

presenti lungo il gene *ERG11*, che codifica per una citocromo P450 monossigenasi, coinvolta nella sintesi dell'ergosterolo, sono state associate all'azolo-resistenza.

In questo lavoro è stata utilizzata la tecnica Pyrosequencing™ per stabilire se esistano differenze in un frammento del gene *ERG11* tra ceppi ketoconazolo-sensibili e ketoconazolo-resistenti di *C. albicans*.

Sono stati analizzati 48 ceppi isolati dalla mucosa orale di soggetti affetti da candidiasi oro-faringea. La sensibilità al ketoconazolo è stata determinata con la tecnica delle microdiluzioni in piastra secondo le direttive del NCCLS. 15 ceppi sono risultati SDD (Sensibilità Dose Dipendente) o resistenti al ketoconazolo con valori di MIC compresi tra 0,25 e >16 µg/ml. Dopo amplificazione tramite PCR con un primer biotinilato di un frammento del gene *ERG11* (dal codone 464 al 483), è stata eseguita la separazione del singolo filamento con un metodo a base di sfere ricoperte con streptavidina. Il sequenziamento ha richiesto sistema e procedure della Pyrosequencing (Pyrosequencing AB Uppsala, Sweden). Durante la reazione di sequenza per ogni base nucleotidica incorporata viene emessa radiazione luminosa grazie ad un sistema enzimatico contenente luciferina, il metodo utilizzato è in grado di eseguire 96 esami/5 ore.

Tra gli isolati clinici di *C. albicans* sono state rilevate mutazioni a carico del codone Gly464Ser (4 ceppi), questi dati sono in accordo con quanto descritto in letteratura. La metodica utilizzata può rappresentare un sistema efficace per l'esecuzione dell'antibiogramma molecolare nella diagnosi di laboratorio di infezione per *C. albicans*.

**Ringraziamenti:** Dott. Carlo Farachi (BIOSENSE S.r.l.)  
Dott. Roberto Usai (DEPECO S.r.l.)

## P122

### FUNGURIE NEI PAZIENTI OSPEDALIZZATI: INDAGINE RETROSPETTIVA MULTICENTRICA

Faggi E.<sup>1</sup>, Farina C.<sup>2</sup>, Lombardi G.<sup>3</sup>, Andreoni S.<sup>4</sup>, Manso E.<sup>5</sup>, Fazzii P.<sup>6</sup>, Nicoletti P.<sup>7</sup>, Pini G.<sup>1</sup>, Brigante G.<sup>3</sup>, Verna G.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Sanità Pubblica - Università di Firenze,

<sup>2</sup>A.O. Ospedali Riuniti di Bergamo - Bergamo,

<sup>3</sup>Ospedale di Circolo e Università dell'Insubria - Varese,

<sup>4</sup>A.O. Ospedale Maggiore della Carità - Novara,

<sup>5</sup>A.O. Umberto I - Ancona,

<sup>6</sup>P.O. Ospedale Spirito Santo - Pescara,

<sup>7</sup>A.O. Careggi - Firenze

In seguito alle numerose segnalazioni dell'aumento, in ambiente ospedaliero, delle infezioni micotiche delle vie urinarie è stata fatta un'indagine multicentrica retrospettiva sull'incidenza delle fungurie in sei centri ospedalieri italiani (Bergamo, Novara, Varese, Firenze, Ancona, Pescara). L'indagine riguarda il periodo gennaio 2001 - dicembre 2002 ed ha avuto lo scopo di precisare la frequenza di isolamento di miceti nelle urinocolture, la distribuzione delle fungurie in base ai reparti, gli agenti eziologici e l'incidenza di fungemie in pazienti con funguria.

Sono stati isolati microrganismi (batteri o funghi) nel 21% delle urinocolture (oltre 100.000 colture): il 2% delle colture risultarono positive per miceti, mentre il 19% per batteri. Miceti furono isolati nell'8% delle urinocolture positive.

Le fungurie sono state osservate soprattutto nei reparti di terapia intensiva (24% delle urinocolture positive), meno frequentemente invece nei reparti chirurgici e medici.

*Candida albicans* è la specie maggiormente isolata (63% degli stipti), seguita da *C. glabrata* (18%), *C. tropicalis*

(9%), *C. parapsilosis* (3%); saltuariamente sono state isolate altre specie di *Candida* e rari stipti di *Trichosporon asahii* (3) e *Saccharomyces cerevisiae* (1); non sono mai stati ritrovati funghi miceliali.

Le urinocolture positive per lieviti provenivano da pazienti con età media di 66 anni e di sesso prevalentemente femminile.

Il 5% dei pazienti con funguria presentò fungemia. La specie isolata dal sangue fu la stessa di quella isolata dalle urine nel 75% dei pazienti; nel 25% furono isolate specie differenti. Le candidemie associate a candidurie si osservarono soprattutto nei reparti chirurgici.

