

Η χιτοτριοζιδάση σε νεογνά με συστηματική μυκητίαση και κοινές μικροβιακές λοιμώξεις

Ι. Λαμπαδαρίδης,¹
Ε. Δημητρίου,²
Μ. Θεοδωράκη,¹
Α. Βεηεγράκη,³
Γ. Καφαλήδης,¹
Ε. Μιχεηλάκη²

ΣΚΟΠΟΣ Η μελέτη της χιτοτριοζιδάσης, ενζύμου με χιτινολυτική δράση που παράγεται από ενεργοποιημένα μακροφάγα, σε νεογνά με συστηματική μυκητιασική λοίμωξη και κοινές μικροβιακές λοιμώξεις. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Η δραστηριότητα της χιτοτριοζιδάσης μετρήθηκε σε διαδοχικά δείγματα πλάσματος και ούρων σε 8 νεογνά με μυκητιασική λοίμωξη (7/8 *C. albicans*, 1/8 *Aspergillus niger*). Μετρήθηκαν τουλάχιστον 4 δείγματα ανά νεογνό, με διάστημα 1 εβδομάδας. Μετρήσεις έγιναν επίσης σε 15 νεογνά στη διάγνωση Gram-θετικών και Gram-αρνητικών λοιμώξεων. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Αύξηση της δραστηριότητας της χιτοτριοζιδάσης παρατηρήθηκε στο πλάσμα ή και στα ούρα σε 7/8 νεογνά με μυκητιασική λοίμωξη (1,2-9 και 1,9-150× του ανώτερου φυσιολογικού ορίου, αντίστοιχα). Τα επίπεδα της χιτοτριοζιδάσης μειώθηκαν ή αυξήθηκαν ανάλογα με την έκβαση της νόσου. Αύξηση παρατηρήθηκε επίσης στο πλάσμα και στα ούρα 13/15 νεογνών με μικροβιακές λοιμώξεις (1,9-12,5 και 1,5-40× του ανώτερου φυσιολογικού ορίου, αντίστοιχα). **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η αύξηση της χιτοτριοζιδάσης παρατηρείται όχι μόνο σε μυκητιασικές αλλήλ και σε κοινές μικροβιακές λοιμώξεις. Ως εκ τούτου, δεν μπορεί να αποτελέσει ειδικό δείκτη ύπαρξης μυκητιασικής λοίμωξης. Διαδοχικές μετρήσεις, ιδιαίτερα στα ούρα, μπορεί να αποτελέσουν κριτήριο ανταπόκρισης στην εφαρμοζόμενη θεραπεία.

¹*MEN Νεογνών, Γενικό Κρατικό Νοσοκομείο Νίκαιας, Πειραιάς*
²*Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού, Νοσοκομείο Παιδών «Αγία Σοφία», Αθήνα*
³*Κέντρο Αναφοράς Μυκητιάσεων, Ιατρική Σχολή, Αθήνα*

Chitotriosidase in neonates with systemic fungal and common microbial infections

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Βακτηριακές λοιμώξεις
Μυκητιασικές λοιμώξεις
Νεογνά
Χιτοτριοζιδάση

Υποβλήθηκε 7.3.2005
Εγκρίθηκε 13.6.2005

Η ανθρώπινη χιτοτριοζιδάση είναι ένα σχετικά πρόσφατα αναγνωρισμένο ένζυμο, το πρώτο ένζυμο με χιτινολυτική δράση που περιγράφηκε στον άνθρωπο, το οποίο παράγεται από ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα.^{1,2}

Η ενζυμική πρωτεΐνη ανιχνεύεται σε δύο μορφές. Η μία απαντάται ενδοκυτταρικά και έχει χιτινολυτική δράση, ενώ η άλλη απαντάται εξωκυτταρικά και επιπλέον της χιτινολυτικής δράσης έχει και την ικανότητα πρόσδεσης της χιτίνης.²

