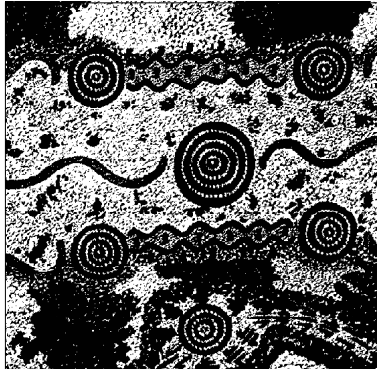


Caleidoscopio



Stefano Andreoni

Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti

Laboratorio di Microbiologia
Ospedale Maggiore
Novara

82

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

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

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1993

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

INFORMAZIONI GENERALI. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Endocrinologia, di Patologia Clinica o di particolare interesse in altri campi della Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall' *International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile in base alla loro esperienza e competenza. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, purché redatte secondo le regole editoriali e conformi allo spirito della Rivista.

TESTO. In considerazione del carattere didattico, la monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi ed allo stesso tempo chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati, è opportuno evitare di riportare contrastanti o solo proprie personali opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte, in rapporto anche al numero di tabelle e figure. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio. Tutte le pagine del testo devono essere scritte a spaziatura 2, con sufficienti margini e numerate consecutivamente.

TABELLE E LE FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica esplicativa (in bianco e nero eccetto in casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di comparsa nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento. Le figure devono essere realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, quando pubblicati, risultino ancora leggibili. Si consiglia la realizzazione di disegni e figure con una larghezza non superiore ai 9 cm. Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le illustrazioni. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro ed in particolare dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, l'eventuale Clinica o Istituto di lavoro, l'indirizzo compreso il numero di telefono e fax.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell' *Index Medicus* e lo stile illustrato negli esempi:

1) Bjorklund B., Bjorklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. *J. Nucl. Med. Allied. Sci* 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2) Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): *The Endocrine Hypothalamus*. London. Academic Press, 1978.

La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati europee e statunitensi (per esempio: Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. Riporre le fotografie e le diapositive in busta separata, una copia del testo archiviata su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh, se MS-DOS il testo dovrà essere in formato RTF ed i grafici in formato PC.TIF o PC.Paintbrush.

E' inoltre necessario accompagnare il lavoro da copie di ogni permesso di riprodurre materiale pubblicato o di usare illustrazioni che possono far riconoscere soggetti umani.

Il dattiloscritto originale, le figure e le tabelle devono essere spedite al Direttore Responsabile in duplice copia. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cento copie della monografia.

L'Autore della monografia cede i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera alla Rivista *Caleidoscopio* con diritto di stampare, pubblicare, dare licenza a tradurre in altre lingue in Nazioni diverse rinunciando ai diritti d'Autore.

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

*Dott. Sergio Rassa
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari*

Editoriale

Dopo aver affrontato in un precedente volume il problema delle infezioni opportunistiche in corso di AIDS, (n. 47) ed aver analizzato alcuni aspetti strettamente diagnostici di laboratorio in un più recente volume del Caleidoscopio (n. 75), puntiamo l'attenzione con questo volume su un singolo settore di questo vasto campo: le infezioni da lieviti.

I lieviti, di cui si conoscono oltre 500 specie, in realtà si riducono, se si considerano solo quelli di più stretto interesse medico ad un numero molto più piccolo.

Tra questi, quelli che sicuramente hanno un rilievo epidemiologico maggiore sono il genere *Candida* (e la *Candida albicans* in particolare) ed il genere *Criptococcus* (il *Cr. neoformans* in particolare).

Questi lieviti sono presenti normalmente sulla superficie corporea o nell'intestino ma in particolari condizioni: immunodeficienza, trattamenti antibiotici o corticosteroidi, patologie endocrine o altro sono responsabili di importanti infezioni opportunistiche.

L'impatto sempre più rilevante in questi ultimi anni della sindrome da immunodeficienza acquisita ha ovviamente sollevato l'interesse del clinico e del ricercatore su queste patologie che sino a non molti anni ne avevano abbastanza poco. Il risultato è stato un proliferare della ricerca e della letteratura su aspetti molto particolari di questo settore dove già la classificazione è problematica e rende difficile l'orientamento.

Questo volume, partendo proprio da una chiarificazione del problema tassonomico e classificativo ed una breve quanto preziosa parte dedicata alla epidemiologia delle infezioni da lieviti pone le basi per un inquadramento chiaro ed aggiornato.

Buona parte del volume è comunque dedicata a tutti quegli aspetti diagnostici di identificazione, biotipizzazione e sierodiagnosi che sono i problemi che quotidianamente affronta lo specialista in Medicina di Laboratorio.

Si tratta quindi di una utilissima monografia supportata inoltre da una iconografia esplicativa originale molto chiara.

Stefano Andreoni

*Diagnostica di laboratorio
delle infezioni da lieviti*

Stefano Andreoni, laurea in Medicina e Chirurgia all'Università di Torino, specializzazione in Biologia Clinica presso l'Università di Pavia, dopo essere stato assistente presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale Maggiore di Novara ha assunto l'incarico di Aiuto corresponsabile presso lo stesso Laboratorio.

Premiato per le sue relazioni, è autore di oltre 50 pubblicazioni su riviste di Microbiologia su temi di carattere batteriologico e micologico.

E' stato docente in Corsi di Micologia promossi dall'Amcli, relatore in numerosi Congressi e la giovane età gli permetterà sicuramente di cogliere altri e più importanti traguardi.

Sergio Rassu

Introduzione

Aspetti tassonomici e classificazione

I miceti sono organismi eucarioti, chemioeterotrofi, aerobi o anaerobi facoltativi. Essi si riproducono mediante formazione di spore: queste ultime possono essere sessuate (ascospore, basidiospore, oospore, zigospore), risultanti, cioè, da processi di meiosi preceduti da fusione di protoplasma e nuclei, oppure asessuate (sporangiospore, artroconidi, blastoconidi, phialoconidi, anelloconidi, poroconidi, simpoduloconidi, aleurioconidi), derivanti solo da processi mitotici senza fusione di gameti differenziati (le forme sessuate sono dette *teleomorfe*, quelle asessuate *anamorfe*).

I miceti che presentano entrambi i tipi di riproduzione vengono definiti *perfetti*, diversamente dai miceti *imperfetti*, di cui non si conosce la forma sessuata. Strutture specializzate, i corpi fruttiferi, possono essere associate sia con forme sessuate che asessuate.

Spore e le loro modalità di formazione stanno di norma alla base di vari raggruppamenti tassonomici, pur tenendo presente che notevoli difficoltà si sono sempre accompagnate ad ogni tentativo di elaborare uno schema definitivo di classificazione. In sintesi, le maggiori problematiche tassonomiche sono risultate doversi correlare con:

- esistenza di generi comprendenti specie produttrici o meno di spore sessuate;
- presenza di forme sessuate e asessuate in uno stesso organismo;
- presenza di più tipi di forme sessuate o asessuate in uno stesso organismo;
- dimostrazione di forme sessuate in funghi imperfetti, già classificati come tali per le caratteristiche della forma asessuata.

Stante lo schema tassonomico proposto da Mc Ginnis (51) e ripreso di recente da Dixon e Fromtling (21) con lo scopo di sintetizzare e semplificare quanto in tema di classificazione è stato proposto in quest'ultimo ventennio, i miceti di interesse medico possono essere compresi in 5 classi (*Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes*, *Oomycetes*, *Zigomycetes*). Per quanto riguarda quella dei *Deuteromycetes*, che comprende il vasto raggruppamento dei

lieviti e a cui non si riconosce la produzione di spore sessuate, non si esclude la possibilità che essa rappresenti uno stadio conidiale di Ascomiceti e di Basidiomiceti e che, pertanto, sia rappresentativa di un gruppo tassonomico provvisorio.

I lieviti sono organismi monocellulari con tallo globoso, ovoidale, o sferico, talvolta allungato o irregolare (8-10 x 4,5-6 μ), i cui conidi si riproducono mediante gemmazione o per frammentazione di un processo blastico o tallico (Fig.1). Essi hanno una distribuzione ubiquitaria essendo presenti in acque, nella vegetazione e nel terreno, dove concorrono a vari cicli biologici. Alcune specie possono parassitare gli animali, come le vie respiratorie di uccelli e l'apparato digerente di bovini e suini, oppure albergare nell'uomo come normali abitanti della superficie corporea e della mucosa enterica.

La gemmazione è un processo riproduttivo in base al quale da una cellula madre ha origine una cellula figlia attraverso una serie di eventi che vedono:

- una strozzatura, a larga base d'impianto, a livello della cellula madre;
- l'abbozzo di una gemma derivante dal corpo materno;
- migrazione tardiva del nucleo;
- un progressivo ingrossamento della gemma che si rende sempre più periferica;
- la rottura della giunzione e il distacco della gemma. In alcuni lieviti, i blastoconidi, prodotti uno dall'altro in sequenza lineare senza separazione, danno origine a catene allungate dette pseudoife. In altri casi, i blastoconidi possono rimanere uniti alla cellula madre e, continuando il processo di gemmazione, strutturarsi in grappoli (clusters).

In particolari condizioni ambientali, quali, ad esempio, diminuita tensione di O_2 (5-10%), è possibile la produzione di veri filamenti o ife, quale risultato della germinazione di cellule di transizione (blastoconidi appiattiti o arrotondati, o clamidospore) (Fig.1).

Come per il regno delle *Myceteae*, anche per il vasto gruppo dei lieviti non sono mancate le classificazioni, tra cui quella di Lodder e Van Rji (47), che già propose una distinzione tra *Cryptococcoideae* e *Trichosporoideae*. In realtà, ad ogni classificazione dei lieviti, si è sempre accompagnato il problema relativo alla definizione del termine stesso di lieviti, ritenuto tuttora tassonomicamente incerto. Considerata, ad esempio, la possibilità che alcuni *Deuteromycetes* corrispondano allo stato conidiale di *Ascomycetes* o, più raramente, di *Basidiomycetes* a seguito di repressione della capacità di produrre

spore sessuate, si è voluto attribuire il termine lievito ad un gruppo specifico di ascomiceti che nel ciclo sessuato producono ascospore e in quello asessuato si riproducono per gemmazione. Su questa base, miceti con morfologia lievitifforme, ma senza la dimostrazione di cicli sessuati, sono stati definiti *lievito-simili*. Per altri, si è preferito usare il termine di *miceti lievitiforimi*, comprendendo in tale denominazione, lieviti che formano o meno pseudo-ife, che producono veri filamenti e che presentano l'aspetto lievitifforme dei funghi dimorfi. Si comprende, pertanto, come, nello schema classificativo di Dixon e Fromtling (21), figurino funghi imperfetti (classe *Deuteromycetes*), lieviti formanti ascospore (classe *Ascomycetes*) e altri lieviti (classe *Basidiomycetes*), con una diversa terminologia di taluni di essi a seconda del tipo di riproduzione (Tav. 1-2).

Attualmente, confermate talune distinzioni tassonomiche, come quella tra *Candida* e *Torulopsis* e considerata la possibilità di schemi classificativi basati su altre caratteristiche dei lieviti e, in particolare, sul loro patrimonio genetico, i miceti lievitiforimi, come dall'elenco di Larone (44), risulterebbero costituire un vasto raggruppamento di generi (*Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Malassezia*, *Ustilago*, *Trichosporon*, *Blastoschizomyces*), tra cui il genere *Candida* e, in particolare, *C.albicans*, occupa da tempo un posto di primo piano nell'ambito della patologia infettiva umana.

