

## Identification of *Fusarium verticillioides* using gene sequencing in a patient after orthotopic liver transplantation

Antonella Grottola<sup>2</sup>, Claudia Venturrelli<sup>2</sup>, William Gennari<sup>2</sup>, Mauro Codeluppi<sup>1</sup>, Francesca Cavrini<sup>2</sup>, Fabio Rumpianesi<sup>2</sup>, Giovanni Guaraldi<sup>1</sup>, Stefania Cocchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Clinica delle Malattie Infettive, Dipartimento di Medicine e Specialità Mediche, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena

<sup>2</sup> Struttura Complessa di Microbiologia e Virologia, Policlinico di Modena

<sup>3</sup> Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Ematologia e Oncologia, Ospedale S. Orsola-Malpighi, Università degli Studi di Bologna, Bologna

**Key words:** *Fusarium verticillioides*, gene sequencing,  $\beta$ -Tubulin, translation Translation elongation factor EF-1

**Identificazione di *Fusarium verticillioides* mediante sequenziamento genico in una paziente trapiantata di fegato**

### SUMMARY

*Fusarium* is an opportunistic fungal pathogen which is emerging as a significant cause of morbidity and mortality particularly in patients with haematological malignancies and bone marrow transplant recipients but also in solid organ transplant recipients.

Here we have diagnosed a case of disseminated *Fusarium* infection with cutaneous localization in a patient undergoing a second liver transplant after chronic rejection of primary graft.

The morphology of the isolated strain didn't allow a clear distinction between *Fusarium. napiforme* and *Fusarium. verticillioides*. For this reason it was performed a gene sequencing analysis to have a reliable identification. The isolated strain was thus identified as *F. verticillioides*.

### INTRODUZIONE

L'incidenza d'infezioni fungine invasive è in aumento nei pazienti immunocompromessi. *Fusarium* è un fungo opportunistico patogeno che sta emergendo come importante causa di morbilità e mortalità soprattutto in pazienti affetti da neoplasie ematologiche, in pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo e occasionalmente anche in pazienti sottoposti a trapianto d'organo solido (43, 76). Presentiamo un caso d'infezione disseminata da *Fusarium F. verticillioides* con interessamento cutaneo in una paziente sottoposta a ritrapianto di fegato per rigetto cronico per il quale si è giunti all'identificazione di specie tramite l'utilizzo della tecnica di sequenziamento genico.

### CASO CLINICO

Una donna romana di 30 anni veniva sottoposta a trapianto di fegato per cirrosi da colangite sclerosante primitiva. A distanza di 18 mesi, a causa di ripetuti episodi di rigetto, veniva effettuato un ri-trapianto. Dopo 23 giorni dall'ultimo intervento la paziente manifestava febbre elevata, papule di 5-10 mm di diametro ulcerate e dolorose sulla gamba destra di cui alcune emorragiche.

### MATERIALI E METODI

#### Esame colturale

Da due campioni di sangue periferico, prelevati al 28° giorno dopo il ritrapianto, venivano allestite emocolture. I flaconi venivano incubati nello strumento Bactec 9.240 (Becton Dickinson, Italia).

Alla comparsa di una positività dell'emocoltura erano allestiti sia un esame microscopico mediante colorazione di Gram che delle subcolture su Sabouraud dextrose agar (BioMérieuxbioMérieux, Marcy l'Etoile, France) incubate a 37°C e a 24°C per 5 settimane.

#### Antimicogramma

L'antimicogramma è stato eseguito utilizzando il metodo E-test per amfotericina B, itraconazolo, fluconazolo, voriconazolo, caspofungina e seguendo le istruzioni della ditta produttrice (AB BbioMérieux, Solna, SwedenFrance). Da una coltura del ceppo clinico isolato, di 7 giorni cresciuta su potato dextrose agar a 35°C per 7 giorni, è stata preparata allestita una sospensione (range 0,4x10<sup>4</sup>-5x10<sup>4</sup> UFC/ml) di conidi o sporangiospore distribuita successivamente seminata su RPMI agar + 2% glucosio (Biolife, Italiana, Milano, Italia).

In parallelo è stato allestito un analogo antimicogramma di controllo utilizzando il ceppo ATCC 22019 di *Candida parapsilosis*. Le piastre sono state incubate a 48 ore a 35°C, la MIC è stata rilevata in corrispondenza dell'intersezione del bordo della zona ellittica di una prominente (itraconazolo, fluconazolo, voriconazolo) o di una completa (amfotericina) inibizione con la strip di antifungino. Per caspofungina è stata determinata la MEC.

