, 30:357–368
18. ΜΠΕΡΓΕΛΕΣ ΓΧ. *Η Αεροδυναμική του Αεροσκάφους*. Αθήνα, 1984
19. HEARN VM. 3. Structure and function of the cell wall. In: Jacobs PH, Nail J (eds) *Fungal Disease. Biology, Immunology and Diagnosis*. Marcel Dekker Inc, New York, 1997:27–46
20. HOSTETTER MK. Adherence molecules in pathogenic fungi. *Curr Opin Infect Dis* 1996, 9:141–145
21. SWANINK CMA, MEIS JFGM, RIJS AJMM, DONNELLY JP, VERWEIJ PE. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus* galaktomannan. *J Clin Microbiol* 1997, 35:257–260
22. ΛΕΜΠΕΣΗ Ε, ΒΕΛΕΓΡΑΚΗ Α, ΣΤΑΜΟΣ Γ, ΜΠΑΚΑ Μ, ΣΑΜΑΡΑ Α, ΚΟΣΜΙΔΟΥ Ε ΚΑΙ ΣΥΝ. Νοσοκομειακή ασπεργίλλωση σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς κατά τη διάρκεια οικοδομικών εργασιών. 18ο Εθνικό Συνέδριο Μικροβιολογίας-Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Πρακτικά, 1998:77
23. 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 Immun Med Microbiol* 1999, 25:255–264
24. VELEGRAKI A, KAMBOURIS ME, KOSTOUROU A, CHALEVELAKIS G, LEGAKIS NJ. Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification. *Med Mycol* 1999, 37:69–75
25. VELEGRAKI A, IATROUDELLI I, GRAFAKOS S, KITRA V, LEGAKIS NJ. Preliminary evaluation of PCR and PLATELIA *Aspergillus*® in discriminating the type of aspergillosis in bone marrow transplant patients. Book of Abstracts, 14th ISHAM, Buenos Aires, Argentina, 2000:206
26. DUONG M, OUELLET N, SIMARD M, BERGERON Y, OLIVIER M, BERGERON MG. Kinetic study of host defence and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid-induced immunosuppressed mice. *J Infect Dis* 1998, 178:1472–1482
27. GOTTER G, VERHAEGEN S, CLYNES M, KANAVAGH K. Membrane changes associated with the early stages of apoptosis in HEp-2 cells decrease susceptibility to adherence by *Candida albicans*. *J Med Veterin Mycol* 1997, 35:219–224
28. TRONCHIN G, BOUCHARA JP, FERRON M, LARCHER G, CHABASSE D. Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* conidia: correlation

