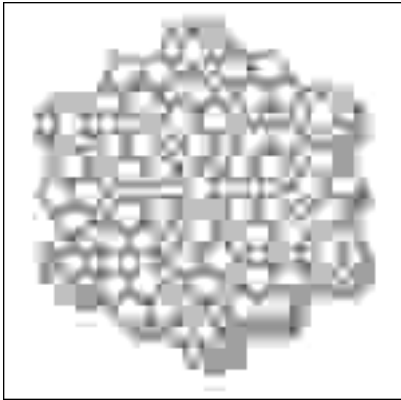


Caleidoscopio



Serena Gori

Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti

Laboratorio Divisionale
Malattie Infettive
Pisa

75

**Direttore Responsabile
Sergio Rassu**

 **MEDICAL
SYSTEMS S.P.A.**

Via Rio Torbido, 40 - 16165 Genova Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1992

Serena Gori

Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti

Editoriale

E' fuori di dubbio che le manifestazioni cliniche che si registrano con maggior frequenza nei pazienti affetti dalla Sindrome da Immunodeficienza Acquisita (AIDS) sono legate al gruppo delle infezioni opportunistiche.

Utilizzando la classificazione dei Centers for Disease Control per l'infezione da HIV, queste costituiscono il gruppo IV, sottogruppo C.

Sono tante le infezioni opportunistiche che fanno da corollario alla storia della malattia ed alcune di esse, come la polmonite da *Pneumocystis carinii* che si presenta nell'80% dei pazienti nel corso della loro storia clinica, sono per tale ragione, in maniera marcata, strettamente legate alla Sindrome.

I problemi diagnostici posti da queste infezioni, in questo tipo di pazienti, sono del tutto peculiari e sono ben evidenziati in questa monografia della dott.ssa Gori.

Le alterazioni immunologiche, non solo dell'immunità cellulo-mediata ma anche di quella legata alla produzione di immunoglobuline, offrono l'opportunità di approcci e metodologie che si differenziano da quelle utilizzate in altre patologie.

Per tale motivo riprendiamo ben volentieri il discorso che avevamo già affrontato con il Prof. Gargani (v. *Caleidoscopio* n. 47, Gennaio 1990) con questo volume che, anche per la ricchezza dell'iconografia, è di sicuro interesse.

Va tuttavia precisato che questo bellissimo volume-atlante non può, per motivi che sono comprensibili, esaurire tutte le problematiche legate alla diagnostica di queste patologie, che contiamo di trattare ancora in futuro.

E' sufficiente pensare al grosso problema delle infezioni da micobatteri o da herpesvirus in corso di AIDS, qui assenti, per comprendere quanto vasto sia l'argomento.

D'altra parte non possiamo ignorare le tecniche diagnostiche, che stanno prepotentemente emergendo, con sonde molecolari e

che si stanno dimostrando in molti casi superiori alle tecniche tradizionali per capire che tanto c'è ancora da scrivere sull'argomento.

La Dott.ssa Serena Gori è comunque una testimone diretta di queste tematiche. Laureata in Scienze Biologiche presso l'Università di Firenze e si è specializzata in Microbiologia presso l'Università di Pisa.

Dal 1973 lavora presso l'Ospedale di Pisa. Ha prestato la sua opera presso il Servizio di Istologia ed Anatomia Patologica dove si è dedicata alla diagnostica citopatologica ed alle tecniche immunoistochimiche.

Dal 1990 è responsabile del Laboratorio Divisionale di Malattie Infettive. Questo Laboratorio, che è una emanazione del Laboratorio Centrale, è stato istituito nel 1990 nell'ambito del Progetto Nazionale AIDS con la finalità della diagnostica di laboratorio dei patogeni opportunisti. Le profonde competenze nel campo della morfologia dei microorganismi correlate alla conoscenza delle tecniche microbiologiche si sono dimostrate molto utili nella ricerca dei patogeni opportunisti.

Queste esperienze sono una sicurezza e il volume potrà fornire informazioni che sicuramente arricchiranno il bagaglio culturale e professionale di tanti operatori.

Sergio Rassu

Introduzione

Il numero delle persone immunocompromesse è in continuo aumento (per AIDS, trapianti di organo, pazienti che assumono farmaci immunosoppressivi) e queste persone sono esposte ad infezioni anche da parte di nuovi patogeni. I pazienti immunosoppressi hanno una risposta immunitaria alterata che provoca una presentazione clinica atipica e difficile da interpretare e l'andamento della infezione è spesso caratterizzato da un instaurarsi silente ed insidioso della infezione seguito da una progressione molto rapida. La diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti ha quindi un ruolo di primo piano nella gestione del malato. Sono infatti disponibili farmaci attivi nella maggioranza delle infezioni e la sopravvivenza è spesso correlata alla precocità del trattamento. La diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti presenta alcune peculiarità:

- Lo studio dello sviluppo e della cinetica degli anticorpi non è così significativo come nei pazienti immunocompetenti. Infatti, anche se è principalmente la immunità cellulo-mediata ad essere alterata, anche la produzione degli anticorpi subisce delle interferenze. Un titolo anticorpale basso può quindi corrispondere sia ad una infezione remota che ad una in atto, inoltre nelle riattivazioni, che sono molto frequenti, difficilmente si ha la produzione di IgM. Lo studio degli anticorpi è comunque sempre utile al clinico per studiare il malato, ma perde il ruolo prioritario ed inequivocabile che riveste nelle infezioni "tradizionali".

- La diagnostica dei patogeni opportunisti deve privilegiare quindi i metodi che mettono direttamente in evidenza il microorganismo (m.o.): colture, ricerca citologica, uso di Anticorpi monoclonali (ACM) diretti contro i m.o., uso di sonde a DNA, ricerca di antigeni solubili nel siero. Per le colture c'è la complicazione che i protozoi (che hanno un grosso ruolo in questa patologia) non si coltivano facilmente e che i virus (anche essi hanno un ruolo importantissimo) in genere sono coltivati solo in laboratori molto specializzati. Per queste due categorie di patogeni la identificazione morfologica e con ACM è quindi preminente.

- In aiuto al laboratorista viene il fatto che, proprio per la scarsa o nulla reazione dell'ospite, i m.o. presenti sono spesso

abbondantissimi e in attiva crescita per cui sono facilmente individuabili all'esame microscopico e facilmente coltivabili.

- Tra pazienti immunocompromessi è molto frequente il contagio interumano: la grande carica infettante da una parte e la scarsità di difese dall'altra rendono possibili vie di contagio che non si verificano tra persone immunocompetenti.

Esaminiamo adesso le possibilità diagnostiche offerte dai vari m.o.

Protozoi

Pneumocystis carinii (P. c.)

Questo è senz'altro il m.o. che con maggiore assiduità i clinici ci chiedono di individuare, essendo il più frequente responsabile di polmoniti e quindi molto spesso sospettato clinicamente.

La presenza degli Ac non ha correlazione con la clinica dato che l'infezione è una riattivazione e quindi anche i sani possono possedere Ac contro lo *P.c.* La ricerca colturale non è possibile. Non rimane altro che la ricerca microscopica e con ACM. Materiali utili: la ricerca può essere fatta su liquido di lavaggio bronchiale o su espettorato indotto da aerosol di soluzione salina.

Nell'espettorato non indotto lo *P.c.* arriva con molta difficoltà perché le cisti dentro l'alveolo sono circondate da una densa schiuma che forma come uno stampo interno e rimane quindi incastrata tra le pareti degli alveoli e non esfolia spontaneamente. Lo studio dell'espettorato indotto è abbastanza complesso perché gli espettorati sono normalmente ricchi di lieviti (che hanno le stesse affinità tintoriali dello *P.c.*) e perché è difficile che l'espettorazione indotta produca materiale ricco di parassiti.

In caso di pneumopatia da definire è sempre bene cercare di avere il liquido di lavaggio bronchiale, molto più agevole da studiare sia dal punto di vista citologico che colturale. Per evidenziare lo *P.c.* abbiamo a disposizione gli ACM, l'esame a fresco e con colorazioni citologiche (Giemsa, Papanicolaou, Grocott, Blu di Toloidina).