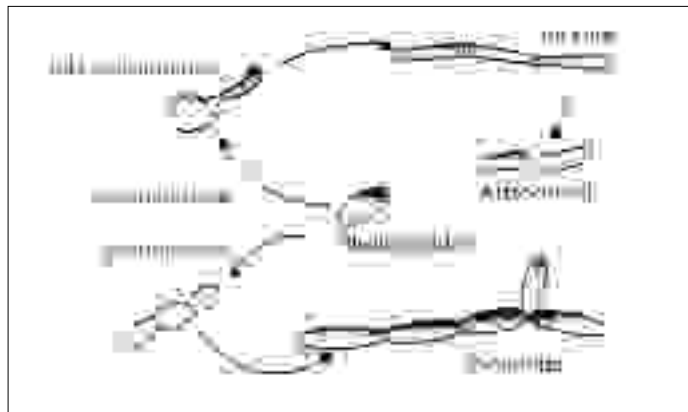


Figura 1. Ciclo riproduttivo di un lievito.

Classe	Ordine	Genere
Deuteromycetes	Cryptococcales	<i>Candida</i>
		<i>Cryptococcus</i>
		<i>Torulopsis*</i>
		<i>Pytirosporium</i>
		<i>Trichosporon</i>
		<i>Rhodotorula*</i>
Ascomycetes	Endomycetales	<i>Saccharomyces</i>
		<i>Pichia</i>
		<i>Hansenula*</i>
Basidiomycetes	Ustilaginales	<i>Filobasidiella</i>
* non riportato nello schema		

Tavola 1. Classificazione di lieviti di importanza medica (Dixon e Frontling, 1988).

Stato anamorfo	Stato teleomorfo
<i>Candida krusei</i>	<i>Issatchenchia orientalis</i>
<i>Candida lusitanae</i>	<i>Clavispora lusitanae</i>
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Lodderomyces parapsilosis</i>
<i>Candida pseudotropicalis</i>	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
<i>Candida kefir</i>	<i>Kluyveromyces marxienus</i>
<i>Cryptococcus neoformans A, D</i>	<i>Filobasidiella neoformans var. neoformans</i>
<i>Cryptococcus neoformans B, C</i>	<i>Filobasidiella neoformans var. gattii</i>

Tavola 2. Denominazione di lieviti in base al tipo di riproduzione.

Aspetti clinico-epidemiologici

Le infezioni da lieviti, cosmopolite e di frequenza variabile in rapporto alle specie in causa e alla diversità geografica di territori e ambienti, rappresentano di norma una patologia di tipo opportunistico, quale conseguenza di un alterato rapporto ospite-micete, sia quest'ultimo di origine endogena che esogena. Relativamente all'ospite, non poche possono essere le cause che agevolano l'aggressività del micete (diminuzione delle difese organiche, modificazioni ormonali, somministrazione di antibiotici, corticosteroidi, contraccettivi orali, forme morbose varie, quali diabete, insufficienza surrenalica, tiroidea e paratiroidea, obesità, emopatie maligne, turbe circolatorie periferiche, interventi operatori, impiego di dispositivi protesici, ecc.), mentre, per quanto riguarda il micete, non è da escludersi che la gravità dell'infezione sia da attribuirsi anche ad una sua particolare virulenza.

Come documentano i risultati di una innumerevole serie di osservazioni sulla frequenza di isolamento di lieviti da materiali di provenienza umana, di cui ad alcuni esempi riportati nelle Tav.3-4-5, *C.albicans* è la specie di lievito di più frequente riscontro. Altri lieviti sono ritenuti da tempo potersi correlare sul piano etiopatogenetico con determinate forme morbose, mentre altri ancora hanno assunto una particolare importanza solo in questi ultimi anni e soprattutto in alcune condizioni di immunodeficienza tanto da essere qualificati come patogeni emergenti (1). In ogni caso, il numero di lieviti di importanza medica non è di certo elevato se di 500 specie appartenenti a 60 generi, solo a poche decine di esse sono stati riconosciuti requisiti di patogenicità (53).

Genere *Candida*

C.albicans, presente solo occasionalmente in specie animali, ha un rapporto privilegiato con l'uomo, rappresentando, inoltre, nel 90-95% dei casi, l'agente causale di *candidosi* (Tav. 6).

Nella patogenesi di queste infezioni sono stati chiamati in causa svariati fattori predisponenti (Tav. 7).

Altre specie di *Candida* possono essere più o meno frequentemente isolate dall'uomo, la loro presenza potendo peraltro rappresentare soltanto un processo di contaminazione, oppure una transitoria colonizzazione. Esse, inoltre, non avrebbero le medesime capacità aggressive di *C.albicans* e la loro frequenza come agenti etiologici sarebbe minore sia perchè non provengono da distretti organici

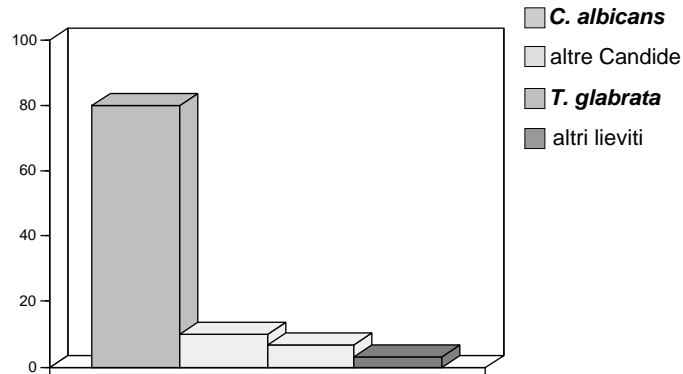


Tavola 3. Distribuzione di specie diverse di lieviti in 2588 stipiti isolati da materiali di provenienza umana. (Andreoni e Coll. - Ospedale Maggiore di Novara: 1986-1990).

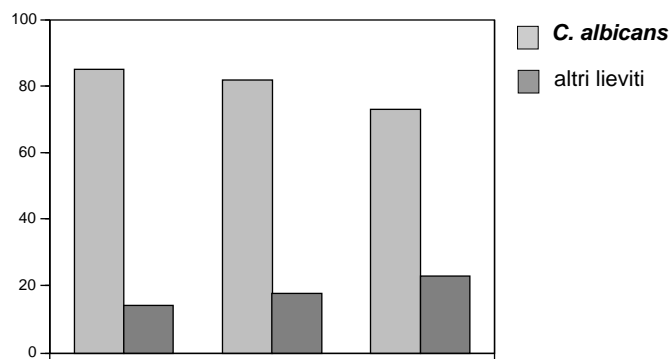


Tavola 4. Lieviti isolati presso il Policlinico S. Orsola di Bologna. (Graf. dedotto dal lavoro di Mazzoni e Nanetti, 1990).

abituamente colonizzati, sia perchè agiscono quando le difese organiche sono particolarmente compromesse. In ogni caso, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* sono state riconosciute da più parti quali agenti causali di endocardite, pielonefrite, artrite, nonché di forme disseminate in tossicodipendenti e in soggetti portatori di catetere endovenoso sottoposti ad interventi cardio-

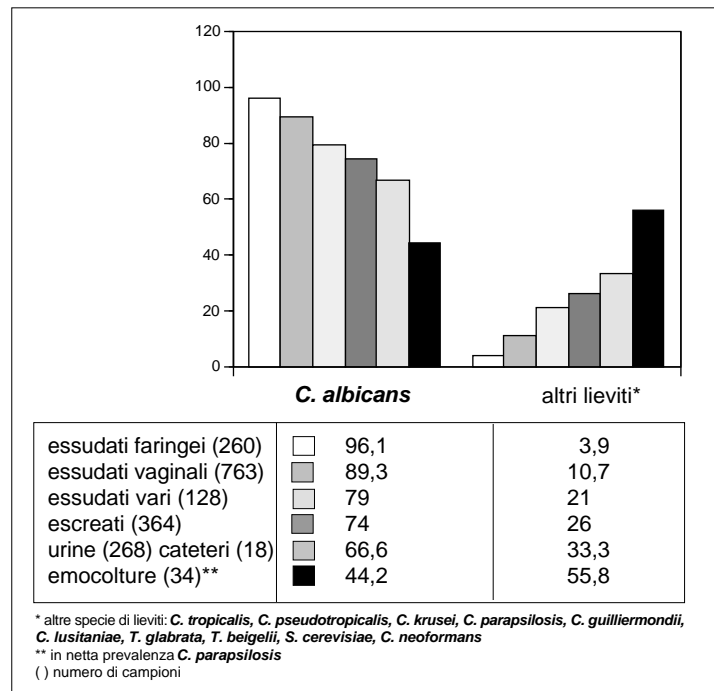


Tabella 5. Percentuali di positività per *C. albicans* e per altre specie di *Candida* in rapporto al materiale di isolamento. (Ospedale Maggiore di Novara - anni 1991-1992).

vascolari (16, 93). Ugualmente, *C. lusitaniae* è stata ritenuta responsabile di forme setticemiche, di meningiti in neonato e di infezioni delle vie urinarie, mentre *C. lipolytica* è risultata potersi correlare con casi clinici di persistente fungemia con tromboflebite associata a cateterismo, di sinusite e di colonizzazione tissutale. Per quanto riguarda *C. krusei*, non privi di interesse sono stati i dati raccolti da Merz et al. (54) circa la frequenza di isolamento (12,4%) in 868 pazienti granulocitopenici con manifestazioni morbose a carico soprattutto dell'apparato digerente, nonché l'aumento, nel corso di 9 anni, dei processi di colonizzazione e di quelli infettivi sostenuti da questa specie. Di rilievo anche le recenti segnalazioni di fungemia associata a catetere venoso correlata con specie di eccezionale riscontro in patologia umana, quali *C. rugosa* e *C. utilis*.

Mucocutanea: orale, anorettale, genitale (vulvovaginite, balanopostite)*

Mucocutanea cronica**

Invasiva: fungemia (setticemia), oftalmite, lesioni cutanee macronodulari, esofagite, polmonite, endocardite, meningo-encefalite, nefrite, osteoartrite***

* = infezione limitata abitualmente allo strato epiteliale con indici modesti di flogosi. Possibile penetrazione di ife e pseudo-ife nella membrana basale epiteliale, nella lamina propria, sottomucosa o derma, associata a processi infiammatori con prevalenza di polinucleati neutrofili.

** = più frequente nei bambini con difetti genetici, coinvolge cute, mucose, capelli, unghie, determinando marcata ipercheratosi e processi infiammatori granulomatosi. Deficit nella risposta dei T-linfociti.

*** = penetrazione del micete nei tessuti sotto la superficie epiteliale o infezione di più visceri (forma sistemica). Sul piano patogenetico, essa è definita tale quando il micete è isolato da più emocolture praticate ad intervalli, quando il micete è isolato da biopsia, oppure quando è isolato da liquidi abitualmente sterili (cefalo-rachidiano, pleurico, peritoneale, articolare). Oltre a queste situazioni "ottimali" vi possono essere situazioni particolari, come emocoltura positiva e lesioni retiniche tipiche, febbre in soggetto sottoposto a terapia antibiotica e isolamento del micete da più sedi.