Το γονίδιο της ενζυμικής πρωτεΐνης βρίσκεται στη θέση 1q31-q32, αποτελείται από 12 εξώνια, τα οποία καλύπτουν 20 kb, και είναι ομόλογο με τα γονίδια άλλων χιτινασών που απαντώνται στη φύση. Υπολογίζεται ότι περίπου 6% του γενικού πληθυσμού είναι ομόζυγο για ένα διπλασιασμό 24 bp στο εξώνιο 10, που αναστέλλει τη σύνθεση λειτουργικού ενζύμου.³ Η βιολογική δράση της ανθρώπινης χιτοτριοζιδάσης δεν έχει πλή-

ρως διευκρινιστεί, αλλά πολλές παρατηρήσεις κάνουν ιδιαίτερα πιθανή τη συμμετοχή του ενζύμου στην άμυνα έναντι παθογόνων που περιέχουν χιτίνη, όπως είναι οι μύκητες.⁴⁻⁷

Τα τελευταία χρόνια, οι μυκητιασικές λοιμώξεις έχουν αναδειχθεί σ' έναν πολύ σημαντικό παράγοντα θνητότητας και νοσηρότητας στις μονάδες εντατικής θεραπείας νεογνών. Υπολογίζεται ότι 2-5% των πρόωρων νεογνών πολύ χαμηλού βάρους γέννησης θα αναπτύξουν συστηματική μυκητιασική λοίμωξη, που στην πλειοψηφία της θα οφείλεται σε *Candida albicans*.⁸ Η ανωριμότητα του ανοσιακού συστήματος των ιδιαίτερα μικρού βάρους γέννησης νεογνών, η μακροχρόνια χορήγηση ισχυρών αντιβιοτικών ευρέος φάσματος, η παρεντερική διατροφή, αλλά και οι χειρισμοί που γίνονται στη διάρκεια της νοσηλείας σε μια μονάδα εντατικής νοσηλείας, είναι μερικοί από τους παράγοντες που προδιαθέτουν για την εμφάνιση αυτών των λοιμώξεων. Η έγκαιρη διάγνωση

όμως των μυκητιασικών λοιμώξεων καθώς και η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της εφαρμοζόμενης θεραπείας είναι εξαιρετικής σημασίας για την επιβίωση των μικρών αυτών ασθενών.⁹

Σε αρχική μελέτη μας, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της χιτοτριοζιδάσης σε νεογνό με συστηματική λοίμωξη από *Candida albicans*. Επιπλέον, σε διαδοχικές μετρήσεις και παράλληλα με τη βελτίωση της κατάστασης του ασθενούς, παρατηρήθηκε μείωση της χιτοτριοζιδάσης.¹⁰

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μελέτης της συμπεριφοράς της χιτοτριοζιδάσης σε νεογνά με συστηματική μυκητιασική λοίμωξη, καθώς και σε νεογνά με Gram-αρνητικές και Gram-θετικές μικροβιακές λοιμώξεις.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Μελετήθηκαν συνολικά 23 νεογνά, 8 με μυκητιασική λοίμωξη (ομάδα Α) και 15 με διάφορες μικροβιακές λοιμώξεις (ομάδα Β).

Στην ομάδα Α, 7 νεογνά (I, II, IV-VIII) είχαν θετικές αιμοκαλλιέργειες για *Candida albicans*. Στα νεογνά II και IV, η διάγνωση έγινε post mortem και ο μύκητας αναπτύχθηκε επίσης στο περιτοναϊκό υγρό, στον τραχειοσωλήνα και στον ομφαλικό καθετήρα. Στο νεογνό III, που είχε θετική καλλιέργεια αίματος, χωρίς όμως ταυτοποίηση του μύκητα, βρέθηκε με μεθόδους ανίχνευσης γενετικού υλικού (PCR) *Aspergillus niger*¹¹ και μετρήθηκε επίσης υψηλός τίτλος αντιγόνων (Platelia *Aspergillus*, Marnes La Coquette, France). Αντιμυκητιασική αγωγή (Amphotericin B Liposome + Flucytosine) χορηγήθηκε σε 5 νεογνά αμέσως μετά από τη διάγνωση. Τέσσερα είχαν θετική έκβαση (V-VIII), ενώ ένα (I) κατέληξε. Η χορήγηση θεραπείας στα νεογνά II, III και IV δεν ήταν εφικτή, δεδομένου ότι η

διάγνωση έγινε λίγο πριν ή αμέσως μετά από το θάνατό τους (πίν. 1).