Nella fig. 1 è rappresentato un ammasso di *P.c.* a fresco, sopra tre macrofagi polmonari. Si vedono bene le pareti delle cisti ammassate tridimensionalmente (molte sono fuori fuoco) e in alto a sinistra si vede una cisti vuota con le due metà della parete collabite tra loro. Questa forma "a tazza" è tipica dello *P.c.*

Il laboratorista che non ha pratica di citologia è propenso ad usare gli ACM evidenziati in fluorescenza per la individuazione di *P. c.*, ma c'è una complicazione: proprio per la disposizione delle cisti all'interno di una schiuma compatta difficilmente è riconoscibile il profilo fluorescente di singole cisti, ma il risultato positivo è rappresentato da masserelle più o meno grandi con fluorescenza diffusa. Queste masserelle sono rappresentate dalle

schiume che racchiudono le cisti sia intere che spezzettate ad opera del ciclo replicativo. Nella fig. 2 si vede un ammasso di *P.c.* positivo all'ACM evidenziato in fluorescenza e nella fig. 3 l'ACM è stato evidenziato con perossidasi ed appare in rosso. I due quadri sono sovrapponibili, nella colorazione immunocitochimica si vede come l'antigene oltre che nelle cisti intere sia presente polverizzato all'interno della schiuma. In alto è visibile una forma "a tazza".

La mancanza dei dettagli citologici nella immunofluorescenza espone al rischio di male interpretare colorazioni di fondo o reazioni aspecifiche, per cui è prudente accompagnare sempre la ricerca con ACM a qualche colorazione citologica. Aspetti citologici dello *P.c.*: nella schiuma, ammassate tridimensionalmente, sono presenti le cisti che hanno diametro di 7-10 micron. All'interno di ogni ciste ci sono i trofozoiti, che alla fine del ciclo replicativo sono 8 e misurano 1,5-2 micron in diametro. Alcune colorazioni come il Grocott e il Blu di Toloidina colorano la parete della ciste e non mostrano i trofozoiti all'interno, altre come il Giemsa invece mostrano i trofozoiti all'interno in ble.

Nelle figure 4 e 5 e 6 sono rappresentate le colorazioni Ble di Toloidina e Grocott: si vede che le immagini sono simili, oltre alla parete circolare della ciste spesso all'interno è possibile scorgere una inclusione tonda che è caratteristica dello *P.c.*

Nella fig. 7 è stata usata la colorazione di Giemsa: la parete cistica non è colorata e dà un alone bianco mentre si scorgono i trofozoiti, 4 in una ciste, 8 in un'altra. Sono presenti alcuni globuli rossi che danno un'idea delle dimensioni. Nella fig. 8 si vede circondato da tre istiociti un ammasso di *P. c.* colorato con il Papanicolaou.

Questa colorazione, che è la colorazione di routine della citologia, è ritenuta normalmente inadeguata per la diagnosi di *P.c.* Indubbiamente è bene eseguire anche colorazioni specifiche, ma il sospetto della presenza di *P.c.* deve essere sollevato anche dalla colorazione citologica di routine. Quale colorazione conviene scegliere per la routine di laboratorio? Le foto dei preparati a fresco, con Giemsa e con Papanicolaou rappresentano quadri particolarmente nitidi, spesso gli ammassi si presentano con dettagli più confusi. Le foto con il Grocott e con il Ble di Toloidina invece rappresentano la norma, le immagini sono sempre così chiare. Il Grocott è una colorazione impegnativa che richiede molti reattivi e tempi lunghi, circa 4 ore (anche se adesso ci sono proposte che accorciano i tempi con l'uso del forno a microonde).

Il Ble di Toloidina è invece estremamente semplice, 2 passaggi per complessivi 20 minuti ma non avendo controcolorazione deve essere affiancato da un'altra colorazione. Inoltre il Grocott dà una positività di colore bruno (precipitano i sali d'argento) che ha lo stesso colore delle inclusioni che hanno i macrofagi nei forti fumatori. Per tutte queste ragioni abbiamo scelto per la nostra routine due colorazioni, il Ble di Toloidina ed il Giemsa.

***Cryptosporidium* (Cr)**

La diagnosi di Criptosporidiosi richiede la identificazione delle oocisti nelle feci o nelle biopsie intestinali. La ricerca degli Ac non ha infatti stretta correlazione con la clinica. Talvolta le oocisti sono state trovate anche nello sputo. Le tecniche usate per identificare le oocisti sono la colorazione di Ziehl-Neelsen, la colorazione estemporanea di Heine e la colorazione con ACM evidenziati in fluorescenza. Recentemente sono stati proposti metodi immunoenzimatici per evidenziare le oocisti nelle feci.

Le oocisti a fresco non sono facilmente identificabili perché rotonde e di 4-6 micron di diametro sono confondibili con i lieviti. Il metodo più agevole per identificare il *Cr.* è per la nostra esperienza la colorazione di Heine, che è una colorazione negativa che mette in evidenza la impermeabilità della parete della oocisti al colorante, la Carbofucsina. Per allestire il preparato si unisce il materiale fecale ad una goccia di colorante, si stempera bene sul vetrino e si lascia asciugare. Quando il preparato è asciutto, senza aspettare più di mezz'ora altrimenti il colorante tende a penetrare, lo si osserva ad immersione. Le oocisti, proprio come conseguenza della impermeabilità della parete, non sono colorate in rosso ed appaiono come perle bianche fortemente rifrangenti, omogenee in forma e dimensioni.

Nella fig. 9 si vede il quadro a piccolo ingrandimento, nella figura 10 a più forte ingrandimento una oociste si trova tra due lieviti colorati in rosso. Si vede come si riesca a distinguere facilmente tra *Cr.* e lieviti. L'altra colorazione utile per evidenziare il *Cr.* è la colorazione di Ziehl-Neelsen. Questo metodo colora in rosso la parte interna della ciste e lascia incolore i lieviti. Nella fig. 11 sono visibili le oocisti colorate in rosso e facilmente distinguibili dai lieviti, colorati in verde dalla controcolorazione. L'uso degli

ACM è un ottimo metodo per la conferma del quadro citologico. Nelle preparazioni per la fluorescenza il materiale deve essere disposto in uno strato sottile per essere raggiunto dagli ACM e la quantità di materiale osservabile è quindi minore rispetto a quella esaminata in un preparato citologico. E' quindi opportuno allestire diversi vetrini se le oocisti non sono molto abbondanti. Trattate con ACM le cisti presenti mostrano il profilo circolare fluorescente (fig. 12). Data la costanza della forma e della dimensione il profilo fluorescente è facilmente distinguibile da fluorescenze aspecifiche. Per l'esame parassitologico delle feci noi usiamo l'esame diretto con Lugol e l'esame dopo arricchimento. Tra le tecniche di arricchimento pratichiamo la tecnica di Richtie con formalina etere. In alcuni casi di Criptosporidiosi ho notato che il numero di parassiti era superiore nell'esame a fresco rispetto all'arricchimento.

Questo dipende dal fatto che le oocisti sono spesso intrappolate in cordoni di muco e non passano l'ostacolo della filtrazione. Così adesso noi di routine effettiamo esame a fresco e colorazione di Heine sulle feci fresche, quindi l'arricchimento e su questo di nuovo la osservazione con Lugol ed un vetrino per lo Ziehl-Neelsen. Le feci sono spesso acquose di colore ocra e si deve esaminare il materiale che si è depositato in fondo al contenitore dato che le oocisti tendono a sedimentare. E' importante fare sempre lo Ziehl-Neelsen anche se la colorazione di Heine è negativa perché può capitare di individuare dei bacilli acido-alcool resistenti.

Nella fig. 13 si vede un campione fecale positivo che è stato il primo elemento di laboratorio che ha permesso di orientare i clinici verso una micobatteriosi intestinale.