Tavola 6. Suddivisione clinica delle candidosi.

Fisiologici: età infantile, gravidanza, dieta ricca di carboidrati, attività lavorativa in ambienti umidi, stato di macerazione cutanea.

Patologici: debilitazione, malassorbimento, diabete, neoplasie, emopatie, deficit immunologici, AIDS.

Meccanici: ustioni estese, protesi dentarie.

Origine medica: terapia antibiotica, antiblastica, steroidea, immunodepressiva.

Origine chirurgica: resezioni intestinali, interventi a cuore aperto, cateterismo permanente, sondini, dispositivi protesici.

Tavola 7. Fattori favorevoli le candidosi.

Genere *Cryptococcus*

C. neoformans è l'unica specie del genere *Cryptococcus* riconosciuta come patogena, anche se non mancano segnalazioni di processi morbosi a carico del polmone, meningi e cute indotti da altre specie (*C. albidus*, *C. luteulus*, *C. laurentii*). In *C. neoformans* sono stati individuati 5 sierotipi (A, B, C, D, AD), di cui A e D sono ubiquitari, con prevalenza del sierotipo D in Italia, mentre B e C hanno una distribuzione più ristretta (Africa centrale, Asia sud-orientale, California) (Tav. 8) (28). Le infezioni causate da *C. neoformans*, che trovano riscontro soprattutto in particolari condizioni immunitarie, sono di natura esogena e il lievito infettante proviene in genere dal suolo contaminato da escrementi di uccelli, in particolare, di piccioni. La meningo-encefalite è la forma infettiva più frequente: seguono localizzazioni al polmone, cervello, linfonodi, pelle, ossa, cute, pericardio. L'infezione polmonare è la forma più comune, sovente asintomatica.

Genere *Hansenula*

Compreso con altri generi nel vasto gruppo dei miceti patogeni emergenti (1), questo genere presenta due specie correlate con infezioni umane: *H. polymorpha*, in malattia granulomatosa cronica con isolamento da linfonodi del mediastino e *H. anomala*, in casi di pneumopatia e fungemia in immunocompromessi portatori di catetere venoso centrale e in leucemici.

Genere *Malassezia*

Precedentemente denominata *Pytirosporium ovale* e *Pytirosporium orbiculare*, *M. furfur*, agente etiologico della *pitiriasis versicolor*, è stato riconosciuto causa di infezioni sistemiche nell'uomo. Predisposti a queste infezioni sono i soggetti immunosoppressi e i bambini prematuri che hanno subito lunghi ricoveri ospedalieri e che sono stati sottoposti a iperalimentazione lipidica per via endovenosa. Sempre in bambini ad alto rischio sono risultate possibili infezioni da *M. pachydermatis*, lievito, quest'ultimo, isolato da materiale di provenienza umana (escreato, sangue, urina, essudato vaginale) in sindromi febbrili.

Genere *Rhodotorula*

Normali ospiti della cute, soprattutto se umida per condizioni ambientali o per alterata fisiologia, *R. rubra* e *R. glutinis* sono state identificate in casi di meningite, infezioni cutanee croniche e di fungemia correlata con la presenza di catetere venoso.

Genere *Saccharomyces*

S.cerevisiae è la più comune specie di *Saccharomyces* isolata nei laboratori di microbiologia clinica. Infezioni umane correlate con questo lievito comprendono fungemia, peritonite, endocardite, polmonite e vulvo-vaginite. In alcuni casi di fungemia associati alla presenza di catetere venoso centrale, la terapia di scelta è stata la rimozione del catetere stesso.

Genere *Torulopsis*

T.glabrata è ritenuta ospite dell'organismo umano e può essere isolata dalla cavità orale, dagli apparati respiratorio e intestinale e dalle vie genito-urinarie di molti individui. Frequenti anche tra miceti isolati da urina, stipiti di questa specie sono stati associati a casi di endocardite su valvola bovina e di meningite, nonché, in epoca più recente, a svariati processi morbosi.

Genere *Trichosporon*

T.beigelii, precedentemente denominato *T.cutaneum*, oltre ad essere l'agente specifico di *pieira bianca*, è stato associato ad infezioni invasive soprattutto in soggetti con marcata neutropenia e nei quali la malattia si manifesta con febbre e lesioni necrotiche cutanee. In talune casistiche, l'infezione da *T.beigelii* è risultata manifestarsi più frequentemente in forma sistemica, coinvolgendo polmone, fegato, milza, cute, ossa e apparato gastrointestinale.

Genere *Blastoschizomyces*

B.capitatus, isolato anche da cute umana normale, trova attualmente un sempre più ampio riscontro in infezioni disseminate soprattutto in soggetti immunocompromessi.

Osservazioni cliniche	Dati sperimentali
Deficit T linfociti (Hodgkin, AIDS)	Scarsa resistenza in topi provvisti di anticorpi (nude mice)
Stato di tolleranza	Tolleranza transitoria. Blocco delle cellule immunocompetenti
Scarsa produzione di anticorpi	Scarsa produzione di anticorpi. Blocco aspecifico di macrofagi
Polisaccaride capsulare in circolo	Inibizione della fagocitosi e del killing intracellulare da polisaccaridi

Tavola 8. Condizioni immunitarie favorevoli alla criptococcosi (Gargani e Azzi, 1986).

Diagnostica di laboratorio

1) Raccolta e preparazione del materiale

A materiali di provenienza umana, prelevati per l'isolamento e l'identificazione di lieviti, sono applicabili gli stessi principi generali stabiliti per la raccolta di campioni per indagini batteriologiche: a) definizione del periodo ottimale del prelievo; b) prelievo dalla zona in cui è in atto un processo infettivo di quantità sufficiente di materiale per l'espletamento delle indagini; c) prelievo del materiale prima dell'impiego di antimicotici; d) scelta di dispositivi di raccolta. Inoltre, come in tutta la diagnostica di laboratorio delle infezioni da miceti, è stata considerata l'opportunità di conservare parte del materiale (formalina 10%) per eventuali valutazioni a distanza della quantità e della morfologia del lievito all'atto della raccolta.

Nelle infezioni superficiali mucocutanee (Tav. 9), il prelievo del materiale avviene, di norma, a livello delle sedi coinvolte, a seguito di raschiamento o mediante tampone sterile. Nelle infezioni invasive e sistemiche (Tav.10a-10b), oltre al prelievo di liquidi organici o di tessuti (biopsia) da sedi profonde clinicamente compromesse, si renderebbe pressochè indispensabile l'emocoltura e raccomandabile l'esame di altri materiali (5, 77). Ad esempio, è stato ritenuto per lungo tempo che, fatta eccezione per *C.neoformans*, il riscontro di lieviti e, in particolare, di *C.albicans*, nell'escreato non rivestisse alcun valido significato per la diagnosi di candidosi polmonare, ma in epoca più recente è stato sostenuto che l'isolamento anche da questo materiale di lieviti patogeni può contribuire alla diagnosi di candidosi sistemica in casi di immunosoppressione, soprattutto se associato al riscontro della stessa specie di lievito in altre sedi. Inoltre, accanto a specifiche raccomandazioni sulle modalità di raccolta e di conservazione del materiale, non sono mancati schemi di guida in merito a materiali che si prestano maggiormente all'isolamento di determinate specie fungine (Tav.11).

Nella recente rassegna di Jones (38), sono state fatte presenti alcune difficoltà interpretative che si presentano allorchè si perviene all'isolamento di lieviti da taluni materiali di provenienza umana, da dispositivi protesici e da cateteri a lunga permanenza. Ad esempio,

Cute:	disinfezione (alcool 70%, isopropanolo); raccolta con tampone di mussolina (non con tampone greggio) o con tampone di cellulosa impregnato con isopropanolo; in altri casi raschiamento con bisturi o con vetrino sterile; il prelievo viene generalmente eseguito a livello del margine periferico della lesione; le particelle vengono raccolte in capsula Petri o in altri contenitori sterili etichettati.
Unghie:	raccolta del materiale dopo rimozione di tutta o parte dell'unghia al di fuori delle sedi dove il tessuto infetto è a contatto diretto con quello sano; le particelle vengono raccolte in capsula Petri o in altri contenitori sterili etichettati.
Capelli:	raccolta di 20-40 capelli (a livello della base del capello è presente tessuto micotico recente) in capsula Petri; possibile evidenziazione di noduli nerastri (<i>Piedra nigra</i>) o biancastri (<i>Piedra alba</i>) lungo il capello.
Cornea:	il materiale è raccolto con speciale spatola (platino) dopo raschiamento di aree ulcerate o suppurate; semina mediante incisioni ripetute su terreno solido.
Secreti:	(secrezioni vaginali e balano-prepuziali, mucosità orale, nasale e faringea, essudati auricolari e altri) prelievo mediante tampone sterile; invio rapido in laboratorio o conservazione in frigorifero per una notte.

Tavola 9. Raccolta e trattamento di materiali clinici nel corso di infezioni mucocutanee.

in casi di positività di liquido peritoneale di soggetti sottoposti a dialisi, può essere posto l'interrogativo se il lievito isolato era presente nella cavità addominale o se è da considerarsi un semplice contaminante acquisito nel corso di manovre di manipolazione strumentale. Lo stesso è risultato poter valere per la positività di cateteri endovenosi, quale espressione di fungemia oppure di inquinamento nel corso delle manovre di impiego e di rimozione. In questi casi, come quelli relativi all'isolamento di *C. albicans* da urina, potrebbe avere un valore discriminante la valutazione semi-quantitativa o quantitativa della positività, con specifici riferimenti (soglie indicative di Unità Formanti Colonie di 10^5 /ml. per l'urina e di 10^3 per cateteri infetti) all'interpretazione dei risultati di indagini batteriologiche.

<p>Escreato: toilette della cavità orale e raccolta in un recipiente metallico o di plastica a collo largo di 10-15 ml di materiale da inviare in laboratorio al massimo entro 2 ore (campioni conservati non sono adatti per crescite batteriche o di funghi saprofiti). Controllo dei caratteri macroscopici (sangue, materiale purulento o caseoso), allestimento di strisci e coltura. Possibile omogeneizzazione con brodo nutritivo su agitatore. Il materiale può essere concentrato dopo fluidificazione con agenti mucolitici (N-acetil-L-cisteina o ditiotreitolo), agitato su Vortex per 5-10', neutralizzato con M/15 fosfato (pH 6.8-7.2), centrifugato (2000 rpm per 15') e sottoposto come sedimento ad esami diretti e colturali. Lo stesso trattamento può essere praticato con altre secrezioni delle vie respiratorie (lavaggio bronchiale o broncoalveolare, aspirato tracheale o transtracheale) e dopo lavaggio gastrico. La decontaminazione per alcool-acido resistenti non è adatta per la ricerca di miceti (NaOH danneggia le strutture fungine).</p> <p>Fluidi: (peritoneale, pleurico, articolare) raccolti con siringa eparinata, collocati in contenitori sterili e inviati nel minore tempo possibile in laboratorio. Il materiale può essere concentrato mediante centrifugazione (2500 rpm per 15'), da cui le colture con 0.5 ml di sedimento.</p>

Tavola 10a. Raccolta e trattamento di materiali clinici nella diagnostica di infezioni invasive e sistemiche.