Τα χαρακτηριστικά των νεογνών της ομάδας Β φαίνονται στον πίνακα 2.

Η δραστηριότητα της χιτοτριοζιδάσης μετρήθηκε με το φθορίζον υπόστρωμα μεθλουμπελλιφερυλ-β-D-N, N', N'-τριάκετυλοχιτοτριοζίνη σε δείγματα αίματος και ούρων.¹² Στην ομάδα Α μελετήθηκαν τουλάχιστον 4 δείγματα ανά νεογνό, που ελήφθησαν ανά εβδομάδα.

Στην ομάδα των νεογνών με μικροβιακές λοιμώξεις, δείγματα ελήφθησαν μόνο στη διάγνωση.

Μετρήσεις έγιναν επίσης σε 10 νεογνά που δεν παρουσίαζαν λοίμωξη και τα οποία αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή ηθικής και δεοντολογίας του Ινστιτούτου Υγείας του Παιδιού.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αύξηση των επιπέδων της χιτοτριοζιδάσης παρατηρήθηκε στο αίμα (1,2-9× του ανώτερου φυσιολογικού ορίου) ή και στα ούρα (1,5-150× του ανώτερου φυσιολογικού ορίου) σε 7 νεογνά της ομάδας Α, στη διάγνωση της μυκητιασικής λοίμωξης. Ένα νεογνό (VIII) είχε μηδενική δραστηριότητα σε όλες τις χρονικές στιγμές που μελετήθηκαν (πίν. 1).

Συγκεκριμένα, αύξηση στο πλάσμα παρατηρήθηκε σε 4 νεογνά, η οποία μάλιστα σε δύο περιπτώσεις προηγείτο της διάγνωσης της μυκητιασικής λοίμωξης. Σε 3 νεογνά, τα επίπεδα της χιτοτριοζιδάσης στο πλάσμα ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων.

Οι αυξήσεις ήταν υψηλότερες στα ούρα. Όλα τα νεογνά, εκτός από ένα, είχαν αυξημένα επίπεδα στη διά-

Πίνακας 1. Συνοπτική παρουσίαση νεογνών με συστηματική μυκητιασική λοίμωξη και δραστηριότητα της χιτοτριοζιδάσης στη διάγνωση της λοίμωξης (ομάδα Α).

Καλλιέργεια αίματος	Βάρος γέννησης (g)	Ηλικία κύησης (εβδομάδα)	Χιτοτριοζιδάση	
			Πλάσμα (nmoles/mL/ώρα)	Ούρα (nmoles/mg κρεατινίνης/ώρα)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=4)	1200-3200	26, 27, 28, 40	21, 22, 45, 600	22, 68, 196, 212
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=5)	800-1460	25, 26, 27, 28	30, 42, 43, 90	207, 570, 850, 1342, 1859
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=4)	960-1170	27, 28, 32	17, 20, 222	75, 211, 211, 2825
<i>Serratia marcescens</i> (n=1)	1460	30	15	108
<i>Citrobacter</i> (n=1)	960	28	27	192
Ομάδα ελέγχου (n=10)	-	-	0-48	0-70

Πίνακας 2. Συνοπτική παρουσίαση νεογνών με Gram(+) και Gram(-) λοίμωξη (ομάδα Β).