Isospora belli

La diffusione di *I.b.* è mondiale, anche se è più frequente nelle zone tropicali rispetto alle temperate. La diagnosi si fa mediante la identificazione del parassita nelle feci e nelle biopsie intestinali. La *I.b.*, che come il *Cryptosporidium* appartiene al genere *Isospora*, presenta un ciclo prima asessuato e poi sessuato che termina nella formazione delle oocisti che si ritrovano nelle feci. A differenza del *Cr.*, in cui l'ooocisti matura contiene direttamente 4 sporozoi senza sporocisti, nelle *I.b.* la oocisti matura contiene due sporocisti uguali (da cui il nome *Isospora*) ognuna delle quali contiene 4

sporozoiiti. Questa particolarità permette di riconoscere facilmente la *I.b.* a fresco (fig. 14), essa comunque presenta le stesse caratteristiche tintoriali del *Cr.* rispetto alla colorazione di Heine (fig. 15) e allo Ziehl-Neelsen (fig. 16). Le oocisti arrivano nelle feci immature senza aver completato il processo di sporulazione, a differenza del *Cr.* non sono quindi immediatamente infettanti.

Come nelle infezioni da *Cr.*, spesso le feci sono acquose e color ocra e i parassiti sono inglobati in cordoni di muco, per cui è molto utile la colorazione di Heine praticata direttamente sulle feci prima dell'arricchimento. Le oocisti misurano fino a 30 micron in lunghezza, sono ovali e spesso hanno una estremità con un restringimento. La oocisti matura presenta due sporocisti, la oocisti immatura una sola centrale.

Blastocystis hominis (B.h.)

La *B.h.* si trova comunemente nel tratto intestinale come commensale. Attualmente è sospettata di essere causa di diarrea in pazienti immunocompromessi e quindi in tali pazienti la sua presenza va segnalata. Il protozoo presenta un diametro variabile tra 5 e 20 micron, la forma in cui è più facilmente riconoscibile è la forma a "cintura" in cui un grosso vacuolo centrale schiaccia il corpo citoplasmatico alla periferia in un anello sottile che contiene 1 o 2 nuclei (fig. 17). La *B.h.* è più difficilmente riconoscibile quando non ha i vacuoli e può assomigliare ad una cisti di *Entamoeba coli*, (fig. 18) ma la variabilità delle dimensioni e la presenza contemporanea delle 2 forme rendono generalmente agevole il riconoscimento.

Giardia

La *Giardia* non si comporta come opportunistica per motivi che non sono chiari. La incidenza della infezione in categorie a rischio come omosessuali non è aumentata in concomitanza con la comparsa di individui immunodepressi.

Nella fig. 19 a fresco trofozoiti e cisti immature.

Toxoplasma gondii (T.g.)

Il *T.g.* è una frequente causa di encefalite; la diagnosi di toxoplasmosi cerebrale è clinica. Il *T.g.* è infatti altamente immunogenico e gli anticorpi restano indefinitamente nell'individuo che ha superato una infezione a causa della persistenza del parassita nei tessuti per cui le riattivazioni non provocano chiare differenze. Attualmente si stanno sviluppando le tecniche di coltura su linee cellulari. Le infezioni extraneurali sono più rare e più difficili da dimostrare.

La presenza dei tachizoiti è stata descritta in lavaggi bronchiali, liquidi pleurici, strisci di sangue. Nel caso qui illustrato l'identificazione è avvenuta nel sedimenti urinario.

Nella fig. 20 si vede un ammasso di tachizoiti e nella fig. 21 un tachizoite isolato. I tachizoiti hanno aspetto caratteristico: forma a mezzaluna, lunghezza fino ad 8 micron, diametro di 3 micron, l'estremità contrattile appare più intensamente colorata. Per l'identificazione di *T.g.* nei tessuti e liquidi biologici si può ricorrere all'ausilio di ACM.

I funghi

La diagnosi di laboratorio dei miceti opportunisti è la grande sfida che il laboratorista deve vincere. Come risulta evidente da studi autoptici sistematici le infezioni micotiche opportunistiche sono sottodiagnosticate in vivo. Le difficoltà diagnostiche derivano da quadri clinici spesso non caratteristici e dalla complessità del riscontro colturale. Alcuni funghi necessitano infatti di tempi lunghi e di terreni e temperature differenziate.

Le indagini sierologiche, con l'unica eccezione della ricerca dell'Ag. del Criptococco, difficilmente sono risolutive. La ricerca degli Anticorpi (con immunodiffusione, fissazione del complemento ed agglutinazione) e la ricerca dell'Antigene (con agglutinazione) non sempre risultano positivi in caso di infezione sistemica. Quindi, se la negatività non esclude l'infezione, la positività è una importante conferma. Si finisce così per isolare solo i lieviti che crescono rapidamente a 37°, mentre gran parte delle patologie sono a carico di funghi filamentosi e dimorfi che necessitano di ben altre attenzioni. E' d'altra parte chiaro che non tutti i materiali possono essere trattati con lunghe incubazioni, pena l'ingolfamento del laboratorio. E' quindi necessario che il laboratorista selezioni i materiali da trattare in maniera privilegiata. Noi abbiamo trovato nello studio citologico del materiale un metodo sicuro e sensibile per effettuare questa selezione. La correlazione tra citologia e coltura comporta inoltre i seguenti vantaggi:

- alcuni miceti opportunisti (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*) sono normali contaminanti ambientali e la loro crescita colturale deve essere ricercata in campioni successivi per escludere una contaminazione. Nel caso in cui la crescita confermi il quadro citologico si può escludere una contaminazione.

- I pazienti immunodepressi presentano spesso una crescita di lieviti a livello orofaringeo. La crescita di lieviti dalla coltura di lavaggi bronchiali può lasciare il dubbio di una contaminazione dalle alte vie, ma se c'è una evidenza citologica di stretta connessione tra lieviti e cellule bronchiali questo dubbio può essere accantonato.

- I miceti dimorfi hanno quadri citologici molto caratteristici e tempi di crescita molto lunghi. La preventiva osservazione

citologica dei lieviti permette di programmare le colture con i tempi dovuti.

La osservazione citologica del materiale non richiede tecniche complesse. Anche la semplice osservazione diretta a fresco del campione può essere sufficiente per individuare i funghi presenti. La parete di chitina è fortemente rifrangente e facilmente riconoscibile. Le colorazioni citologiche permanenti concluderanno lo studio. Nelle fig. 22 e 23 tratte da uno sputo si vede lo stesso reperto di ife settate a fresco e con colorazione di Giemsa, i quadri sono corrispondenti.

Nella fig. 24 si vede in un lavaggio bronchiale una infezione mista da ife settate e lieviti. Tali reperti indirizzeranno verso colture a 37° e 25°.

La differenza morfologica tra ife settate e pseudoife.

L'ifa fungina è un particolare aggregato di cellule in cui i setti, che si formano per ispessimento anulare della parete, hanno la funzione di strutture di rinforzo. I setti presentano un foro centrale attraverso cui possono passare citoplasma, organelli citoplasmatici e nuclei. Le ife settate non sono tutte uguali.

La osservazione citologica delle ife settate è un grosso aiuto per il laboratorista che cercherà di identificare il fungo mediante la coltura. Alcuni caratteri morfologici possono orientare verso la giusta identità.

fig. 34: ifa di *Aspergillus* hanno calibro uniforme, 7-10 micron, si dividono dicotomicamente con angolo di 45°. Nella foto tratta da un lavaggio bronchiale si vede un nucleo che sta traversando il setto attraverso il foro centrale.

fig. 33 : ifa di *Aspergillus* sopra un gruppo di cellule bronchiali. La reazione dell'ospite può causare rigonfiamenti nello spessore della ifa, ma la struttura di ifa settata è sempre facilmente individuabile.

fig. 27: pseudoifa di *Candida albicans* : si riconosce facilmente che la struttura è formata da diversi lieviti concatenati tra loro.

fig. 38 e 39: ifa di *Mucor*; sono ife a nastro, con pochi setti, di spessore da 6 a 50 micron e diramazioni con angolo di 90°.

fig. 41: ifa di *Trichosporon capitatum*: ife sottili, 5 micron di spessore, tendono a dividersi in artrospore e presentano la produzione di alcuni lieviti.

fig. 44: ifa di *Geotricum*; anche qui le ife tendono a dividersi in artrospore, il diametro è tra 4 e 8 micron e non ci sono lieviti.

Lieviti

L'indagine citologica ci può solo dire che sono presenti alcuni lieviti. La identificazione avviene con i tests di assimilazione che sono disponibili commercialmente. Una volta isolato il lievito si può anche eseguire l'antimicogramma.

