

Percorso Diagnostico: Micosi profonde e sistemiche

Comitato di Studio per la Micologia - CoSM

Coordinatore: Stefano Andreoni

Segretario: Gianluigi Lombardi

Componenti: Elisabetta Blasi, Marco Conte, Claudio Farina, Paolo Fazii, Esther Manso, Silvana Sanna, Giuliana Lo Cascio

Generalità

(Gianluigi Lombardi e Claudio Farina)

Vengono definite come **profonde** o **sistemiche** le infezioni fungine in cui sono coinvolti uno o più organi interni. Possono essere causate da patogeni obbligati (i miceti dimorfi) oppure da miceti opportunisti (lieviti e miceti filamentosi ialini o dematiacei): nel primo caso possono interessare anche soggetti sani, mentre nel secondo caso colpiscono per lo più pazienti immunocompromessi o comunque che presentano fattori di rischio anche per altre patologie sottostanti. La modalità di infezione è quasi sempre inalatoria: ad una prima infezione polmonare, molte volte asintomatica, può seguire la disseminazione per via ematogena, con diffusione ad altri organi interni. L'esito è spesso infausto, anche a causa delle difficoltà diagnostiche e delle limitate opzioni terapeutiche a disposizione del medico curante, nonostante la recente disponibilità di nuovi farmaci antifungini.

Classificazione

1. Aspergillosi
2. Altre ialoifomicosi
3. Candidosi
4. Criptococchi
5. Altre infezioni da miceti lievitiiformi
6. Zigomicosi
7. Feoifomicosi
8. Pneumocistosi
9. Infezioni da miceti dimorfi

Epidemiologia e cenni di clinica

1. Aspergillosi

L'agente eziologico è rappresentato da miceti del genere *Aspergillus*, tra cui *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus* e *A. nidulans* sono quelli più frequentemente isolati. L'infezione avviene quasi sempre per via inalatoria e le ridotte dimensioni dei conidi (<5 µm) consentono ai miceti di questo raggruppamento di superare le difese delle prime vie respiratorie e di raggiungere gli alveoli polmonari. Lo spettro di patologie che *Aspergillus* spp. è in grado di provocare dipende principalmente dallo stato immunitario del paziente, secondo un gradiente di iper- e iper-reattività immunologica:

Aspergilloma – configura il quadro conseguente alla colonizzazione asintomatica, con l'attivazione dei linfociti Th₁/T_{reg}. L'aspergilloma (in inglese "fungus ball") è una forma particolare di aspergillosi in cui il micete colonizza una cavità polmonare determinata da pregresse patologie (tubercolosi, sarcoidosi, bronchiectasie, pneumoconiosi, spondilite anchilosante) o da neoplasie. Di solito localizzata nei lobi superiori, l'infezione è spesso asintomatica, ma a volte può causare tosse cronica, malessere generalizzato e calo ponderale. Il sintomo più comune, comunque, è rappresentato dall'emottisi (50-80% dei casi) che può essere anche massiva e mettere in pericolo la vita del paziente.

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

Aspergillosi Bronco-Polmonare Allergica (ABPA) – configura il quadro determinato da iperreattività immunologica, con l'attivazione dei linfociti Th₂/Th₁₇. E' caratterizzata da febbre ricorrente, tosse, difficoltà respiratorie, manifestazioni asmatiche, espettorato con “tappi” micotici e da un quadro radiologico con infiltrati polmonari ricorrenti. La malattia può evolvere in bronchiectasie e fibrosi polmonare. E' stata da tempo associata anche alla fibrosi cistica.

Aspergillosi invasiva – configura il quadro determinato da iporeattività immunologica o anergia del sistema immunitario. Colpisce quasi esclusivamente i pazienti immunodepressi, spesso con esito fatale, anche in caso di diagnosi tempestiva e di terapia appropriata. I fattori di rischio per la sua insorgenza sono rappresentati da prolungata neutropenia e da terapia corticosteroidica, soprattutto se associata ad altri trattamenti immunosoppressivi come quelli in uso nei pazienti sottoposti a trapianto d'organo solido o di midollo osseo. La durata della neutropenia è un fattore molto importante: il rischio di insorgenza di aspergillosi sembra essere basso durante le prime due settimane, ma aumenta enormemente dopo la terza settimana. I sintomi comprendono febbre persistente (>38° C) che non risponde alla terapia antibiotica ad ampio spettro. Sono presenti anche dolore pleurico e tosse scarsamente produttiva, mentre l'emottisi non è di solito presente. La forma polmonare acuta, la più comune, è caratterizzata da un alto tasso di mortalità (fino al 95% secondo alcuni studi). Si presenta come broncopolmonite con infiltrati polmonari (singoli o multipli), febbre e assenza di risposta alla terapia antibiotica. Negli stadi iniziali della malattia l'esame radiografico del torace può non essere in grado di individuare gli infiltrati, mentre la TAC può evidenziare il cosiddetto “*halo sign*” attorno all'infiltrato nodulare. L'evoluzione della malattia porta alla formazione di ascessi e di lesioni cavitari: se viene interessato un vaso sanguigno di discrete dimensioni può comparire emottisi massiva, a volte fatale. Un'altra manifestazione dell'aspergillosi polmonare acuta è rappresentata dall'infarto polmonare emorragico causato dall'invasione e dalla trombosi di una grande arteria polmonare. Questa forma è caratterizzata da febbre improvvisa e da sfregamento pleurico: se non trattata, può estendersi ai distretti anatomici contigui (mediastino, costole, vertebre, esofago e pericardio).

Aspergillosi cronica – come l'aspergillosi invasiva configura il quadro determinato da iporeattività immunologica. L'aspergillosi cronica necrotizzante colpisce soprattutto le persone anziane con patologie polmonari croniche o pregresse, come la tubercolosi. Può evolvere con disseminazione alle pleure, ma di solito non si osserva una diffusione ematica. La sintomatologia comprende febbre, tosse produttiva, malessere generalizzato e calo ponderale.

Sono descritte anche forme di aspergillosi invasiva, caratterizzate da specifiche localizzazioni d'organo:

Aspergillosi sinusale – è ubiquitaria, anche se la maggior parte dei casi si verifica in zone caratterizzate da un clima caldo e secco e rappresenta la localizzazione fungina più frequente a carico dei seni paranasali. La sua gravità clinica si esplicita in un *trend* clinico prognostico compreso tra forme benigne e non invasive e quadri estremamente aggressivi ed invasivi.

Aspergillosi cerebrale – si verifica a seguito di una diffusione per via ematogena, a partenza quasi sempre dal polmone e, molto raramente, dai seni paranasali, soprattutto in pazienti neutropenici. La sintomatologia compare gradualmente ed è caratterizzata dalla comparsa di uno stato confusionale e di alterazioni comportamentali, e da uno stato soporoso. Nel 50% dei casi i parametri liquorali sono normali; altrimenti è possibile osservare un aumento della protidorrachia, mentre la glicorrachia è di solito normale; a volte si osserva una marcata pleocitosi.

Altre forme di aspergillosi – Sono state descritte altre forme di aspergillosi: **endo-oftalmite** (in soggetti tossicodipendenti, in pazienti con endocardite e trapiantati d'organo), **endocardite e miocardite** (la prima descritta soprattutto in pazienti sottoposti ad interventi di cardiocirurgia oppure a nutrizione parenterale, ed in soggetti tossicodipendenti; la seconda sembra essere conseguente a disseminazione ematogena ed è stata segnalata in circa il 15% di pazienti deceduti per aspergillosi disseminata), **osteomielite** (segnalata soprattutto in pazienti pediatriche affetti da malattia granulomatosa cronica).

Caratteri del tutto peculiari caratterizzano, infine:

Aspergillosi nei trapiantati – la sintomatologia può essere subdola e può sovrapporsi a quella di altre patologie infettive: sono presenti tosse non produttiva, dolore toracico, dispnea e febbre. Dai polmoni *Aspergillus* spp. può disseminarsi a quasi tutti i distretti anatomici (cervello, fegato, milza, reni, tiroide, cuore, parete dei vasi

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

sanguigni, ossa, ed articolazioni); è in grado di causare anche peritonite in pazienti trapiantati di rene sottoposti a dialisi peritoneale ambulatoriale o in trapiantati di fegato con ascessi epatici.

2. Altre ialoifomicosi

Le ialoifomicosi sono causate da miceti ialini, cioè a quei funghi il cui micelio vegetativo non presenta pigmentazione melaninica. Il numero di questi microrganismi in grado di causare infezioni è in costante aumento e in letteratura vengono riportate nuove segnalazioni in contesti caratteristicamente di opportunismo: le infezioni sistemiche sono sempre descritte in pazienti immunocompromessi. Anche le localizzazioni sono assolutamente plurime, spaziando da quadri di fungemia e di lesioni viscerali ad episodi di lesioni superficiali e limitate alla cute. Tra i miceti ialini segnalati più frequentemente come agenti di ialoifomicosi è possibile segnalare, tra gli altri, *Fusarium* spp., *Paecilomyces* spp., *Acremonium* spp. *Scopulariopsis* spp.

Fusarium – L'infezione causata da membri del genere *Fusarium* rappresenta un evento molto pericoloso soprattutto per i pazienti immunocompromessi, anche per la scarsa sensibilità di questi miceti ai farmaci antifungini (Tortorano et al.). All'esordio si presenta di solito come febbre persistente refrattaria agli antibiotici ed agli antimicotici. Altre possibili manifestazioni comprendono quadri di sinusite e di infezione rino-cerebrale, di endo-oftalmite, di polmonite, di miosite e di localizzazione al Sistema Nervoso Centrale. E' possibile il riscontro anche di lesioni cutanee dolenti: queste sono il risultato della disseminazione dell'infezione. Il tasso di mortalità nei pazienti immunocompromessi affetti da fusariosi può arrivare anche all'80%, soprattutto se lo stato di immunosoppressione permane a lungo. Nei pazienti sottoposti a trapianto d'organo solido l'infezione da *Fusarium* spp. sembra caratterizzarsi per aspetti peculiari: è più localizzata, è tardiva rispetto alla data del trapianto ed ha un esito migliore rispetto alle forme che colpiscono pazienti onco-ematologici o sottoposti a trapianto di midollo osseo. Nei soggetti immunocompetenti le infezioni sistemiche da *Fusarium* spp., peraltro rare, sono sempre il risultato di una penetrazione diretta del microrganismo. Esse comprendono: endo-oftalmite, osteomielite, artrite settica, polmonite, ascessi cerebrali, cistite e peritonite (nei soggetti sottoposti a dialisi peritoneale), oltre alle forme primitivamente a carico degli annessi cutanei.

Acremonium – segnalati più frequentemente come agenti di infezioni ungueali e corneali, i miceti del genere *Acremonium* sono stati recentemente riconosciuti anche come causa di infezioni invasive/sistemiche, tra cui: peritonite in pazienti dializzati ed osteomielite. Solo occasionalmente sono descritti casi di meningite iatrogena conseguente ad anestesia spinale, cerebriti in tossicodipendenti, endocardite post-chirurgica e polmonite in età pediatrica.

Paecilomyces – le due specie di *Paecilomyces* più comunemente segnalate come agenti di infezione umana sono *P. variotii* e *P. lilacinus* (quest'ultimo recentemente ridenominato *Purpureocillium lilacinus*). Possono causare infezioni disseminate, polmonite, cellulite e pielonefrite in pazienti immunocompromessi.

Scopulariopsis – Sono state segnalate infezioni sistemiche in pazienti sottoposti a trapianto di fegato o onco-ematologici. Le localizzazioni sono soprattutto a carico di polmoni e tessuti molli. Anche in questo caso frequenti sono le forme primitive a carico degli annessi cutanei.

Altri patogeni – **Chrysosporium** spp. è stato segnalato come agente di sinusite e di infezione disseminata in pazienti immunocompromessi. **Phialemonium** spp. può causare infezioni disseminate in pazienti ustionati, fungemia in pazienti oncologici, peritonite in pazienti trapiantati di rene ed osteomielite in seguito ad impianto traumatico. **Trichoderma viride** può causare peritonite in soggetti sottoposti a dialisi peritoneale continua.

3. Candidosi

Numerosi sono i quadri clinici che caratterizzano l'eziologia da lieviti e, in particolare, da *Candida* spp.

Candidosi urinaria – la candiduria asintomatica in pazienti cateterizzati è raramente associata a complicanze invasive e di solito non richiede alcun trattamento farmacologico. Per contro, la candiduria in un paziente non cateterizzato richiede ulteriori esami per escludere eventuali ostruzioni. Nei pazienti neutropenici o in gravi condizioni la candiduria potrebbe essere un *marker* di candidosi disseminata, anche se questo dato è ancora molto controverso. Certamente essa costituisce un sito di colonizzazione che può contribuire alla disseminazione per via ematica.

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

Infezioni cardiovascolari – l'endocardite da *Candida* spp. è associata ad un alto tasso di recidive e ad una bassa percentuale di sopravvivenza. La terapia comprende sia un trattamento farmacologico sia la sostituzione chirurgica della valvola interessata dalla presenza di biofilm fungino, ovvero vegetazioni caratteristicamente molto voluminose: la durata del trattamento con antifungini è molto lunga, fino, in alcuni casi, a 2 anni dopo l'intervento chirurgico. La ragione della sostituzione valvolare risiede nel fatto che molti antifungini sono fungistatici e penetrano poco nel biofilm. La **miocardite** da *Candida* spp. viene di solito diagnosticata in sede autoptica in pazienti deceduti in seguito a candidosi disseminata. La **pericardite**, se non trattata, è associata ad un tasso di mortalità del 100%, mentre la percentuale di sopravvivenza dei pazienti trattati arriva quasi al 50%. Il protocollo di trattamento più appropriato prevede la combinazione di terapia farmacologica e chirurgica (drenaggio pericardico o pericardiectomia).

Osteomielite e artrite – la diagnosi precoce di una artrite da *Candida* spp. è fondamentale per prevenire la distruzione della cartilagine o lo scollamento della protesi. Il drenaggio chirurgico del pus è essenziale per il buon esito del trattamento farmacologico dell'osteomielite da *Candida* spp.

Infezioni addominali – In pazienti oncologici con drenaggi percutanei sono stati descritti ascessi epatici, subfrenici e localizzati alla colecisti, mentre la peritonite da *Candida* spp. è stata osservata in pazienti sottoposti per periodi prolungati a dialisi peritoneale ambulatoriale.

Candidosi disseminata (acuta o cronica) – è associata ad un alto tasso di mortalità. La candidemia è ai primi posti tra le cause di infezioni ospedaliere del torrente circolatorio sia negli Stati Uniti che nel resto dei Paesi industrializzati ed è responsabile di più della metà degli episodi di sepsi nei pazienti non neutropenici ricoverati in Reparti di Terapia Intensiva o in Chirurgia.

4. Criptococcosi

La criptococcosi è causata da lieviti appartenenti al genere *Cryptococcus*: fino a pochi anni fa erano tutti considerati varianti di *C. neoformans*. Recentemente sono stati classificati come singole specie: *C. neoformans*, *C. grubii* e *C. gattii*, i primi due a distribuzione ubiquitaria, il terzo inizialmente confinato in zone tropicali ed ora segnalato anche in aree a clima continentale (Vancouver, Canada). La criptococcosi è un'infezione che colpisce quasi esclusivamente i pazienti immunocompromessi: prima della comparsa dell'infezione-malattia da HIV la criptococcosi era una rara complicanza osservata soprattutto in pazienti affetti da linfoma (di Hodgkin e non-Hodgkin) e da sarcoidosi. Nei pazienti HIV-positivi la criptococcosi extrapolmonare rappresenta una delle patologie fungine inserite dai CDC di Atlanta nella "working definition" di un caso di AIDS; la meningite criptococcica era, in epoca pre-HAART, abbastanza frequente in questi pazienti, con percentuali di incidenza che negli Stati Uniti e nell'Europa Occidentale potevano arrivare al 7-10%, mentre nei Paesi dell'Africa Sub-Sahariana a più del 30%. Prima dell'introduzione dell'HAART il 60% dei pazienti AIDS con meningite criptococcica moriva entro 6 mesi dalla prima diagnosi, spesso a causa delle frequenti recidive. Dopo l'introduzione della terapia antiretrovirale la meningite criptococcica nei Paesi industrializzati è quasi scomparsa, mentre la situazione in Africa continua ad essere molto grave, soprattutto a causa delle difficoltà economiche che precludono a molti pazienti l'accesso a cure adeguate. L'infezione viene acquisita per via inalatoria e provoca una prima infezione polmonare: nel soggetto normoergico i meccanismi di difesa (macrofagi alveolari e risposta adattativa T_h) impediscono la diffusione, mentre nei pazienti immunocompromessi, mancando questa linea di difesa, l'infezione è in grado di disseminarsi per via ematica. *Cryptococcus* spp. ha un elevato tropismo per il Sistema Nervoso Centrale, dove è in grado di provocare una meningite a liquor limpido. Altre localizzazioni secondarie dell'infezione disseminata segnalate in letteratura sono: occhio, linfonodi, cute, ossa e prostata.

5. Altre infezioni da miceti lieviformi

Malassezia – il genere *Malassezia* comprende un gruppo di lieviti caratterizzati da spiccata lipofilia, che normalmente colonizzano la cute umana ed animale. *Malassezia furfur* è stata segnalata come agente di fungemia in soggetti, soprattutto neonati, cateterizzati e sottoposti a nutrizione parenterale a base di lipidi. Più rari, ma pure descritti, sono i casi di sepsi in pazienti immunocompromessi (sia pediatrici che adulti), anche in

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

assenza di somministrazione di lipidi. La sintomatologia è sovrapponibile a quella delle altre sepsi: febbre, leucocitosi e trombocitopenia. Nella maggior parte dei casi *M. furfur* viene isolata solamente nelle emocolture prelevate attraverso il catetere e non in quelle prelevate da vena periferica.