Νεογνά	Βάρος γέννησης (g)	Ηλικία κύησης (εβδομάδα)	Είδος μύκητα	Βασικά κλινικά προβλήματα	Χιτοτριοζιδάση	
					Πλάσμα (nmoles/mL/ώρα)	Ούρα (nmoles/mg κρεατινίνης/ώρα)
I	950	27	<i>C. albicans</i>	ΣΑΔ, άπνοια, ΜΑΥ, βοτάλειος, σπυραιμία	59	312
II	720	25	<i>C. albicans</i>	ΣΑΔ, ΜΑΥ, ΕΑ, ΒΠΔ, βοτάλειος, ΝΕΚ, ΔΕΠ, ασκίτης	432	10060
III	830	25	<i>Aspergillus niger</i>	Ασφυξία, ΣΑΔ, ΜΑΥ, πνευμοθώρακας, ΑΦΜ, σππτικό shock	32	210
IV	900	28	<i>C. albicans</i>	ΣΑΔ, βοτάλειος, ΜΑΥ, σππτικό shock	150	3250
V	1000	29	<i>C. albicans</i>	ΣΑΔ, βοτάλειος, ΜΑΥ	46	661
VI	3620	TM	<i>C. albicans</i>	Αδυναμία λήψης τροφής, λήθαργος, σπασμοί, μπνιγγίτιδα	40	83
VII	3870	TM	<i>C. albicans</i>	Νεφρική ανεπάρκεια, οστεομελίτιδα	95	560
VIII	1750	TM	<i>C. albicans</i>	Υπογλυκαιμία, πυρετός, απόστημα	0	0
Ομάδα ελέγχου (n=10)	-	-	-	-	0-48	0-70

TM=Τελειόμηνο, ΣΑΔ=Σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας, ΒΠΔ=Βρογχοπνευμονική δυσπλασία, ΝΕΚ=Νεκρωτική εντεροκολίτιδα, ΑΦΜ=Αφαιμαζομετάγγιση, ΜΑΥ=Μηχανική αναπνευστική υποστήριξη, ΔΕΠ=Διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, ΕΑ=Εγχεφαλική αιμορραγία

γνωση. Σε 4 νεογνά, αύξηση παρατηρήθηκε ήδη πριν από τη διάγνωση της μυκητιασικής λοίμωξης. Σταδιακή μείωση των επιπέδων της χιτοτριοζιδάσης παρατηρήθηκε στα ούρα των νεογνών που εμφάνισαν κλινική βελτίωση και αποκατάσταση των εργαστηριακών ευρημάτων, με τη χορήγηση της αντιμυκητιασικής αγωγής. Αντίθετα, τα επίπεδα της χιτοτριοζιδάσης στα ούρα των νεογνών που κατέληξαν σε σππτικό shock, παρουσίασαν συνεχή αύξηση (εικ. 1).

Αύξηση των επιπέδων της χιτοτριοζιδάσης παρατηρήθηκε επίσης στην πλειοψηφία των νεογνών με μικροβιακές λοιμώξεις, που ήταν υψηλότερη στα ούρα (πίν. 2).