Candida albicans (C.a.)

Per questo lievito abbiamo la possibilità di ricorrere a ricerca colturale, ricerca dell'antigene solubile nel siero e ricerca dell'anticorpo. Per tipizzare *C.a.* si può ricorrere alla ricerca dei "germ-tube" dopo incubazione per 2 ore nel siero a 37°, metodo pratico ed economico. Nel caso di crescita di *C.a.*, come di altri lieviti nel lavaggio bronchiale è importante cercare di capire se si tratta di un inquinamento dalle alte vie o di una reale presenza a livello bronchiale. In questa situazione ha ruolo prioritario lo studio citologico: nella fig. 25 si vede alcune pseudoife che penetrano nel gruppo di cellule bronchiali, nella fig. 26 un polimorfonucleato che ha inglobato un lievito gemmante.

Questi quadri testimoniano una profonda invasione dei tessuti da parte del lievito. Nella fig. 27 una pseudoifa formata da diversi lieviti in un BAL. Molte ricerche sono indirizzate a stabilire quanta della capacità dei singoli ceppi di *C.a.* di produrre pseudoife sia variabile su base genetica e quanto sia condizionato dalla presenza delle difese immunitarie. La ricerca degli Ac ha scarso significato clinico, la ricerca dell'Ag avrebbe grande significato clinico ma non sempre viene positivo in caso di infezioni sistemiche. Nei casi sospetti questa ricerca deve essere ripetuta diverse volte al giorno per più giorni.

Cryptococcus neoformans (C.n.)

Le possibilità di diagnosticare il *C.n.* risiedono nella coltura, nella ricerca dell'Ag solubile e nella ricerca citologica. La ricerca citologica è possibile perché il *C.n.* possiede la capsula

polisaccaridica evidenziabile con inchiostro di china e con la colorazione di Mucicarminio. La ricerca con inchiostro di china è facile, veloce e permette di identificare *C.n.* nel liquor, sputo, BAL, urine. Attenzione però perché la capsula non è sempre dello stesso spessore e può diventare così sottile da diventare irriconoscibile.

Queste osservazioni sono in accordo con la teoria che ipotizza che il fattore di virulenza del *C.n.* risieda nella capacità del contenuto capsulare di diffondere nell'ambiente, per cui i lieviti con capsula sottile sono molto più virulenti di quelli con capsula grossa. La sequenza delle 5 foto del *C.n.* sono tutte allo stesso ingrandimento ed è interessante notare come vari lo spessore della capsula. Nella fig. 28 si vede un *C.n.* nel liquor con grossa capsula, nella fig. 29 un *C.n.* inglobato da un istiocita polmonare in un liquido di lavaggio bronchiale, nella fig. 30 nel sedimento urinario colorato con Papanicolaou, nelle ultime due (fig. 31 e 32) colorato con Mucicarminio. La caratteristica forma di gemmazione del *C.n.* "a lacrima che casca" è chiaramente riconoscibile nella fig. 32.

Correlazione tra citologia e coltura:

Un malato colpito da criptococcosi è sottoposto a terapia antimicotica per lunghi periodi e la probabilità del successo della coltura è condizionata dalla somministrazione di farmaci antimicotici. Prima dell'inizio della terapia fino al 90% delle colture di materiale citologicamente positivo dà luogo a crescita, mentre durante la terapia solo il 50% dei casi con positività citologica dà coltura positiva, evidentemente come conseguenza della presenza dell'antifungino che anche se non riesce ad inibire totalmente la crescita in vivo, interferisce nello sviluppo in vitro. E' quindi utile eseguire sempre i due esami in parallelo.

Ricerca dell'antigene solubile:

Si può eseguire su siero e liquor. Questo è forse l'unico test sierologico del "pianeta opportunisti" che è chiaro, ripetibile, univoco, sensibile, con forte correlazione con la situazione clinica. E' sempre positivo in caso di infezione, cala progressivamente fino ad azzerarsi durante la terapia, basta eseguire un test su un solo prelievo perché il risultato è ripetibile. Data la affidabilità di questo test e la notevole diffusione della criptococcosi, nel nostro reparto questo esame è stato inserito tra i tests di base anche per i malati ambulatoriali. Purtroppo anche questo test ha un difetto: molto facilmente si assiste all'effetto prozona, cioè casi positivi danno alle diluizioni più basse reazione false negativa. Dopo

qualche risultato falso negativo abbiamo individuato il problema ed ora eseguiamo lo screening di base contemporaneamente con due diluizioni, siero puro e diluito 1:50.

Funghi filamentosi

Aspergillus

La diagnosi di Aspergillosi può essere basata sull'esame citologico, colturale, sulla ricerca dell'Antigene circolante e sulla ricerca degli Anticorpi. La coltura va tenuta a temperatura ambiente per un minimo di due settimane. Abbiamo visto l'aspetto delle ife settate (fig. 33 e 34).

In alcuni casi che presentano lesioni cavitare si può evidenziare morfologicamente anche le ife conidiofore che terminano con un caratteristico rigonfiamento. Nella fig. 35, tratta da un BAL, è presente una ifa conidiofora tra cellule bronchiali, nella fig. 36 altre due ife conidiofore. In questi casi la identificazione di *A.* è particolarmente semplice, ma generalmente sono presenti solo ife settate. Si noti come sia completamente assente una reazione infiammatoria verso il fungo patogeno. Lo *A.* dà molto frequentemente infezioni associate con altri funghi, virus e protozoi. Le infezioni miste hanno generalmente una prognosi peggiore. Nella fig. 37 l'*A.* è associato con un ammasso di cisti di *P.c.*, in altri casi lo abbiamo trovato insieme a HCMV ed a *C.n.*

Mucor

Il *Mucor* è caratterizzato da ife molto larghe (fino a 50 micron), non settate e che si diramano ad angolo retto. Le ife raramente presentano restringimenti o ingrossamenti. Nelle fig. 38 e 39 si vede il tipico aspetto delle ife. Le ife larghe e sottili a fresco si possono presentare con ripiegamenti che imitano i setti. Nella coltura, che si sviluppa rapidamente, la identificazione è agevole per la presenza delle ife sporangiofore con gli sporangi che contengono le spore all'interno.(fig. 40)

Trichosporon

Questo fungo che in passato dava solo lesioni cutanee è descritto sempre più frequentemente come causa di infezioni

profonde e sistemiche in pazienti immunocompromessi.

La fig. 41 è tratta da uno scraping di profonde ulcere orali ed esofagee. La caratteristica disposizione delle ife settate con piccoli lieviti che sorpassano il setto è facilmente identificabile sia nella citologia che nella coltura su vetrino (fig. 42). Le colonie sono formate da ammassi di artrospore (fig. 43), crescono sia a 37° che a 25° e sono tipizzabili con i tests commerciali che saggiano le assimilazioni.

Geotricum

Anche questo fungo si presenta sotto forma di ife settate che si segmentano in artrospore; è simile a *Trichosporon* ma a differenza di questo le ife non hanno la produzione di blastospore (fig. 44). *Geotricum* è facilmente identificabile nella coltura su vetrino dove si evidenziano le artrospore rettangolari che si formano per frantumazione delle ife mature. (fig. 45)

Fusarium

Questo fungo, normale contaminante dell'aria, fa parte dei nuovi patogeni, che sempre più spesso sono descritti come causanti infezioni in individui immunocompromessi. Data la tendenza delle ife settate a spezzettarsi in artrospore il quadro citologico è spesso di non chiaro riconoscimento.

Nella fig. 46 tratta da un BAL massivamente positivo alla coltura per *F. solani*, erano riconoscibili solo gruppi di microconidi. Semplice invece l'identificazione colturale, data la capacità di *F.* di crescere rapidamente a 37° e le caratteristiche morfologiche offerte dal modo di aggregazione dei microconidi e dalla forma dei macroconidi. Nella fig. 47 dalla coltura su vetrino si vede i microconidi di *F. s.* portati da un'ifa conidiofora e nella fig. 48 i macroconidi fusoidali settati.