Trichosporon – *T. beigelii* è stato segnalato come agente di infezione disseminata in pazienti ematologici, oncologici o sottoposti a trapianto d'organo solido: nella maggior parte dei casi l'infezione era conseguente ad uno stato di profonda neutropenia ($<100/\text{mm}^3$) e quasi tutti i pazienti non ematologici erano in terapia con steroidi. I neonati prematuri e i pazienti ustionati rappresentano altri gruppi di pazienti in cui è stata descritta fungemia da *T. beigelii*. Si ritiene che la colonizzazione del tratto gastro-intestinale e del catetere venoso centrale rappresentino una potenziale via di penetrazione per questo microrganismo

Blastoschizomyces – I casi di infezione sistemica da *B. capitatus* (ora denominato *Saprochaete capitata*) sono stati descritti quasi esclusivamente in pazienti onco-ematologici con neutropenia grave. La disseminazione per via ematica determina secondariamente localizzazioni polmonari, epatiche, spleniche, renali, neurologiche e cardiache.

6. Zigomicosi

Le forme sistemiche di zigomicosi sono causate da miceti appartenenti all'Ordine *Mucorales*: questa è la ragione per cui spesso queste patologie vengono indicate anche con il nome di mucormicosi. Sono infezioni fortunatamente molto rare perché la loro prognosi è quasi sempre infausta, in parte per la notevole velocità di propagazione di questi microrganismi, ma anche per la loro scarsa (o nulla) sensibilità ai farmaci antifungini. I principali fattori di rischio per l'insorgenza di zigomicosi nei pazienti defedati sono l'acidosi diabetica e l'iperglicemia, la neutropenia, le terapie steroidee e quelle immunosoppressive per trapianto d'organo solido o di midollo osseo, e la terapia con deferosamina. Nei soggetti normoergici, invece, le infezioni sistemiche da zigomiceti sono sempre conseguenza di una penetrazione traumatica del microrganismo. Sono descritte varie forme di zigomicosi invasiva.

Zigomicosi rinocerebrale – l'infezione di solito ha origine a livello dei seni paranasali in seguito all'inalazione di sporangiospore. Successivamente le spore germinano ed il microrganismo diffonde velocemente interessando la cavità orbitale, il palato e la piramide nasale. In seguito le ife attraversano la lamina cribrosa dell'etmoide e penetrano nell'encefalo, portando il paziente rapidamente a morte.

Zigomicosi polmonare – anche in questo caso l'infezione è il risultato dell'inalazione delle sporangiospore e della loro localizzazione a livello dei bronchioli e degli alveoli, con conseguente infarto polmonare e necrosi.

Zigomicosi gastrointestinale – è molto rara, di solito associata a grave malnutrizione, soprattutto nei bambini, e a malattie gastrointestinali che alterano l'integrità della mucosa. L'infezione primaria probabilmente è conseguente all'ingestione di elementi fungini e si presenta di solito con ulcere necrotiche.

Ognuna di queste forme può essere fonte di **zigomicosi disseminata**, a volte con localizzazione cerebrale.

7. Feoifomicosi

Le feoifomicosi sono infezioni causate da funghi appartenenti al gruppo dei miceti dematiacei, caratterizzati dalla presenza di pigmenti melaninici nel micelio vegetativo e, tutti, caratterizzati da un *habitat* tellurico. Per l'uomo, sono tutti patogeni in quanto opportunisti. Tra i microrganismi segnalati come agenti di feoifomicosi si ricordano: *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp., *Exserohilum* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. e *Scedosporium* spp. I quadri clinici sono di vario tipo:

Sinusite fungina allergica – il quadro istopatologico è simile a quello dell'aspergillosi broncopolmonare allergica. Colpisce soprattutto soggetti immunocompetenti in giovane età che di solito presentano un'anamnesi di sinusite cronica che data anche da parecchi anni. Spesso la sintomatologia comprende un'ostruzione delle vie nasali, secrezioni e cefalea, ma sono stati osservati anche altri sintomi, come la comparsa di un edema peri-orbitale, di proptosi e di disturbi visivi. Spesso i pazienti segnalano di aver osservato la presenza, dopo uno starnuto molto forte, di "tappi" bruno-verdastri.

Sinusite fungina cronica – gli stessi microrganismi che determinano la sinusite allergica possono provocare anche una forma di sinusite lentamente progressiva ma invasiva. Anche in questo caso i pazienti affetti sono

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

giovani adulti, ma manca il dato anamnestico di una pregressa rinite allergica. La sintomatologia è molto simile, anche se a volte sono state segnalate complicanze neurologiche, quali crisi convulsive ed anche coma.

Feoifomicosi sistemica – quella cerebrale è la forma sistemica più comunemente segnalata. Altre localizzazioni comprendono quelle all'endocardio e al polmone (nei pazienti con fibrosi cistica si può osservare colonizzazione senza danno tissutale). Sono descritti anche casi di artrite settica, osteomielite, esofagite, peritonite associata a dialisi e di infezione disseminata. La malattia può interessare sia soggetti apparentemente immunocompetenti sia pazienti immunocompromessi.

Feoifomicosi cerebrale – nella maggior parte dei casi è sostenuta da *Cladophialophora bantiana*, ma sono stati descritti anche episodi sostenuti da *Wangiella dermatitidis*, *Ramichloridium mackenzii*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Curvularia* spp., *Ochroconis gallopavum* e *Bipolaris spicifera*. Ha una distribuzione ubiquitaria, con una prevalenza maggiore tra la popolazione maschile, più frequente tra i giovani adulti apparentemente senza deficit immunologici. La maggior parte dei casi si presenta con un quadro compatibile con una lesione massiva intracerebrale. E' frequente la cefalea; in alcuni casi si può osservare emiparesi causata da ascessi della corteccia cerebrale o da invasione del tronco encefalico. Una seconda possibile forma è costituita dalla meningite cronica, da sola o associata ad ascessi cerebrali. Ancora una volta la cefalea rappresenta il sintomo prominente, ma il decorso è più prolungato, potendo durare anche più di 3 mesi. A volte possono essere presenti papilledema, rigidità nucale e crisi convulsive, mentre la presenza di ascessi cerebrali può determinare emiparesi. La prognosi di questa infezione è quasi sempre sfavorevole, essendo gli unici casi di sopravvivenza a lungo termine segnalati legati alla possibilità della rimozione chirurgica delle lesioni.

Infezione da *Scedosporium* spp. – Sono riportate infezioni sistemiche in soggetti immunocompromessi, con localizzazioni in vari distretti anatomici, e con un discreto tropismo per la cute (noduli cutanei dolenti, che evolvono verso la necrosi), per i seni, per i polmoni e per il Sistema Nervoso Centrale. Sono stati segnalati anche casi di endocardite. Nei soggetti normoergici l'infezione cerebrale è conseguente ad una pregressa sinusite, a traumi penetranti oppure ad episodi di quasi-annegamento in acque inquinate, mentre nei pazienti immunocompromessi consegue ad una diffusione per via ematogena. La maggior parte delle infezioni cerebrali si presenta con ascessi, ma sono stati segnalati anche casi di ventricolite e di meningite. La mortalità è molto elevata (>75%), soprattutto se la terapia non viene iniziata tempestivamente.

8. Pneumocistosi

Pneumocystis jiroveci è stato recentemente riconosciuto come micete patogeno per l'uomo, mentre *P. carinii* è patogeno per il ratto. Inizialmente considerato un parassita, alla fine degli anni '80, in seguito a studi filogenetici, è stato classificato come appartenente al Regno dei Funghi. *P. jiroveci* causa polmonite (PCP) nei pazienti immunocompromessi, soprattutto se affetti da infezione da HIV: ancora oggi, nell'era della terapia antiretrovirale, la PCP rappresenta l'infezione opportunistica più frequente nei pazienti affetti da AIDS. Il tasso di mortalità associato a questa infezione non è cambiato molto in seguito all'introduzione della HAART e può variare, negli Stati Uniti e nei Paesi industrializzati, dal 10% al 13.5%. Il tasso di mortalità è strettamente correlato alla disponibilità di cure mediche adeguate, ma può essere drammaticamente elevato (fino all'80%) nei pazienti sottoposti a ventilazione meccanica. La mortalità nei pazienti non affetti da HIV è molto superiore, potendo arrivare anche al 48%. La pneumocistosi è molto comune tra i pazienti pediatrici affetti da HIV, soprattutto nel primo anno di vita, con un picco tra i 3 ed i 6 mesi. Mentre negli Stati Uniti è stata riscontrata una significativa diminuzione dell'incidenza di PCP nei bambini, questa infezione rimane estremamente diffusa in Africa. La sintomatologia clinica nei bambini comprende febbre, tachipnea, dispnea e tosse. L'insorgenza può essere acuta o subacuta, in associazione con altri sintomi aspecifici quali la tosse moderata, il calo ponderale, la diarrea e l'inappetenza. Negli adulti la PCP si presenta con dispnea, tosse secca, incapacità di inspirare profondamente, oppressione toracica, sudorazione notturna, febbre moderata e tachipnea.

9. Infezioni da miceti dimorfi

I miceti dimorfi sono un particolare gruppo di microrganismi che si caratterizza per diverse morfologie macro- e microscopiche a seconda della temperatura di incubazione: a 25°C si presentano in forma miceliare, mentre a

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

37°C crescono in forma lievito. Ad eccezione di *Penicillium marneffeii*, che è un patogeno opportunisto, i dimorfi sono tra i pochi miceti considerati come **patogeni primari** poiché sono in grado di causare malattia anche in soggetti immunocompetenti. Hanno aree di diffusione endemica ben definite, che coincidono con zone turisticamente molto apprezzate oppure con Paesi di provenienza di molti immigrati extra-comunitari.

Istoplasmosi

L'istoplasmosi è un'infezione causata dall'inalazione di conidi di *Histoplasma capsulatum*. Presenta distribuzione ubiquitaria: tuttavia, la zona a cavallo dei fiumi Ohio-Missouri-Mississippi negli Stati Uniti rappresenta uno degli areali di massima endemia. L'Africa Sub-Sahariana, l'Australia e parte dell'Asia Orientale, in particolare India e Malesia sono altre regioni endemiche. Sono state segnalate anche alcune decine di casi autoctoni in Italia e noto è il riscontro ambientale del micete nella terra dell'Appennino Tosco-Emiliano (come dimostrato dal professor Aldo Mazzoni). Il fungo è stato isolato dal suolo contaminato da guano di uccelli e di pipistrelli. Sono oggi conosciute due varietà di *H. capsulatum*: var. *capsulatum* e var. *duboisii*, quest'ultima diffusa soprattutto in Africa. Le due varietà, seppur identiche nella loro forma miceliare, presentano una morfologia differente nella loro forma lievito. Nel corso dell'infezione, le forme a lievito si ritrovano a livello intracellulare, soprattutto nei macrofagi e più in generale nelle cellule del sistema reticolo-endoteliale. Circa il 95% dei casi di istoplasmosi sono asintomatici o comunque hanno un andamento benigno. Il restante 5% dei casi si può presentare con una forma polmonare cronica progressiva, con localizzazioni cutanee croniche o con un'infezione sistemica, a volte fulminante. Tutte le forme di questa malattia possono mimare il quadro clinico della tubercolosi. L'istoplasmosi extra-polmonare è una delle quattro infezioni fungine incluse dai CDC nella "working definition" di caso di AIDS.

Blastomicosi

La blastomicosi è una malattia granulomatosa cronica e suppurativa causata da *Blastomyces dermatitidis*, caratterizzata da un'infezione primaria a livello polmonare, spesso seguita da disseminazione ad altri distretti anatomici, con un elevato tropismo per la cute e le ossa. In passato si riteneva che questa malattia fosse confinata al continente Nord Americano, non solo nelle stesse aree di diffusione di *H. capsulatum*, ma anche nella zona dei Grandi Laghi. Casi autoctoni di blastomicosi sono stati però segnalati anche in Africa ed in Asia. Tutti i dati clinici indicano una via di infezione inalatoria, ma l'*habitat* naturale di *B. dermatitidis* non è ancora stato individuato con precisione. **Blastomicosi polmonare:** nella maggior parte dei casi è asintomatica. In molti casi si osserva un andamento cronico dopo un periodo di incubazione di 3-15 settimane: i sintomi comprendono tosse, febbre, malessere generalizzato e calo ponderale. Alcuni pazienti possono presentare sintomi di infezione acuta con ipertermia, brividi, tosse produttiva, artromialgie e dolore pleurico. Spesso questi pazienti sembrano guarire dopo 2-12 settimane, ma alcuni di essi presentano, dopo mesi, localizzazioni ad altri distretti. **Blastomicosi cutanea:** la diffusione ematogena della malattia dà origine a lesioni cutanee in più del 70% dei pazienti, che tendono ad essere indolenti e a presentarsi in forma verrucosa rilevata con bordi irregolari oppure come ulcere. **Blastomicosi osteoarticolare:** si verifica in circa il 30% dei pazienti con frequente localizzazione al rachide, alle ossa pelviche e a quelle craniche, alle costole ed alle ossa lunghe. Spesso rimangono asintomatiche fino a quando l'infezione diffonde alle articolazioni o ai tessuti limitrofi, causando ascessi. Altre forme di blastomicosi sistemica comprendono la forma **genitourinaria**, che interessa prostrata, epididimo e testicoli, la **meningite** e gli **ascessi spinali e cerebrali**, causati tutti dalla disseminazione per via ematica. I pazienti possono sviluppare una forma fulminante con disseminazione a molti distretti anatomici in seguito a riattivazione endogena di un'infezione pregressa.

Coccidioidomicosi

La coccidioidomicosi è un'infezione causata dall'inalazione di artroconidi di *Coccidioides immitis/posadasii*, diffuso soprattutto nelle aree semidesertiche (*Lower Sonoran Lifezone*) del Sud-Ovest degli Stati Uniti e del Messico settentrionale, con piccole aree di endemia anche in Sud America. L'agente eziologico è un unico

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

microrganismo, ma vari Autori indicano *C. immitis* nei casi di infezioni contratte nella San Joaquin Valley in California e *C. posadasii* nei casi di infezioni riscontrate nelle altre aree di endemia della coccidioidomicosi. L'infezione primaria si risolve spesso in modo rapido e spontaneo, lasciando il paziente con una forte difesa immunitaria specifica contro eventuali reinfezioni. Tuttavia, la malattia può progredire verso un quadro polmonare cronico o verso una disseminazione sistemica, con localizzazioni meningee, ossee, articolari, cutanee e sottocutanee. Tutti i casi diagnosticati in altri Paesi presentavano in anamnesi una permanenza in aree di endemia. La maggior parte dei pazienti (60%) presenta un'infezione polmonare benigna che non richiede trattamento. Il restante 40% presenta sintomi quali una sindrome febbrile acuta, simil-influenzale, 7-28 giorni dopo l'inalazione degli artroconidi, spesso seguita da guarigione spontanea. I principali sintomi sono febbre, dolore pleurico, tosse, malessere generalizzato, cefalea, mialgia, sudorazione notturna ed inappetenza. Molti pazienti presentano anche *rash* eritematoso o maculopapulare a livello del tronco e dei fianchi. Comunque, 5-10% dei pazienti sintomatici presentano noduli polmonari residui o cavità che vengono di solito evidenziate dopo parecchi mesi o anni. Un ulteriore 5% di pazienti può andare incontro a disseminazione extra-polmonare con localizzazioni a vari distretti anatomici entro un breve periodo di tempo (da poche settimane a mesi) dall'insorgenza dell'infezione primaria.

Paracoccidioidomicosi

La paracoccidioidomicosi è una malattia granulomatosa cronica che esordisce con una localizzazione polmonare primaria, spesso asintomatica, e che poi dissemina determinando la comparsa di granulomi ulcerativi a livello delle mucose orale, nasale e, a volte, anche gastrointestinale. L'agente eziologico, *Paracoccidioides brasiliensis*, è geograficamente confinato in alcune aree dell'America Meridionale e Centrale, caratterizzate da un particolare *habitat* definito come Foresta Montana Subtropicale. La malattia sembra più frequente tra i soggetti di sesso maschile, di età compresa tra i 20 ed i 50 anni, dediti ad attività lavorative o ricreative all'aperto. L'esordio della paracoccidioidomicosi è molto simile a quello della blastomicosi e della coccidioidomicosi. Le manifestazioni cliniche variano da quadri subclinici, diagnosticati solamente mediante intradermoreazione, fino ad infezioni croniche con localizzazioni ad uno o più organi. **Paracoccidioidomicosi polmonare:** nella maggior parte dei casi l'infezione è asintomatica e il paziente si presenta con sintomi cronici, quali tosse, febbre, sudorazione notturna, malessere generalizzato e calo ponderale. **Paracoccidioidomicosi mucocutanea:** le mucose orale e nasale rappresentano la localizzazione più frequente in caso di disseminazione dell'infezione, con la comparsa di lesioni ulcerative dolenti a livello di gengive, lingua, labbra e palato che possono progredire per settimane o mesi. In alcuni casi si può osservare la perforazione del palato o del setto nasale e possono comparire anche lesioni cutanee in prossimità del naso e della bocca. **Paracoccidioidomicosi linfonodulare:** la linfadenite è più frequente nei pazienti più giovani. La tumefazione dei linfonodi cervicali e di quelli sottomandibolari rappresenta la manifestazione più evidente, e l'infezione può progredire fino alla formazione di ascessi con fistole drenanti. **Paracoccidioidomicosi disseminata:** la diffusione ematogena di *P. brasiliensis* può causare un'infezione disseminata, con lesioni intestinali e epatiche, con la distruzione delle ghiandole surrenali, e con la comparsa di osteomielite, artrite, endoftalmite, meningo-encefalite e di lesioni cerebrali focali.