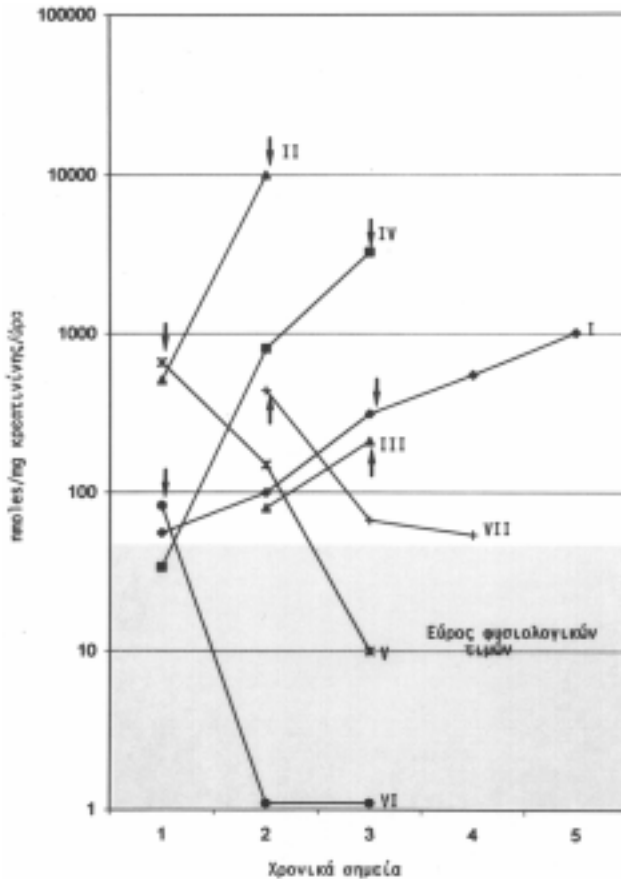
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι χιπνάσες είναι ευρέως διαδεδομένα ένζυμα, τα οποία καταλύουν την υδρόλυση της χιτίνης. Οι βιολογικές δράσεις που έχουν αποδοθεί στις χιπνάσες αφορούν στη μορφογένεση, τη θρέψη των οργανισμών που τις παράγουν, την αλληλεπίδραση οικιστού-παρασίτων, την παθογένεση της λοίμωξης, αλλά και την άμυνα έναντι μικροοργανισμών που περιέχουν χιτίνη, όπως οι

μύκητες.¹³ Παρόλο που ο βιολογικός ρόλος της ανθρώπινης χιτοτριοζιδάσης διερευνάται, πολλά δεδομένα ενισχύουν την άποψη ότι συμμετέχει στην άμυνα έναντι παθογόνων, όπως οι μύκητες, οι οποίοι περιέχουν χιτίνη.

Κύρια πηγή του ενζύμου είναι τα μακροφάγα, τα οποία αποτελούν έναν από τους πρώτους και κυριότερους μηχανισμούς άμυνας έναντι των μυκήτων.^{2,14} Το ένζυμο καταλύει *in vitro* την υδρόλυση κολλοειδούς χιτίνης, αλλά και της χιτίνης του κυτταρικού τοιχώματος της *Candida albicans*.^{4,5} Επιπλέον, η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση του ενζύμου σε ποντίκια με συστηματική μυκητιασική λοίμωξη από *Candida albicans* ή *Aspergillus* είχε ως αποτέλεσμα τη θεαματική ανάρρωσή τους.⁶ Αύξηση της χιτοτριοζιδάσης έχει παρατηρηθεί σε ιστούς και στο πλάσμα ινδικών χοιριδίων με πειραματική μόλυνση από *Aspergillus fumigatus*.⁷ Αύξηση των επιπέδων στα ούρα και στο πλάσμα παρατηρήθηκε επίσης σε νεογνό με αποδεδειγμένη λοίμωξη από *Candida albicans*.¹⁰

Η παρούσα μελέτη, που αφορούσε σε ένα μεγαλύτερο αριθμό νεογνών με μυκητιασική λοίμωξη, σε συμφωνία με τις προηγούμενες αναφορές, έδειξε αύξηση της χιτοτριοζιδάσης στο πλάσμα ή και τα ούρα των νεογνών



Εικόνα 1. Μεταβολή της δραστηριότητας της χιτοτριозиδάσης στα ούρα νεογνών με μυκητιασική λοίμωξη. Τα βέλη αντιστοιχούν στο χρόνο διάγνωσης.

που μελετήθηκαν. Επιπλέον, όμως, έδειξε ότι η αύξηση αυτή δεν ήταν ειδική για τις μυκητιασικές λοιμώξεις, δεδομένου ότι παρατηρήθηκε και σε νεογνά με Gram-θετικές και Gram-αρνητικές μικροβιακές λοιμώξεις. Είναι