Funghi dimorfi

Il numero di pazienti HIV+ affetti da micosi sistemiche da miceti dimorfi in USA è sempre in aumento e tali infezioni sono state inserite tra i criteri per definire la stadiazione della malattia. Queste infezioni sono contratte per inalazione delle spore che si trovano nel terreno ed i casi riscontrati hanno quindi stretta connessione con la permanenza nelle zone endemiche.

Histoplasma capsulatum (H.c.)

Questo fungo si presenta come patogeno per l'uomo sotto forma di lieviti che hanno uno spiccato tropismo per le cellule del sistema reticolo-endoteliale di cui invadono il citoplasma. Anche se si chiama capsulatum, la capsula in realtà non c'è ma è un artefatto dato dalla retrazione del lievito durante i processi di fissazione. Nella fig. 49 si vede un imprint a fresco di un linfonodo massivamente colonizzato da *H. c.*: i piccoli lieviti ovali, lunghi 5-7 micron, sia extra che intra cellulari, non hanno niente di caratteristico se non la localizzazione all'interno del linfonodo.

Nella fig. 50 lo stesso imprint è stato colorato con Giemsa: si mette in evidenza la retrazione delle cellule fungine con comparsa della "capsula" e soprattutto la localizzazione all'interno del citoplasma degli istiociti. Nella fig. 51 lo stesso materiale nella sezione istologica colorata con Grocott mostra la localizzazione intracitoplasmatica. Questo fungo a 37° si sviluppa rapidamente come lievito, portato a temperatura ambiente dà luogo velocemente alla conversione, cioè alla formazione di ife settate.

Nella fig. 52 i lieviti portati da 37° a 25° dopo tre giorni hanno già formato lunghe ife settate. A temperatura ambiente le colonie diventano visibili dopo 15 giorni: le ife settate sono sottili e dopo 20 giorni producono due tipi diversi di spore: macroconidi tubercolati e microconidi lisci (fig. 53). Il quadro citologico può porre problemi di diagnosi differenziale con la infezione da *Leishmania*, che ha circa le stesse dimensioni e tropismo per le stesse cellule del sistema reticolo-endoteliale.

Nella fig. 54 in un puntato sternale si vedono alcuni protozoi

che con il Giemsa mostrano due corpuscoli, il nucleo e il blefaroplasto, ed ovviamente non si colorano con le colorazioni specifiche per miceti.

Paracoccidioides brasilienses

Anche questo fungo dimorfo presenta una doppia morfologia di cui la più caratteristica è quella in fase lievitiforme.

A 37° e come patogeno il lievito si riproduce sia mediante gemmazioni singole che multiple. I lieviti a gemmazione multipla sono grosse cellule di 10-30 micron di diametro dalla cui superficie si dipartono tante piccole gemmazioni. Le gemme figlie sono omogenee per forma e distribuzione, hanno grandezza di 1-5 micron e sono collegate alla cellula madre attraverso un sottile collo. Nelle immagini riprese da un BAL sono visibili i diversi aspetti in cui si presenta la fase lievitiforme: sia forme miste, da un lievito si stacca un altro a gemmazione multipla (fig. 55 e 57), sia forme isolate di gemmazione multipla (fig. 56).

La distribuzione geografica del *P.b.* è estesa e comprende l'America del Sud e Centrale.

Virus

Nei pazienti immunocompromessi (sia trapiantati che malati di AIDS) le infezioni da *Cytomegalovirus* (HCMV) sono le più frequenti e le più gravi.

Cytomegalovirus (HCMV)

La diagnosi di infezione da HCMV presenta particolari difficoltà nei pazienti immunodepressi, dato che non è sufficiente dimostrare la presenza del virus ma è necessario distinguere tra infezione latente ed infezione in atto. La presenza del virus può essere dimostrata mediante la coltura su fibroblasti (che necessita di 20 giorni), con la identificazione veloce su fibroblasti dopo 48 ore con l'uso di Anticorpi monoclonali, con la ricerca mediante Anticorpi monoclonali del virus in biopsie e strisci di materiali vari, con l'uso di sonde a DNA, contando il numero di polimorfonucleati infetti. L'alta frequenza dei casi in cui il virus si presenta come latente e non è correlato ad alcuna patologia e la possibilità di usufruire di efficaci farmaci antivirali ci deve orientare verso l'utilizzo di metodiche di laboratorio che definiscano la presenza di una infezione attiva. Il miglior metodo per valutare una infezione da HCMV è la ricerca dell'antigenemia, che si basa sulla conta dei polimorfonucleati infetti da HCMV.

Purtroppo questo metodo è abbastanza indaginoso perché comporta la separazione dei PMN, la loro conta, la ricerca dell'antigene mediante Anticorpi monoclonali evidenziati in fluorescenza o con perossidasi e possibilmente indagini in parallelo sui fibroblasti. La diagnosi di polmonite da HCMV può essere posta con buona sensibilità dallo studio del lavaggio bronchiale. In corso di polmonite da *Cytomegalovirus* infatti nella popolazione cellulare del BAL sono presenti numerose cellule bronchiali isolate, dato che le cellule infette perdono coesione intercellulare e facilmente desquamano. Normalmente invece nei BAL le cellule bronchiali sono scarse e coese in piccoli gruppi. Per evidenziare la presenza del virus all'interno delle cellule si può ricorrere alla ricerca dell'effetto citopatico caratteristico con la

colorazione di Papanicolaou (fig. 58). Questo quadro citologico, costituito dall'ispessimento della membrana nucleare, dall'addensarsi del materiale cromatinico prima in piccoli ammassi e poi in grossi inclusi e dalla presenza di inclusioni extranucleari non si reperta però in tutti i casi di infezioni da HCMV. Solo un terzo delle polmoniti da HCMV presentano cellule con effetto citopatico. E' quindi indispensabile l'uso di Anticorpi monoclonali diretti verso gli Antigeni Early e Late del HCMV (fig. 60).

La evidenziazione dei nuclei delle cellule bronchiali positive e la loro quantizzazione darà informazioni molto attendibili sulla entità della polmonite. Capita spesso di trovare infezioni da HCMV associate ad altre infezioni.

Nella fig. 59 si vede il quadro citologico caratteristico di polmonite da HCMV con numerose cellule bronchiali isolate (che sono poi risultate positive alla ricerca con ACM) ed un ammasso di cisti di *Pneumocystis carinii*. Praticiamo la ricerca degli antigeni del HCMV anche sui sedimenti urinari. La positività di tali reperti è molto frequente nei malati di AIDS (fino ad un terzo dei pazienti) e quindi non si accompagna sempre ad una infezione in atto. La quantificazione delle cellule positive è però di ausilio sia per la valutazione clinica del paziente che nel monitoraggio della terapia. Nella fig. 61 in un gruppo di cellule uroteliali una cellula risulta positiva all'ACM evidenziato con perossidasi e si manifesta come inclusioni intranucleari rosse.

Per finire alcuni consigli pratici.

1- Guardate sempre al microscopio anche semplicemente a fresco i campioni biologici che vi vengono sottoposti per colture. Spesso l'evidenziazione dei microorganismi o di quadri citologici caratteristici potranno indirizzare verso l'iter giusto.

2- Evitate le eccessive specializzazioni. Chi cerca di identificare lo *Pneumocystis carinii* in uno striscio colorato con il Ble di Toloidina deve poter riconoscere anche i vari funghi che gli passano sotto gli occhi e che pure si colorano con lo stesso metodo. Nello stesso campione possono coesistere infezioni associate riconoscibili citologicamente o con l'ausilio di ACM.

3- Attenzione a pollini, conidi di funghi e granuli di talco che vanno a cadere dappertutto, anche su vetrini di materiale nor-

malmente sterile come sangue o liquor. I microorganismi hanno sempre dei sosia non patogeni!

Nella fig. 62 tratta da un BAL si vede un conide di *Alternaria*, caratterizzato dai setti trasversi e longitudinali. Questi reperti sono molto frequenti, costituiscono una contaminazione ambientale e vanno distinti dai funghi patogeni. Come regola pratica va ricordato che il fungo patogeno nei tessuti si sviluppa mediante ife e la presenza dei conidi è occasionale e sempre accompagnata a frammenti di ife.

Se ritroviamo solo conidi siamo chiaramente di fronte ad un inquinamento ambientale dato che i conidi sono deputati alla propagazione per via aerea e quindi spesso presenti nell'atmosfera ed anche inalati all'interno dei polmoni.