<p>Urina: il materiale è ottenuto mediante "mitto intermedio" o tramite cateterismo o puntura sovrapubica. Coltura da eseguirsi prontamente, oppure non più tardi di 12-15 ore ponendo il materiale a 4°C. Il materiale può essere concentrato mediante centrifugazione (2000 rpm per 15'), da cui le colture con 0,1 ml di sedimento. Per valutazioni semiquantitative semina diretta con ansa calibrata.</p> <p>Tessuti: invio immediato in laboratorio o, nell'impossibilità, conservazione a 4°C, per non più di 8-10 ore. Il materiale può essere sminuzzato con bisturi, tritato o frammentato in mortaio; l'aggiunta di soluzione salina facilita la macerazione. L'omogeneizzazione è sconsigliata per il danneggiamento di strutture ifali.</p> <p>Sangue: prelievo con siringa eparinata di 8-10 ml di materiale ad intervalli prestabiliti. Con l'impiego di terreno nutritivo in flaconi, essi possono essere conservati a 25-30°C, prima del loro trasporto. La condotta da seguire è condizionata dal sistema colturale impiegato (bifasico, filtrazione su membrana, lisi-centrifugazione, radiometrico). Per il <u>midollo osseo</u>, il prelievo viene eseguito con siringa eparinata e il materiale prontamente sottoposto a coltura.</p> <p>Liquor: prelievo di almeno 2 ml, centrifugazione (2000 rpm per 15', coltura su terreno bifasico o coltura dopo filtrazione su membrana.</p> <p>Catetere: rotazione su terreno solido o coltura di singole sezioni.</p>
--

Tavola 10b. Raccolta e trattamento di materiali clinici nella diagnostica di infezioni invasive e sistemiche.

2) Esame microscopico diretto

Contrariamente a quanto si verifica nei laboratori di microbiologia, l'esame microscopico diretto dovrebbe essere praticato pressochè sistematicamente su gran parte dei materiali inviati tenendo presente che tale esame, in relazione all'aspetto e alla quantità di strutture fungine evidenziabili, può contribuire a dare un significato al successivo isolamento in coltura, offrire talora utili indicazioni per un trattamento terapeutico e, in alcuni casi, consentire un'identificazione presuntiva del micete (Tav.12).

I campioni di materiale fluido (liquido cefalo-rachidiano, peritoneale, pleurico e articolare, urina, lavaggio bronchiale e broncoalveolare, escreato trattato con agenti mucolitici), una volta centrifugati, vengono esaminati direttamente al microscopio, dopo aver mescolato una parte del sedimento con una parte di soluzione fisiologica, oppure, a seconda dei casi con:

- blu di lattofenolo, di cui l'acido lattico svolge un'azione chiarificante, l'acido fenico agisce come antisettico, il glicerolo impedisce l'essiccamento e il blu cotone colora le strutture fungine;

- soluzione di inchiostro di china, che consente di identificare cellule lievitiiformi capsulate (*C.neoformans*). A tale scopo una goccia di sedimento di liquido cefalo-rachidiano, oppure di altri liquidi (pleurico, peritoneale, articolare) è mescolata con una goccia di reattivo su vetrino portaoggetti, coperta con un coprioggetti e esaminata al microscopio (se l'immagine è troppo scura la sospensione viene diluita con acqua distillata). Il materiale capsulare viene evidenziato sottoforma di alone chiaro, con uno spessore di 2-10 μ , ben demarcato, attorno alla cellula fungina (Fig. 2). In soggetti immunodepressi o sottoposti a terapia antimicotica, tale struttura può risultare più sottile. Le cellule del sangue possono presentare un alone di chiarificazione di solito sfumato e irregolare.

I campioni di una certa consistenza (frammenti di cute, capelli, unghie) sono invece trattati con liquidi di montaggio e chiarificazione, quali:

- idrossido di potassio al 20%, che, come soluzione moderatamente alcalina, dissolve la cheratina e consente un più netto contrasto tra micete e altre strutture. Il campione viene emulsionato con KOH su un vetrino portaoggetti, riscaldato alla fiamma e, dopo 10-15', previa aggiunta di un vetrino coprioggetti, osservato al microscopio.

Materiale	Candidosi	Criptococcosi
Sangue	1	2
Liquido cefalo-rachidiano	X	5
Lavaggio bronchiale	X	1
Essudato vaginale	4	X
Urina	2	3
Sedi multiple in forme sistemiche	3	4

1-5 = ordine di importanza
X = valutata in rapporto all'isolamento da altre sedi

Tavola 11. Selezione di materiale clinico per colture fungine (Roberts et al., 1985: sempl.).

<i>Candida spp.</i>	- cellule isolate, rotonde, ovali (3-4 μm) - gemmazione singola - pseudoife ramificate con restrizioni terminali (a salsiccia) (5-10 μm) - ife settate
<i>C. neoformans</i>	- cellule rotondeggianti (5-20 μm), isolate o gemmanti, dotate di spessa capsula
<i>M. furfur</i>	- cellule rotondeggianti, isolate o a gruppi (3-8 μm)
<i>Trichosporon spp.</i>	- ife e artroconidi rettangolari o arrotondati

Tavola 12. Caratteri morfologici di lieviti rilevabili all'esame microscopico diretto.

- soluzione colorante/chiarificante a base di KOH e inchiostro di china.

Per taluni campioni particolarmente consistenti può essere impiegato un apparecchio per omogeneizzazione, quale Stomaker 80, in cui una serie di palette esercita un'azione compressiva su un sacchetto di plastica in cui è stato posto il materiale da esaminare. Per l'osservazione diretta, il microscopio a contrasto di fase presenta il vantaggio di una migliore differenziazione strutturale, nonchè l'impiego di substrati non colorati.

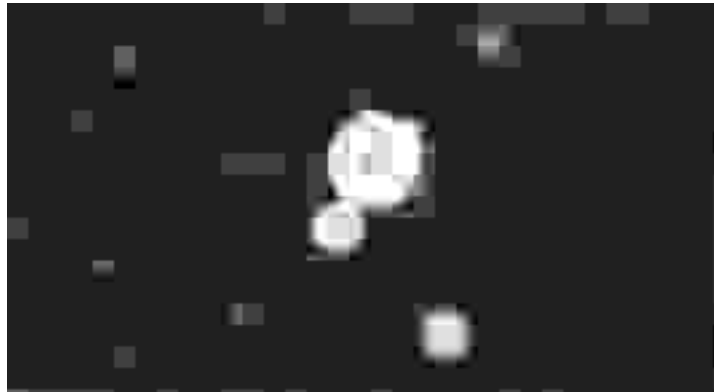


Figura 2. Colorazione con inchiostro di china: *C. neoformans*.

Per quanto riguarda i metodi di colorazione, alcuni, come Gram (Fig. I-II) e Papanicolaou, possono essere impiegati anche allo scopo di valutazioni più complete (presenza e tipo di flora batterica, presenza di cellule atipiche), tenendo peraltro in considerazione il fatto che taluni lieviti, come *C. neoformans*, si prestano scarsamente a tali colorazioni. Raccomandabili, al contrario, accanto a quelle tradizionali (Gram, Blu di metilene, Giemsa) sono risultate la colorazione all'acido periodico di Schiff (PAS) (fig III), la colorazione al mucicarminio di Mayer e, per quanto riguarda il rilievo di miceti in sezioni istologiche, l'impregnazione argentea di Gomori-Grocott o colorazione metenamina-argentea (Fig. IV) (91).

L'identificazione presuntiva dei lieviti si basa su una serie di rilievi volti a porre in evidenza proprio le specifiche caratteristiche morfologiche di tale gruppo di miceti e precisamente:

- la presenza o meno di forme capsulate
- la presenza o meno di pseudo-ife o di ife vere
- grandezza e forma delle cellule lievitiforni
- numero di gemme e attaccamento alla cellula madre

3a) Isolamento: emocolture

L'isolamento di lieviti dal sangue ripropone in pratica le stesse metodiche o gli stessi sistemi impiegati per l'isolamento di microrganismi batterici (monofasico non automatizzato, bifasico, membrana-filtrazione, lisi-centrifugazione, radiometrico e non radiometrico) (Tav.13a-13b).

In breve, stabilito da tempo che i procedimenti convenzionali richiedono periodi prolungati di osservazione, in questi ultimi anni sono state proposte numerose metodiche rivolte appunto a ridurre tali periodi e contemporaneamente ad accertare il numero di microrganismi sviluppatasi in un determinato periodo di tempo. Di tutte queste metodiche non sono mancati saggi comparativi (Tav.14-15-16), di cui ad un recente protocollo sintetico (38). Inoltre, è stato rilevato che: a) sistemi non radiometrici sono preferibili a quelli radiometrici (39) e a quelli basati su membrana-filtrazione (59), sia per quanto riguarda il tempo medio di osservazione che le percentuali di positività nella prima settimana; b) sistemi radiometrici sono più sensibili di quelli monofasici completati con segnali di positività (94); c) l'aggiunta di perossido di idrogeno alla coltura si traduce in un maggior numero di positività, per lo meno per quanto si riferisce a *C.albicans* e *C.neoformans* (35); d) l'aggiunta al substrato nutritivo di composti lipidici può favorire lo sviluppo di alcuni miceti, come *M.furfur*. Infine, è stato ritenuto da più parti che il più valido criterio per la diagnosi di una infezione invasiva o sistemica è quello di ottenere almeno due emocolture positive per lo stesso lievito a distanza di 24 ore.

3b) Isolamento: esami colturali di altri materiali

Pur non esistendo la stessa gamma di possibilità presenti nella diagnostica di laboratorio delle infezioni batteriche, la coltura dei miceti in generale e dei lieviti in particolare si basa su una notevole serie di terreni che possono essere indicati come non selettivi, selettivi, indicatori, particolari (Tav.17-18-19-20)(Fig.V-VI).

Monofasico e bifasico:	semina diretta di 5 ml di sangue in Brain-Heart-Infusion o in Trypticase-soy broth con un rapporto ottimale sangue-brodo pari a 1:10. Positività macroscopica in 20-30 giorni e positività microscopica, accertabile mediante ripetute sottocolture, a partire dalla 4 ^a giornata.
Monofasico:	(Oxoid Signal: Oxoid USA) Thioglycolate-broth in flacone con dispositivo cilindrico di plastica sensibile a variazioni di tensione interna in casi positivi.
Bifasico:	(Septi-Check Roche) Tryptic-soy-broth con 0.05% di Liquoid in flacone cui si avvita una camera cilindrica portante stratificazioni di agar cioccolato, McConkey e malt-agar. Coltura a 35°C per 2 settimane.
Membrana-filtrazione:	(Vacutainer: Bekton-Dickinson V.S.) apparecchio provvisto di membrana filtrante (HA 0.45µ, filtro Falcon Plastica), in cui si versano 50 ml di Triton-X-100, 3-4 ml di sangue, 50 ml di sodio carbonato 0.08%. Agitare, filtrare e contattare il filtro con Brain-Heart-Infusion. Analoghe operazioni possono essere praticate con il liquor, una volta filtrato con aggiunta di alcuni ml di brodo. Semina della membrana su Sabouraud agar.