Penicilliosi

Penicillium marneffei è un micete dimorfo in grado di causare malattia sia nei soggetti normoergici sia nei pazienti immunocompromessi; è stato descritto come un importante patogeno opportunista tra i pazienti HIV-positivi in Indocina: molti dei casi descritti provenivano dalla provincia di Chiang Mai nel nord della Thailandia. Altri fattori predisponenti sono costituiti dai disordini linfoproliferativi, dalle bronchiectasie e dalla tubercolosi, da patologie autoimmuni e dalla terapia steroidea. Tutti i casi finora descritti di infezione da *P. marneffei* si sono verificati in soggetti residenti in Asia Sud-Orientale o in viaggiatori che avevano soggiornato nelle zone di diffusione di questo fungo: Thailandia settentrionale, Vietnam, Hong Kong, Taiwan e Cina Meridionale. Casi di importazione sono stati segnalati in Australia, Francia, Italia, Olanda, Gran Bretagna e Stati Uniti.

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

L'*habitat* naturale di *P. marneffei* non è ancora stato determinato con certezza, anche se è stato ipotizzato che il serbatoio possa essere costituito dal ratto del bambù. Sono stati descritti casi di infezione conseguente ad inoculazione traumatica, a consumo di carne di ratto del bambù o ad inalazione delle spore; nel complesso, si ritiene, comunque, che la contaminazione si realizzi, come per gli altri miceti dimorfi, soprattutto per via inalatoria. Nei soggetti normoergici l'infezione da *P. marneffei* può essere sia localizzata che disseminata: in quest'ultimo caso i quadri clinico-istologici sono molto simili a quelli presentati dalla tubercolosi. Nei pazienti HIV-positivi la diagnosi è possibile quando l'infezione da *P. marneffei* è ormai disseminata, di solito con localizzazione a cute, sistema reticolo-endoteliale, polmone e tratto gastro-intestinale. La fungemia è presente nella maggior parte dei casi e si può osservare anche la disseminazione a distretti anatomici, quali il rene, le ossa, le articolazioni e il pericardio. I pazienti di solito presentano sintomi aspecifici: febbre, anemia e calo ponderale. Le lesioni cutanee sono costituite da papule con un centro necrotico, di aspetto simile a quelle del mollusco contagioso, di solito al viso, al tronco ed alle estremità. I numerosi ascessi sottocutanei tendono ad ulcerarsi con il progredire della malattia. I sintomi clinici dell'infezione disseminata da *P. marneffei* sono molto simili a quelli osservati nei pazienti con AIDS affetti da criptococcosi o da istoplasmosi disseminate.

Criteri diagnostici – Definizioni (IFI certa, probabile, possibile)

(Paolo Fazio e Marco Conte)

La diagnosi di malattia fungina invasiva, molto spesso, si realizza con non poche difficoltà a causa di varie problematiche quali la non eccelsa sensibilità e specificità dei test diagnostici, la scarsa evidenza di segni e sintomi clinici, quasi sempre osservati in un contesto di grave immunodepressione, l'impossibilità talora di eseguire manovre diagnostiche invasive ecc. La diagnosi, ad esempio, non si può realizzare in base al solo esame colturale, come in presenza di infezioni causate da altri microrganismi patogeni, a meno di esami condotti su campioni biologici per definizione sterili.

Per tale motivi si è sentita la necessità di istituire un *Consensus Committee* per la definizione di malattia fungina invasiva sulla base di diversi gradi di certezza diagnostica. Esso era costituito dai membri del *Fungal Infections Cooperative Group* (IFICG) del *National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group* (MSG) e dell'*European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC).

La diagnosi di malattia fungina invasiva è stata quindi definita come possibile, probabile e certa in base a criteri riguardanti, in ordine, le condizioni cliniche di base del paziente (paziente a rischio), i segni clinici e radiologici di micosi, le evidenze degli esami microbiologici sui diversi campioni clinici testati.

Le definizioni riguardano le malattie invasive da funghi filamentosi e da lieviti oltre che quelle causate dai funghi endemici invasivi (funghi dimorfi). Le definizioni del gruppo EORTC/MSG non comprendono le malattie causate da *Pneumocystis jirovecii* che, pure rappresentano un problema importante sia nei pazienti oncoematologici che in quelli affetti da AIDS.

Il gruppo EORTC/MSG ha classificato i livelli di certezza diagnostica di malattia fungina invasiva in: 1) certa, 2) probabile e 3) possibile.

Infezione certa

Il fungo deve essere evidenziato mediante un esame a) istopatologico e/o b) citologico e/o c) microscopico diretto effettuato sul campione di tessuto interessato dall'infezione fungina e che sia stato ottenuto mediante una procedura diagnostica sterile quali la biopsia o l'agoaspirato, oppure d) da un esame colturale da un sito organico per definizione sterile quale ad esempio il sangue. Nel caso della meningite criptococcica è sufficiente e) il risultato positivo della ricerca dell'antigene capsulare o l'evidenziazione tramite colorazione inchiostro di China del lievito da LCR.

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI
Rimini, 18-21 ottobre 2015

Vi è un consenso generale sul fatto che la categoria di IFD provata debba essere mantenuta, e che richieda, nella maggior parte dei casi, la dimostrazione di elementi fungini in tessuto infetto. La revisione operata su questa categoria è legata ai progressi dei test indiretti che, in alcuni casi, sono altamente specifici per il rilevamento di un'infezione fungina. Per sua stessa natura, questa categoria può ritenersi valida a prescindere dai fattori dell'ospite o dai caratteri clinici. Questa categoria è stata modificata in modo da riflettere i progressi nella comprensione dei caratteri sierologici delle infezioni fungine: ad esempio la presenza di anticorpi anti-*Coccidioides* nel liquor viene considerato criterio sufficiente per definire una coccidioidomicosi provata; analogamente, la presenza di antigene capsulare nel liquor viene considerato sufficientemente distintivo per stabilire una diagnosi di criptococcosi disseminata. La presenza di antigene urinario di *Histoplasma* sostiene viceversa una diagnosi di probabile micosi endemica, in associazione con criteri legati all'ospite e criteri clinici, ma non può essere ritenuta una prova sufficiente di istoplasmosi provata, poiché l'antigene di *Histoplasma* si può trovare anche nelle urine e nel siero di pazienti con coccidioidomicosi e blastomicosi.

Infezione probabile

La definizione di infezione probabile si basa sulla combinazione di tre criteri: fattori dell'ospite, criteri clinici e criteri micologici (tabella)

Infezione possibile

Si parla di infezione fungina possibile in presenza di a) un criterio dell'ospite e di un criterio clinico. La categoria di possibile infezione fungina è stata mantenuta ma con criteri inclusivi più circoscritti limitati a fattori dell'ospite appropriati, con un'evidenza clinica sufficiente ma senza un supporto micologico.

Criteri per la conferma di una malattia fungina invasiva provata

Analisi e campioni	Miceti filamentosi ^a	Lieviti ^a
Microscopia (materiale sterile)	Esame istologico, citologico o microscopico diretto di un campione ottenuto mediante agoaspirato o biopsia con dimostrazione di ife o di forme lievito-simili melanizzate, accompagnate da evidenze di un danno tissutale associato	Esame istologico, citologico o microscopico diretto di un campione ottenuto mediante agoaspirato o biopsia con dimostrazione di cellule lieviti formi, pseudoife o ife vere
Per micosi endemiche	Dimostrazione mediante esame istologico o microscopico diretto di forme morfologiche caratteristiche di funghi dimorfi (<i>Coccidioides Blastomyces, Paracoccidioides, Histoplasma</i>)	
Coltura Materiale sterile	Riscontro di una muffa o di un "lievito nero" dalla coltura di un campione ottenuto da un sito normalmente sterile, clinicamente e radiologicamente anormale consistente con un processo patologico infettivo, con esclusione di liquido di lavaggio broncoalveolare, di cavità sinusale e di urine	Riscontro di un lievito dalla coltura di un campione ottenuto da un sito normalmente sterile, clinicamente e radiologicamente anormale consistente con un processo patologico infettivo
Sangue	Emocoltura che evidenzia la crescita di una muffa (es. <i>Fusarium</i>) nello contesto di un processo infettivo compatibile	Emocoltura che evidenzia la crescita di lieviti
Per micosi endemiche	Isolamento di miceti dimorfi da siti infetti o da sangue	
Sierologia (CSF)	Non applicabile	Antigeni criptococcici in CSF confermano una criptococcosi

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI
Rimini, 18-21 ottobre 2015

		sistemica; Per coccidioidomicosi dimostrazione di anticorpi in CSF o in siero/sangue (2 campioni consecutivi)
--	--	--

Criteri per la conferma di una malattia fungina invasiva probabile *

Criteri dell'ospite	Criteri clinici, secondo il sito di localizzazione della micosi	Criteri micologici
<ul style="list-style-type: none"> • Storia di recente neutropenia (<0,5 x 10⁹ neutrofil/L per più di 10 giorni), temporalmente correlata all'insorgenza della malattia fungina • Trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche • Prolungata terapia corticosteroidea (> 3 settimane) (esclusione pazienti con l'aspergillosi broncopolmo-nare allergica) • Terapia con altri immunosoppressori dei T-linfociti (ciclosporina, inibitori de TNF α, anticorpi monoclonali specifici o analoghi nucleosidici) durante i 90 giorni precedenti l'esordio sintomatologico • immunodeficienza grave congenita (malattia 	<p>Infezione fungina delle basse vie aeree</p> <ul style="list-style-type: none"> - Presenza di una delle seguenti lesioni all'esame TAC: <ul style="list-style-type: none"> • lesione consolidata, a margini netti con o senza il segno dell'alone • segno della luna crescente • cavitazione <p>Tracheobronchite</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ulcerazione tracheobronchiale, nodulo, pseudomembrana, placca o escara alla broncoscopia <p>Infezione dei seni paranasali, sinusite radiologicamente documentata con presenza di uno dei seguenti segni:</p> <ul style="list-style-type: none"> • dolore acuto localizzato (incluso il dolore irradiato all'occhio) • ulcerazione nasale con presenza di escara nerastra • estensione della lesione dai seni paranasali attraverso l'osso, inclusa l'orbita <p>Infezione del sistema nervoso centrale con presenza di uno dei seguenti segni:</p> <ul style="list-style-type: none"> • lesione radiologica focale 	<p>Test diretto (citologia, microscopia diretta o coltura)</p> <p>Muffe in campioni di espettorato, BAL, brush bronchiale o aspirato sinusale, evidenziate da:</p> <ul style="list-style-type: none"> • presenza di elementi fungini indicanti una muffa • isolamento colturale di una muffa <p>Test indiretto (rilevamento di antigeni o costituenti del cell wall)</p> <p>Aspergillosi</p> <p>Rilevamento Galattomannano in plasma, siero, BAL o CSF</p> <p>Infezione fungina invasiva ad eccezione di criptococcosi o zigomicosi</p> <p>Rilevamento β-D-glucano nel siero</p>

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI
Rimini, 18-21 ottobre 2015

granulomatosa immunodeficienza combinata)	cronica, severa	<ul style="list-style-type: none"> • ispessimento meningeo evidenziato da TAC o RMN Candidiasi disseminata, almeno uno dei seguenti criteri dopo un episodio di candidemia nelle due settimane precedenti: <ul style="list-style-type: none"> • piccoli ascessi epatici o splenici con aspetto a bersaglio • essudato retinico progressivo all'esame del fundus
---	--------------------	---

* Per le micosi endemiche presenza di fattori dell'ospite, inclusi ma non limitati a quelli in tabella, più un quadro clinico compatibile con una micosi endemica ed evidenze micologiche come un test antigenico positivo (*Histoplasma*) da campione di urina, sangue o CSF

Diagnosi convenzionale delle infezioni fungine invasive

(Paolo Fazii e Marco Conte)

La diagnosi microbiologica delle infezioni fungine invasive risulta non sempre agevole e spesso difficoltosa, richiedendo, oltre a specifiche competenze in campo micologico, la stretta collaborazione tra più figure professionali. L'individuazione dell'agente eziologico dipende infatti dal corretto campionamento di materiali biologici, così come dalla scelta delle indagini da eseguire in termini di tempi e di modalità. Alle tecniche diagnostiche convenzionali, essenzialmente basate sulla rilevazione morfologico-culturale dei microrganismi, si sono affiancate negli ultimi decenni soluzioni diagnostiche non culturali, alternative e/o complementari, quali quelle molecolari, col rilevamento di materiale genetico fungino, direttamente nei campioni biologici, e quelle sierologiche, con la determinazione di antigeni fungini circolanti. L'introduzione di recente della spettrometria di massa in campo microbiologico ha rappresentato un'ulteriore evoluzione anche nella diagnostica fungina. Le tecniche tradizionali rappresentano, comunque, ancora oggi l'approccio diagnostico fondamentale in ambito micologico clinico, risultando tra i criteri di riferimento per addivenire ad una diagnosi di malattia fungina invasiva certa, probabile o possibile.

Osservazione diretta del campione clinico

L'esame microscopico diretto dovrebbe essere praticato pressoché sistematicamente su gran parte dei materiali sottoposti ad indagini micologiche, tenendo presente che tale esame, in relazione all'aspetto e alla quantità di strutture fungine evidenziabili, può contribuire a dare un significato al successivo isolamento in coltura, offrire talora utili indicazioni per un trattamento terapeutico e, in alcuni casi, consentire un'identificazione presuntiva del micete. La presenza di particolari elementi fungini (ife settate, cenobitiche, pseudoife, blastoconidi) può inoltre orientare la scelta dei substrati culturali più adatti per l'isolamento, condizionando anche i tempi di incubazione, che per alcuni miceti possono prolungarsi per periodi protratti. Per miceti difficilmente coltivabili (es. *Pneumocystis jirovecii*) l'osservazione microscopica, previa idonea colorazione, può peraltro rappresentare la principale opzione diagnostica disponibile. Non va dimenticato che l'osservazione microscopica può dare informazioni anche sul tipo di reazione infiammatoria, sulla cellularità e sull'eventuale presenza di altri microrganismi, anche se le coinfezioni non sono molto frequenti.

La sensibilità dell'esame microscopico è subordinata al tipo di campione da analizzare, alla quantità di materiale disponibile e in parte anche alla scelta delle procedure operative per l'allestimento microscopico e il tipo di colorazione.

I campioni di materiale fluido (liquido cefalo-rachidiano, peritoneale, pleurico, urina, lavaggio bronchiale e broncoalveolare, escreato trattato con agenti mucolitici), una volta centrifugati, vengono esaminati direttamente al microscopio, dopo aver mescolato una parte del sedimento con una parte di soluzione fisiologica, oppure, a seconda dei casi con blu di lattofenolo, in cui il blu cotone colora le strutture fungine o con una soluzione di inchiostro di china, che consente di identificare cellule lievitoformi capsulate (*C.neoformans*). I campioni di una

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

certa consistenza o densità (essudati, materiale respiratorio o articolare) sono invece trattati con soluzioni di idrossido di potassio (20%), con azione cheratinolitica e fibrinolitica che consentono un più netto contrasto tra micete e altre strutture. In alternativa o in associazione si possono prendere in considerazione colorazioni microbiologiche (blu di metilene, Gram, Kinyoun, Wright-Giemsa, Calcofluor White) (Tavola 1).

Tavola. Liquidi di montaggio o colorazioni impiegabili per un esame microscopico diretto

- a) soluzione fisiologica direttamente su vetrino senza coloranti
- b) soluzione di idrossido di potassio (KOH) a varie concentrazioni
- c) colorazione con lattofenolo cotton blu
- d) colorazione con "India ink" per la meningite da *Cryptococcus neoformans*
- e) colorazione di Gram
- f) colorazione di Wright-Giemsa
- g) colorazione con il blu di metilene
- h) colorazioni fluorescenti (Calcofluor White)
- i) colorazione con blu di toluidina per il rilevamento di *Pneumocystis jirovecii*

L'esame microscopico su materiale biotico o tessutale profondo assume un notevole valore diagnostico, in grado di stabilire una diagnosi di certezza di malattia fungina invasiva. La biopsia di una lesione tissutale micotica potrebbe essere colorata con:

- a) ematossilina/eosina
- b) impregnazione argentea (Gomori, Grocott) associata ad ematossilina/eosina
- c) acido periodico di Schiff (PAS)
- d) Mucicarminio di Mayer (per le infezioni sostenute da *Cryptococcus neoformans* dove viene messa in evidenza la componente capsulare)

Alcune tecniche inoltre, sono utili all'identificazione istopatologica dei funghi (soprattutto nei pazienti neutropenici) quali:

- 1) le metodiche che mettono in evidenza l'autofluorescenza fungina
- 2) la colorazione con fluorocromi (Calcofluor White)
- 3) la 2-idrossistilbamidina isotionato
- 4) il Blakophor BA 267 percent
- 5) l'immunofluorescenza diretta
- 6) alcune tecniche immunoistochimiche che utilizzano anticorpi policlonali o monoclonali anti-fungini

Le infezioni da miceti possono essere superficiali, invasive localizzate (ulcerazioni dell'intestino, dell'apparato respiratorio e genito-urinario) ed invasive propriamente dette, intraparenchimali (ascessi, di solito multipli, coinvolgenti usualmente il cuore, i reni, il fegato, la milza, il polmone ed il cervello). Nel caso in cui il fungo si sviluppi su una superficie si osservano ife vere e *cluster* di blastoconidi interposti fra loro, mentre nello sviluppo intraparenchimale si evidenziano invece pseudo-ife e blastoconidi; istologicamente queste lesioni ricordano piccoli ascessi composti da un misto di polimorfonucleati e di cellule mononucleate (linfociti, monociti e plasmacellule) mentre, invece, nei pazienti neutropenici, la reazione infiammatoria è rimpiazzata dalla necrosi coagulativa.