#### Sequenziamento genico

Il DNA fungino è stato estratto dalle subcolture ottenute utilizzando il kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN S.p.A., Milano, Italia) e amplificato tramite Polymerase Chain Reaction (PCR). In particolare sono stati generati due ampliconi corrispondenti ad un frammento dei geni fungini EF-1 (translation elongation factor 1-alpha) e beta-tubulina. I prodotti di PCR per EF-1 e per la beta-tubulina sono stati ottenuti utilizzando rispettivamente i primers EF-1 e EF-2 in accordo con Bezuidenhout (32) ed i primers T1 e T22 in accordo con O'Donnell (87). Nel dettaglio la reazione di amplificazione è stata realizzata in un volume finale di 50ul contenente 100 ng di DNA estratto, 25 ul di REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix con MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Inc. Milano, Italia), 40 pmoli di ciascun primer.

I prodotti di amplificazione (700 bp per EF-1 e 1227 per beta-tubulina) sono stati sequenziati utilizzando il BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit e analizzati su sequenziatore automatizzato a fluorescenza ABI PRISM 3100 Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Le sequenze ottenute sono state analizzate con un software di allineamento (SeqScape, Applied Biosystem), ottenendo una sequenza di consenso. Tale sequenza è stata inserita in GeneBank Database dell'NIH (21) per il confronto, tramite il software BLAST, con le altre sequenze depositate al fine di ottenere l'identificazione di specie.

### RISULTATI

#### Esame colturale

Le colture dei due campioni di sangue periferico, prelevati al 28° giorno dopo il ritrapianto, risultavano positive dopo 96 ore di incubazione in Bactec 9.240 per la presenza di funghi filamentosi. L'osservazione microscopica, eseguita nelle prime tre settimane della coltura, indirizzava per *Fusarium F. verticillioides*; non era comunque possibile escludere *Fusarium F. napiforme*, specie molto simile, che differisce

**Corresponding author: Antonella Grottola**

Struttura Complessa di Microbiologia e Virologia Azienda Integrata Ospedaliero-Universitaria, Policlinico

Via del Pozzo, 71 - 41100 Modena - Tel.:059 4223752 - Fax: 059 4223625

E-mail: [antonella.grottola@unimore.it](mailto:antonella.grottola@unimore.it)

per la comparsa tardiva in coltura di clamidospore e di caratteristici microconidi napiformi, secondo i criteri proposti da Guarro e Liu (54, 65). Così, dopo avere prolungato l'incubazione fino a 5 settimane a 24°C, l'esame microscopico evidenziava nelle ife numerose cellule rigonfie ben strutturate che venivano scambiate per clamidospore di *Fusarium F. napiforme* (Figura I).

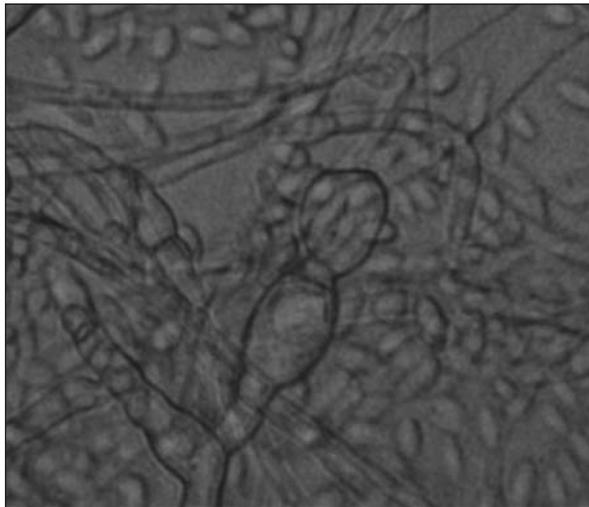
#### Antimicogramma

I risultati del test di suscettibilità sensibilità a 48 ore sono stati i seguenti: fluconazolo MIC $\geq$  256 ug mg/ml, caspofungin MICMEC $\geq$  32 ugmg /ml, itraconazolo MIC  $\geq$  32 ugmg /ml, amfotericina B MIC = 8-16 ugmg /ml, voriconazolo MIC = 4 ugmg /ml. (Fig. 3a e b).

In accordo con CLSI M-38 A2 è stato refertato il valore di MIC/MEC per i farmaci antifungini testati, in quanto non sono stati finora stabiliti i relativi breakpoints interpretativi.