*C. albicans* fu la specie maggiormente isolata da pazienti con fungemia e funguria, seguita da *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

## P123

### ASPERGILLOSI INVASIVA IN PAZIENTE SOTTOPOSTA A TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO ALLOGENICO.

Farris A.G.\* , Caddeu R.\* , Podda G.S.\* , Vacca A\*\*.,

\* Laboratorio Analisi Ospedale "R. Binaghi",

Via Is Guadazzonis 14, 09100 Cagliari

\*\* Centro Trapianti Midollo Osseo P.O. "R. Binaghi",

Via Is Guadazzonis 14, 09100 Cagliari

**Introduzione.** A decorrere dagli anni '70 l'incidenza dell'aspergillosi invasiva è andata progressivamente aumentando. L'inhalazione di spore di *Aspergillus* (muffe ubiquitarie) può risultare molto comune, ma la malattia è relativamente rara. L'inhalazione di aria contenente spore di *Aspergillus* (il 90% è rappresentato da *A. fumigatus*) è una delle cause principali delle infezioni polmonari nei pazienti immunocompromessi o neutropenici (leucemici, trapiantati d'organo, ..). Nonostante l'introduzione di nuovi ed efficaci farmaci antimicotici, l'aspergillosi invasiva ha molto spesso esito fatale (mortalità del 50 - 100 % dei casi).

Per questo motivo le misure preventive rivestono un ruolo di importanza primaria nel controllo di questa patologia e richiedono una piena conoscenza dell'epidemiologia di questa malattia.

**Caso clinico.** Viene riportato un caso clinico che è esemplificativo della multifattorialità presente nell'insorgenza e condizionante il decorso dell'aspergillosi invasiva.

Una donna di 35 aa. affetta da Sindrome Mielo Displasica viene sottoposta in data 07/07/2003 a trapianto di midollo osseo allogenico da donatore familiare HLA-identico. Il trapianto ha esito positivo con attecchimento allogenico completo.

Tre giorni dopo la dimissione compare GVHD di II° grado con interessamento cutaneo e intestinale con iperpiressia, diarrea, vomito per cui viene nuovamente ricoverata. Dopo 3 gg di terapia antibiotica scompare l'iperpiressia mentre compare un aumento della bilirubina (B.T. 2 mg/dl), indice di probabile GVHD epatica che dopo 9 gg aumenta a B.T. 3.3 mg/dl. Contemporaneamente si ha aumento di AST e ALT, si positivizza il CMV-DNA quantitativo, si aggrava la diarrea, compare dispnea con modesta ipossiemia. La colonscopia e la biopsia intestinale evidenziano una colonpatia acuta compatibile con una GVHD acuta. Il quadro complessivo depone per una GVHD di grado IV° per cui si intensifica la terapia con ATG (siero antilinfocitario) e Basilimax (anticorpo monoclonale contro il recettore dell'interleuchina 2).

Dal 23/08 si osserva un peggioramento del quadro addominale e di quello respiratorio. Dal 25/08 compare ipoestesia all'emiviso dx associato a parestesie. La RMN evidenzia lesioni focali multiple (Ø 1-2 mm) presenti in entrambi gli

emisferi cerebrali. La pz. viene trattata con ambisome e voriconazolo.

Si ha un peggioramento della GVHD epatica (Bil.Tot. = 29 mg/dl) e intestinale; compare lieve iperpiressia (37,9 °C). Contemporaneamente compare ileo paralitico e insufficienza respiratoria che determina il decesso della paziente.

La pz è stata sottoposta per tutto il periodo della malattia a terapia antibiotica (levofloxacin, meropenem, teicoplanina), antivirale (aciclovir, ganciclovir), antimicotica (fluconazolo, voriconazolo), immunosoppressiva (ciclosporina, urbason, ATG, Basilimax).

**Materiali e metodi.** Numerosi campioni di espettorato, di feci, di tamponi faringei e nasali, e di emocolture sono stati inviati durante il ricovero della pz. in Laboratorio per le ricerche microbiologiche di routine. Tuttavia solo dai campioni di espettorato e di feci inviati in data 28/08/03 nelle piastre contenenti agar destrosio Sabouraud con CAF dopo 48 ore a 37°, si sono sviluppate colonie piatte, polverose che hanno assunto un colore grigio fumo. L'esame microscopico è stato eseguito utilizzando il metodo del "Vetrino con nastro adesivo": l'osservazione microscopica ha evidenziato una disposizione colonnare delle teste conidiali con vescicole semisferiche da cui si dipartivano una sola fila di fialidi regolari; i conidi si presentavano globulari e rugosi. Pertanto sulla base dell'aspetto macroscopico e delle caratteristiche microscopiche si è posta diagnosi di *Aspergillus fumigatus*.

Il monitoraggio ambientale dell'aria è stato effettuato con campionatore d'aria "SAS Super 90" P.B.I. seguendo il protocollo operativo indicato dalle stessa Ditta.