L'esame colturale

L'esame colturale, pur essendo ancora considerato tra i test diagnostici di riferimento, presenta una limitata capacità diagnostica in termini di sensibilità. Nella diagnosi di candidemia e di altre fungemie da lieviti le emocolture hanno una sensibilità non superiore al 50-60%, con differenze di incidenza in relazione alla specie

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

coinvolta; per i miceti filamentosi le emocolture possono consentire in alcuni casi l'isolamento del microrganismo (fusariosi, scedosporidiosi) risultando raramente positive per altri (aspergilloso, zigomicosi).

La ricerca colturale di miceti provenienti da campioni biologici non sterili può presentare alcune criticità legate al microrganismo coinvolto, alle difficoltà di crescita, ai tempi di crescita e all'interpretazione dell'isolamento. Ne è un classico esempio l'isolamento di *Aspergillus* spp. da campioni di materiale respiratorio, non sempre agevole e spesso espressione di colonizzazione delle vie aeree o di contaminazione ambientale.

L'isolamento fungino rappresenta comunque un "gold standard" diagnostico, in particolare se proveniente da un sito sterile (liquido pleurico, peritoneale, materiale bioptico), garantendo l'identificazione della specie coinvolta e consentendo l'esecuzione di saggi di sensibilità nei confronti di antimicotici (antimicogrammi).

I campioni destinati all'esame colturale devono essere inoculati su terreni appropriati che devono consentire la crescita dei miceti di rilevanza clinica. Il Laboratorio di Microbiologia può utilizzare una grande varietà di terreni e la scelta dipende spesso da fattori quali caratteristiche del campione, tipi di funghi da ricercare, costo e disponibilità di detti terreni, scopo dell'indagine (isolamento primario o secondario, studio morfologico, conservazione del micete, ecc.), nonché dalle personali esperienze/preferenze del personale addetto. In ogni caso, la batteria di terreni deve comprendere terreni contenenti antibiotici, per ridurre al massimo la sovracrescita da parte della flora batterica eventualmente presente. In alcuni casi può essere utile utilizzare anche terreni addizionati con cicloesimide (Actidione®), che, inibendo la crescita della maggior parte dei funghi saprofiti, consente l'isolamento di miceti a lenta crescita, quali i Dermatofiti, che in caso contrario verrebbero mascherati dalla sovracrescita dei contaminanti. Il terreno con cicloesimide non può essere utilizzato tuttavia da solo, perché notoriamente inibisce la crescita di molti miceti sicuramente patogeni, come i Dimorfi, e di altri miceti opportunisti (*Cryptococcus neoformans*, *Penicillium marneffeii*, *Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium apiospermum*, alcune specie di *Candida* e la maggior parte degli Zigomiceti).

E' molto importante che i campioni vengano inoculati nel più breve tempo possibile dopo l'arrivo in Laboratorio, poiché molti miceti sono assai labili al di fuori dell'organismo; in caso contrario il materiale deve essere conservato in frigorifero (2-8° C) fino al momento della semina.

La temperatura ottimale di incubazione per i miceti è 30° C, ma una temperatura ambientale di 25°C a volte consente un regolare sviluppo fungino. La crescita fungina a 35°C è generalmente comune per i lieviti, in particolare del genere *Candida*, mentre può esprimere l'adattamento all'ospite da parte dei miceti filamentosi, da cui l'importanza di un'incubazione anche a questa temperatura. Si può utilizzare una temperatura di incubazione di 35-37°C; qualora vi sia il sospetto della presenza di miceti dimorfi: il Laboratorio deve inoculare due set di piastre, uno dei quali viene incubato a 35-37° C, mentre l'altro viene tenuto a temperatura ambiente (25°C).

I tempi di incubazione variano a seconda del tipo di miceti da isolare: infatti si passa dalle 48-72 ore per la maggior parte dei lieviti ai 3-4 giorni per gli ifomiceti a crescita rapida (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., Zigomiceti), per arrivare alle 3-4 settimane di incubazione a volte necessarie per i Dermatofiti e per i Dimorfi.

L'impiego di capsule Petri presenta i vantaggi di una migliore aerazione, di una maggiore superficie di isolamento, nonché i requisiti di maneggevolezza e di facilità di osservazione, accompagnandosi, tuttavia, ad una maggiore disidratazione del terreno, da cui l'opportunità di un contenuto di terreno di 40 mL e di una chiusura con materiali che permettano di mantenere un'umidità del 30-40%, consentendo al contempo gli scambi gassosi (ad es. Parafilm®). L'impiego di provette si traduce in una maggiore stabilità e sicurezza, nell'occupazione di uno spazio minore e nel consumo di una minore quantità di substrato. La chiusura con tappo a vite non deve essere ermetica, in modo da consentire una continua aerazione.

I miceti del genere *Malassezia* (*M. furfur* e *M. pachidermatis*) che, seppur raramente, possono essere causa di sepsi da CVC, per svilupparsi richiedono un arricchimento del *medium* con lipidi; ciò si realizza utilizzando un terreno contenente il Tween 80 oppure, più semplicemente, strisciando un velo di olio di oliva sulla superficie del SDA appena seminato.

Di seguito vengono citati alcuni dei terreni di più frequente utilizzo in campo micologico (per una rassegna più dettagliata si consiglia di consultare alcuni dei Manuali disponibili):

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI
Rimini, 18-21 ottobre 2015

Agar Destrosio di Sabouraud (SDA)

E' il terreno normalmente utilizzato per l'isolamento primario dei miceti, spesso con aggiunta di antibiotici come cloramfenicolo e/o gentamicina. Se si aggiunge anche la cicloesimide diventa un terreno selettivo per l'isolamento dei Dermatofiti. Tale terreno consente la rilevazione della morfologia "standard", non permettendo le migliori condizioni di crescita o di sporulazione.

Agar Destrosio di Sabouraud modificato secondo Emmons

Terreno impiegato per coltura e identificazione di miceti patogeni. La concentrazione di glucosio, ridotta al 20%, consente di incrementare la sporulazione dei miceti con scarso sviluppo di corpi fruttiferi.

Agar infuso cuore-cervello (BHI)

Può essere utilizzato per l'isolamento di miceti che richiedono terreni più ricchi; l'aggiunta di antibiotici, quali il cloramfenicolo, può essere utile per prevenire la sovracrescita batterica. Viene utilizzato soprattutto per l'isolamento e mantenimento di miceti dimorfi (*H. capsulatum*), muffe e lieviti. Una volta isolato, il microorganismo deve essere sottocolturato su terreno privo di sangue per indurre la conidiogenesi.

Agar patata-destrosio (PDA)

Viene utilizzato soprattutto per stimolare la produzione di conidi da parte dei miceti filamentosi, risultando utile per l'identificazione mediante la tecnica della coltura su vetrino.

Agar all'estratto di malto (MEA)

Terreno impiegato per l'isolamento e la determinazione di lieviti e muffe, in particolare negli alimenti, nel latte e nei suoi derivati; è utilizzato anche per l'isolamento (Zigomiceti), l'identificazione e il mantenimento dei funghi.

Terreno di Czapek

E' un terreno povero, costituito da una soluzione contenente vari sali, a cui viene aggiunto del saccarosio. Viene utilizzato per studi tassonomici e morfologici. Il terreno può essere impiegato per mettere in luce clamidospore, blastoconidi e artroconidi e per indurre la riproduzione di conidi da parte di *Aspergillus* spp. e di *Penicillium* spp.
Agar con farina di mais (CMA) o con estratti di riso (RAT) addizionato con Tween 80®

Vengono utilizzati per indurre la produzione di clamidospore da parte di *Candida albicans* e di pseudomicelio da parte di altre specie di *Candida*.

Terreni cromogenici

Alcuni ricercatori hanno messo a punto terreni particolari, contenenti alcuni substrati che consentono di ottenere colonie pigmentate. Il primo è stato il terreno preparato con i semi di *Guizotia abyssinica* (una pianta simile al lino coltivata in aree tropicali), che veniva utilizzato per il riconoscimento selettivo della presenza di *Cryptococcus neoformans* in base al colore marron-nerastro delle colonie. Successivamente è stato formulato il terreno di Nickerson (detto anche BiGGY Agar: Bismuth sulfite-Glucose-Glycine-Yeast), contenente sali di bismuto, che consentiva l'identificazione presuntiva di alcune specie di *Candida* in base al colore delle colonie (capacità solfito-riducente della specie); il limite nell'utilizzo di questo terreno dipendeva dal fatto che tutte le

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

specie coinvolte assumevano tonalità differenti di marrone, generando spesso dei dubbi interpretativi. Un'ulteriore variante è rappresentata dal terreno di Pagano-Levin, contenente sali di tetrazolio, in grado, in base alla capacità di ridurre tali sali, di produrre colonie bianco-rosa-viola, per la differenziazione di lieviti. Terreni a base di sali di Tetrazolio sono stati utilizzati con successo per la tipizzazione intraspecie (morfotipizzazione) di *Candida* e di altri lieviti, in base al colore (bianco oppure rosa, più o meno intenso) ed all'aspetto morfologico-strutturale delle colonie. Sono oggi disponibili in commercio terreni policromogenici che consentono l'identificazione delle principali specie del genere *Candida*; alcuni permettono di individuare solo le colonie di *C.albicans*, mentre altri permettono l'identificazione presuntiva di alcune delle specie di *Candida* di più frequente isolamento in base al colore delle colonie. I terreni cromogenici, comunque, non devono essere usati in sostituzione dei terreni classici, perché i composti cromogeni presenti nella loro composizione spesso alterano le caratteristiche tintoriali delle colonie dei miceti filamentosi.

Nel sospetto di un episodio di fungemia è utile l'esecuzione di set di emocolture con flaconi per microrganismi aerobi previsti dai sistemi per la gestione automatica delle emocolture presenti in commercio, oppure flaconi con *medium* liquidi, specifici per miceti. Lo sviluppo dei lieviti in coltura si realizza, nella maggioranza dei casi, entro i primi 4 giorni di incubazione, anche se, va ricordato, la sensibilità dell'indagine è limitata (50-60%) in relazione a differenti fattori, quali il distretto corporeo interessato, la tipologia di paziente, la bassa carica fungina presente nel torrente circolatorio. L'indagine emocolturale per miceti filamentosi raramente consente l'isolamento del microrganismo responsabile (fusariosi, scedosporidiosi) e per lo più in fase avanzata di infezione.

Identificazione dei miceti

L'identificazione corretta dei miceti isolati ha rilevanza sia prognostica che terapeutica ed ogni laboratorio microbiologico dovrebbe essere organizzato sia nei mezzi che nelle persone per la sua compiuta esecuzione.

Ciò è oggi abbastanza semplice per quanto riguarda l'identificazione dei miceti lieviformi, grazie ai progressi ed ai miglioramenti delle prestazioni delle strumentazioni disponibili in commercio.

Più complicata, e spesso ancora oggi perseguita solo da un ristretto numero di "iniziati", è la corretta identificazione dei miceti filamentosi eventualmente isolati dai campioni clinici: infatti essa richiede l'osservazione della morfologia macro- e microscopica delle colonie isolate e il riconoscimento di particolari elementi fungini che consentano un inquadramento a livello di genere-specie del microrganismo.

Un aiuto alla diagnosi micologica viene oggi offerto dalla spettrometria di massa che può competere con le più note e finora più usate tecniche molecolari genetiche. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI TOF-MS) è infatti una tecnica spettrometrica, di recente introduzione in microbiologia, da ritenersi come "rivoluzionaria" in quanto in grado di determinare una identificazione rapida ed accurata dei batteri, dei lieviti e dei funghi filamentosi, isolati su terreno solido, da cui l'importanza della crescita culturale.

Con gli analizzatori di ultima generazione la spettrometria di massa entra a far parte dell'equipaggiamento del laboratorio di microbiologia proponendosi di cambiare i modi e i tempi di lavorazione delle metodiche di identificazione dei microrganismi e, in futuro, dell'esecuzione dei *test* di suscettibilità agli antibiotici e agli antifungini.

Sono stati condotti vari studi sull'utilizzo della tecnica MALDI-TOF direttamente sui campioni biologici. La presenza tuttavia di proteine e di emoglobina, ad esempio nelle emocolture, può interferire con gli spettri generati e causare problemi di identificazione. Vari gruppi di ricercatori hanno messo a punto particolari metodiche per l'uso diretto con risultati spesso molto differenti tra loro: in molti casi sono state utilizzate emocolture "simulate" che spesso danno risultati molto diversi rispetto a quelli ottenuti nella routine del Laboratorio di Microbiologia Clinica.

Recentemente un'importante studio condotto presso due Laboratori su un totale di 346 emocolture positive per lieviti ha evidenziato che MALDI-TOF consentiva una corretta identificazione del 95% di *C. albicans* e dell'86.5% delle specie di *Candida non-albicans* se paragonato alle tecniche tradizionali di identificazione

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

basate sull'esame colturale. Ciò suggerisce l'ipotesi che il MALDI-TOF possa diventare una metodica di routine per la ricerca diretta e l'identificazione di molte specie di *Candida* spp. nelle emocolture positive.

L'utilizzo della spettrometria di massa per l'identificazione dei miceti filamentosi presenta invece alcune problematiche legate a vari fattori, quali, ad esempio, l'età della coltura, perché il corredo proteico della parete delle ife vegetative è spesso diverso da quello dei conidi e le modalità di crescita del micete (crescita anamorfa, teleomorfa). Inoltre, per ottenere un buon risultato, spesso il campione deve essere sottoposto a vari passaggi per l'estrazione delle proteine con diversi reagenti chimici come acetone, alcool etilico e acido formico.

Un problema non indifferente è inoltre rappresentato dal database dei vari strumenti disponibili in commercio, che spesso è carente per quanto riguarda gli spettri di riferimento dei miceti filamentosi.

Per una completa e più aggiornata rassegna delle metodiche colturali e di identificazione dei miceti si consiglia di consultare il Manual of Clinical Microbiology, 11th edition, ASM Press (2015).

Diagnosi immunologica

(Esther Manso e Elisabetta Blasi)

Gruppi di studio internazionali hanno revisionato e pubblicato i criteri diagnostici condivisi per le infezioni fungine invasive (IFI), includendo i test sierologici. L'applicazione di questi criteri oltre a consolidare il percorso diagnostico può contribuire a migliorare l'*outcome* clinico del paziente. Nel presente capitolo, verrà trattata la diagnosi sierologica delle infezioni da *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e altri miceti.

Glucuronoxilomannano

Cryptococcus neoformans e *Cryptococcus gattii* presentano un antigene (Ag) capsulare (glucuronoxilomannano) che può essere determinato, mediante test disponibili in commercio, nel liquor, nel siero e nelle urine di soggetti infetti. Tutti i campioni di liquor che provengono da pazienti immuno-compromessi, con sarcoidosi o con tumori maligni o che mostrano concentrazioni anomale di glucosio, proteine o un elevato numero di leucociti nel sangue senza una spiegazione adeguata, devono essere sottoposti alla ricerca dell'Ag di *Cryptococcus*. I campioni di siero prelevati da pazienti immuno-compromessi con sospetta meningite criptococcica, per i quali non è reperibile un campione di liquor (ad esempio quando la puntura lombare è controindicata), devono essere saggiati per la ricerca dell'Ag criptococcico.

La determinazione dell'Ag capsulare di *Cryptococcus* può essere eseguita mediante test di agglutinazione (LA), test immunoenzimatici (EIA) o con il nuovo test "lateral flow assay" (LFA). La sensibilità di alcuni test nel siero aumenta quando questo viene pretrattato con pronase. LA e EIA hanno mostrato una elevata concordanza sia nel siero che nel liquor (> 93-98%). LFA è un test immuno-cromatografico molto semplice, basato sul principio del "capillary flow sandwich"; può essere facilmente utilizzato come test di screening nei "point of care" e permette anche la titolazione semi-quantitativa dell'Ag criptococcico. LFA mostra elevati livelli di sensibilità e specificità; la sua concordanza con EIA e LA è notevole. LFA è in grado di rilevare tutti i sierotipi (A-D) di *Cryptococcus* e comunque con elevata sensibilità; è stato approvato dall'FDA, sia per testare campioni di siero che liquor. Nel caso in cui venga utilizzato su siero, il saggio non richiede il pretrattamento del campione con pronase.

Il monitoraggio del titolo dell'Ag di *Cryptococcus* nel siero di pazienti HIV-positivi si è dimostrato inefficace, mentre è ancora dibattuta la sua utilità nel paziente non-HIV, sia per monitorare la risposta terapeutica (CIII) che per predire l'*outcome* (BIII).

Significativo per la risposta terapeutica è l'abbassamento del titolo antigenico nel liquor: la maggior parte dei pazienti con criptococcosi meningea, che risponde alla terapia, presenta una diminuzione del titolo Ag nel liquor di 4 volte.