Tavola 13a. Sistemi di isolamento mediante emocoltura.

Lisi-centrifugazione:	(Isolator 10: Dupont) azione di componenti litici su emazie e leucociti e semina successiva su agar-sangue -Columbia e su agar-cioccolato. Coltura in anaerobiosi e in ambiente con CO ₂ al 5% per 5 giorni a 35°C. Conteggio delle colonie e registrazione della data della loro comparsa.
Radiometrico:	(Bactec R: Johnston Lab.) semina in Tryptic-Soy-broth per aerobiosi (flacone 6B) e per anaerobiosi (flacone 7D). Agitare e procedere a valutazione radiometrica a tempi determinati per 2-3 giorni. Trapianto su agar-cioccolato in casi negativi.
Non Radiometrico:	(Bactec NR: Johnston Lab.) semina di 3-5 ml di sangue in terreno per aerobiosi (NR6A) e per anaerobiosi (NR7A). Rilievo di produzione di CO ₂ mediante infrarossi. Valutazione con computer.

Tavola 13b. Sistemi di isolamento mediante emocoltura.

Sistemi	Campioni	Positività	Tempo medio (giorni)
Lisi-centrifugazione	3.335	21	1.8
Brodo-peptone		15	3.7
Lisi-centrifugazione: Isolator	7.000	85	1.9
Columbia-broth		61	2.9
Lisi-centrifugazione: Isolator	11.000	76	
Tryptic-soy-broth: BACTEC		64	
Lisi-centrifugazione: Isolator	2.188	68	1.9
Tryptic-soy-broth: BACTEC		56	2.7
Lisi-centrifugazione: Isolator	5.000	25	
Tryptic-soy-broth: BACTEC		19	
Lisi-centrifugazione: Isolator	5.125	64	2.3
Bifasico BHI		49	5.0
Lisi-centrifugazione: Isolator	23.586	164	1.9
Bifasico BHI: Septi-Chek		115	4.4
Lisi-centrifugazione: Isolator	3.111	26	
Lisi-filtrazione		24	
Bifasico BHI: GIBCO	5.000	29	
BHI-broth: GIBCO		27	
Bifasico Tryptic-soy: GIBCO	3.537	27	2.3
Tryptic-soy-broth: GIBCO		30	3.0
Bifasico BHI	668	24	7.9
Tryptic-soy-broth: BACTEC	38.324	147	2.0
Tryptic-soy: Septic-Chek	5.034	39	
Thioglycolate-broth: Signal		22	

Tavola 14. Emocolture positive per *Candida* spp. nella comparazione di due sistemi di isolamento (da Jones, 1990: sempl.).

In genere, la loro scelta è condizionata da svariati fattori, quali: caratteristiche del campione in esame, tipo di fungo sospetto, costo, validità e praticità del terreno, scopo dell'indagine (isolamento primario o secondario, studio morfologico, conservazione del micete, ecc.). In ogni caso, la temperatura di crescita alla quale si ha lo sviluppo della maggior parte di miceti clinicamente importante è di 30°C., una temperatura ambiente di 25°C. consentendo parimenti

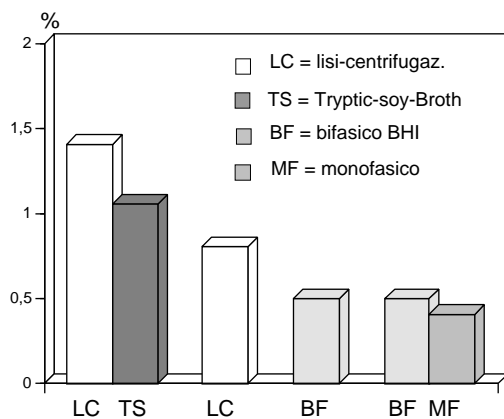


Tavola 15. Comparazione di percentuali di positività per Candida spp. di emocolture praticate con sistemi diversi.

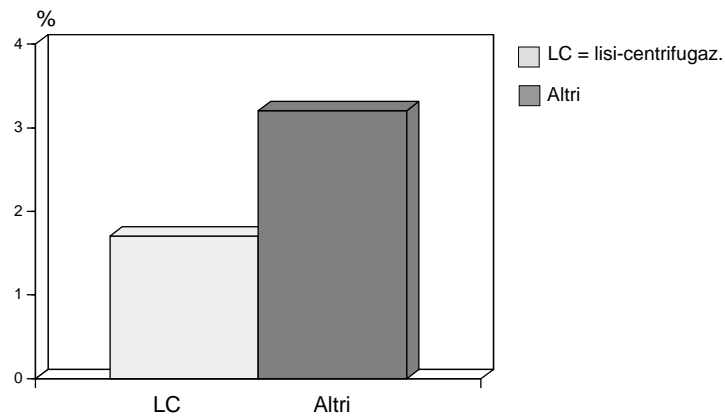


Tavola 16. Comparazione dei tempi medi (giorni) di positività di Candida spp. di emocolture praticate con sistemi diversi.

<u>Sabouraud-dextrose-agar:</u>	è il terreno non selettivo più impiegato nella pratica di laboratorio per l'isolamento, l'identificazione, non consentendo peraltro la migliore sporulazione, e il mantenimento di miceti patogeni e saprofiti. Pur non essendo un terreno selettivo esso è in grado di inibire parzialmente lo sviluppo di specie batteriche, stante il suo pH acido (pH 5,6 ± 0,2)
<u>Sabouraud-Emmons-agar:</u>	è impiegato per coltura e identificazione di miceti patogeni. Presenta una concentrazione di glucosio ridotta al 20%, tale da incrementare la sporulazione di miceti con scarso sviluppo di corpi fruttiferi (pH 6,5 ± 0,1)
<u>Sabouraud-maltose-agar:</u>	rappresenta un buon substrato per lieviti e muffe. Addizionato con Tergitol 7 (0,1 ml), bromocresolo porpora (0,0025%), tellurito di potassio (0,3 ml) e TTC (cloruro di trifeniltetrazolio-3 ml), esso consente l'identificazione di <i>C. albicans</i> per il colore delle colonie (pH 5,6 ± 0,2)
<u>Malt-agar:</u>	impiegato per l'isolamento e identificazione di lieviti e muffe presenti negli alimenti, nel latte e suoi derivati (pH 5,5 ± 0,1)
<u>Malt-extract-agar:</u>	terreno con caratteristiche simili a Malt-agar ma di efficacia minore
<u>Mycobios agar</u> (Soypeptone):	terreno per l'isolamento di miceti da particolari campioni clinici (sangue, liquor) e per la determinazione dell'attività di antimicotici (pH 7,0 ± 0,2)
<u>Yeast-morphology-agar:</u>	contiene tutti i fattori di crescita per i lieviti: impiegato per saggi culturali e di sensibilità ad antimicotici (pH 5,8 ± 0,2)

Tavola 17. Terreni non selettivi.

un regolare sviluppo fungino. Per quest'ultimo, il periodo di osservazione è di 5 giorni in caso di sospetta candidosi, di 10 giorni per criptococchi, di 8 settimane per funghi dimorfi, risultando comunque consigliabile la conservazione per 4 settimane di gran parte delle colture prima di una valutazione negativa. L'impiego di capsule Petri

<u>Sabouraud-dextrose-agar</u> + CAF	terreno impiegato per l'isolamento di miceti patogeni o patogeni opportunisti (Cryptococcus, Aspergillus, Mucor, Rhizopus, Candida), sensibili a cicloeximide, da campioni di origine clinica. (pH 5,6 ± 0,2)
<u>Sabouraud-dextrose-agar</u> + CAF e CEX	terreno impiegato per l'isolamento di dermatofiti e alcuni miceti dimorfi. Può essere utilizzato nella diagnostica differenziale di Candida * (pH 5,6 ± 0,2)
<u>Sabouraud-dextrose-agar</u> + GM	terreno raccomandato per l'isolamento di tutte le specie di lieviti da materiali contaminati, stante le proprietà antibatteriche di gentamicina (pH 5,6 ± 0,2)
<u>Mycobios-selective-agar</u>	in esso, il cloramfenicolo inibisce la crescita batterica e cicloeximide quella di miceti saprofiti*. Il pH neutro consente lo sviluppo di funghi patogeni non sviluppantesi su terreno acido. Il terreno viene generalmente usato per l'isolamento di dermatofiti e di funghi responsabili di infezioni sistemiche (pH 7,0 ± 0,2)
<u>Littman-Oxgall-agar</u>	terreno con streptomina e cristalvioletto quali agenti batteriostatici. Impiegato per l'isolamento primario di funghi, in particolare di dermatofiti (pH 7, ± 0,2)
<u>OGYE</u>	(Oxytetracycline Glucose Yeast Extract) terreno impiegato per il conteggio di lieviti e muffe negli alimenti. L'aggiunta di tetraciclina, ad una base a pH neutro, consente conteggi più elevati rispetto a quelli praticati su terreni a pH acido. Con alimenti ad alto contenuto proteico e con sospetta presenza di batteri Gram-negativi è necessaria l'aggiunta di gentamicina (pH 7,0 ± 0,2)
<u>Rose-Bengal-agar</u>	impiegato per conteggio di funghi negli alimenti (pH 7,2)

* C.neoformans, A.boydii, miceti opportunisti tra cui alcune specie di Candida sono inibite da Cex.

Tavola 18. Terreni selettivi.

<u>Nickerson-medium:</u>	(Biggy: bismuth-sulfite-glucose-glycine-agar o Candida-agar) impiegato per l'isolamento primario e la differenziazione di lieviti del genere <i>Candida</i> : il solfito di bismuto inibisce la crescita batterica e, in base alla capacità solfito-riducente delle varie specie, le colonie risultano colorate in nero-marrone più o meno intensamente (pH 6,8 ± 0,2)
<u>Pagano-Levin-medium:</u>	terreno contenente cloruro di trifeniltetrazolio che, con l'aggiunta di antibiotici, è impiegato per l'isolamento primario di lieviti e, in base alla capacità di ridurre i sali di tetrazolio con formazione di colonie bianco-rossastre, per la differenziazione di lieviti del genere <i>Candida</i> . E' segnalata una parziale inibizione di crescita di alcune specie di <i>Candida</i> (pH 5,6 ± 0,2)
<u>Candida-BCG-agar:</u>	(Bromo-cresol-green) terreno contenente verde di bromocresolo che conferisce una colorazione giallo-verdastra alle colonie. La differenziazione delle specie si basa su diversità di colore in rapporto al pH (pH 6,1 ± 0,2)
<u>Birdsee-agar:</u>	terreno contenente estratto di semi di <i>Guizotia abyssinica</i> , su cui <i>C.neoformans</i> produce colonie pigmentate a differenza di <i>C.albicans</i>

Tavola 19. Terreni "indicatori".

presenta i vantaggi di una migliore aerazione, di una maggiore superficie di isolamento, nonché i requisiti di maneggevolezza e di facilità di osservazione. L'impiego di capsule si accompagna, tuttavia, ad una maggiore disidratazione del terreno, da cui l'opportunità di un contenuto di terreno di 40 ml e di una loro chiusura con nastro adesivo per il mantenimento di un'umidità del 30-40%. L'impiego di provette si traduce in una maggiore stabilità e sicurezza, nell'occupazione di uno spazio minore e nel consumo di una minore quantità di substrato. Di norma, esse sono poste in senso orizzontale per 24 ore dopo l'inseminamento, onde favorire una regolare distribuzione senza accumuli di fondo, indi collocate in posizione verticale. La chiusura con tappo a vite non deve essere ermetica, in modo da consentire una continua aerazione.

