

**G001**

**SENSIBILITA' AL FLUCONAZOLO DI DIVERSI CEPPI DI CANDIDA ISOLATI DA MICOSI PROFONDE O MUCO-CUTANEE. VALUTAZIONE DELLA CONCORDANZA TRA DUE DIVERSI METODI DI DETERMINAZIONE.**

Sarnelli B., Abate R., Morelli M.L., Lambiase A., Ingala F.

Laboratorio di Patologia Clinica e Microbiologia - P.O. "Ascalesi" Via E. a Forcella 31 - 80139 Napoli

**Scopo** dello studio, tuttora in corso, è quello di determinare la sensibilità al "Fluconazolo" di diversi ceppi di Candida, scelti con l'intento di valutare un campione di popolazione che sia il più possibile ampio per numero di specie e per sede di isolamento. Questo antifungino tiazolico, infatti, viene utilizzato nel primo approccio terapeutico di candidiasi diverse per sede e specie coinvolta più spesso di altri; ciò sia per considerazioni di natura economica, sia per alcune favorevoli caratteristiche relative alla farmacocinetica ed alla bassa tossicità del Fluconazolo, che ne rendono la gestione più agevole rispetto ad altri antimicotici.

Il metodo utilizzato è l'ETEST AB BIODISK che, per la sua buona riproducibilità e la semplicità di allestimento, risulta applicabile routinariamente rispetto ai più elaborati metodi di diluizione in brodo (NCCLS M27-A) da cui derivano i breakpoint interpretativi per diverse specie di Candida.

Tuttavia, nei casi di MIC > 16 g/ml, è stata verificata la concordanza dei risultati dell'Etest rispetto a quelli ottenuti con il metodo delle microdiluizioni (MDB).

**Materiali e metodi.** 132 ceppi appartenenti alle specie indicate in Tabella 1, identificati con il sistema ID32C Biomerieux sono stati isolati da 18 emocolture, 5 cateteri venosi, 39 espettorati, 7 broncoaspirati, 18 tamponi faringei, 19 tamponi vaginali, 10 cateteri vescicali, 12 drenaggi o tamponi da ferite chirurgiche, 4 colture di bile. Da tutti i ceppi, utilizzando inoculi pari a 0.5 McFarland ottenuti da colture di 24h, sono stati allestiti gli Etest su Agar Casitone modificato e su Sabouraud Destrosio Agar, incubando per 24 h a 35°C. La concordanza Etest-MDB è stata valutata in 26 ceppi (Tabella 2) con MIC > 16 g/ml, da cui sono stati allestiti inoculi in piastre Microtiter in cui erano state preparate microdiluizioni di Fluconazolo in RPMI 1640 (secondo NCCLS M27-A).

**Tabella 1**

Specie (n. isolati)	SENSIBILI	SENSIBILI-DD	RESISTENTI
	n. (%)	n. (%)	n. (%)
	MIC<16	MIC 16-32	MIC>32
<i>C. albicans</i> (53)	43 (81,13%)	6 (11,33%)	4 (7,54%)
<i>C. tropicalis</i> (29)	24 (82,76%)	4 (13,80%)	1 (3,44%)
<i>C. glabrata</i> (16)	7 (43,75%)	9 (56,25%)	0%
<i>C. krusei</i> (11)	0%	1 (9,09%)	10 (90,91%)
<i>C. parapsilosis</i> (15)	13 (86,66%)	1 (6,66%)	1 (6,66%)
<i>C. inconspicua</i> (3)	3 (100%)	0%	0%
<i>C. guilliermondi</i> (2)	2 (100%)	0%	0%
<i>C. rugosa</i> (2)	2 (100%)	0%	0%
<i>C. kefyr</i> (2)	2 (100%)	0%	0%

**Tabella 2**

Ceppi	CONCORDAZA % (n./tot)	
	MDB - Etest	
Non Sensibili (n.)	SENSIBILE-DD	RESISTENTE
<i>C. albicans</i> (10)	83,33% (5/6)	100% (4/4)
<i>C. tropicalis</i> (5)	100% (4/4)	100% (1/1)
<i>C. parapsilosis</i> (2)	100% (1/1)	100% (1/1)
<i>C. glabrata</i> (9)	100% (9/9)	-

**Risultati.** Le Tabelle 1 e 2 riassumono rispettivamente i risultati delle MIC ottenute da tutti i ceppi con l'Etest (Tab. 1) e della percentuale di concordanza MDB-Etest secondo i breakpoint NCCLS, per 26 ceppi risultati non sensibili con il metodo Etest (Tab. 2).

**Conclusioni.** L'efficacia della sensibilità in vitro nell'essere predittiva del successo della terapia antifungina dipende sia da fattori clinici ed individuali, ma anche dal tipo di popolazione studiata. Il tentativo di ampliare in tal senso il punto di osservazione, oltre a confermare l'inefficacia del Fluconazolo su *C. krusei*, sembra evidenziare, nel nostro campione, la presenza non trascurabile di ceppi con Sensibilità-dose dipendente, secondo i breakpoint NCCLS, anche per specie diverse da *C. glabrata*.