Galattomannano

Il galattomannano (GM) è un componente importante della parete cellulare di *Aspergillus* spp (e di pochi altri funghi); viene rilasciato nel torrente circolatorio durante la rapida crescita delle ife che invadono i tessuti. Si ritiene che il rilascio di GM sia dovuto anche alla lisi della parete cellulare che può avvenire quando i nutrienti

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

sono scarsi e/o lo sviluppo fungino risulta limitato dalla risposta dell'ospite e/o i tessuti necrotici diventano ipossici. Una volta in circolo, il GM viene sequestrato ed eliminato dai macrofagi e dai reni; per questo motivo, la sua presenza nel siero di soggetti con Aspergillosi Invasiva (AI) può essere fugace e intermittente.

Esiste attualmente un unico kit commerciale per la rilevazione del GM su siero e campioni respiratori, il "Platelia *Aspergillus* Ag" (Bio-Rad Laboratories, Marne-La-Coquette, Francia) approvato dall'FDA nel 2006 per adulti e bambini. Il test è un EIA *sandwich immunoassay*, dove lo stesso anticorpo monoclonale utilizzato per rivestire i pozzetti è utilizzato anche per rilevare il GM eventualmente presente nel campione biologico. La concentrazione di GM viene espressa come un indice; nel caso di campioni di siero, si raccomanda di considerare la positività rispetto ai seguenti cut-off: ≥ 0.5 in 2 sieri consecutivi o ≥ 0.7 in un unico campione. E' da ricordare che il valore di un singolo test del GM in pazienti con sospetta aspergillosi invasiva è meno accurato.

Il GM viene comunemente rilevato nel siero o nel plasma, ma può anche essere presente nel BAL, nell'espettorato, nel liquor e in altri liquidi biologici. Il cut-off più utilizzato per la positività del GM nel BAL è un indice ≥ 1 , sebbene il cut-off raccomandato dalla Ditta sia 0.5 sia per il siero che per il BAL. Nel liquor il valore di cut-off è ≥ 0.5 .

La performance del GM varia a seconda dei differenti gruppi di pazienti studiati. La miglior performance del GM nel siero è stata osservata principalmente nei pazienti sottoposti a chemioterapia, come i pazienti con malattie onco-ematologiche (sensibilità: 58%, specificità: 95%) e riceventi un trapianto di midollo osseo allogenico (HSCT) (sensibilità: 65%, specificità: 65%), rispetto ai trapiantati d'organo solido (sensibilità: 41%, specificità: 85%). La specificità è minore nei pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali e nei bambini (65 e 60% rispettivamente, con frequenti falsi-positivi in queste popolazioni). E' stato rilevato inoltre che, nei pazienti ematologici, la sensibilità del GM è funzione del numero dei neutrofilici circolanti: nei soggetti che hanno una conta di neutrofilici $<100/\text{mm}^3$ la sensibilità è del 61%, mentre in quelli con una conta >100 la sensibilità scende al 19%. Le differenze nella performance del GM sono dovute probabilmente a differenze nella patogenesi della malattia aspergillare, che si osservano nei vari tipi di pazienti. Se l'AI è angio-invasiva, come avviene nei pazienti neutropenici, dove la risposta immunitaria è scarsa, il GM è positivo nel siero. Nei pazienti non-neutropenici, un'inflammatione locale significativa limita l'angio-invasione e di conseguenza la dispersione di GM in circolo, per cui risulta ridotta l'efficacia del saggio per la ricerca del GM.

La determinazione di un *biomarker* di *Aspergillus* come il GM, può essere effettuata sia nel BAL e nel siero, in quanto queste due matrici forniscono informazioni complementari. L'infezione è diagnosticata in alcuni pazienti tramite la presenza di GM nel siero e non nel BAL, oppure viceversa; altre volte, risultano positivi al test GM sia il siero che il BAL. Se l'AI è localizzata solamente a livello polmonare, il GM è positivo principalmente nelle secrezioni respiratorie. Per quanto riguarda la determinazione del GM su BAL, una meta-analisi, che comprende 30 studi, ha riportato una sensibilità dell'87% ed una specificità dell'89%.

Nell'utilizzo del test per *screening*, come per altri test, la prevalenza di AI (la probabilità pre-test) influenza la performance del GM, particolarmente il valore predittivo positivo, che si incrementa nel siero dal 31% in una popolazione con il 5% di prevalenza al 69% quando la prevalenza è del 20%. Nel caso di indagini su BAL, in una popolazione a rischio con prevalenza di malattia del 12%, la probabilità di AI provata o probabile raggiunge il 67% nei casi GM positivi, mentre diminuisce all'1% nei soggetti GM negativi.

La ricerca di GM permette una diagnosi precoce di AI. Da sottolineare il fatto che la positività del test nel siero precede frequentemente, di almeno 1 settimana, lo sviluppo dei segni clinici, le anomalie radiologiche e la crescita del micete in coltura.

I livelli di GM rilevati nel siero sono utili anche per la prognosi: valori molto alti all'inizio di una terapia antifungina sono associati ad una prognosi peggiore; l'antigenemia persistente, con indice >1 durante la terapia è segno di fallimento terapeutico; la negativizzazione del test GM nelle prime 2 settimane di terapia, si associa ad una maggiore possibilità di sopravvivenza.

Il GM non si trova solo in *Aspergillus* spp, ma è presente e viene rilasciato in diverse quantità da altri miceti, come *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Cryptococcus* e *Saprochaete capitata* (prima *Geotrichum capitatum*).

Uno dei problemi legati all'utilizzo del GM è la possibilità di falsi positivi, dovuti alla presenza della molecola in preparati di antibiotici come la piperacillina-tazobactam, amoxicillina-clavulanato; ultimamente si vedono

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI
Rimini, 18-21 ottobre 2015

meno falsi positivi con queste molecole, probabilmente per cambiamenti effettuati nella loro produzione. Di recente stato sviluppato il lateral flow assay (*Aspergillus* LFD), che consente di rilevare mediante anticorpi monoclonali la presenza di antigeni GM-simili ed è perciò utilizzabile come potenziale test diagnostico rapido di AI; il sistema ha dimostrato una buona sensibilità e specificità, sia su siero, dove la performance è comparabile a quella del GM e della PCR, sia su BAL. La lettura di questo test è a volte problematica dato che in alcuni casi le bande sono poco visibili.

Indicazioni	Vantaggi	Svantaggi
Diagnosi precoce di aspergillosi invasiva (IA) Screening: 2 campioni di siero/settimana Indice cut-off positivo >0.5 (2 campioni) Indice cut-off positivo >0.7 (1 campione)	Test di screening nei pazienti ad alto rischio di IA Riproducibile Buona sensibilità e specificità Negli adulti neutropenici Nei bambini neutropenici Valore prognostico: >1 (siero): segno di fallimento terapeutico negli adulti e nei bambini Quantificazione nel BAL (cut-off >1) e CSF (cut-off >0.5) (utile nei pazienti neutropenici e non)	Nei pazienti non-neutropenici: non ha lo stesso valore diagnostico e prognostico Possibilità di falsi + e - La terapia con antifungini può avere impatto sulla sensibilità Rileva anche <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Alternaria</i> e <i>Histoplasma</i>

TABELLA - Galattomannano: vantaggi e svantaggi (Lackner M, Curr Pharm Res, 2013; Norkin M, JNCCN, 2013)

Mannano/anti-mannano

Il mannano (Mn) è un componente altamente immunogenico della parete cellulare di *Candida*, il quale si ritrova comunemente nel sangue di soggetti che sviluppano un'infezione invasiva. Per questo motivo, a fini diagnostici, sono stati sviluppati e sono presenti sul mercato test immunoenzimatici per la determinazione sia dei livelli di Mn che degli anticorpi anti-Mn (Anti-Mn) nel siero (Platelia *Candida* Ag Plus e Platelia *Candida* Ab Plus, Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, Francia).

La determinazione simultanea dei due parametri, Mn e Anti-Mn è una strategia raccomandata dall'ESCMID per la diagnosi di candidemia. Come risulta dai dati ottenuti in 14 studi con 453 pazienti e 767 controlli, la determinazione combinata Mn e Anti-Mn è più efficace rispetto alla singola rilevazione (83% di sensibilità per Mn/Anti-Mn versus 58 e 59% per solo Mn e solo Anti-Mn, rispettivamente).

La ricerca di Mn/Anti-Mn deve essere eseguita su campioni serati. I cut-off, indicati dal produttore, sono di 0.5 ng/mL per il Mn e 10 unità/mL per l'Anti-Mn, mentre sono considerati indeterminati valori compresi tra 0.25-0.5 ng/mL per il Mn e 5-10 unità/mL per l'Anti-Mn. La sensibilità dell'indagine dipende anche dalla specie di *Candida* responsabile dell'infezione; in particolare, è massima in caso di infezione da *C. albicans* e poi gradatamente decresce nei casi dovuti a *C. glabrata* o *C. tropicalis*, e quindi a *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. kefyr*.

L'utilità dell'indagine basata sulla ricerca di Mn/Anti-Mn è legata anche al fatto che essa consente di rilevare precocemente un'infezione da *Candida*, anticipando di diversi giorni la positività delle emocolture, sia in pazienti ematologici che nei ricoverati delle terapie intensive (ICU). Inoltre, l'utilizzo combinato dei test Mn/Anti-Mn ha un elevato potere predittivo negativo (>85%) e può pertanto essere utile per escludere una candidemia.

L'uso combinato dei due parametri Mn/Anti-Mn è raccomandato anche dall'ESCMID per la diagnosi di candidosi disseminata cronica (livello II); la sensibilità riportata è dell'86% e, anche in questi casi, il sistema può

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI
Rimini, 18-21 ottobre 2015

anticipare di molto la positività delle colture, anche fino a 16 giorni. Diversamente, l'ESCMID non raccomanda questo test per la diagnosi di candidosi invasiva. In conclusione, in pazienti con sospetta candidemia ma con emocolture negative, la determinazione simultanea dei marcatori Mn/Anti-Mn può fornire una indicazione determinante per il clinico, soprattutto alla luce del fatto che facilitando una diagnosi precoce può consentire l'inizio tempestivo della terapia antifungina e quindi migliorare l'*outcome* del paziente.

Indicazioni	Vantaggi	Svantaggi
Candidemia	Buona sensibilità e specificità, se combinati, in pazienti in ICU Diagnosi precoce rispetto ai risultati dell'emocoltura Combinazione dei 2 test raccomandata dall' ESCMID Diagnostic & Management Guideline for Candida Diseases 2012 & Surviving Sepsis Campaign Elevato valore predittivo negativo	Esperienza limitata Test non contenuto tra i criteri EORTC/MSG La sensibilità e specificità erano del 89.3% e del 63.0% per l'antigene mannano+anticorpi anti-mannano Candida Ag Plus <i>assay</i> rileva meno le fungemia da <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. guilliermondii</i>

TABELLA - Mannano/antimannano: vantaggi e limiti della determinazione di Mannano/Anti-mannano (Mikulska, 2010; Held 2013)

1,3-β-D-glucano

L'1,3-β-D-glucano (BDG) è un carboidrato abbondantemente presente nella parete cellulare dei miceti ed è prodotto *in vivo* durante l'infezione da parte di diversi patogeni importanti (*Candida* spp, *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp e *P. jirovecii*); diversamente, non è prodotto o non è presente nel siero in quantità rilevabili nel caso di infezioni da *Cryptococcus* o Zigomiceti.

Il test per la determinazione del BDG è considerato un metodo diagnostico panfungino, seppur con le dovute eccezioni. E' stato approvato dall'FDA come ausilio nel percorso diagnostico di micosi invasiva, con l'indubbio vantaggio di fornire indicazioni molto precocemente, rispetto ai metodi convenzionali. Il BDG è stato inserito tra i criteri micologici per la diagnosi di IFI probabile proposti dell'EORTC/MSG. Essendo effettuato su siero, il test BDG si presta per la determinazione seriatata nello screening dei pazienti ad alto rischio.

Sono stati messi a punto e commercializzati diversi kit per la determinazione del BGD nel siero. In Europa e in America, il più utilizzato è il Fungitell (Associated of Cape Cod, Inc.). L'esecuzione del test esige l'utilizzo di materiale e ambiente "glucan-free"; si raccomandano determinazioni seriali (almeno 2 a settimana); i valori di cut-off indicati dal produttore sono ≥ 80 pg/mL per la positività e ≤ 60 pg/mL per la negatività, mentre i valori compresi tra 60 e 80 pg/mL sono considerati borderline. I risultati positivi devono essere considerati ed interpretati attentamente, alla luce del fatto che possono esserci dei falsi positivi legati all'impiego di emoderivati, albumina, emodialisi, immunoglobuline somministrate per via endovenosa, antibiotici beta-lattamici, garze, concomitanti infezioni da batteri Gram positivi.

Come sottolineato dalle diverse indagini di meta-analisi, le differenze riscontrate in termini di performance del BDG possono essere ricondotte alla eterogeneità delle popolazioni studiate, dei criteri diagnostici, del disegno dello studio, ecc. In tre meta-analisi riportate da Mikulska 2015, che comprendono dati relativi a candidosi invasiva ed aspergillosi, è stata riportata una sensibilità del test BDG $\geq 76\%$ ed una specificità $\geq 82\%$.

In sintesi, la performance del test BDG è particolarmente elevata nei casi di pneumocistosi e candidosi invasiva, seguiti dai casi di aspergillosi invasiva. Il valore predittivo negativo molto alto rappresenta un valore aggiunto importante di questo saggio nella pratica clinica.

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI
Rimini, 18-21 ottobre 2015

L'ESCMID raccomanda (livello II) il test BDG nella diagnosi di candidemia, candidosi invasiva e candidosi disseminata cronica.

Il ruolo del test BDG nella diagnostica di aspergillosi/candidosi nei pazienti ematologici rimane al momento controverso. La determinazione del BDG è stata introdotta dall'ECIL-3 come criterio diagnostico di IFI (BII) nei pazienti ematologici ad alto rischio (leucemia acuta con neutropenia prolungata dopo chemioterapia di induzione/consolidamento o nei riceventi di trapianto di midollo osseo allogenico).

In una meta-analisi relativa a studi su pazienti ematologici e trapiantati di midollo con IFI provata o probabile, la performance migliore del test BDG si ottiene considerando 2 sieri consecutivi positivi: in tal caso, la specificità raggiunge il 98,96% mentre la sensibilità scende al 49,6%. I valori predittivi positivi e negativi, in una popolazione con una prevalenza di IFI del 10%, sono rispettivamente 83,5% e 94,6%.

L'utilizzo del test BDG è anche indicato dalle linee-guida per la gestione della sepsi nella "Surviving Sepsis Campaign: 2012" per fare diagnosi differenziale di candidiasi invasiva.

Nell'AI, la relazione tra cinetica del BDG ed *outcome* clinico è ancora oggetto di studio. I livelli di BDG declinano lentamente nella maggior parte dei pazienti con aspergillosi invasiva, candidosi invasiva e pneumocistosi, nonostante una terapia antifungina appropriata e talvolta persistono sopra il valore di cut-off per lungo tempo dopo la risoluzione clinica dell'infezione.

Indicazioni	Vantaggi	Svantaggi
Diagnosi precoce di IFI in pazienti critici 2 campioni /settimana (minimo)	Marker pan-fungino (tranne poche eccezioni) Marker precoce di infezione Riproducibile 37% dei risultati falsi positivi: 1 x 80 pg/mL 23% di risultati falsi positivi: 2 x 80 pg/mL Sensibilità legata alla tipologia del paziente Prime evidenze di valore prognostico Più accurato nei pazienti delle terapie intensive (rispetto a emocoltura), con infezione profonda da Candida	Esperienza limitata Risultati falsi negativi: non rileva <i>Mucorales</i> e <i>C. neoformans</i> Risultati falsi positivi: emoderivati, dialisi, beta-lattamici, batteriemia Valore di cut-off non ben definito (Fungitell ≥ 80 pg/mL) Con terapia appropriata, declina <u>lentamente</u> ? nella maggior parte dei pazienti con IA, IC e PCP Può persistere sopra il limite di positività per lungo tempo dopo la risoluzione clinica dell'infezione primaria No dati sui pazienti pediatrici Meno accurato nei pazienti ematologici

TABELLA - 1,3- β -D-glucano: vantaggi e svantaggi (Hanson KE, PLoSOne, 2012; Koo S, CMI, 2012; Jaijakul S, CID 2012)

Nello studio di S. Jaijakul et al (2012), effettuato su 257 pazienti con candidiasi invasiva provata (53% non-*Candida albicans*) e trattamento con anidulafungina, si osserva una correlazione significativa tra la riduzione dei livelli di BDG e il successo del trattamento, mentre, nei casi di fallimento terapeutico, i livelli di BDG tendono ad aumentare. La sensibilità del BDG è simile nei riguardi delle differenti specie di *Candida*, con l'eccezione di *C. parapsilosis* e *C. glabrata* verso cui la sensibilità è più bassa. La terapia empirica con antifungini non riduce la sensibilità globale del BDG. Il test non è stato ancora validato nei pazienti pediatrici.

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

Sebbene licenziato per indagini su siero, il test BDG ha dato risultati positivi anche su campioni di liquor da pazienti con diversi tipi di infezioni del sistema nervoso centrale (aspergillosi, candidosi, istoplasmosi o altri miceti filamentosi).