**Risultati e conclusioni.** Il caso descritto è esemplificativo della concomitanza di più fattori di rischio presenti nell'insorgenza della aspergillosi invasiva che possiamo così sintetizzare:

1. fattore estrinseco: durante il periodo cui si riferisce il caso clinico descritto, nel terreno adiacente all'ospedale è stato effettuato uno sbancamento. Il monitoraggio ambientale dell'aria sia nelle stanze di degenza ordinaria del CTMO (dove si trovava la pz) sia all'esterno del P.O. ha evidenziato la presenza di *aspergillus fumigatus* in carica elevata.
2. fattore intrinseco: la paziente presentava una marcata neutropenia, una GVHD di IV grado, ed è stata sottoposta a terapia immunosoppressiva con ATG (siero antilinfocitario) e Basilimax (anticorpo monoclonale IL2-R).

Sulla base degli accertamenti ambientali ed in conseguenza del caso clinico sopra riportato sono state predisposte le seguenti procedure:

1. chiusura temporanea e bonifica del reparto;
2. installazione di un sistema di filtrazione dell'aria con filtri HEPA e U.V. non solo nelle camere sterili, dove erano già presenti, ma anche nelle stanze di degenza ordinaria;
3. effettuazione di un più stretto monitoraggio dell'aria confinata;
4. predisposizione di tests diagnostici più precoci per rilevare infezioni di tipo micotico.

## P124

### RHODOTORULA IN ASCESSO CORNEALE

Giardini F., Machetta F\*, de Sanctis U.\*, Pollino C.

Laboratorio Analisi, Direttore: D. Poncini,  
Ospedale Oftalmico "G. Sperino", Torino

\*Clinica Oculistica dell'Università di Torino,

Direttore: F.M. Grignolo,

Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Via Juvarrà 19, 10128 Torino

Paziente di anni 60 affetto da ipertensione arteriosa, NIDDM e glaucoma malformativo in OO. Sottoposto nel 1986 in OD

ad enucleazione per glaucoma maligno ed esiti di endoftalmite. Nel 2003 era effettuato in OS un trapianto di cornea a scopo terapeutico per ascesso corneale da *Candida albicans* resistente alla terapia antimicotica locale e sistemica. A 4 mesi dall'intervento si sviluppava in corrispondenza del lembo innestato un'infezione da *Rhodotorula*. Dal prelievo corneale erano eseguite diverse semine:

1. su Agar Cioccolato con arricchimento
2. su Agar Haemophilus (incubato in microaerofilia)
3. su Sabouraud Dextrose Agar
4. in brodo Hemolyne difasico\*

\* (questo brodo, correntemente usato per le emocolture, è stato da noi adottato anche in caso di infezioni oculari a prognosi severa (panoftalmite, endoftalmite, ulcere corneali gravi) poiché nel corso degli anni abbiamo potuto constatare che in questi casi clinici, normalmente già ampiamente trattati con antibiotici, spesso risulta l'unico terreno che consente uno sviluppo culturale in vitro).

Dopo 72 ore d'incubazione in termostato a 37°C tutti i terreni di coltura solidi davano esito culturale negativo. Faceva eccezione il brodo Hemolyne, che presentava una debolissima torbidità. In 4° giornata il brodo si positivizzava nettamente. Al microscopio, con colorazione al Lactophenol Cotton Bleu, alcune cellule presentavano una tipica morfologia allungata con gemmazione bipolare.

La successiva subcoltura da brodo su una nuova piastra di Sabouraud Dextrose Agar dava esito positivo, con discreta pigmentazione rosacea delle colonie sviluppatesi, che pertanto si identificavano come lieviti appartenenti al genere *Rhodotorula*.

Si allestiva immediatamente un antimicogramma su piastre di RPMI Agar con il metodo E-Test. Gli antimicotici saggiati erano: Fluconazolo, Amfotericina-B, Ketoconazolo, Itraconazolo, 5-Fluorocitosina. La risposta culturale all'antimicogramma era completamente negativa. Ciononostante veniva comunque instaurata una terapia locale con Amfotericina-B e con Iodopovidone. Dopo un iniziale miglioramento del quadro clinico si assisteva ad un nuovo peggioramento dello stesso e pertanto si effettuava un intervento di cheratectomia a scopo diagnostico e terapeutico associata a ricoprimento congiuntivale.

## P125

### CASE REPORT: INFEZIONE DA *ALTERNARIA INFECTORIA* IN UN PAZIENTE TRAPIANTATO DI CUORE.

Lo Cascio G (1); Maccacaro L (2); Rizzonelli P(2);  
Fontana R(2).

<sup>1</sup>Servizio di Microbiologia, Azienda Ospedaliera di Verona

<sup>2</sup>Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Verona

L'aumento del numero di trapianti d'organo comporta anche l'aumento dei pazienti immunodepressi esposti al rischio di sviluppare infezioni micotiche opportunistiche che richiedono al laboratorio di microbiologia diagnosi un tempo non comuni.

**Case report.** T.M., paziente di 49 anni trapiantato di cuore dopo circa un anno dall'intervento manifestò la comparsa di lesioni nodulari multiple ad entrambi gli arti inferiori; non erano presenti né febbre né dispnea. L'esame istologico eseguito sulla biopsia di una lesione mostrò strutture lievitiforimi e ife all'interno di un processo granulomatoso.

**Materiali e metodi.** Le indagini culturali portarono all'isolamento di colonie giallo-biancastre con reverse verde oliva che al vetrino mostravano ife settate con pigmento melaninico