**G002**

**RHODOTORULA MUCILLAGINOSA: PICCOLO FOCOLAIO EPIDEMICO IN UN REPARTO DI TERAPIA INTENSIVA**

Faneschi M.L., Rizzo A., Sticchi Damiani A., Pizzolante M., Perniola R.\*

Laboratorio di Microbiologia \*Unità Operativa di Terapia Intensiva Neonatale A.S.L.L.E.I.-Presidio Ospedaliero "Vito Fazzi", Piazza F. Muratore, 73100 Lecce

**Obiettivi della ricerca:** L'incremento delle infezioni fungine può essere ascritto a più fattori: terapia immunosoppressiva, caterizzazione prolungata, uso di antibiotici a spettro sempre più ampio e lunga sopravvivenza di pazienti immunocompromessi. Sempre più frequentemente, grazie a tecnologie avanzate e a una maggior attenzione da parte del personale sanitario si isolano funghi diversi da *Candida albicans* e ritenuti fino a pochi anni or sono semplici contaminanti.

Descriviamo 5 casi di sepsi da *Rhodotorula mucillaginosa* verificatosi nel giro di un mese nel reparto di terapia intensiva neonatale del nostro nosocomio.

*Rhodotorula mucillaginosa* è un comune inquinante dell'aria. Nell'uomo può essere isolato da pelle, polmone, urine, feci, sangue, vagina, cavità orale e nella maggior parte dei casi è considerato un inquinante: sono stati però descritti in letteratura rari casi di infezioni sistemiche esattamente come avvenuto nei casi clinici sotto elencati.

**CASI CLINICI:**

	Pz. 1	Pz. 2	Pz. 3	Pz. 4	Pz. 5
S	F	F	F	M	F
SG	30	31	30	28	31
PN (g)	830	1,350	1,750	1,340	680
VA	Si	Si	Si	Si	Si
CO	Si	Si	Si	Si	Si

S: sesso, SG: settimane di gestazione, PN: peso alla nascita (grammi), VA: ventilazione assistita, CO: catetere ombelicale

**Metodologia usata:** L'emocolture, insemenate nei flaconi pediatrici BACTALERT, sono state incubate a 37° nello strumento BACTALERT 3D. La positività delle emocolture è stata segnalata fra la quinta e la settima giornata. L'esame microscopico diretto ha evidenziato la presenza di spore di miceti quindi si è provveduto alle subcolture su agar Sabouraud. A 48 ore dalla semina le piastre presentavano una crescita non rigogliosa di colonie bianco-rosate che con il passare dei giorni assumevano un colore decisamente rosa arancio. L'identificazione del micete è stata eseguita con card ID YST VITEK II. L'antimicogramma è stato eseguito con metodo E-test saggiando la sensibilità a Fluconazolo, Itraconazolo, Anfotericina B.

**Risultati e conclusioni:** I pazienti, trattati tutti con Anfotericina B e con rimozione dei cateteri sono perfettamente guariti e tutti i controlli successivi sono risultati negativi.

## G003

### RISPOSTA IMMUNE ANTI-CANDIDA: RUOLO DEI LINFOCITI VAGINALI IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI VAGINITE .

Boccanera M .,<sup>1</sup> Santoni G.,<sup>2</sup> Adriani D.,<sup>1</sup> Amantini C.,  
<sup>2</sup> Lucciarini R.,<sup>2</sup> Girolamo A.,<sup>1</sup> Cassone A.<sup>1</sup> F. De Bernardis<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Medicina Sperimentale, Università di Camerino, Camerino, Italia

*C. albicans* è l'agente di una infezione vaginale, la vulvovaginite, che può presentarsi anche con episodi ricorrenti piuttosto gravi. Il meccanismo di difesa a livello vaginale non è stato ancora completamente chiarito: per valutare la risposta dell'ospite è stato impiegato un modello di infezione vaginale in ratta ovariectomizzata con caratteristiche simili alla malattia umana. Nell'animale una prima infezione con *Candida* è in grado di suscitare una consistente risposta immune ad una successiva infezione, mediante la produzione di anticorpi protettivi e l'aumento di linfociti attivati a livello mucosale.

È stato condotto uno studio sulle proprietà funzionali e protettive dei vari subsets di linfociti vaginali utilizzando il trasferimento adottivo di linfociti vaginali provenienti da animali infettati e successivamente inoculati per via intravenosa in ratte naive che poi ricevevano un challenge intravaginale con *C. albicans* nelle 24 ore successive alla vaccinazione adottiva. I linfociti adottivi trasferiti erano attivi in quest'ordine: CD4<sup>+</sup> T linfociti ≥ CD5<sup>+</sup> B linfociti ≥ CD8<sup>+</sup> T linfociti.

È stata inoltre saggiata la loro capacità di proliferare dopo stimolazione con mitogeni quali PHA, PWD, LPS o mannanoproteina di *C. albicans*. I linfociti vaginali totali ( CD3<sup>+</sup> T linf., CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> linf., e CD5<sup>+</sup> B linf. ) ottenuti da animali infetti, proliferano analogamente sia quando sono stimolati con i mitogeni classici che con la mannanoproteina specifica di *C. albicans*, mentre i CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T linfociti hanno un minor grado di attivazione.