Nella fig. 63 sempre in un BAL si vede un polline. Questi sono identificabili per la parete spessa e per le forme simmetriche caratteristiche. Dato le affinità tintoriali per le colorazioni per miceti vanno riconosciuti per non incorrere in errore.

Nella fig. 64 si vede un granulo di talco in un preparato di BAL. Dato che utilizziamo i guanti quando allestiamo i preparati, i granuli di talco sono sempre presenti in grande quantità ed anche questi si colorano con le tecniche specifiche per i miceti. Vanno quindi riconosciuti e la loro osservazione può costituire un controllo sulla riuscita della colorazione.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Sig. Pierluigi Conforti, tecnico di laboratorio del Laboratorio Divisionale di Malattie Infettive di Pisa per l'assistenza tecnica.



Figura 1. Lavaggio bronchiale, esame diretto a fresco x1000: ammasso di *Pneumocystis carinii*.

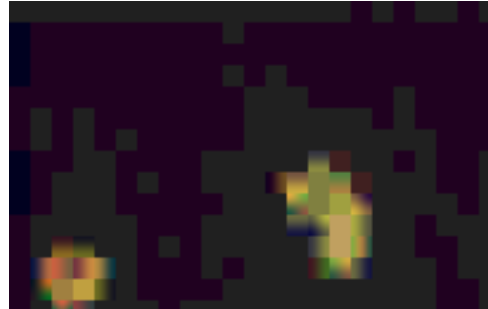


Figura 2. Lavaggio bronchiale, ACM evidenziati in fluorescenza, x400: ammasso di *Pneumocystis carinii*.



Figura 3. Lavaggio bronchiale, ACM evidenziati con perossidasi, x400: ammasso di *Pneumocystis carinii*.



Figura 4. Lavaggio bronchiale, Blu di toluidina x400: ammasso di *Pneumocystis carinii*.



Figura 5. Lavaggio bronchiale, Blu di toluidina x1000: ammasso di *Pneumocystis carinii*.



Figura 6. Lavaggio bronchiale, Grocott x1000: ciste isolate di *Pneumocystis carinii*.



Figura 7. Lavaggio bronchiale, Giemsa x1000: ammasso di *Pneumocystis carinii*.



Figura 8. Lavaggio bronchiale, Papanicolaou x1000: ammasso di *Pneumocystis carinii*.



Figura 9. Feci, colorazione di Heine x400: oocisti di *Cryptosporidium*.



Figura 10. Feci, colorazione di Heine x1000: oociste di *Cryptosporidium* tra due lieviti.



Figura 11. Feci, colorazione di Ziehl-Neelsen x400: oocisti di *Cryptosporidium* e lieviti.



Figura 12. Feci, ACM anti Cr. evidenziati in fluorescenza x700: una oocisti di *Cryptosporidium*.



Figura 13. Feci, colorazione di Ziehl-Neelsen x1000: bacilli acido-alcool resistenti.



Figura 14. Feci, esame diretto a fresco x400: Oociste di Isospora belli.



Figura 15. Feci, colorazione di Heine x400: Oocisti di Isospora belli.



Figura 16. Feci, colorazione di Ziehl-Neelsen x100: Oociste di Isospora belli.



Figura 17. Feci, esame a fresco x1000: forma "a cintura" di Blastocystis hominis.



Figura 18. Feci, esame a fresco x1000: forma cistica di Blastocystis hominis.



Figura 19. Feci, esame a fresco x1000: trofozoiti di Giardia.



Figura 20. Urine, Giemsa x1000: ammasso di tachizoiti di Toxoplasma gondii.



Figura 21. Urine, Giemsa x1000: tachizoita isolato di Toxoplasma gondii.

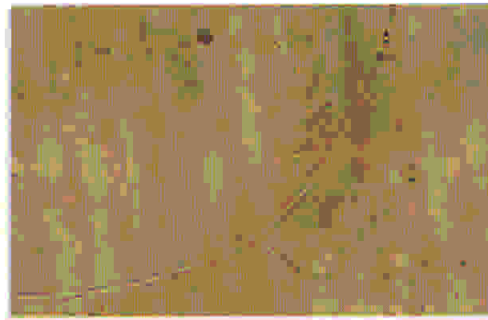


Figura 22. Sputo, esame diretto a fresco x400: ifa settata.

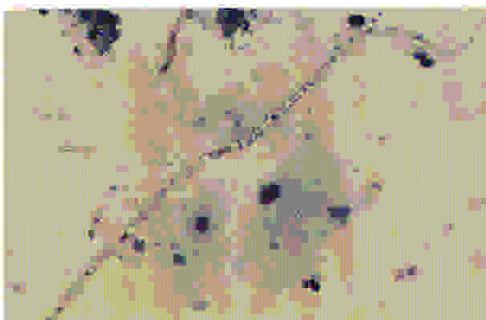


Figura 23. Sputo, stesso campione, colorazione di Giemsa x400: ifa settata.



Figura 24. BAL, Giemsa x700: ifa settata e lievito gemmante.

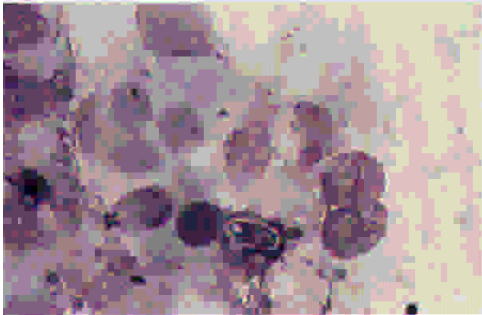


Figura 25. BAL, Giemsa x1000: lieviti di *Candida albicans* gemmanti in un gruppo di cellule cilindriche.

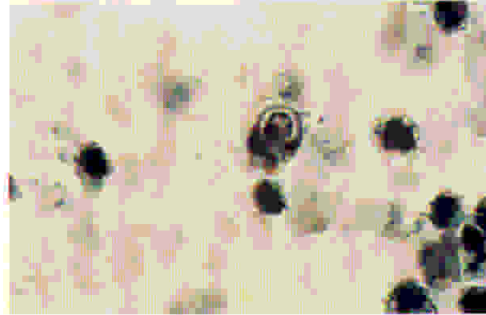


Figura 26. BAL, Papanicolaou x1000: lievito di *Candida albicans* gemmante all'interno di un polimorfonucleato.



Figura 27. BAL, Ble di Toloidina x1000: pseudoifa di *Candida albicans*.

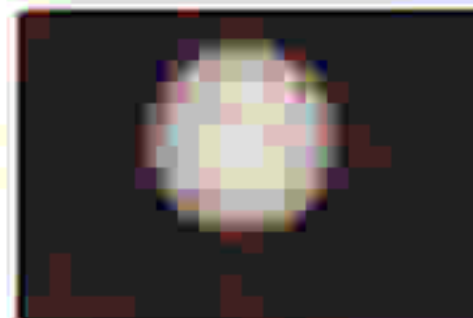


Figura 28. Liquor, esame con inchiostro di china x1000: lievito di *Cryptococcus neoformans*.



Figura 29. Bal, Papanicolaou x1000: lievito di *Cryptococcus neoformans* inglobato da un istiocita polmonare.



Figura 30. Sedimento urinario, Papanicolaou x1000: lievito di *Cryptococcus neoformans* tra cellule uroteliali.



Figura 31. Sedimento urinario, Mucicarmineo x1000: alcuni lieviti di *Cryptococcus neoformans*.

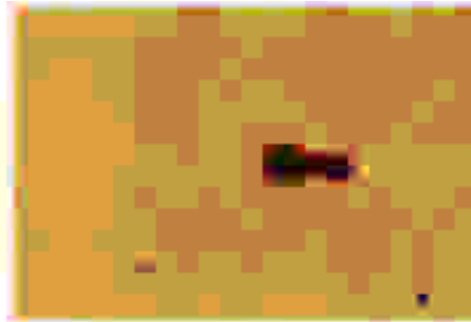


Figura 32. Sedimento urinario, Mucicarmineo x1000: lievito gemmante di *Cryptococcus neoformans*.



Figura 33. BAL, Giemsa x1000: ifa di *Aspergillus* contro un gruppo di cellule bronchiali.