Anticorpi

Rispetto ad altre infezioni, la diagnosi sierologica delle IFI presenta alcune complicazioni:

1. L'interpretazione del risultato positivo (presenza di anticorpi) è condizionato dal fatto che la maggior parte delle IFI è di tipo opportunistico, ovvero dovuta a patogeni che colonizzano anche soggetti sani (ad esempio la *Candida* è un commensale delle nostre mucose); quindi, la presenza di anticorpi può indicare l'infezione invasiva, ma anche la semplice colonizzazione, o addirittura essere legata a fenomeni allergici (come nell'aspergillosi allergica).
2. I soggetti a rischio di IFI sono soprattutto i soggetti immuno-compromessi; in tali pazienti la produzione di anticorpi può essere ridotta.
3. La produzione di anticorpi, dovuta alla risposta immunitaria specifica, richiede alcune settimane per raggiungere livelli apprezzabili; questo in un contesto grave e urgente come quello delle IFI può essere estremamente limitante.

Attualmente, sono disponibili diversi kit commerciali per la ricerca di anticorpi sierici diretti contro antigeni fungini: nel complesso, la sensibilità di questi metodi varia dal 17%-90%.

Le performance di alcune fra queste metodiche sono riportate in Tabella.

TABELLA Performance di alcuni test per la ricerca di anticorpi verso antigeni fungini

Anticorpi ricercati	Sensibilità %	Specificità %
anti-MsgC1 (<i>P. jirovecii</i>)*	57,2-63,4	61,7-100
anti-CAGTA (<i>Candida</i>)	77-89	91-100
anti-mannano (<i>Candida</i>)	60-89	80-84

*Saggio non commerciale

La ricerca di anticorpi anti tubulo germinativo di *C. albicans* (IFA IgG, Vircell, Spain) ha dimostrato una buona performance del sistema; ulteriori studi sono necessari per valutarne l'impatto nella pratica clinica. La ricerca di anticorpi anti-*P.jirovecii* a fini diagnostici è al momento documentata solo dallo studio di Djawe, K. *et al.* (2010).

La ricerca di anticorpi anti-mannano acquisisce maggior significato se associata alla rilevazione dell'antigene mannanico, come dettagliato sopra.

Indagini recenti forniscono le prime indicazioni sulla efficacia diagnostica di un nuovo approccio basato sulla tecnologia del microarray di proteine. Grazie a piattaforme miniaturizzate e multi-parametriche che determinano in modo qualitativo e quantitativo la presenza di anticorpi serici, sia IgG che IgM verso specifici antigeni di *C. albicans*, è possibile identificare profili sierologici riconducibili a condizioni di colonizzazione, candidiasi profonda o convalescenza. Analogamente, è stata messa a punto una piattaforma, il MYCO-array, in grado di fornire in poche ore una diagnosi sierologica di micosi primitive endemiche, dovute a *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*. Mentre l'approccio diagnostico convenzionale è caratterizzato da notevoli limitazioni, ad esempio prevede tecniche poco sensibili e procedimenti lunghi, come la doppia immunodiffusione in agar, o l'EIA, per la diagnosi sierologica di istoplasmosi e coccidioidomicosi, la disponibilità di nuove piattaforme miniaturizzate e multi-parametriche potrebbe semplificare notevolmente l'iter diagnostico soprattutto in un paese non endemico come il nostro. Si auspicano studi ulteriori che possano portare alla validazione clinica di queste piattaforme diagnostiche al momento utilizzate soltanto nell'ambito di ricerca.

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

La ricerca di IgG specifiche anti-*Aspergillus* mediante ELISA nei pazienti con aspergillosi acuta invasiva è positiva nel 48% dei pazienti non neutropenici, mentre lo è solo nel 6% dei neutropenici. Ci vogliono in media circa 11 giorni per sviluppare anticorpi durante la malattia acuta; per questo motivo l'utilità del test è molto ridotta. La sensibilità del GM, in presenza di anticorpi anti-*Aspergillus* è minore rispetto ad una situazione di assenza di anticorpi, probabilmente a causa del legame diretto tra questi ultimi ed il GM. Pertanto la ricerca anticorpale in caso di aspergillosi invasiva può avere il valore di una diagnosi retrospettiva: un aumento delle IgG anti-*Aspergillus* può confermare la diagnosi nei pazienti che sono guariti dopo terapia empirica per sospetta aspergillosi invasiva o essere utilizzata come screening. La determinazione delle IgG anti-*Aspergillus* prima dell'inizio della terapia immunosoppressiva può identificare i pazienti colonizzati con *Aspergillus*, che beneficerebbero di una profilassi o di una terapia empirica antifungina precoce, oppure può essere utile ad uso prognostico e non diagnostico: un aumento di anticorpi alla fine della fase di immunodepressione indica una prognosi fausta, mentre, se dopo terapia antifungina i livelli di IgG anti-*Aspergillus* diminuiscono la prognosi è infausta.

Invece, in caso di aspergillosi subacuta invasiva (ad esempio, nei pazienti trapiantati di polmone) dove l'aspergillosi invasiva si sviluppa con frequenza dopo mesi dal trapianto e può evolvere lentamente, si riscontrano livelli elevati di IgG anti-*Aspergillus* nel 77-93% dei casi.

Diagnosi Molecolare

(Stefano Andreoni e Silvana Sanna)

Come precedentemente sottolineato, la diagnosi di laboratorio delle infezioni fungine è in gran parte dipendente da metodi microscopici e colturali, che rappresentano ancora il "gold standard" per la conferma di una micosi invasiva. Questi metodi non sempre soddisfano le esigenze clinico-diagnostiche, essendo indaginosi, di limitata sensibilità e con esiti disponibili in tempi medio-lunghi, da cui la necessità di ricorrere a tecniche diagnostiche alternative che permettano, rapidamente, il raggiungimento di una diagnosi, che escluda o confermi un'infezione fungina.

L'area più promettente per la diagnostica fungina è identificabile nello sviluppo di piattaforme di amplificazione e rilevamento di acidi nucleici per le potenzialità, l'elevata sensibilità e la rapida disponibilità di risultati, in grado di fornire conferme sulla presenza di specifici patogeni fungini, direttamente in campioni clinici. Questi test molecolari sono ampiamente utilizzati dai laboratori clinici nella diagnosi di infezioni virali e batteriche, risultando tuttavia di limitata applicazione per la diagnosi di malattie fungine.

Nel tempo si sono rese disponibili diverse piattaforme molecolari per la rilevazione qualitativa e quantitativa di miceti e per la loro identificazione. Ne sono esempi PCR *standard*, PCR-ELISA, diverse varianti di *real-time* PCR, *nested* PCR, *multiplex* PCR seguite da DNA *microarray*, sequenziamento e pirosequenziamento. Una revisione della letteratura, condotta da Khot e Fredricks nel 2009, relativa alla diagnosi di infezioni fungine umane basata su PCR, nel corso di un periodo di 10 anni, fornendo informazioni sui differenti parametri di studio, ha evidenziato che la maggior parte dei saggi molecolari sono stati sviluppati *in house*, mostrando una vasta gamma di prestazioni, in termini di sensibilità analitica e specificità. Per esempio, intervalli di sensibilità del 55-100% e di specificità del 63,5-100% sono stati segnalati in pubblicazioni (33) che descrivono test molecolari per la diagnosi di aspergillosi invasiva, mentre una gamma di sensibilità del 77-100% e una specificità del 66-100% è stata riportata per valutazioni su test molecolari per la diagnosi di candidiasi invasiva.

Revisioni sistematiche e meta-analisi si sono susseguite negli anni anche a fronte del forte aumento di pubblicazioni dal 2009 al 2012 nell'ambito di applicazioni di test molecolari per la diagnosi di infezioni fungine, in particolare per le diagnosi di aspergillosi e candidiasi invasiva. Tuttavia, la maggior parte degli studi clinici che si avvalgono di metodologie molecolari sono stati effettuati in un numero limitato di pazienti e non sono stati ancora segnalati studi clinici prospettici di larga portata. A ciò va aggiunto che, nonostante l'aumento del numero di pubblicazioni, pochi documenti (<1%) hanno riportato i dati di *outcome* clinico associati all'impiego di test molecolari come ausilio nella gestione dei pazienti con infezioni fungine.

Barnes e collaboratori avrebbero dimostrato che un approccio diagnostico-guidato (rilevazione di antigeni e di acidi nucleici) comporterebbe una riduzione della spesa di farmaci antifungini inutili, mentre in altre

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

pubblicazioni si sottolinea il fatto che il rilevamento rapido di *Candida* sp. e *Aspergillus* sp. nel sangue e in campioni di BAL, utilizzando una PCR *in house*, vada a generare un intervento precoce, riducendo significativamente il tasso di mortalità nei pazienti con neoplasie ematologiche e sottoposti a trapianto di cellule staminali allogeniche. Altre pubblicazioni tuttavia, avrebbero mostrato che l'attuazione dei saggi *in house* PCR non comporti un miglioramento dell'*outcome* clinico dei pazienti. Se i dati relativi agli *outcome* clinici sono limitati e controversi, le valutazioni sui test molecolari nel rapporto costo-efficacia sono ancora più contenute, rendendo oltremodo difficoltoso riconoscere il valore delle nuove tecnologie molecolari e la loro efficacia diagnostica.

Criticità legate all'impiego dei test molecolari

In realtà, ad oggi, nessun saggio molecolare è incluso tra i criteri stabiliti dal Gruppo di studio di cooperazione dell'Organizzazione Europea per la Ricerca e Cura del Cancro/Istituto Nazionale di allergie e malattie infettive (EORTC/MSG) (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group* per definire malattie fungine invasive. Il numero elevato di variabili presenti nei saggi molecolari crea enormi ostacoli alla loro standardizzazione, limitandone l'impiego.

Le valutazioni sul potenziale diagnostico dei metodi non colturali sono focalizzate principalmente sul paziente ematologico con grave e prolungata neutropenia ma lo spettro di pazienti immunocompromessi, e quindi a rischio di infezione fungina invasiva (IFI), è tuttavia in continua espansione e le *performance* dei *markers* diagnostici non colturali su questi pazienti non sono chiare: poiché l'angioinvasione determina l'ammontare degli antigeni circolanti e/o del DNA fungino, la presenza di lesioni segregate, senza angioinvasione, può essere associata a mancati riscontri diagnostici.

In fase preanalitica, le risultanze dei *tests* molecolari andrebbero inoltre contestualizzate con:

- a. popolazione di pazienti oggetto di valutazione (ad esempio, i pazienti trapiantati di cellule staminali rispetto a pazienti con emopatia maligna);
- b. grado di immunosoppressione;
- c. fase della malattia;
- d. trattamenti profilattico-terapeutici che possano influenzare i risultati.

Nella fase analitica devono essere presi in considerazione altri aspetti quali:

- e. la scelta dei campioni biologici da utilizzare (frazione, volume) e la frequenza di raccolta;
- f. quali siano i sistemi ottimali di estrazione e di lavaggio del DNA fungino che possano meglio influenzare le prestazioni dei test molecolari a valle;
- g. quali DNA *target* si prestino meglio per l'impiego in saggi diagnostici;
- h. quali piattaforme molecolari (real-time PCR vs. PCR convenzionale) si prestino meglio per determinare il DNA fungino.

Anche la fase interpretativa è soggetta ad alcune criticità. L'interpretazione clinica di campioni PCR-positivi può infatti non risultare agevole: campioni con test molecolare positivo con coltura negativa, se da un lato possono rappresentare veri positivi, in relazione all'alta sensibilità del sistema molecolare, di contro possono rappresentare false positività, espressione di rilevamento di DNA fungino non vitale, degradato o legato a contaminazione dei campioni o a fenomeni di colonizzazione. Tale difficoltà interpretativa è riferibile in particolare a miceti del genere *Aspergillus*, la cui diffusione ambientale, come noto, è particolarmente elevata.

Campioni clinici

Una delle criticità che condizionano la standardizzazione dei sistemi molecolari è legata alla scelta dei campioni clinici da analizzare. Le numerose esperienze riportate in letteratura hanno visto l'impiego di campioni di sangue intero così come di siero o plasma, di materiali respiratori, in particolare BAL, di liquor, di liquido peritoneale, di essudato corneale, di materiale biptico e di campioni di tessuti, a fresco o inclusi in paraffina.

Nessun *consensus* è stato ancora raggiunto su quale campione, tra siero, plasma o sangue intero, sia il più idoneo per indagini molecolari. Per accertamenti molecolari di aspergilloso invasiva, il sangue intero è stato dichiarato superiore al plasma, ma per la rilevazione di candidiasi invasiva, sono stati ritenuti preferibili campioni di siero. D'altro canto in campioni di siero può essere determinato solo DNA libero (cellule fungine eliminate con la

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

centrifugazione senza lisi cellulare), mentre nel sangue intero si ha accesso sia alla componente libera che a quella associata a cellule. La presenza di EDTA inoltre eserciterebbe un effetto inibente su DNasi presenti nel sangue, senza interferire con la PCR, mentre l'eparina presente in campioni di plasma eserciterebbe un effetto inibente sulle polimerasi. Poiché però su sangue intero vengono generalmente eseguiti lisi delle emazie, decontaminazione e lavaggio, per eliminare inibitori della PCR (emoglobina), il DNA libero probabilmente viene eliminato e il DNA intracellulare rimane come unico *target* per il dosaggio. L'uso di siero peraltro, può però offrire il vantaggio di un dosaggio simultaneo di altri *biomarkers* (GM, BG). Nondimeno, sebbene DNA aspergillare circolante possa essere rilevato in uno stadio precoce d'infezione, non sono noti come e in che forma il DNA venga liberato dal sito d'infezione e quali effetti sulla cinetica del DNA subentrino in caso di somministrazione di antifungini.

Comparazioni sulle *performance* delle differenti frazioni di sangue per i *tests* molecolari sono piuttosto limitate. In un'esperienza di Springer del 2013, viene descritta una comparazione nel rilevamento di DNA di *Aspergillus* su siero e sangue, ottenuti da pazienti ad alto rischio, selezionati tra quelli di aspergillosi invasive (IA) provate o probabili, in accordo con i criteri EORTC/MSG e in casi controllo. In base ai riscontri, non sono risultate significative differenze nell'impiego di sangue o siero per la diagnosi di IA in PCR. È risultata tuttavia la tendenza ad una maggiore sensibilità del sangue intero (85% *versus* 79%) e una maggiore precocità (36 giorni *versus* 15 giorni) comparata al siero. Di contro il riscontro di falsi positivi è ridotto dall'uso di siero, a fronte anche di una maggiore rapidità e facilità di processo, in aggiunta alla contemporaneità di impiego per test antigenici.

Uno dei maggiori svantaggi per la marcatura di DNA nel sangue è legata al fatto che entrambe le componenti, sangue intero o plasma, sono state impiegate con eliminazione delle altre frazioni. Una combinazione di entrambe le frazioni potrebbe aumentare la sensibilità complessiva del sistema, come suggerisce uno studio recente, in cui viene utilizzato un sistema di estrazione per il rilevamento di DNA derivante sia dalla componente cellulare che da quella libera.

Anche sul volume di sangue da impiegare esistono delle divergenze: nei vari studi esistenti il volume di sangue ha un *range* di variabilità da 200µl a 10ml e attualmente non sono disponibili indicazioni precise su volumi adeguati. È documentato che la concentrazione di particelle fungine nel sangue periferico di pazienti con IFI sia generalmente molto bassa e siccome la carica fungina nel sangue circolante può risultare pari a meno di 1 genoma per ml, da più parti viene raccomandato di processare da 3 a 5ml di sangue, corrispondenti al volume di sangue previsto dalla maggior parte delle provette con EDTA.

Per una diagnosi precoce di IFI, la PCR applicata a campioni di BAL risulterebbe meno promettente, rispetto a siero e plasma, per l'elevato numero di falsi positivi e per il fatto che il BAL viene spesso eseguito in pazienti in stadio avanzato di malattia. Ciò nonostante PCR su BAL risulta essere più sensibile rispetto alla coltura e ha un accettabile PVP, (valore predittivo positivo) utile ai fini diagnostici. L'aggiunta di un alto NPV (valore predittivo negativo) e la capacità di rilevare un ampio spettro di miceti, ne fanno un utile mezzo per escludere un'infezione fungina in pazienti immunocompromessi. In una revisione della letteratura, venne valutata l'efficacia della PCR su BAL per la diagnosi di AI da cui risultarono rispettivamente un 79% e 94% di sensibilità e specificità, confermando però che le possibili contaminazioni e il metodo di PCR, fossero due importanti variabili in grado di condizionare l'interpretazione del test .

L'utilizzo di tecniche molecolari su altri materiali (liquor, essudati, *scraping* corneale, cute e annessi), sia pure in singole esperienze, ha dato risultati incoraggianti in termini di sensibilità e sui tempi di risposta. Saggi molecolari sono stati impiegati per il rilevamento di patogeni fungini nel sospetto clinico di cheratite fungina. È stato condotto di recente uno studio prospettico randomizzato in un Centro di cura terziario dell'occhio per valutare 30 occhi di 30 pazienti con presunta cheratite fungina. Sono stati effettuati raschiamenti corneali su ciascun paziente e i campioni sono stati analizzati mediante *semi-nested* PCR utilizzando *primers* fungini specifici. I prodotti di PCR sono stati sequenziati per l'identificazione e confrontati con procedure convenzionali (striscio e coltura). Sui 30 campioni, la PCR ha mostrato positività nel 93,3%, la coltura in 40% e la microscopia nel 20%. La PCR non è mai risultata falsamente negativa in campioni coltura positiva. Questi risultati suggeriscono che la PCR possa essere un utile complemento alle procedure diagnostiche per una diagnosi rapida di cheratite fungina, in particolare nei casi di mancato rilevamento con procedure convenzionali.