<u>Chlamidospore-agar</u>	terreno impiegato per la differenziazione di <i>C. albicans</i> da altre specie in base alla formazione di clamidospore che vengono meglio evidenziate al microscopio per l'assunzione di un colorante vitale (blu tripano) (pH 5,1 ± 0,2)
<u>Czapek-dox-agar</u>	terreno indicato per il mantenimento di stipiti di collezione e per studi tassonomici. Il terreno, che contiene nitrato di sodio come sola sorgente di azoto e saccarosio come sola sorgente di carbonio, può essere impiegato per lo studio della formazione di clamidospore, blastoconidi e artroconidi (pH 7,2 ± 0,2)
<u>Corn-meal-agar</u>	impiegato, con l'aggiunta di Tween 80 (0,3%), per l'evidenziazione di clamidospore di <i>C. albicans</i> e per la coltivazione di miceti patogeni (pH 6,0 ± 0,2)
<u>Potato-dextrose-agar</u>	indicato per il conteggio di lieviti e muffe negli alimenti e nei prodotti caseari, può essere impiegato, a temperatura ambiente, per saggi morfologici (pH 5,6 ± 0,2)
<u>Rice-extract-agar</u>	indicato per lo studio morfologico di miceti. L'aggiunta di Tween 80 (0,3%) favorisce lo sviluppo di clamidospore di <i>C. albicans</i> (7,1 ± 0,2)
<u>TOC</u>	contenente Tween 80, Oxygall e acido caffeico, il terreno si presta sia per saggi morfologici sia per l'identificazione di lieviti in base alla comparsa di pigmentazione nero-marrone dovuta ad attività fenolo-ossidasi
<u>GPYA</u>	(glucose-peptone-yeast-agar) terreno adatto alla conservazione, a temperatura di 4°C., degli stipiti
<u>Gorodkova</u>	(o V8 medium, Fowell-acetate-agar, Wickerham's-malt-agar, Acetate-ascospore-agar) indicato per l'evidenziazione di ascospore

Tavola 20. Terreni particolari per saggi morfologici e conservazione.

4) Identificazione a livello di specie

I lieviti, una volta isolati in coltura pura, possono essere identificati in base alle loro:

- proprietà morfologiche, macroscopiche e microscopiche; (Tav.21)
- proprietà biochimico-culturali; (Tav. 21)
- caratteristiche antigeniche.

Nell'ambito delle proprietà morfologiche macroscopiche (colonie) e microscopiche (gemmazione) si inserisce, per lo meno a livello di *C.albicans*, il fenomeno della variazione o instabilità fenotipica.

a) Proprietà morfologiche

Sul piano macroscopico, l'aspetto delle colonie, pur non consentendo le medesime differenziazioni proprie dei miceti filamentosi, può dare utili indicazioni sul lievito isolato (Tav. 22).

Le colonie possono presentarsi strutturalmente regolari o irregolari, a margini netti o frangiati, di aspetto lucido, cremoso o rugoso, di forma rotondeggiante o conica. Gli aspetti caratteristici, già presenti in 3^a giornata di coltura, tendono ad evidenziarsi in 5^a-10^a giornata (Fig.3-4a-b).

Naturalmente l'uso di terreni "indicatori" consente di stabilire le differenze di pigmentazione tra le varie specie, così come l'impiego di terreni selettivi limita la crescita di alcune specie. E' da rilevare che, in assenza di micelio aereo, l'aspetto della superficie delle colonie e della loro faccia posteriore non può consentire le medesime valutazioni proposte nel corso di colture di miceti filamentosi.

Sul piano microscopico, una corretta procedura prevede una osservazione nella fase iniziale di sviluppo e una seconda osservazione in una fase successiva (7^a-8^a giornata). Queste osservazioni, per le quali sono stati proposti diversi metodi di applicazione (Tav. 23), sono avvantaggiate dall'impiego di particolari terreni colturali (Corn-meal-agar, Potato-dextrose-agar, Rice-extract-agar) dove sono appunto più evidenti fenomeni di sporulazione e conidiazione importanti per l'identificazione (Tav. 24a-c) (Fig. 5a-f) (Fig. 6-16).

Un primo saggio morfologico microscopico che viene abitualmente praticato è quello della germinazione su siero o test dei tubi germinativi, che consente di porre in evidenza un'estensione filamentosa, della lunghezza 3-4 volte maggiore e della larghezza di circa la metà della cellula madre. Di norma, il test viene praticato sospenden-

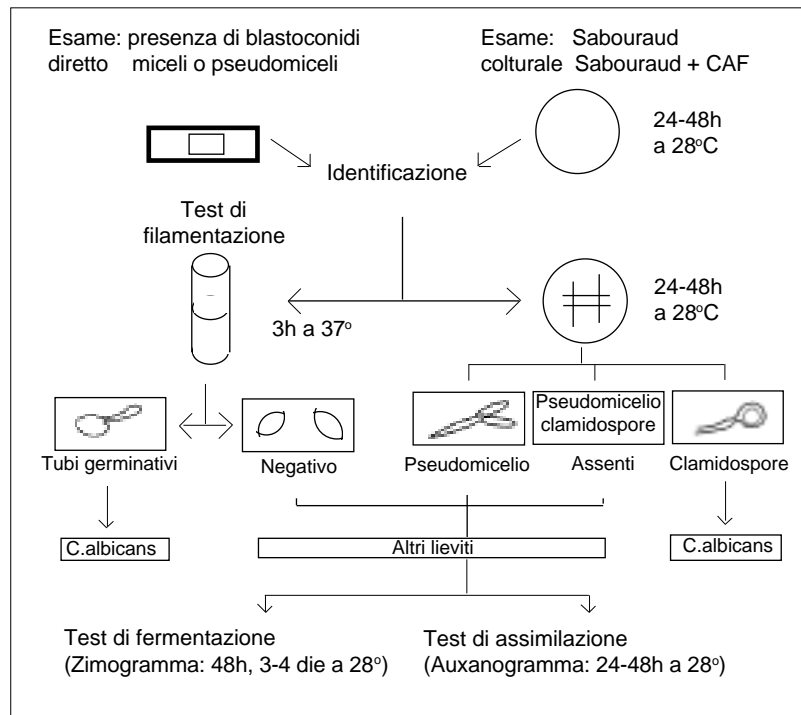


Tavola 21. Schema di identificazione di lieviti.

do una colonia di lievito in una provetta contenente siero di cavallo o siero umano (0,5 ml), oppure in altri substrati proposti in commercio (uovo albumina, albumina e siero bovino, plasma di coniglio e trypticase-soy-broth, siero di pecora, pool di sieri umani): dopo 3 ore di contatto a 37°C., una goccia di sospensione viene posta tra vetrini copri e portaoggetto e osservata al microscopio (consigliabile l'uso di un controllo positivo e di uno negativo). *C.albicans* e *C.stellatoidea* producono tubi germinativi senza restringimento nel punto d'origine, mentre *C.tropicalis* può presentare, anche se raramente, tubi germinativi con restringimento nel punto d'origine (Fig.17-18-19).

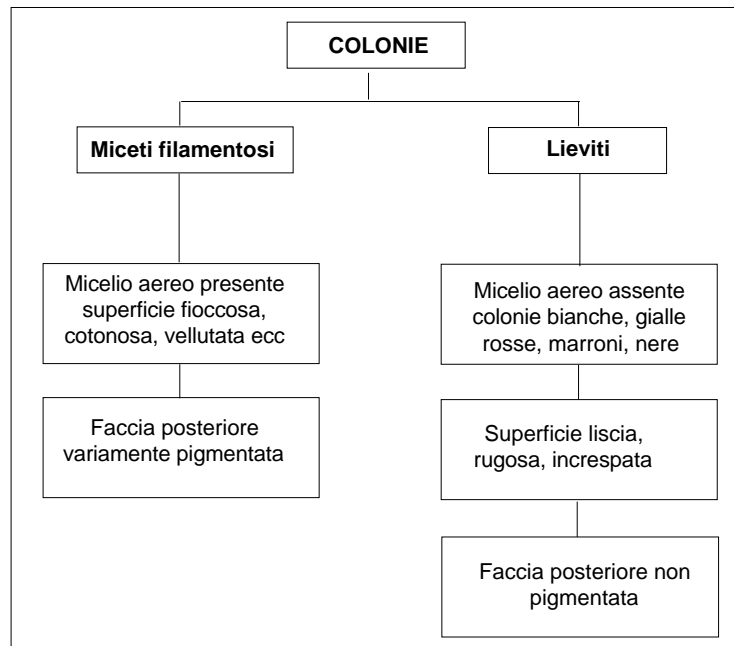


Tavola 22. Aspetti morfologici macroscopici.

E' da sottolineare che dopo 5-6 ore di incubazione anche altri lieviti possono germinare e che, al contrario, non tutti gli stipti di *C.albicans*, in particolare in soggetti sottoposti a terapia antimicotica e in soggetti neoplastici, producono tubi germinativi. E' stato fatto notare, inoltre, che nel test dei tubi germinativi: a) più aumenta la concentrazione dell'inoculo, minore è la produzione di estensioni filamentose; b) la produzione di tubi germinativi è favorita dalla presenza di piccole quantità di glucosio; c) in presenza di soluzione tampone e etanolo il test è positivo in 45'-60'.

Nel capitolo dell'identificazione dei lieviti su base morfologica macroscopica (colonie), assume una particolare importanza a livello di *C.albicans*, ma anche di altre specie (*C.tropicalis*) il fenomeno della variazione fenotipica o instabilità fenotipica (switching). Si tratta di un



Figura 3a. Colonie di *C. albicans* e *T. beigelii* in 8^a giornata.



Figura 3b. Particolare di *T. beigelii*.



Figura 4a. Colonie di *C. tropicalis* in 10^a giornata.



Figura 4b. Colonie di *C. albicans* e di *C. krusei* in 7^a giornata.

fenomeno che fondamentale si esprime nella possibilità che un lievito possa andare incontro ad una serie di variazioni morfologiche, a livello di colonie, cui si associano comportamenti differenti sia a livello cellulare che a livello fisiologico, in particolare per quanto riguarda ricambio metabolico, attività aggressive e risposta al sistema immune, resistenza ad antimicotici. La comparsa di queste colonie, variamente denominate (opache, a stella, ad anello, puntiformi o nane, a uovo, a medusa, lanuginose, ecc.) (Fig.VII-VIII-IX) si manifesta con frequenza variabile, è reversibile e può essere indotta da radiazioni UV, aumenti di temperatura ed agenti ossidanti.