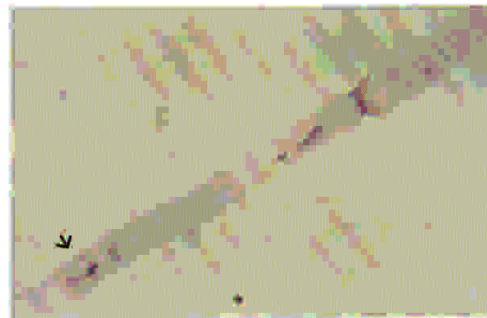


Figura 34. BAL, Giemsa x1000: ifa di *Aspergillus*, un nucleo sta attraversando il setto.



Figura 35. BAL, Giemsa x1000: ifa conidiofora di *Aspergillus* tra cellule bronchiali.

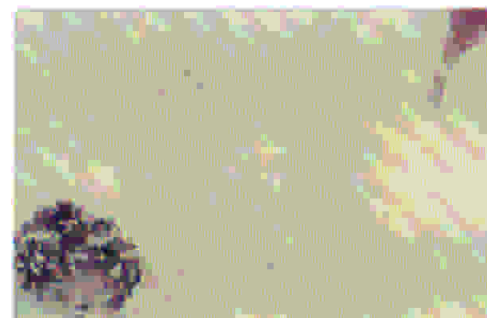


Figura 36. BAL, Giemsa x1000: ife conidiofere di *Aspergillus* con conidi.



Figura 37. BAL, Ble di Toloidina x1000: ife di Aspergillus e cisti di Pneumocystis carinii.



Figura 38. BAL, Grocott x1000: ife di Mucor.



Figura 39. BAL, Giemsa x1000: ife di Mucor.



Figura 40. Coltura su vetrino x400: sporangio di Mucor.



Figura 41. Scraping ulcera orale, Giemsa x400: ife di Trichosporon capitatum.

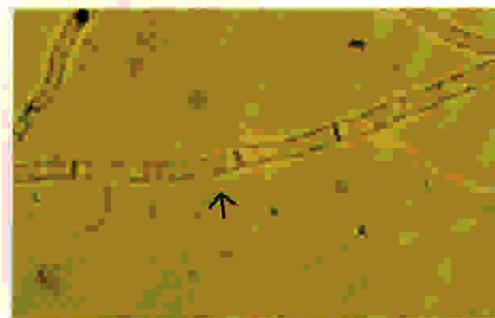


Figura 42. Coltura su vetrino x1000: ifa di Trichosporon capitatum.



Figura 43. Coltura di *Trichosporon capitatum* x400 : ammassi di artrospore.

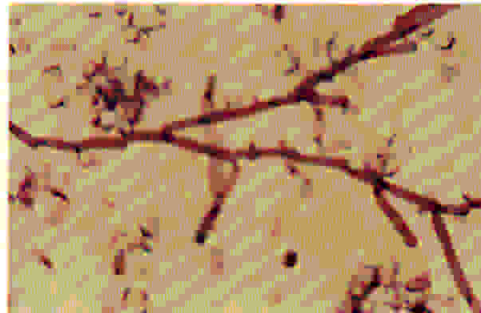


Figura 44. Striscio da coltura, Giemsa x400: ife di *Geotrichum*.



Figura 45. Coltura su vetrino x1000: ifa matura di *Geotrichum* si spezzetta in artrospore.



Figura 46. BAL, Giemsa x1000: gruppo di microconidi.

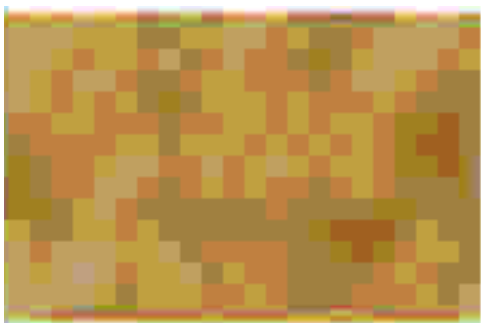


Figura 47. Coltura su vetrino x400: *Fusarium solani*, gruppi di microconidi su ife conidiofore.



Figura 48. Striscio da coltura x1000: *Fusarium solani*, macroconidi.



Figura 49. Imprint linfonodo, fresco x1000: lieviti di *Histoplasma capsulatum* tra cellule del linfonodo.



Figura 50. Imprint linfonodo, Giemsa x1000: lieviti di *Histoplasma capsulatum* entro il citoplasma degli istiociti.



Figura 51. Sezione istologica del linfonodo, Grocott x1000: lieviti di *Histoplasma capsulatum* entro il citoplasma degli istiociti.



Figura 52. Striscio da coltura x1000: lieviti di *Histoplasma capsulatum* a 25° si trasformano in ife settate.



Figura 53. Striscio da coltura x1000: *Histoplasma capsulatum*, coltura a 25°, produzione di macroconidi tuberculati e microconidi lisci.



Figura 54. Puntato sternale, Giemsa x1000: *Leishmania donovani* entro il citoplasma delle cellule istiocitarie.



Figura 55. BAL, Giemsa x1000: due lieviti di cui uno a gemmazione multipla di *Paracoccidioides brasilienses*.



Figura 56. BAL, Giemsa x400: lievito a gemmazione multipla di *Paracoccidioides brasilienses*.

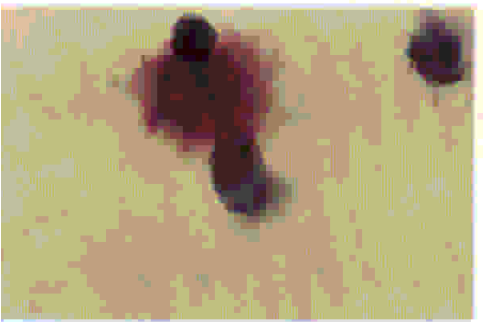


Figura 57. BAL, Giemsa x1000: tre lieviti di cui uno a gemmazione multipla di *Paracoccidioides brasilienses*.

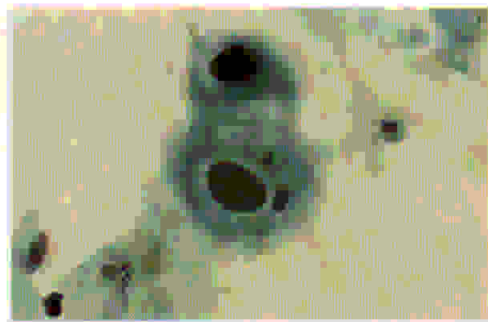


Figura 58. BAL, Papanicolaou x1000: effetto citopatico da Cytomegalovirus in cellule bronchiali.



Figura 59. BAL, Giemsa x400: quadro citologico da infezione da Cytomegalovirus e *Pneumocystis carinii*.



Figura 60. BAL, ACM anti Cytomegalovirus evidenziati in fluorescenza x700: un nucleo di cellula bronchiale risulta positivo.



Figura 61. Sedimento urinario, ACM anti Cytomegalovirus evidenziati con perossidasi: un nucleo di cellula uroteliale risulta positivo.



Figura 62. BAL, esame a fresco x1000: conide di Alternaria.

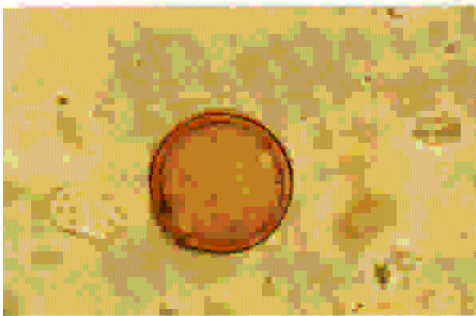


Figura 63. BAL, esame a fresco x1000: granulo di polline.

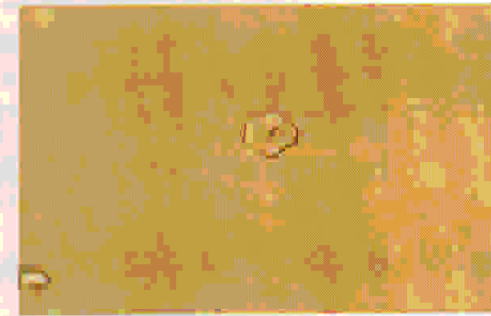


Figura 64. BAL, esame a fresco x1000: granulo di talco.