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

Sistemi molecolari sono stati utilizzati anche su campioni tissutali freschi, fissati in formalina o inglobati in paraffina, a conferma che tali dosaggi possano essere un valido supporto all'indagine istopatologica o che comunque possano essere utilizzati in combinazione con sistemi convenzionali per l'identificazione di miceti in campioni tissutali.

Preparazione/Estrazione del Campione

La preparazione dei campioni può avere un impatto significativo sulla sensibilità e la riproducibilità di un test diagnostico molecolare e, d'altra parte, l'efficacia del sistema di estrazione risulta influenzato dal tipo di campione, dal volume e dal protocollo usato. In generale, il metodo di preparazione del campione deve consentire di rilasciare DNA intracellulare, deve poter concentrare il DNA *target* che può essere presente in quantità molto contenute e deve consentire di eliminare potenziali inibitori quali residui proteici, o altri contaminanti, senza degradare il DNA *target*. Le due principali limitazioni della PCR sono infatti rappresentate dalla difficoltà di rompere la parete cellulare di miceti per liberare DNA e la limitata sensibilità del sistema quando il dosaggio è adattato a campioni clinici come quelli di sangue, nei quali il quantitativo di DNA fungino può essere molto basso.

Per la lisi della parete fungina, necessaria all'estrazione del DNA, sono stati proposti vari metodi: trattamento termico con alcali, basse temperature con ghiaccio secco o azoto liquido, lisi meccanica o enzimatica. Anche a questo livello un accordo generale non è stato ancora raggiunto. Attualmente, ci sono molti protocolli per la preparazione dei campioni, ma un metodo universale che consenta l'estrazione, la purificazione e la concentrazione del DNA fungino in modo ottimale da campioni clinici, non è ancora disponibile. Inoltre, l'efficienza dei questi metodi, applicati a diversi campioni clinici, non risulta equivalente, in relazione anche al fatto che il DNA presente nei diversi campioni clinici è probabilmente di diversa origine.

L'utilizzo di *kits* commerciali riduce significativamente i tempi di estrazione, in particolare con sistemi automatizzati, ma l'efficienza di estrazione varia in base al metodo utilizzato.

La maggior parte dei protocolli di estrazione comunemente usati sono basati su pretrattamento enzimatico (liticasi ricombinante, zimolasi), meccanico o su entrambi, per facilitare la distruzione della parete cellulare fungina, seguiti da diversi metodi per la purificazione del DNA, compresi fenolo-cloroformio, affinità su spin-colonne o estrazione con biglie magnetiche. La presenza di possibili frammenti ifali o conidi (BAL, materiali biotici), rende più lunghi e complessi i protocolli d'estrazione.

Le prime valutazioni sulla standardizzazione dei dosaggi in PCR per AI avrebbero indicato la fase di estrazione del DNA quale *step* a maggiori criticità. Linee guida per l'estrazione e il rilevamento di DNA da sangue e siero sono state pubblicate da EAPCRI (*European Aspergillus PCR Initiative*), da cui si evince che l'efficacia del sistema di estrazione risulta influenzato dal tipo di campione e dal volume. Di fatto l'estrazione di acidi nucleici da siero implica protocolli più rapidi e meno complessi rispetto a quelli su una componente cellulare dove deve essere prevista una fase di lisi meccanica od enzimatica.

Selezione sequenze target

Nella definizione di un sistema molecolare, la scelta del *target* molecolare rappresenta un aspetto fondamentale. Quando si procede all'accertamento di popolazioni o raggruppamenti microbici, il gene o la sequenza *target* scelta devono poter contemplare regioni altamente conservate che possano garantirne il riconoscimento, così come saranno necessarie sequenze variabili che consentano discriminazioni a livello di genere/specie. L'approccio ottimale in diagnostica clinica sarebbe quello di condurre una PCR ad ampio spettro, seguita da una PCR specie-specifica per l'identificazione. Per l'identificazione di specie, non vi è ancora un consenso diffuso su quali geni debbano essere usati: sono state valutate numerose sequenze genetiche. Questi *barcode* molecolari, per essere utilizzati con successo nell'identificazione, devono essere sufficientemente variabili per concordare con una specie, con bassi livelli di variabilità intraspecifica, semplici da sequenziare (sequenziabili da *primers* standard), essere relativamente corti (\approx 500-600bp) e senza ricombinazioni. I geni *target*, inoltre, dovrebbero essere presenti in un alto numero di copie per incrementare la sensibilità del sistema, prima dell'analisi delle sequenze. L'alto numero di copie all'interno di singole cellule fornisce una sorta di amplificazione interna che incrementa la probabilità di rilevamento. Il DNA, rispetto all'RNA è ritenuto generalmente il *target* di scelta, in relazione alla sua relativa stabilità e alla facilità d'estrazione. I geni fungini ribosomiali (rRNA) forniscono un

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

eccellente *template* per le determinazioni genetiche a livello genere/specie: contengono cioè sequenze conservate che sono comuni a tutti i funghi e anche “*domains*” variabili o altamente variabili. La struttura generale della regione ribosomiale di rRNA di cellule fungine consiste di 4 geni ribosomiali (una piccola subunità a 18S, una subunità a 5.8S, una grande subunità a 25-28S, una subunità a 5S) separati da regioni ITS (*internal transcribed spacer*). I *targets* più comunemente usati per i miceti sono le regioni intrageniche non codificanti ITS1 e ITS2 poste tra le subunità ribosomiali 18S e 28S e una regione di circa 600 copie di basi nella regione D1-D2 della subunità 25-28S. Questi geni sono altamente conservati, sono presenti nel genoma fungino in multiple copie (50-100 copie) e sono sufficientemente eterogenee da fornire informazioni a livello di specie. Quando queste regioni non garantiscono una sufficiente variabilità vengono impiegati *target* alternativi (β -tubulina, calmodulina, DNA mitocondriale). L’amplificazione di sequenze multicopia altamente conservate può consentire il rilevamento di un *range* esteso di patogeni fungini con alti livelli di sensibilità, consentendo, con una post-amplificazione con tecnologia *real-time* di specifiche sequenze di DNA, un’identificazione genere/specie specifica. Le tecniche post-analisi più utilizzate si basano su differenze nei profili di restrizione enzimatica (RFLP: *restriction fragment length polymorphism*), sull’utilizzo di sonde specifiche, mediante saggi di ibridazione (immunoenzimatica o in fluorescenza), sul sequenziamento degli ampliconi o sull’analisi dei polimorfismi conformazionali.

Piattaforme di amplificazione

L’aumentata necessità di approcci diagnostici più rapidi, ha portato, negli ultimi decenni, allo sviluppo di una vasta gamma di sistemi molecolari. L’amplificazione di DNA *target* mediante PCR rappresenta la piattaforma molecolare più utilizzata. Differenti sistemi *in-house* e commerciali sono stati sviluppati per la determinazione qualitativa e quantitativa del DNA fungino. Ne sono esempi PCR convenzionali, *semi-nested* e *nested* PCR, PCR-EIA, *real-time* PCR, *TaqMan* PCR, *tandem*-PCR, *multiplex* PCR seguito da DNA sequenziamento o pirosequenziamento. Di base tali dosaggi richiedono l’uso di una polimerasi termostabile per amplificare un DNA stampo a partire da un *set* di *primers*. La ciclizzazione della temperatura è usata per facilitare l’*annealing* dei *primer*, l’allungamento dell’amplicone e la liberazione dei *primer* che comportano un’amplificazione esponenziale del DNA *target*. Quale sistema di amplificazione sia più adatto è dipendente dalle necessità e dalla domanda che tale dosaggio soddisfa: può essere utilizzato infatti come mezzo di conferma diagnostica, come sistema per una diagnosi precoce di infezione, idealmente prima della comparsa di sintomi, e infine come mezzo per monitorare l’efficacia di un trattamento

In situazioni dove la sensibilità deve essere ottimale, può essere utilizzata una *Nested* PCR che prevede che un primo *step* di pre-amplificazione di una larga porzione di genoma contenente il *target* venga usato come *template* per la reazione finale in PCR. La *Nested* ha il problema che DNA contaminanti possono essere amplificati nella prima fase, alterando il risultato.

L’introduzione di PCR *real-time* (RT-PCR) ha portato al superamento di questi limiti, trasformando il modo di diagnosticare un gran numero di malattie infettive. Questa tecnologia abbina l’amplificazione di un *target* genetico, usando una PCR *standard*, ad un rilevamento usando sonde (*probes*) fluorescenti in una singola e simultanea reazione. Questi *probes*, utilizzabili sia in fase di amplificazione che di rilevamento, sono collocati in provette chiuse, condizione che riduce la possibilità di contaminazioni.

Le piattaforme in *real-time*, sia basate su sistema *Light Cycler* che *Taqman*, in grado di rilevare variazioni di singoli nucleotidi in un amplicone e di identificare *targets* multipli in una singola reazione, garantiscono determinazioni più efficaci e meno costose, consentendo di rilevare un numero elevato di miceti. In questi sistemi, i *probes* emettono un segnale fluorescente durante ogni ciclo di amplificazione, quando sono presenti specifiche sequenze *target*, e la quantificazione del segnale deriva dal confronto, nello stesso dosaggio, con un campione noto *standard*.

Molti degli studi più recenti si basano su PCR quantitative (*real time*) che presentano, come *target*, geni ribosomiali multicopia (geni rDNA). Con questi sistemi, sequenze fungine di interesse clinico, possono essere amplificate con *primers* universali che hanno come bersaglio regioni altamente conservate all’interno di geni rDNA, mentre l’identificazione delle singole specie può essere ottenuta attraverso ibridazione con *probes* specifici diretti contro sequenze variabili all’interno degli ampliconi o mediante specifici profili nelle curve di *melting*. Caratteristica importante di questi sistemi è la capacità di rilevare accuratamente variazioni di singoli nucleotidi in un amplicone, consentendo la possibilità di individuare ampliconi strettamente correlati. Data

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

l'ampia gamma di *target* richiesti per le determinazioni fungine, una singola reazione capace d'identificare *target* multipli risulta più efficiente e meno costosa.

L'impiego della *real-time* PCR offre dunque numerosi vantaggi: a) sensibilità e specificità equivalenti rispetto a PCR convenzionali e una maggiore sensibilità rispetto a metodi convenzionali; b) *turnaround time* ridotti rispetto alle PCR convenzionali, con eliminazione dei processi di post-amplificazione; c) contaminazioni ambientali ridotte mediante l'abbinamento dell'amplificazione del *target* e del rilevamento in una sola reazione chiusa; d) possibile abbinamento all'impiego di sistemi automatici per l'estrazione del DNA che può rappresentare un primo *step* per la standardizzazione di dosaggi in PCR; e) possibilità di fornire un risultato quantitativo. La quantificazione può avere importanti implicazioni per differenziare colonizzazione da infezione e monitorare l'efficacia della terapia antifungina e l'evoluzione della malattia. La riduzione o la negativizzazione di un risultato in PCR nel tempo può esprimere una risposta favorevole al trattamento, dove una persistenza o incremento sembrano implicare il contrario. I riscontri positivi dei test in PCR possono inoltre precedere di giorni altri segnali di infezione fungina. Va aggiunto che possono essere rilevati risultati falsamente negativi, durante la terapia antifungina, nonostante la progressione della malattia, ciò probabilmente in relazione ad una rapida scomparsa del DNA fungino dal sangue o comunque ad una presenza intermittente.

È stato documentato che la carica fungina in campioni di sangue intero è molto bassa, generalmente non superiore a 10 UFC/ml, con un massimo di alcune centinaia di UFC/ml, anche in pazienti con provata IA. Di contro va ricordato che organismi vitali possono rispondere alla terapia farmacologica ma gli acidi nucleici rilasciati possono essere eliminati lentamente in relazione alla patofisiologia esistente, risultando apparentemente organismi infettanti o refrattari alla terapia (falsi positivi).

L'ampliamento delle conoscenze sul genoma aspergillare e lo sfruttamento delle tecnologie bioinformatiche ha consentito anche di approfondire le conoscenze sugli effetti che i farmaci antifungini esercitano su *A.fumigatus*, consentendo di osservare l'espressione genetica durante l'esposizione ai farmaci, come ad esempio, la rapida decrescita di alcuni geni ad elevato ricambio (*turnover*) in seguito all'esposizione fungicida di Amfotericina B. La conferma che il *turnover* sia espressione della vitalità cellulare potrebbe consentire lo sviluppo di dosaggi molecolari che verifichino la vitalità dell'organismo infettante durante il trattamento antifungino: un vasto *range* di *target* di RNA in grado di documentare la vitalità del microrganismo, potrebbero risultare utili per un monitoraggio *in situ* dell'efficacia terapeutica, bypassando la necessità di test di sensibilità *in vitro*.

In questi ultimi anni è stato sviluppato un altro tipo di piattaforma molecolare, con vari campi di applicazione, in grado di rilevare un *range* esteso di patogeni fungini nel contesto di infezioni invasive. L'approccio sperimentale, basato su una tecnologia di DNA-ibridazione (*Luminex xMAP*), consente l'analisi di 100 differenti sequenze *target* (analisi *multiplex*) in un singolo vassoio di reazione. Particolari microsfeere, definite unicamente dalle loro caratteristiche spettrali, sono legate covalentemente a *probes* di ibridazione fungo-specifici. Come regione *target* per l'identificazione fungina è stata scelta la sequenza variabile ITS2 all'interno del *cluster* genetico multicopia rDNA. Il DNA *target* biotinilato, amplificato mediante PCR, viene messo a contatto con un *set* di microsfeere portanti i *probes* oligonucleotidici a cattura, genere/specie-specifici all'interno della regione ITS, in grado di ibridizzare con sequenze di miceti di interesse clinico. Il *set* di oligonucleotidi ibridizzanti include 75 *probes* genere/specie-specifici. Con l'aggiunta di *reporter* streptavidina-picoeritrina tutti gli ampliconi ibridizzati, catturati dalle sequenze nucleotidiche complementari sulle microsfeere, vengono riconosciuti e l'intensità della fluorescenza emessa è misurata mediante citometria a flusso. Tale sistema, che consente una rapida identificazione di un largo spettro di funghi (10 generi, 29 specie), è stato saggiato su campioni biotici, respiratori e su sangue periferico di pazienti con infezione fungina provata o probabile, determinando una rapida identificazione di numerosi patogeni fungini. Il dosaggio è stato concepito per l'identificazione di specie e generi fungini e non per una quantificazione della carica fungina.

La maggior parte dei saggi molecolari di rilevamento e identificazione sviluppati ha come bersaglio il DNA fungino. Per un riscontro rapido e sensibile su campioni di sangue, un approccio diagnostico, con tecnologia NASBA sembra poter rappresentare uno dei mezzi più promettenti. Tale tecnologia è basata su un'amplificazione isotermica (41°C) basata su successive trascrizioni con l'impiego di 3 enzimi (trascrittasi inversa, RNasi e RNA polimerasi) e di due *primers* che sono complementari all'acido nucleico *target*. Il sistema di rilevamento è basato sull'amplificazione di sequenze RNA-dipendente (NASBA). Questa tecnologia fornisce sistemi a sensibilità ultra-elevata con amplificazioni di 10¹² copie di *template* in 30 minuti, paragonabili a quelle di una *nested* PCR.

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

Approntando una *real-time NASBA* quantitativa marcante 28S rRNA, gli studi di valutazione hanno dimostrato che il sistema era in grado di rilevare in modo affidabile e rapido *Candida* sp. e *Aspergillus* sp. nel sangue e in campioni di BAL. Con una rilevazione di RNA fungino molto elevata, questa *real-time NASBA* quantitativa può potenzialmente essere utilizzata per quantificare la carica di RNA fungino per una correlazione con risposte terapeutiche.

Le tecnologie emergenti per l'identificazione rapida di microrganismi palesano uno *shift* da algoritmi convenzionali verso metodi molecolari o spettrometrici. In quest'ottica va visto lo sviluppo di un dosaggio batterico e fungino a largo spettro mediante l'abbinamento di una amplificazione *multilocus* in PCR e la spettrometria di massa a ionizzazione *electrospray* (PCR/ESI-MS) per rilevare e identificare microrganismi direttamente da campioni clinici. Il sistema PCR-ESI/MS misura il rapporto massa/carica (*m/z*) di ampliconi di PCR, generati da numerosi *loci* su genomi, batterici e fungini, di regioni conservate e specie-specifiche, per ottenere un'identificazione derivata dal confronto con un *database* di riferimento. Questo metodo è in grado di analizzare i prodotti di amplificazione in PCR mediante spettrometria di massa a ionizzazione *electrospray*. PCR-ESI/MS può misurare la massa di ampliconi con sufficiente accuratezza per ottenere il calcolo della composizione di base dell'amplicone che, nel confronto con quella di organismi noti, può portare all'identificazione del patogeno presente in 6-8 ore. PLEX-ID *system* dispone di un *kit* fungino a spettro allargato in grado di identificare i principali patogeni in un singolo dosaggio. Avendo un unico profilo (*fingerprint*) molecolare per microrganismo, PLEX-ID è in grado di identificare singoli o molteplici organismi da differenti campioni biologici. Esistono già esperienze sull'utilizzo di questa tecnologia che confermano che il sistema PLEX-ID sia da ritenere un metodo rapido per il rilevamento a largo spettro di miceti, direttamente su campioni respiratori, anche in quei campioni dove la coltura può risultare negativa per una sovracrescita batterica. Queste osservazioni meritano un approfondimento, considerando la loro potenziale rilevanza clinica.