Tecniche comuni:	<p>a) sospensione su vetrino di una goccia di blu di lattofenolo e di una parte di colonia, aggiunta di un coprioggetti e osservazione microscopica. Il metodo non consente di conservare la disposizione originale e di preservare le strutture fungine;</p> <p>b) pressione delicata della parte adesiva di un nastro sulla colonia e successiva distensione su vetrino portaoggetti su cui è stata posta preventivamente una goccia di blu di lattofenolo; aggiunta di un coprioggetti e osservazione microscopica. Le strutture si presentano meglio conservate;</p> <p>c) prelievo di un frammento di terreno su cui si è sviluppata la colonia che viene posto tra un vetrino coprioggetti e portaoggetti, riscaldamento alla fiamma fino allo scioglimento dell'agar e osservazione microscopica;</p>
Tecnica di Dalmau:	<p>semina di una sospensione del lievito su terreno solido mediante strisce parallele sulle quali viene posto un vetrino coprioggetti sterile, incubazione a temperatura ambiente e osservazione microscopica a partire dalla 24a ora;</p>
Tecnica di Riddel:	<p>allestimento su un vetrino portaoggetti di un piccolo blocco rettangolare di terreno nutritivo ai lati del quale viene posto un frammento di coltura; copertura del preparato con coprioggetti e incubazione a temperatura ambiente in capsula Petri con acqua distillata sul fondo. La coltura si sviluppa su entrambi i vetrini: allestimento di preparati con blu di lattofenolo.</p>

Tavola 23. Allestimento preparati per esami microscopici.

Stante le ricerche di Soll et al. (87, 88), praticate su singole colonie di *C.albicans* isolate da campioni di essudato vaginale in casi di infezione primitiva e recidivante, la variazione fenotipica è risultata realizzarsi con una frequenza di circa l' 1% delle colonie sviluppatesi sui comuni terreni colturali. A partire da una colonia e sottoponendo la stessa ad opportune diluizioni seguite da sottocolture (colonie primarie, colonie secondarie, colonie terziarie) è risultato possibile distinguere quattro sistemi:

Specie	Caratteri macroscopici	Caratteri microscopici
<i>C.albicans</i>*	colonie lisce, cremose, pastose	presenza di pseudoife (talora ife) con grappoli di blastoconidi a livello delle giunzioni; sviluppo di clamidospore a 25-30°. Test di germinazione: positivo
<i>C.tropicalis</i>	colonie cremose, lisce o irregolari con margini sfrangiati, centro arborescente, o con aspetto verrucoso e con doppia bordatura (7-10 gg.)**	blastoconidi isolati o a piccoli gruppi lungo le pseudoife; possibili ife vere
<i>C.parapsilosis</i>	colonie cremose, biancastre, lisce o corallifere con porosità e circonvoluzioni	blastoconidi isolati o a piccoli gruppi lungo pseudo-ife corte e ricurve, con possibili elementi ifali larghi (cellule giganti)
<i>C.krusei</i>	colonie piatte, ruvide, con frange miceliali	pseudo-ife con blastoconidi allungati ad albero ramificato
* = <i>C.stellatoidea</i> differisce da <i>C.albicans</i> per l'assimilazione del saccarosio ** = presenza di pellicola superficiale in brodocolture		

Tavola 24a. Caratteri morfologici, macroscopici e microscopici, di specie diverse di lieviti.

Specie	Caratteri macroscopici	Caratteri microscopici
<i>C.pseudotropicalis</i>	colonie cremose, lisce	pseudo-ife con blastoconidi allungati disposte parallelamente (tronchi galleggianti)
<i>C.guilliermondii</i>	colonie cremose, lisce, appiattite, e pigmentate nel tempo	piccole cellule lieviformi, scarse e corte pseudo-ife con possibili grappoli di blastoconidi a livello dei setti
<i>C.lusitaniae</i>	colonie cerebriformi, stellari	pseudo-ife corte, curve, con blastoconidi allungati
<i>S.cerevisiae</i>	colonie lisce, bianco-avorio, di forma conica	cellule lieviformi con gemmazioni multiple, possibili corte pseudo-ife; ascospore su terreni particolari
<i>T.glabrata</i>	colonie pastose, lucide, appiattite	cellule rotondeggianti, ovali; assenza di pseudo-ife
<i>C.neoformans</i>	colonie pastose, lucide, mucoidi	cellule rotonde, di grandezza variabile, capsulate; assenza di pseudoife

Tavola 24b. Caratteri morfologici, macroscopici e microscopici, di specie diverse di lieviti.

Genere	Caratteri macroscopici	Caratteri microscopici
Trichosporon	colonie cremose, di aspetto cerebroide	ife vere e pseudo-ife con blastoconidi; artroconidi da colture invecchiate
Rhodotorula	colonie rosa-corallo, lisce, lievitosimili	cellule rotonde, ovali, gemmanti, con possibile capsula sottile; corti e rudimentali pseudo-ife; assenza di ascospore
Hansenula	colonie lisce, umide cremose	cellule germoglianti con formazione di pseudo-ife in alcune specie; su terreni particolari ascospore (morfologia ad elmetto)
Malassezia	colonie cremose, opache nel tempo, di colore arancio-bruno	cellule rotonde, ovali; conidi a larga base d'impianto con formazione di collare; pseudo-ife e ife assenti
Ustilago	colonie bianche, pastose, poi raggrinzite e pigmentate	cellule lievitosimili, allungate a fava o a fiasca; talvolta ife sottili
Prothoteca	colonie cremose, di consistenza mucoide	sporangi rotondi di varia grandezza; assenza di gemmazioni e di ife
Geotrichum	colonie bianche, lievitosimili. Possibile micelio aereo, cottonoso e sviluppo sotto la superficie **	assenza di pseudo-ife; ife vere che si frammentano in artroconidi*; assenza di blastoconidi

*= l'assenza di attività ureasica lo differenzia da Trichosporon
**= la maggior parte dei ceppi non cresce a 37°

Tavola 24c. Caratteri morfologici, macroscopici e microscopici, di specie diverse di lieviti.

- sistema smooth-withe, in cui non è stata osservata alcuna variazione, oppure una variazione con frequenza di 10^{-4} a livello delle colonie secondarie e terziarie ottenute da alcune colonie primarie.
- sistema stippled-ring, in cui, nelle colonie secondarie e terziarie, si sono rese evidenti variazioni fenotipiche con una frequenza di 10^{-2} - 5×10^{-4} (colonie punteggiate, o piccole, o a stella, o a tipo-micelio);
- transizione withe-opaque, in cui, da una colonia, con una frequenza uguale a quella del sistema precedente, originano colonie opache, o a margini dentellati, o a tipo-micelio;

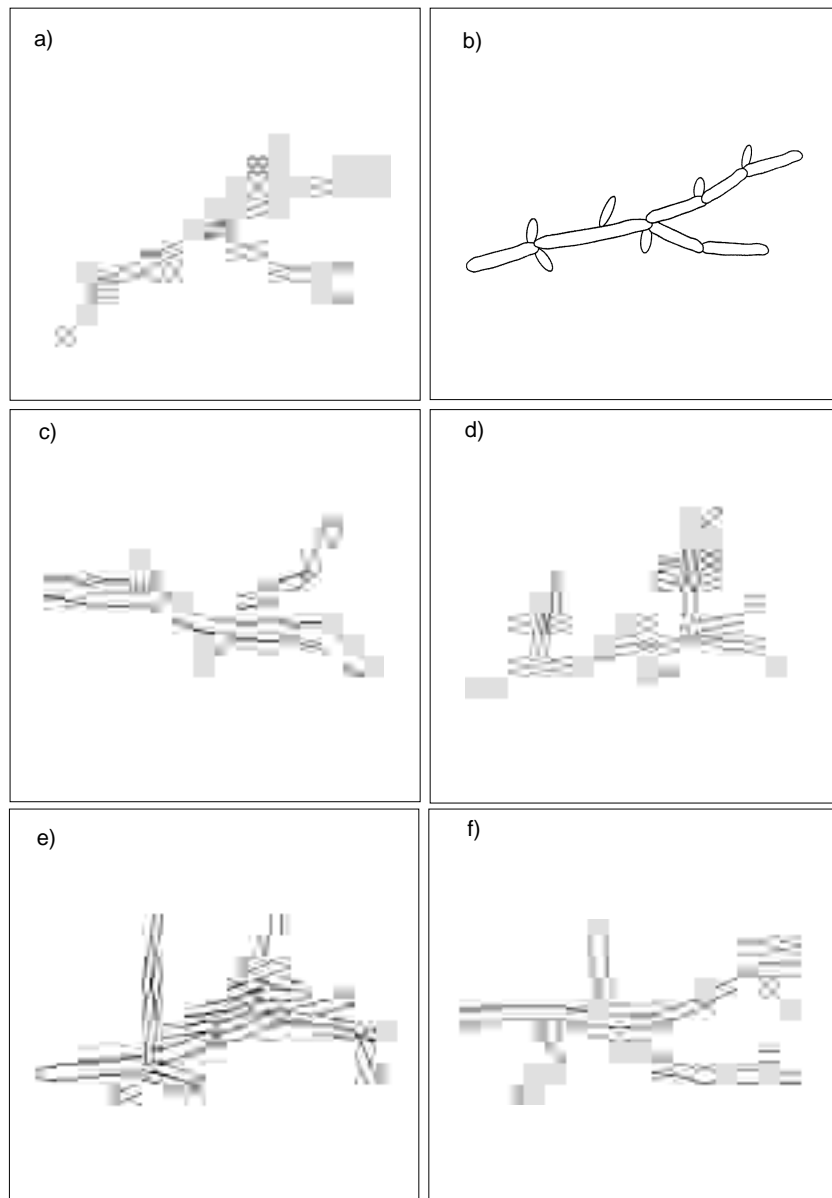


Figure 5a-f. Aspetti morfologici microscopici di: a) *C. albicans*, b) *C. tropicalis*, c) *C. parapsilosis*, d) *C. krusei*, e) *C. pseudotropicalis*, f) *Trichosporon* spp.



Figure 6-7. *C.albicans*: blastoconidi, pseudoife, clamidospore.



Figura 8. *C. tropicalis*.



Figura 9. *C.parapsilosis*.



Figura 10. *C.krusei*.



Figura 11. *C.pseudotropicalis*.



Figura 12. *T.beigeli*.



Figura 13. Arthroconidi e blastoconidi di *T.beigeli*.



Figura 14. *C. paratropicalis* (cellule giganti).



Figura 15. *S. cerevisiae*.



Figura 16. *C. neoformans* (colorazione di Gram).



Figura 17. Tubo germinativo di *C. albicans*.



Figura 18. Tubo germinativo di *C. tropicalis*.

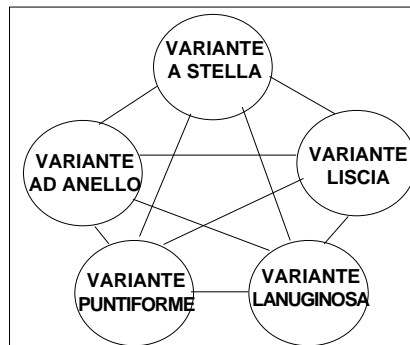


Figura 19. Variabilità fenotipica (switching) di *C. albicans* (Soll, 1992) (sempl.)

- transizione smooth-withe heavy-miceliated, in cui, sempre da una colonia e con una frequenza elevata, si sono ottenute colonie a margini dentellati, o raggiate, o di aspetto floreale, o decisamente tipo-micelio.