#### Sequenziamento genico

L'analisi mediante sequenziamento di un frammento del gene codificante per il Translation Elongation Factor (EF-1) e del gene codificante per la  $\beta$ -tubulina permetteva d'identificare definitivamente il micete come *Fusarium F. verticillioides*. In particolare le sequenze del ceppo isolato mostravano un'identità del 99%, corrispondente ad una differenza di una singola base, con il ceppo di riferimento *Fusarium. verticillioides* NRRL 43697 (GenBank accession number EF 453022).



**Figura I.** Pseudoclamidospore o cellule rigonfie terminali e a catena (5-12  $\mu$ m) di *Fusarium verticillioides*.

#### CONCLUSIONI

Le infezioni da *Fusarium* spp. tendono ad essere disseminate e la prognosi è di solito severa perché i funghi sono resistenti alla maggior parte degli agenti antifungini disponibili.

Il fattore più importante per favorire l'instaurarsi di fusariosi è la neutropenia prolungata e questo è il motivo per cui le fusariosi si osservano più frequentemente nei pazienti trapiantati di midollo rispetto ai pazienti trapiantati d'organo solido. Nel nostro caso è stata riscontrata un'a infezione dissemina-

ta da *Fusarium F. verticillioides* con interessamento cutaneo in una paziente sottoposta a ritrapianto di fegato per rigetto cronico.

I criteri morfologici si sono rivelati insufficienti per una corretta identificazione a livello di specie del ceppo isolato; infatti l'aspetto microscopico del *Fusarium* indirizzava inizialmente per *Fusarium F. napiforme*, senza potere escludere *Fusarium F. verticillioides*. Solamente l'analisi mediante sequenziamento genico ha permesso di identificare definitivamente il micete come *Fusarium F. verticillioides*.

In conclusione, il caso riportato sottolinea ancora una volta la complessità nell'identificazione di *Fusarium* species in base ai soli criteri micologici ed evidenzia la necessità di ricorrere a metodi molecolari, come il sequenziamento genico, da affiancare alle metodiche diagnostiche tradizionali.

Nel caso descritto il sequenziamento genico ha permesso di sciogliere il dubbio tassonomico posto dai criteri microbiologici di identificazione, ma non ha anticipato i tempi per l'inizio del trattamento antimicotico in quanto è stato eseguito dopo l'inizio della trattamento antifungino in profilassi.

La refertazione dell'isolato come *Fusarium. verticillioides*, in associazione con l'antimicogramma, è stata fondamentale nella gestione clinica del paziente poiché ha permesso di definire l'eziologia e di identificare la sorgente dell'evento infettivo nonché di impostare in modo mirato la terapia.

Da questo si evince che

la differenziazione di specie nel trattamento antimicotico permette di orientare il clinico nell'impostazione della terapia empirica basata sui dati della letteratura scientifica internazionale in attesa della disponibilità dell'antimicogramma.

Ad esempio è noto che ceppi clinici di *Fusarium solani* sono resistenti alla maggior parte degli antimicotici (1); l'identificazione di specie si rivela importante per la scelta della terapia antimicotica.

In conclusione il caso riportato sottolinea la complessità nell'identificazione di *Fusarium* species in base ai soli criteri micologici ed evidenzia la necessità di ricorrere a metodi molecolari, come il sequenziamento genico, da affiancare alle metodiche diagnostiche tradizionali.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Azor, M., J. Gené J, J. Cano J, and J. Guarro J.. 2007. Universal *in vitro* antifungal resistance of genetic clades of the *Fusarium solani* species complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51: 1500-1503.)
2. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Research*, 2008, Jan; 36 (Database issue): D25-30).
3. Bezuidenhout CC, Prinsloo M, Van der Walt AM. Multiplex PCR-based detection of potential fumonisin-producing *Fusarium* in traditional african vegetables. *Environ Toxicol* 2006; 21: 360-366, 2006.
4. Denning DW, Evans EG, Kibbler CC, Richardson MD, Roberts MM, Rogers TR et al. Guidelines for the investigation of invasive fungal infections in haematological malignancy and solid organ transplantation. British Society for Medical Mycology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16 (6): 424-436.
5. Guarro J, Gene J. *Fusarium* infections. Criteria for the identification of the responsible species. *Mycoses* 1992; 35 (5-6): 109-114.
6. Liu K, Howell DN, Perfect JR, Schell WA. Morphologic criteria for the preliminary identification of *Fusarium*, *Paecilomyces*, and *Acremonium* species by histopathology. *Am J Clin Pathol* 1998; 109 (1): 45-54.
7. Morrison VA, Haake RJ, Weisdorf DJ. The spectrum of non-*Candida* fungal infections following bone marrow transplantation. *Medicine (Baltimore)* 1993; 72 (2): 78-89.
8. O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogenet Evol* 1997; 7 (1): 103-16.