Standardizzazione dei test molecolari

Come già sottolineato, ad oggi, il rilevamento di patogeni fungini mediante test molecolari non è stato accettato tra i criteri diagnostici di riferimento per la definizione di malattia fungina invasiva (IFDs). L'elevato numero di variabili metodologiche, presenti nei saggi molecolari sviluppati *in house*, crea enormi ostacoli alla standardizzazione, rendendo difficoltosa una precisa valutazione sul loro effettivo rendimento e il potenziale utilizzo come test di cura del paziente.

A tale proposito, nel 2007 venne istituito un Gruppo di Lavoro Europeo, l'*European Aspergillus PCR Initiative* (AEP-CRI) dell'ISHAM (*International Society for Human and Animal Mycoses*), che include più di 60 centri, per lo sviluppo di un protocollo *standard* per la valutazione di PCR su *Aspergillus* in *trials* clinici.

Questo gruppo di lavoro (*EAP-CRI Laboratory Working Party*) comprendente un *core* di 8 laboratori con 16 laboratori addizionali, definendo dei campioni *target*, per valutare le metodologie esistenti, approntò e distribuì ai vari Centri pannelli di controllo di qualità (aliquote di sangue intero insemenate con conidi aspergillari quantificati). In base all'analisi dei risultati di questa prima valutazione, per una seconda distribuzione (2008) venne suggerito di introdurre alcuni accorgimenti e particolari procedure: usare per tutti i campioni una lisi meccanica (*bead beating*) delle cellule fungine, usare un controllo interno di PCR per evitare falsi negativi e eseguire le analisi almeno in duplicato. I risultati dello studio misero in evidenza che la maggior parte dei sistemi di amplificazione in PCR utilizzati (18/20, 90%) fosse in grado di rilevare l'equivalente di 50 conidi di *A. fumigatus* e che l'efficienza della PCR fosse limitata dai processi di estrazione piuttosto che dalle procedure di amplificazione. Attraverso la meta-analisi dei dati si evidenziò che l'uso di volumi ≥ 3 ml di sangue con EDTA, la lisi dei globuli rossi e bianchi, l'incorporazione di uno *step* di agitazione con *bead-beating*, la riduzione del volume post DNA-estrazione a <100 microlitri, e l'introduzione di un controllo interno di PCR, fossero raccomandati per essere inclusi nel *test* protocollo al fine di standardizzare la PCR per *Aspergillus*.

Oltre ad iniziative di gruppi di studio, la standardizzazione dei test molecolari per la diagnostica fungina potrebbe essere raggiunta anche con un modello centralizzato, attraverso il quale sia offerto un test molecolare a disposizione del pubblico eseguito da un laboratorio di riferimento. La commercializzazione potrebbe essere un'altra strada per giungere alla standardizzazione di un *test* molecolare: un saggio disponibile in commercio è in grado di fornire una metodologia standardizzata, comprensiva di estrazione del DNA e con reagenti di qualità controllata. L'istituzione di diversi saggi molecolari di rilevamento per virus e batteri come *test standard* di cura

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI
Rimini, 18-21 ottobre 2015

per uso clinico è stato raggiunto in gran parte proprio attraverso la commercializzazione di quei saggi molecolari che, con procedure standardizzate, facilitano la validazione clinica su larga scala.

I test molecolari commerciali per rilevamento fungino

Ad oggi, sono pochi i test molecolari commerciali disponibili e valutabili da laboratori clinici per la diagnosi di infezioni fungine invasive (Tabella 1).

Yeast Traffic Light® assay (AdvanDx) è un test FDA-approvato utilizzabile in clinica per l'identificazione di *C.albicans/Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata/Candida krusei* da emocolture positive in meno di 3 ore. Il test utilizza sonde non amplificate di acido nucleico che interessano 26S rRNA e impiega la tecnologia FISH. Validazioni cliniche di questo test mostrano il 94-99% di sensibilità e specificità del 100%. Le limitazioni principali sono le ridotte capacità identificative e l'applicazione solo ad emocolture positive.

Uno tra i primi sistemi molecolari disponibile in commercio è stato *SeptiFast* (Roche Diagnostics) per il rilevamento di 25 tra i più frequenti patogeni del torrente circolatorio, incluse 5 specie di *Candida*. Nel sistema, l'estrazione microbica avviene attraverso una lisi meccanica e gli estratti sono amplificati mediante *Light Cycler* (Roche Diagnostics) in 3 *real-time* PCR separate. Gli ampliconi sono ibridizzati con *probes* fluorescenti specie-specifici e il test è completato in 6 ore. I livelli di fluorescenza emessa sono proporzionali alla quantità di DNA generato durante la PCR. L'amplificazione e post-amplificazione avvengono in capillari di vetro chiusi, riducendo il rischio di contaminazione *carryover*.

Le valutazioni iniziali sull'utilizzo di *Septi Fast* in ICU con pazienti ematologici risultarono promettenti con 83% di concordanza con emocolture e risultati discrepanti a vantaggio di *Septi Fast* su molti campioni. Successive valutazioni con campionatura più estesa comprendente anche neonati e bambini, hanno dato risultati simili. In alcuni casi tuttavia, in particolare per quelli causati da *C. glabrata* vi fu un riscontro più frequente in coltura rispetto a *SeptiFast*, forse in relazione alla bassa carica di *Candida* nel sangue e ad un piccolo volume di sangue usato per l'estrazione del DNA. D'altronde alcuni *SeptiFast*-negativi, coltura-positivi o *SeptiFast*-negativi, coltura-negativi potrebbero essere legati ad organismi non identificati dal sistema o non colturabili. Non risulta quindi semplice giungere a conclusioni definitive: questo sistema molecolare non può sostituire le emocolture nel *iter* diagnostico delle infezioni del torrente circolatorio ma può essere utile in situazioni in cui le emocolture persistano negative. La carenza inoltre di valutazioni approfondite sul valore diagnostico del dosaggio, sull'*outcome* clinico e soprattutto analisi più estese sul rapporto costo-efficacia, ne limitano fortemente l'impiego.

Tabella) Dosaggi molecolari commerciali per il rilevamento di miceti patogeni (da Zhang et al., 2013, sempl.)

Sistema	Produttore	Metodo	Target	Campione
Yeast Traffic Light®	AdvanDx (MA, USA)	PNA-FISH	26S rRNA; <i>Candida</i> sp.	Sangue (flaconi di emocolture positive)
MycAssay™ Pneumocystis	Trinity Biotech (County Wicklow, Ireland)	Real-time PCR	mISU; <i>Pneumocystis jirovecii</i>	BAL; escreato
MycAssay™ Aspergillus	Trinity Biotech	Real-time PCR	18S rRNA; <i>Aspergillus</i> sp.	BAL; siero
Luminex xTAG® fungal assay	Luminex Molecular Diagnostics (ON, Canada)	Multiplex PCR abbinata con bead probe array	Fino a 23 miceti	BAL; sangue
IBIS Plex-ID fungal spectrum assay	IBIS Biosciences (CA, USA)	Multiplex PCR abbinata a spettrometria di massa a ionizzazione elettrospray	Subunità grande rRNA; Fino a 75 miceti	BAL; sangue
Seeplex® ACE PCR system	Seegene Diagnostics (Seoul, South Korea)	Multiplex PCR abbinata a separazione elettroforetica con rilevamento in fluorescenza	<i>Candida</i> sp.	Sangue
RenDx™ Fungiplex panel	Renishaw Diagnostics (Glasgow, UK)	Multiplex PCR abbinata a rilevamento a scattering con risonanza Raman	Fino a 50 miceti	Sangue

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI
Rimini, 18-21 ottobre 2015

ICEplex 16-plex fungal panel	PrimeraDx (MA, USA)	Multiplex PCR abbinata a separazione di ampliconi mediante elettroforesi capillare e quantificazione multicolor	Rilevamento multiplo di miceti	Sangue
Prove-it™ sepsis assay	Mobidiag (Helsinki, Finland)	Multiplex PCR abbinata a microarray	ITS; <i>Candida</i> sp.	Sangue
T2Candida®	T2 Biosystems (MA, USA)	Nanoparticelle e rilevamento mediante piattaforma di risonanza	ITS2	Sangue intero

BAL: lavaggio broncoalveolare; ITS: Internal transcribed spacer; mlSU: larga sub unità mitocondriale; PNA: Peptide nucleic acid

È stato sviluppato anche un dosaggio in *real-time* PCR (MycAssay™, Trinity Biotech, Contea di Wicklow, Irlanda) che impiega una marcatura del gene 18S rRNA per la rilevazione del DNA genomico da 15 diverse specie di *Aspergillus*, in pazienti immunocompromessi. Gli studi di valutazione hanno dimostrato che la sensibilità e la specificità del test eseguito su campioni di materiale respiratorio (BAL) di pazienti con aspergillosi invasiva provata/probabile in base a criteri EORTC/MSG erano del 94,1 e del 98,6%, rispettivamente. Altre osservazioni, effettuate su campioni di siero hanno documentato una sensibilità e specificità del 60-70% e del 90,5-100%, rispettivamente. Poiché questo test commerciale fornisce procedure standardizzate e reagenti di qualità controllata, è auspicabile che siano condotte ulteriori ed estese validazioni cliniche per determinare la sua valenza diagnostica.

In una recente esperienza è stata utilizzata una nuova piattaforma commerciale, BD MAX (BD Diagnostics, Sparks, MD), che utilizza un'estrazione del DNA completamente automatizzata e una *multiplex real-time* PCR, per amplificare la glicoproteina principale di superficie (MSG) da *Pneumocystis jirovecii*. Il saggio BD MAX è stato valutato nei confronti di un'estrazione manuale di DNA e di una *real-time* PCR convenzionale. In un'analisi retrospettiva di 54 campioni positivi, il saggio BD MAX ha mostrato una buona correlazione quantitativa col metodo molecolare di riferimento. Prospettivamente, sono stati analizzati 278 campioni respiratori con i due saggi molecolari. Il tasso di positività complessiva è stato del 18,3%. Il saggio BD MAX ha identificato 46 campioni positivi, rispetto al 40 della PCR di riferimento, offrendo indubbi vantaggi per la tempestiva disponibilità dei risultati.

Conferme sull'utilità diagnostica di sistemi molecolari commerciali arrivano anche da uno studio che vede l'impiego di due *kit real-time* PCR commerciali, *MycAssay Pneumocystis* (PJ-PCR, from Myconostica, now a Trinity Biotech company, Kentford, UK) e *MycAssay Aspergillus* (ASP-PCR, Myconostica/Trinity Biotech), per la ricerca del DNA fungino su 44 lavaggi broncoalveolari da pazienti a rischio di malattie fungine invasive. Il dosaggio PJ-PCR ha evidenziato una sensibilità e specificità rispettivamente del 100% e 94,4%. Il test ASP-PCR ha mostrato una sensibilità e specificità del 80% e 97,1%. Rispetto alla coltura, la ASP-PCR ha mostrato maggiore sensibilità ed è stato osservato un buon livello di concordanza tra ASP-PCR e saggi antigenici (GM). Nel complesso, i dati sottolineano l'utilità diagnostica dei saggi molecolari commerciali, soprattutto nei pazienti ad alto rischio in cui una bassa carica fungina può ostacolare, con test convenzionali, una diagnosi corretta e tempestiva.

Considerazioni conclusive

I saggi molecolari svolgono un ruolo importante nello sviluppo di metodi non colturali volti a migliorare la diagnosi di malattie infettive. Per la diagnostica fungina, nonostante decenni di esperienze, i saggi molecolari non sono ancora considerati tra i criteri di riferimento per definire una malattia fungina, principalmente per la mancanza di una diffusa standardizzazione e di dati adeguati di *outcome* clinico. Lo sviluppo e l'utilizzo di test commerciali non potrà che contribuire ai processi di standardizzazione e validazione clinica. Sono certamente necessari ulteriori dati e approfondimenti sia sulle ricadute da un punto di vista clinico che sul rapporto costo-efficacia per comprendere a pieno la loro reale valenza diagnostica.

Bibliografia essenziale

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI Rimini, 18-21 ottobre 2015

- Andreoni S., Farina C., Lombardi G. Atlante di Micologia Medica. System Edition, Vigano di Gaggiano (MI), 2003
- Ascioglu S., Rex J.H., de Pauw B., Bennett J.E., Bille J., Crokaert F., Denning D.W., Donnelly J.P., Edwards J.E., Erjavec Z., Fiere D., Lortholary O., Maertens J., Meis J.F., Patterson T.F., Ritter J., Selleslag D., Shah P.M., Stevens D.A., Walsh T.J.; Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer; Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases “ Clinical Infectious Diseases 2002; 34: 7-14
- Clancy C.J., Nguyen M.H. «Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care” Clinical Infectious Diseases 2013; 56: 1284–92
- Cuenca-Estrella M., Verweij P.E., Arendrup M.C., Arikan-Akdagli S., Bille J., Donnelly J.P., Jensen H.E., Lass-Flörl C., Richardson M.D., Akova M., Bassetti M., Calandra T., Castagnola E., Cornely O.A., Garbino J., Groll A.H., Herbrecht R., Hope W.W., Kullberg B.J., Lortholary O., Meersseman W., Petrikos G., Roilides E., Viscoli C., Ullmann A.J.; ESCMID Fungal Infection Study Group “ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures” Clinical Microbiology and Infection 2012; 18 (Suppl. 7): 9–18
- de Pauw B., Walsh T.J., Donnelly J.P., Stevens D.A., Edwards J.E., Calandra T., Pappas P.G., Maertens J., Lortholary O., Kauffman C.A., Denning D.W., Patterson T.F., Maschmeyer G., Bille J., Dismukes W.E., Herbrecht R., Hope W.W., Kibbler C.C., Kullberg B.J., Marr K.A., Muñoz P., Odds F.C., Perfect J.R., Restrepo A., Ruhnke M., Segal B.H., Sobel J.D., Sorrell T.C., Viscoli C., Wingard J.R., Zaoutis T., Bennett J.E.; European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. “Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group” Clinical Infectious Diseases 2008; 46:1813–1821
- Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Eds. „Manual of Clinical Microbiology, 11th edition” ASM Press, Washington DC, 2015
- Lamoth F., Cruciani M., Mengoli C., Castagnola E., Lortholary O., Richardson M., Marchetti O.; Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3) “β-Glucan Antigenemia Assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3)” Clinical Infectious Diseases 2012; 54: 633-43
- Marchetti O., Lamoth F., Mikulska M., Viscoli C., Verweij P., Bretagne S.; European Conference on Infections in Leukemia (ECIL) Laboratory Working Groups “ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients” Bone Marrow Transplantation 2012; 47: 846-854
- Metwally L., Fairley D.J., Coyle P.V., Hay R.J., Hedderwick S., McCloskey B., O'Neill H.J., Webb C.H., Elbaz W., McMullan R. “Improving molecular detection of *Candida* DNA in whole blood: comparison of seven fungal DNA extraction protocols using real-time PCR” Journal of Medical Microbiology 2008; 57: 296-303
- Posteraro B., De Pascale G., Tumbarello M., Torelli R., Pennisi M.A., Bello G., Maviglia R., Fadda G., Sanguinetti M., Antonelli M. “Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1→3)-β-D-glucan assay, *Candida* score, and colonization index”. Critical Care 2011; 15: R249
- Pfeiffer C.D., Fine J.P., Safdar N. “Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis” Clinical Infectious Diseases 2006; 42: 1417-1427
- Sendid B., Poirot J.L., Tabouret M., Bonnin A., Caillot D., Camus D., Poulain D. “Combined detection of mannanemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species” Journal of Medical Microbiology 2002; 51: 433-42
- Springer J., Morton C.O., Perry M., Heinz W.J., Paholcsek M., Alzheimer M., Rogers T.R., Barnes R.A., Einsele H., Loeffler J., Whitec P.L. “Multicenter Comparison of Serum and Whole-Blood Specimens for Detection of *Aspergillus* DNA in High-Risk Hematological Patients” Journal of Clinical Microbiology 2013; 51: 1445–50
- Torelli R., Sanguinetti M., Moody A., Pagano L., Caira M., De Carolis E., Fuso L., De Pascale G., Bello G., Antonelli M., Fadda G., Posteraro B. “Diagnosis of invasive aspergillosis by a commercial real-time PCR assay for *Aspergillus* DNA in bronchoalveolar lavage fluid samples from high-risk patients compared with a galactomannan enzyme immunoassay” Journal of Clinical Microbiology 2011; 49: 4273–8
- Tortorano A.M., Prigitano A., Esposto M.C., Arsic Arsenijevic V., Kolarovic J., Ivanovic D., Paripovic L., Klingspor L., Nordøy I., Hamal P., Arikan Akdagli S., Ossi C., Grancini A., Cavanna C., Lo Cascio G., Scarpaio C., Candoni A., Caira M., Drogari Apiranthitou M. On the behalf of the ECMM Working Group “European Confederation of Medical Mycology (ECMM) epidemiological survey on invasive infections due to *Fusarium* species in Europe” European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2014; 33: 1623–1630

Percorso Diagnostico presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI
Rimini, 18-21 ottobre 2015

-
- White P.L., Mengoli C., Bretagne S., Cuenca-Estrella M., Finnstrom N., Klingspor L., Melchers W.J., McCulloch E., Barnes R.A., Donnelly J.P., Loeffler J.; European Aspergillus PCR Initiative (EAPCRI) “Evaluation of *Aspergillus* PCR Protocols for Testing Serum Specimens” *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49: 3482–2848
 - Zou M., Tang L., Zhao S., Zhao Z., Chen L., Chen P., Huang Z., Li J., Chen L., Fan X. “Systematic review and meta-analysis of detecting galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive aspergillosis” *PLoS One* 2012; 7 (8): ArticleID: 43347