Bibliografia

- Bower M, Barton S E et al: The significance of the detection of *Cytomegalovirus* in the bronchoalveolar lavage fluid in AIDS patients with pneumonia. *AIDS* 1990, 4: 317-320
- Clark R A, Greer D et al: Spectrum of *Cryptococcus neoformans* infection in 68 patients infected with HIV. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 768-77
- Costanzi G, Sfrondini G, Barberis M.: Anatomia Patologica dell'AIDS, EMSI Roma 1990
- DeFine L, Saleba KP et al: Cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage specimens in immunosuppressed patients with suspected opportunistic infections. *Acta Cytol* 1987;3: 235-242
- Dismukes W E : Cryptococcal meningitis in patients with AIDS, *J Inf Dis* 1988; 157: 624-628
- Drew W L: *Cytomegalovirus* infection in patients with AIDS. *Clin Inf Dis* 1992; 14:608-15
- Galgiani J, Ampel N: Coccidioidomycosis in HIV Infected Patients. *J Inf Dis* 1990; 162: 1165-1169
- Garavelli PL, Scaglione L et al: *Blastocystis*: a new disease in AIDS, *Int J AIDS* 1:134-135, 1990
- Garcia LW, Hemphill RB et al: AIDS with disseminated toxoplasmosis presenting as an acute pulmonary and gastrointestinal illness. *Arch Pathol Lab Med*, 1991; 115:459-463
- Gargani G., Faggi E et al: I fattori patogenetici dei funghi. *Microb Med* : 6, 23-25, 1991
- Gerna G, Zipeto D et al: Monitoring of human *Cytomegalovirus* infection and Ganciclovir treatment in heart transplant

- recipients by determination of viremia, Antigenemia and DNAemia. *J Inf Dis* 1991; 164: 488-98
- Gerna G, Parea M et al: Human *Cytomegalovirus* viremia in HIV-1 seropositive patients at various clinical stages of infection. *AIDS* 1990; 4: 1027-31
- Goldani L Z, Coelho C B et al: Paracoccidioidomycosis and AIDS. *Scand J Infect Dis* 23: 393, 1991.
- Gori S, Del Bono L, Paladini A et al: Parassitosi intestinali in pazienti HIV+, *Gior Mal Inf Paras* 44: 5, 1000-1002, 1992
- Gori S, Paoletti P, Scasso A et al: Diagnosi di laboratorio di *Pneumocystis carinii*: paragone tra colorazioni citologiche, immunofluorescenza ed immunocitochimica: *Pathol*, 84, 225-233, 1992
- Gori S, Parenti M et al: Diagnosi di Pneumocistosi su liquido di lavaggio bronchiale; la reale incidenza é inferiore rispetto al sospetto clinico. *Parassitologia*, 34 S, 108-109, 1992
- Graybill J R : Histoplasmosis and AIDS. *J Inf Dis* 1988; 158, 623-626
- Jacobs F, Depierreux M et al: Role of broncoalveolar lavage in diagnosis of disseminated Toxoplasmosis. *Rew Inf Dis*, 1991; 13: 637-641
- Knight F, Mackenzie D W R: *Aspergillus* antigen latex test for diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet* 1992; 330: 188
- Meyers JD, Ljungman P et al: *Cytomegalovirus* excretion as a predictor of *Cytomegalovirus* disease after marrow transplantation: importance of *Cytomegalovirus* viremia. *J Inf Dis*; 1990: 162: 373-380
- Pintozzi RL: Modified Grocott's methenamina silver nitrate method for quick staining of *Pneumocystis carinii*. *J Clin. Pathol.* 31, 803, 1978

- Pursell J, Telzak E et al: *Aspergillus* species colonization and invasive disease in patients with AIDS. *J Inf Dis* 1992;14:141-8
- Radio S J, Rennard S I et al: Cytomorphology of *Alternaria* in bronchoalveolar lavage specimens. *Acta Cytol* ,1987; 31: 243-248
- Richardson MD: Newly-recognised fungal infections originating from cutaneous sites in immunocompromised patients. *Rev Med Microbiol* 1991; 2: 61-67
- Richardson SR, Bannatyne RM et al: Disseminated fusarial infection in the immunocompromised host. *Rev Inf Dis*, 1988; 10:1171-1181
- Senay H, MacPherson D: *Blastocystis hominis* : Epidemiology and Natural History:*J Infect Dis* , 162, 987-990, 1990
- Siddons CA, Chapman PA, Rush BA: Evaluation of an Enzyme Immunoassay for detecting *Cryptosporidium* in Faeces and Environmental Samples. *J Clin Path* 45 : 6, 479-482, 1992
- Volpi A, Richard J et al: Rapid diagnosis of pneumonia due to *Cytomegalovirus* with specific monoclonal antibodies. *J Inf Dis* 1983, 147: 1119-1120
- White M, Cirrincione C et al: Cryptococcal meningitis: outcome in patients with AIDS and patients with neoplastic disease. *J Inf Dis* 1992; 165; 960-3

Indice

Editoriale.....	pag. 3
Introduzione.....	» 5
Protozoi	» 7
I funghi	» 13
Lieviti.....	» 15
Funghi filamentosi.....	» 18
Funghi dimorfi	» 20
Virus.....	» 22
Bibliografia.....	» 36
Indice.....	» 39



1. Rassu S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rassu S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rassu S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rassu S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rassu S.: *L'obesita'*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P., Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La -endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimoimmunologico ed fluoroimmunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rassu S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: *L'amenorrea*. Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale*. Luglio '87.
29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.

30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica*. Novembre '87.
31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali*. Gennaio '88.
32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario*. Febbraio '88.
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress*. Marzo '88.
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro*. Maggio '88.
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare*. Giugno '88.
36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2)*. Luglio '88.
37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia*. Novembre '88.
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili*. Gennaio '89.
39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie*. Febbraio '89.
40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni*. Marzo '89.
41. Caffero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I*. Giugno '89.
44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica*. Luglio '89.
45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie*. Settembre '89.
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio*. Ottobre '89.
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: *Infezioni opportunistiche in corso di AIDS*. Gennaio '90.
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriogonadotropina umana*. Febbraio '90.
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.
50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio*. Aprile '90.
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri*. Maggio '90.
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo*. Giugno '90.
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva*. Luglio '90.
54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allergo-acari*. Agosto '90.
55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C)*. Settembre '90.
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.
57. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I)*. Gennaio '91.
58. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*. Febbraio '91.
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.
60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterin nella pratica clinica*. Aprile '91.
61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.
62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica*. Giugno '91.
63. Bologna M. Biorci L. Martinotti S.: *Gli Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.

65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D. *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.
67. Santini G.F. , Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica*. Gennaio '92.
68. Zilli A., Biondi T. *Il piede diabetico*. Febbraio '92.
69. Rizzetto M. *L'epatite Delta*. Marzo '92.
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali*. Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari*. Maggio '92.
72. Cordido F. , Peñalva A. , De la Cruz L. F. , Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Giugno '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.: *Manuale di Laboratorio (I)*. Novembre '92.

Caleidoscopio

Rivista mensile di Medicina

anno 10, numero 75



Direttore Responsabile

Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
☎ Tel.-Fax 079 270464

Responsabile Commerciale

Alessandra Pater



Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Giovanna Nieddu

Servizio Abbonamenti

Fina Grandeppieno
Giuseppe Gambetta



Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)

☎ Tel. (010) 83401 (7 linee r.a.) Numero Verde 1678 01005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 809737- 802257.

La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio -Ed. Spagnola, Caleidoscopio letterario, Kaleidoscope - Engl. Ed.,- Pandora, Tribuna Biologica e Medica, The Medical Systems Voice, Journal of Preventive Medicine and Hygiene.

Stampa

ATA-Azienda Tipografi Associati
Via G. Torti, 32 C Rosso
16143 Genova - ☎ Tel. 010 503320

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n. 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Dicembre 1992
Sped. in Abb. Post. gr. III/70%

Associata all'USPI
Unione Stampa Periodica Italiana



Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.