πιθανόν, λοιπόν, ότι η συμπεριφορά της χιτοτριозиδάσης είναι το αποτέλεσμα της γενικότερης ενεργοποίησης των μακροφάγων, ανεξαρτήτως παθογόνου μικροοργανισμού. Επιπλέον, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η αύξηση της χιτοτριозиδάσης δεν φαίνεται να είναι ικανή για την αντιμετώπιση των μυκητιασικών λοιμώξεων, δεδομένου ότι οι μεγαλύτερες αυξήσεις παρατηρήθηκαν σε νεογνά που κατέληξαν. Βεβαίως, αυτό δεν σημαίνει και ότι η χιτοτριозиδάση δεν συμμετέχει στην άμυνα έναντι των μυκήτων, η ευνοϊκή έκβαση της οποίας προϋποθέτει την επιτυχή συνεργασία πολλών διαφορετικών παραγόντων.¹⁵

Οι μυκητιασικές λοιμώξεις αποτελούν ένα σημαντικό και συνεχώς αυξανόμενο πρόβλημα στις μονάδες εντατικής νοσηλείας νεογνών. Η διάγνωσή τους είναι συχνά δύσκολη, ενώ το ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων υπολογίζεται στο 20-50% των περιπτώσεων. Η έγκαιρη διάγνωσή τους είναι καθοριστικής σημασίας για την επιβίωση των ασθενών, αλλά δυστυχώς συχνά επιτυγχάνεται μετά θάνατο.¹⁶⁻¹⁸

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι, παρόλο που η αύξηση της δραστηριότητας της χιτοτριозиδάσης παρατηρήθηκε ακόμα και πριν από την τεκμηρίωση της μυκητιασικής λοίμωξης, η μέτρηση της χιτοτριозиδάσης δεν μπορεί να αποτελέσει ειδικό πρώιμο δείκτη, καθότι μπορεί να οφείλεται και σε κοινή μικροβιακή λοίμωξη. Πάντως, τα υψηλά της επίπεδα πρέπει να προβληματίσουν τον κλινικό γιατρό για την ύπαρξη ενεργού μυκητιασικής λοίμωξης, ιδιαίτερα όταν δεν ταυτοποιείται η ύπαρξη μικροβιακής λοίμωξης. Επιπλέον, οι διαδοχικές μετρήσεις της δραστηριότητας του ενζύμου, ιδιαίτερα στα ούρα, μπορεί να αποτελέσουν κριτήριο ανταπόκρισης στην εφαρμοζόμενη θεραπεία.

ABSTRACT

Chitotriosidase in neonates with systemic fungal and common microbial infections

I. LABADARIDIS,¹ E. DIMITRIOU,² M. THEODORAKIS,¹ A. VELEGRAKIS,³ G. KAFALIDIS,¹ H. MICHELAKAKIS²

¹Neonatal Intensive Care Unit, General Hospital Nikea, Piraeus, ²Institute of Child Health, "Aghia Sophia" Children's Hospital, Athens, ³Mycology Reference Laboratory, University of Athens, Medical School, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2006, 23(2):173-177

OBJECTIVE To investigate the behavior of chitotriosidase, a human chitinolytic enzyme produced mainly by activated macrophages, in neonates with fungal and common microbial infections. **METHOD** Chitotriosidase activity was assayed in serial plasma and urine samples from 8 neonates with fungal infections (7/8 *Candida albicans*, 1/8 *Aspergillus niger*). At least 4 samples were investigated per neonate at one week intervals. Chitotriosidase activity was also determined in plasma and urine samples from 15 neonates on diagnosis of

Gram-positive and Gram-negative infections. **RESULTS** Increased chitotriosidase activity was found in plasma and/or urine in 7/8 neonates with fungal infections, ranging from 1.25–9 and 1.9–150 times the upper normal limits in plasma and urine respectively. Improvement of the clinical condition was associated with decline in chitotriosidase activity and vice versa. Increased activity, 1.9–12.5 and 1.5–40 times the upper normal limits in plasma and urine respectively, was also found in 13/15 neonates with bacterial infections. **CONCLUSIONS** Increased activity of chitotriosidase is observed not only in fungal but also in microbial infections. As a result chitotriosidase activity cannot be used as a specific marker for fungal infections. However serial assays of the enzyme could be of value in monitoring the outcome of treatment of neonates with fungal infection.