Infine, è stata saggiata la presenza di anticorpi anti-mannanoproteina di *C. albicans* nel supernatante di CD5<sup>+</sup> B linfociti proliferati in presenza di T linfociti . I risultati dimostrano che è presente una cooperazione cellulare antiCandida a livello vaginale mediata da cellule e da anticorpi. Particolarmente importante è il ruolo svolto dalle cellule CD4<sup>+</sup> T linfociti e dai CD5<sup>+</sup> B linfociti.

## G004

### IDENTIFICAZIONE DI CANDIDA SPP. MEDIANTE SEQUENZIAMENTO CON ELETTROFORESI CAPILLARE

Bordi E., Paglia M.G., Nebuloso E., Pucillo L.P.

Laboratorio di analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia-Sezione di Microbiologia Molecolare, I.N.M.I. L. Spallanzani, IRCCS, Roma.

I metodi tradizionali per l'identificazione di *Candida spp.* includono l'esame al microscopio della morfologia del lievito

e l'allestimento di saggi biochimici per l'identificazione di specie. Sono stati sviluppati diversi sistemi in grado di identificare tali patogeni in poche ore, i quali però, pur consentendo una corretta identificazione delle specie più rilevanti clinicamente, possono risultare non conclusivi con ceppi di lieviti rari. I metodi basati sull'amplificazione del DNA ribosomale offrono una valida alternativa nella identificazione di specie, essendo i geni ribosomali costituiti da regioni conservate, identificabili con primer idonei, e frammenti di sequenze variabili utili per l'identificazione della specie.

**Obiettivo.** Effettuare una valutazione preliminare sull'utilizzo diagnostico di un sistema di sequenziamento automatico che consenta la diagnosi di specie di *Candida*, rispetto ai metodi tradizionali.

**Materiali e Metodi.** L'identificazione fenotipica dei lieviti isolati da materiali biologici (8 espettorati, 1 urina, 1 tampone faringeo), è stata eseguita con il sistema RapID Yeast Plus System (Remel). Per l'identificazione genotipica, il DNA estratto da colonie pure è stato amplificato, come descritto da Sandhu et al. (1). L'analisi delle sequenze nucleotidiche dei prodotti di amplificazione è stata eseguita, dopo purificazione, con "terminatori" marcati con sostanze fluorescenti mediante "Big Dye Terminator Sequencing kit v. 3.0" (Applied Biosystem), utilizzando lo strumento ABI-PRISM 3100. I dati relativi alle sequenze nucleotidiche sono stati confrontati con le sequenze depositate in banca dati.

**Risultati.** Il sistema RapID Yeast Plus System ha consentito di identificare: *C. krusei* (5/10), *C. paratropicalis* (1/10), *C. glabrata* (1/10), *C. parapsilosis* (1/10), *C. tropicalis* (2/10), mentre con il sequenziamento abbiamo ottenuto: *Saccharomyces spp* (4/10), *C. albicans* (1/10), *C. glabrata* (2/10), *C. tropicalis* (2/10) e una specie indeterminata.

**Conclusioni.** Il sequenziamento mediante elettroforesi capillare ha permesso di confermare la diagnosi fenotipica di *C. tropicalis*. Gli altri genotipi mostrano lievi differenze rispetto all'identificazione fenotipica e meritano ulteriori studi ed approfondimenti.

## G005

### CASO DI INFEZIONE RINO-FARINGEA INVASIVA DA MUCOR SPP.

Clerici P., Agrappi C., Vigano' E.F., Melloni P., Mazzone A\*.

U.O. Microbiologia, \* U.O. Oncologia Azienda Ospedaliera "Ospedale Civile di Legnano" Via Candiani 2-20025 Legnano (MI)

**Introduzione** Le zigomicosi sono le infezioni fungine acute a decorso più fulminante nei pazienti immunocompromessi. Sono causate da funghi appartenenti all'ordine Mucorales (*Mucor*, *Rhizomucor*, *Absidia*, *Rhizopus*). Più frequentemente colpiti sono il distretto cranio-rino-facciale ed il tessuto sottocutaneo. Il danno deriva dal particolare tropismo che questi funghi hanno per l'endotelio arterioso con infiltrazione dei vasi e conseguente necrosi tessutale.

**Caso clinico** Il presente caso si riferisce ad una paziente di 81 anni affetta dal novembre 2000 da mielodisplasia. A febbraio 2003 comparsa di stomatite aftosa ingravescente con disturbi nella deglutizione, dolore trafittivo laringo-faringeo e febbre. La paziente viene inizialmente messa in trattamento con Fluconazolo ma senza alcun miglioramento del quadro clinico. All'esame obiettivo si riscontra necrosi del palato duro con croste plurime siero ematiche nelle cavità nasali. La TAC evidenzia un ispessimento flogistico sottocutaneo a livello della regione temporo-zigomatica di sinistra. Si eseguono due tamponi nasali ed un tampone orofaringeo per l'e-