- between adherence, agglutination and rearrangements of the cell wall. *Can J Microbiol* 1995, 41:14–21
29. TRONCHIN G, ESNAULT K, RENIER G, FILMON R, CHABASSE D, BOUCHARA JP. Expression and identification of a laminin-binding protein in *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun* 1997, 1:9–15
 30. CASSONE A. Cell-mediated immunity mechanisms in fungal infections. In: Jacobs PH, Nail J (eds) *Fungal Disease. Biology, Immunology and Diagnosis*. Marcel Dekker Inc, New York, 1997: 113–136
 31. ROGERS SO, BENDICH AJ. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol* 1985, 5:69–76
 32. CONRAD LILES W, HUANG JE, VAN BURIK JAH, BOWDEN RA, DALE DC. Granulocyte colony-stimulating factor administered *in vivo* augments neutrophil-mediated activity against opportunistic fungal pathogens. *J Infect Dis* 1997, 175:1012–1015
 33. GRAZZIUTI M, REX JH, COWART RE, ANAISSIE EJ, FORD A, SAVARY CA. *Aspergillus fumigatus* conidia induce a Th-1 type cytokine response. *J Infect Dis* 1997, 176:1579–1583
 34. NEMUNAITIS J. Use of colony-stimulating factor in the treatment of fungal infections. *Clin Infect Dis* 1998, 26:1279–1281
 35. REX JH, BENNETT JE, GALLING JI, MALECH HL, MELNICK DA. Normal and deficient neutrophils can cooperate to damage *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J Infect Dis* 1990, 162:523–528
 36. ROILIDES E, BLAKE C, HOLMES A, PIZZO PA, WALSH TJ. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon- γ prevent dexamethasone-induced immunosuppression of antifungal monocyte activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J Med Veterin Mycol* 1996, 34:63–69
 37. ROILIDES E, DIMITRIADOU-GEORGIADOU A, SEIN T, KADILTSOGLOU I, WALSH T. Tumor necrosis factor alpha enhances antifungal activities of polymorphonuclear and mononuclear phagocytes against *A. fumigatus*. *Infect Immun* 1998, 66:5999–6003
 38. TARAMELLI D, MALABARBA MG, SALA G, BASILICO N, COCUZZA G. Production of cytokines by alveolar and peritoneal macrophages stimulated by *Aspergillus fumigatus* conidia or hyphae. *J Med Veterin Mycol* 1996, 34:49–56
 39. MARTINS MD, RODRIGUEZ IJ, SAVARY CA, GRAZZIUTTI ML, DESPHANDE D, COHEN DM ET AL. Activated lymphocytes reduce adherence of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 1998, 38:281–289
 40. CENCI E, PERITO S, ENSSLE KH, MOSCI P, LATGE JP, ROMANI L ET AL. Th-1 and Th-2 cytokines in mice with invasive aspergillosis. *Infect Immun* 1997, 65:564–570
 41. REICHARD U. The role of secretory and structure-associated proteinases of *Aspergillus fumigatus* in the pathogenesis of invasive aspergillosis. *Mycoses* 1998, 41(Suppl 1):78–82
 42. BENNETT JE. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds) *Principles and Practice of Infectious Diseases. Opportunistic Infections*. Churchill Livingstone, New York, 1995:2306–2311
 43. TAKAHASHI H, WATANABE S, CHIKAKANE K, KASHIMA M. Biochemical mechanisms of fungicidal activity with tissue extracts. In: Jacobs PH, Nail J (eds) *Fungal Disease. Biology, Immunology and Diagnosis*. Marcel Dekker Inc, New York, 1997:137–155
 44. BENNETT JE. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds) *Principles and practice of Infectious Diseases. Opportunistic Infections*. Churchill Livingstone, New York, 1995:401–410
 45. WASHBURN RG, GALLIN JL, BENNETT JE. Oxidative killing of *Aspergillus fumigatus* proceeds by parallel myeloperoxidase-dependent and -independent pathways. *Infect Immun* 1987, 55:2088–2092
 46. HEARN VM. Antigenicity of *Aspergillus* species. *J Med Veterin Mycol* 1992, 30:11–25
 47. HUDSON H. In: *Fungal Biology*. Edward Arnold, London, 1986:28
 48. NILIUS AM. Iron acquisition by *Aspergillus fumigatus*. In: Jacobs PH, Nail J (eds) *Fungal Disease. Biology, Immunology and Diagnosis*. Marcel Dekker Inc, New York, 1997, 1:401–411
 49. GOLDEN MC, HAHM SJ, ELESSAR RE, SAKSONOV S, STEINBERG JJ. DNA damage by gliotoxin from *Aspergillus fumigatus*. An occupational and environmental propagule: adduct detection as measured by 32 P-DNA radiolabelling and two-dimensional thinlayer chromatography. *Mycoses* 1998, 41:97–104
 50. HOLDEN DW, TANG CM, SMITH JM. Molecular genetics of *Aspergillus* pathogenicity. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1994, 00:251–255
 51. PAHL HL, KRAUSS B, SCHULZE-OSTHOFF K, DECKER T, BRITT-MAREEN TRAECKNER E, VOGT M ET AL. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF. *Exp Med* 1996, 183:1829–1840
 52. SUTTON P, BEAVER J, WARING P. Evidence that gliotoxin enhances lymphocyte activation and induces apoptosis by effects on cyclic AMP levels. *Biochem Pharmacol* 1995, 50:2009–2014
 53. ΒΕΛΕΓΡΑΚΗ Α. *Μυκοτοξίνες. Μονογραφία*. Αθήνα, 1986
 54. REICHARD U, MONOD M, ODDS F, RUCHEL R. Virulence of an aspergillopepsin-deficient mutant of *Aspergillus fumigatus* and evidence for another aspartic proteinase linked to the fungal cell wall. *J Med Veterin Mycol* 1997, 35:189–196
 55. KOLLATUKUDY PE, LEE JD, ROGERS LM, ZIMMERMAN P, CELELSKI S, FOX B ET AL. Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis. *Infect Immun* 1993, 61:2357–2368
 56. MONOD M, PARIS S, SARFATI J, JATON-OGAY K, AVE P, LATGE JP. Virulence of alkaline protease-deficient mutants of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* 1993, 106:39–46
 57. TANG CM, COHEN J, HOLDEN DW. An *Aspergillus fumigatus* alkaline protease mutant constructed by gene disruption is deficient in extracellular elastase activity. *Mol Microbiol* 1992, 6:1663–1671
 58. REICHARD U, EIFFERT H, RUCHEL R. Purification and characterisation of an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *J Med Veterin Mycol* 1994, 32:427–436
 59. REICHARD U, BETTNER S, EIFFERT H, STAIB F, RUCHEL R. Purification and characterization of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue. *J Med Microbiol* 1990, 33:243–251
 60. STEELE PE, RHODES JC. Proteinase gene identification in aspergillosis. In: Jacobs PH, Nail J (eds) *Fungal Disease. Biology, Immunology and Diagnosis*. Marcel Dekker Inc, New York, 1997:375–382
 61. TANG C, COHEN J, KRAUSZ T, VAN NOORDEN S, HOLDEN DW. The alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* is not a virulence determinant in two murine models of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 1993, 61:1650–1656
 62. MORRIS G, KOKKI MH, ANDERSON K, RICHARDSON MD. Sampling of *Aspergillus* spores in air. *J Hosp Infect* 2000, 44:81–92

Corresponding author:

M.E. Kambouris, Department of Molecular Genetics and Microbiology, UMDNJ-Robert Wood Johnson Medical School. The Cancer Institute of New Jersey, 195 Little Albany Street, New Brunswick, NJ 08901, US