Key words: Bacterial infections, Chitotriosidase, Fungal infections, Neonates

Βιβλιογραφία

1. ESCOTT GM, ADAMS DJ. Chitinase activity in human serum and leucocytes. *Infect Immun* 1995, 63:4770–4773
2. RENKEMA GH, BOOT RG, STRIJLAND A, DONKER-KOOPMAN WE, VAN DEN BERG M, MUIJSERS AO ET AL. Synthesis, sorting and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *Eur J Biochem* 1997, 244:279–285
3. BOOT RG, RENKEMA GH, VERHOEK M, STRIJLAND A, BLIEK J, DE MEULEMEESTER THAMOS ET AL. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem* 1998, 273:25680–25683
4. TJOELKER LW, GOSTING L, FREY S, HUNTER CL, LE TRONG H, STEINER B ET AL. Structural and functional definition of the human chitinase. Chitin-binding domain. *J Biol Chem* 2000, 275:514–520
5. FUSETTI F, VON MOELLER H, HOUSTON D, ROZEBOOM HJ, DIJKSTRA BW, BOOT RG ET AL. Structure of human chitotriosidase implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J Biol Chem* 2002, 277:25537–25544
6. BLOMMAART E, VAN WEELY S, BOOT R, AERTS H, FRIEDMAN BA. Chitotriosidase: A natural antifungal agent? [Abstract 7] presented at the 3rd Workshop of the European Working Group on Gaucher Disease, Lemnos, Greece, 1999:20–23
7. OVERDIJK B, VAN STEIJN GJ, ODDS FC. Distribution of chitinase in guinea pig tissues and increase in levels of this enzyme after systemic infection with *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 1999, 14:259–269
8. BENDEL CM, HOSTETTER MK. Systemic candidiasis and other fungal infections in the newborn. *Semin Pediatr Infect Dis* 1994, 5:35–41
9. MCGUIRE W, CHERIHEW L, FOWLIE PW. Infection in the preterm infant. *Br Med J* 2004, 329:1277–1280
10. LABADARIDIS J, DIMITRIOU E, COSTALOS E, AERTS J, VAN WEELY S, DONKER-KOOPMAN WE ET AL. Serial chitotriosidase activity estimations in neonatal systemic candidiasis. *Acta Paediatr* 1998, 87:605–606
11. KAMBOURIS ME, REICHARD V, LEGAKIS NJ, VELEGRAKI A. Sequences from the aspergillopepsin PEP gene of *Aspergillus fumigatus*: Evidence on their use in selective PCR identification of *Aspergillus* species in infected clinical samples. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999, 25:255–264
12. HOLLAK CEM, VAN WEELY S, VAN OERTS MHJ, AERTS JMFG. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity: A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* 1994, 93:1288–1292
13. FLACH J, PILET PE, JOLES P. What's new in chitinase research? *Experientia* 1992, 48:701–710
14. VAZQUEZ-TORRES A, BALISH E. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997, 61:170–192
15. MANSOUR MK, LEVITZ SM. Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol* 2002, 5:359–365
16. NG PC. Systemic fungal infections in neonates. *Arch Dis Child* 1994, 71:130–135
17. VERWEIJ PE, POULAIN D, OBAYASHI T, PATTERSON TR, DENNING DW, PONTON J. Current trends in the detection of antigenemia, metabolites and cell wall markers for the diagnosis and therapeutic monitoring of fungal infections. *Med Mycol* 1998, 36:146–155
18. ASOLOGLU S, REX JH, DE PAW B, BENNETT JE, BILLIE J, CROKAERT F ET AL. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and haematopoietic stem cell transplants. An international consensus. *Clin Infect Dis* 2002, 34:7–14

Corresponding author:

H. Michelakakis, Institute of Child Health, "Aghia Sophia" Children's Hospital, GR-115 27 Athens, Greece
e-mail: inchildh@otenet.gr