Di rilievo anche l'osservazione, che, nel corso della transizione bianco-opaca, compaiono cellule gemmanti allungate, a fagiolo, con poli smussati e si possono realizzare gemmazioni del tutto singolari, per forma e angolatura della cellula originatasi (Fig. 20)(79).

b) Proprietà biochimico-colturali

Lo studio di queste proprietà ha sempre rappresentato un mezzo particolarmente idoneo per pervenire all'identificazione di lieviti a livello di specie. Esso si basa su due sistemi identificativi: il primo, che comporta tempi da uno a più giorni e che può essere considerato "tradizionale", è rivolto a stabilire le capacità di assimilazione e/o fermentazione, per lo più di carboidrati, da parte del micete; l'altro, che comporta tempi assai più brevi e che non richiede la crescita del micete, utilizza la proprietà di quest'ultimo di agire su sorgenti di enzimi, di cui al viraggio del cromogeno, opportunamente aggiunto, in caso di positività. I saggi possono comportare l'impiego di provette, di capsule o di altri supporti, nonché, come è sempre più frequente in epoca attuale, l'uso di apparecchiature che comprendono sistemi di lettura computerizzata.

Test di assimilazione di composti di carbonio. Esso consente di stabilire la capacità del lievito di utilizzare il composto in presenza di ossigeno (Tav.25a-c). Allo scopo viene impiegato un terreno base contenente tutti i fattori di crescita ad eccezione di fonti di carbonio (Yeast-nitrogen-base), sterilizzato per filtrazione (pH $5,6 \pm 0,2$) e allestito in:

- provetta, con l'aggiunta di una soluzione sterile di carboidrato, insemato con il lievito in esame e controllo della torbidità entro 20 giorni rispetto al controllo senza carboidrato;

- piastra, con l'aggiunta di una sospensione del lievito in esame (10^7 - 10^8 cellule/ml) e di agar e verifica dell'attività enzimatica mediante dischi di carta bibula imbevuti di carboidrato. In particolare, 20 ml di Yeast-nitrogen base agarizzato vengono portati ad ebollizione e contemporaneamente viene allestita una sospensione della coltura di 24-72 ore in 4ml di acqua distillata (torbidità 4 McFarland). La sospensione viene aggiunta al terreno portato a 48° - 50° C. Dopo mescolamento, la mistura viene distribuita in piastra e, una volta

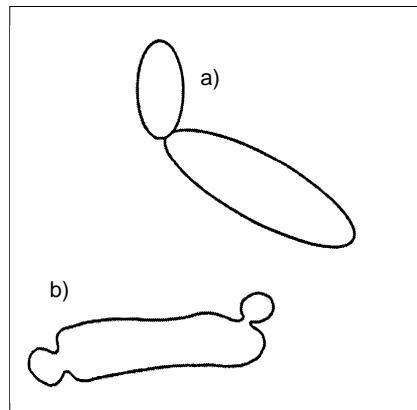


Figura 20. Gemmazioni atipiche nella transizione bianco-opaca.

raggiunta la solidificazione, vi si depositano dischi di carboidrati, attorno ai quali, in caso di positività, si realizza un alone di torbidità nel corso di un'incubazione di 24-48 ore a 25°-30°C. Non rivestono importanza la dimensione dell'alone e la densità di crescita del lievito (Fig.21).

Test di fermentazione di composti di carbonio. Praticato laddove esistono difficoltà interpretative con il test di assimilazione, esso stabilisce la capacità del lievito di utilizzare il carboidrato anaerobicamente (Tav. 26).

Allo scopo, viene impiegato un terreno base (neopeptone-agar-indicatore: pH 7,2) con l'aggiunta di singoli carboidrati, entro il quale, una volta distribuito in provette, viene seminato per infissione il lievito in esame. La superficie del terreno dovrebbe essere coperta con Vaspar (parti uguali di vaselina e paraffina); eguale risultato si dovrebbe ottenere con un tubo Durham, precedentemente sterilizzato e rovesciato sul terreno. Dopo incubazione a 30°C per 4-5 giorni, la lettura è basata sul viraggio di colore (assimilazione del carboidrato) e sullo sviluppo di gas (processo di fermentazione). I tubi vanno mantenuti a 30° per 10-14 giorni. Aggiunta di cellobiosio, oltre glucosio, maltosio, saccarosio, lattosio, trealosio, per *C.lusitaniae*. Da rilevare che tutti i carboidrati fermentati sono assimilati, mentre non tutti i carboidrati assimilati sono fermentati.

	GLU	MAL	SAC	LAC	XYL	TRE	DUL
<i>C.albicans</i>	+	+	+		+	+	
<i>C.stellatoidea</i>	+	+			+	+	
<i>C.tropicalis</i>	+	+	+		+	+	
<i>C.parapsilosis</i>	+	+	+		+	+	
<i>C.lusitaniae</i>	+	+	+		+	+	
<i>C.guilliermondii</i>	+	+	+		+	+	+
<i>C.pseudotropicalis</i>	+		+	+	+		
<i>C.krusei</i>	+						
<i>C.lipolytica</i>	+				+		
<i>C.zeylanoides</i>	+					+	

Tavola 25a. Test di assimilazione di composti di carbonio.

	GLU	LAL	SAC	LAC	XYL	TRE	DUL
<i>T.glabrata</i>	+					+	
<i>T.candida</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>T.incospicua</i>	+						
<i>T.maris</i>	+				+		
<i>C.albidus</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>C.neoformans</i>	+	+	+		+	+	+
<i>C.laurentii</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>C.terreus</i>	+	+		+		+	

Tavola 25b. Test di assimilazione di composti di carbonio.

	GLU	MAL	SAC	LAC	XYL	TRE
<i>Saccharomyces c.</i>	+	+	+			+
<i>Sporobolomyces</i>	+		+			+
<i>Hansenula h.</i>	+	+	+		+	+
<i>Trichosporon b.</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Rhodotorula r.</i>	+	+	+		+	+
<i>Malassezia p.</i>	+					
<i>Prototheca w.</i>	+					+

Tavola 25c. Test di assimilazione di composti di carbonio.



Figura 21. Test di assimilazione in piastra.

	GLU	MAL	SAC	LAC	GAL	TRE
<i>C.albicans</i>	+	+			+	+
<i>C.stellatoidea</i>	+	+				
<i>C.tropicalis</i>	+	+	+		+	+
<i>C.parapsilosis</i>	+				+	
<i>T.glabrata</i>	+					+
<i>C.guilliermondii</i>	+		+		+	+
<i>C.pseudotropicalis</i>	+		+	+	+	
<i>C.krusei</i>	+					
<i>C.famata</i>	+		+			+
<i>S.cerevisiae</i>	+	+	+		+	+

Tavola 26. Test di fermentazione.

Test di assimilazione di nitrato di potassio. Esso consente di evidenziare la capacità o meno dei lieviti di assimilare azoto. Il terreno utilizzato è Yeast-carbon-base, che contiene tutti i fattori di crescita per lieviti, ad eccezione di fonti di azoto. Sterilizzato mediante filtrazione, presenta un pH di $5,8 \pm 0,2$. Il test viene eseguito su piastra, mescolando ad una temperatura non superiore a 50°C . il

terreno base, una sospensione del lievito e agar. Dopo solidificazione, vengono deposti dischi con KNO_3 e dischi con $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ come controllo: in casi positivi, comparsa di aloni di crescita.

Attività ureasica. Questa attività viene evidenziata per la metabolizzazione dell'urea con produzione di ammonio, aumento del pH e viraggio dell'indicatore (rosso fenolo) presente nel terreno. Con il test convenzionale in provetta l'inoculo del lievito avviene su Christensen urea agar e il periodo di incubazione è della durata di 4 giorni a 25-30°C. Con il test rapido (0,2 ml di brodo-urea in piastra microtiter, inoculo di 3-4 colonie) è sufficiente un'incubazione di 4 ore a 37°C. per la lettura del viraggio. Il test è impiegato soprattutto per la diagnosi differenziale di miceti che producono artroconidi (*Trichosporon* positivo, *Geotrichum* negativo) e blastoconidi (*Cryptococcus* e *Rhodotorula* positivi, *Candida*, *Saccharomyces*, e *Torulopsis* negativi).

Attività fenolo-ossidasi. Essa evidenzia la capacità di *C.neoformans* di produrre fenolo ossidasi su un substrato contenente acido caffeico (Birdsee-agar). Su questo terreno, il lievito produce in 2-5 giorni colonie di colore nero-marrone.

Attività -glucosidasica. Essa si basa sull'utilizzazione di fluorofori per la dimostrazione di specifiche attività enzimatiche. Questi substrati, come 4-metil-umbelliferil-beta-D-glucoside (4-MUB), sono coniugati non fluorescenti di umbelliferone, che, a seguito di una specifica rottura enzimatica, liberano umbelliferone fluorescente rilevabile con lampada di Wood (366 nm). Tecnicamente, tubi con substrato 4-MUB sono preincubati a temperatura ambiente e a temperatura di 37°C., indi coltivati con una modesta sospensione di lievito. Lo sviluppo di una fluorescenza blu elettrico è da rilevarsi ogni 10', oppure può essere determinata con spettrofotometro. E' stato dimostrato che *C.parapsilosis* presenta una forte attività glucosidasica sia a temperatura ambiente che a 37°C., mentre altre Candide (*C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, *C.stellatoidea*) a temperatura ambiente non danno fluorescenza. E' stato anche osservato che 6-bromo-2-naftil-beta-D-glucopiranoside e beta-naftil-beta-D-glucopiranoside, di cui il primo impiegato nel sistema API-ZYM, non sono substrati efficienti per la dimostrazione di beta-glucosidasi, mentre p-nitrofenil-beta-D-glucopiranoside si presta per la ricerca di tale attività soprattutto con l'impiego di supernatanti di colture e di lisati protoplastici (70).

Attività -galattosaminidasica. Il suo rilievo comporta l'impiego di 4-metil-umbelliferil-N-acetil-galattosaminide, incorporato direttamente nel terreno o aggiunto successivamente (MUAG-Candi-reagent-kit). Tale substrato viene idrolizzato dall'enzima beta-galattosaminidasi di *C.albicans*, con liberazione di 4-metil-umbelliferone che in ambiente fortemente alcalino sviluppa fluorescenza azzurra evidenziabile con lampada di Wood.

API 20 C AUX (Bio Merieux). Introdotta verso la fine degli anni '70, questa galleria è costituita da 20 cupole che contengono substrati disidratati che permettono di effettuare 19 tests di assimilazione (Fig.22).

Le cupole vengono inoculate con una minima quantità di terreno semisolido e i lieviti si sviluppano solo se capaci di utilizzare il substrato. Incubazione per 48-72 ore a 30°C., lettura e confronto con controlli, identificazione mediante tabelle e programma. Questo sistema è stato frequentemente utilizzato per saggi comparativi.

ATB ID 32 C (Bio Merieux). La galleria è composta, in questo caso, da 32 cupole contenenti substrati di carbonio disidratati. Inoculate con un lievito sospeso in terreno semisolido e incubate per 24-48 ore a 30°C. , le gallerie vengono lette automaticamente con strumenti ATB o manualmente con lettura ed interpretazione diretta.

API YEAST IDENT SYSTEM (Analytab). E' stato il primo sistema commerciale che impiega substrati cromogeni per saggi di attività enzimatica. Esso consiste in una striscia di plastica contenente 20 microcupole, ciascuna delle quali contiene un substrato deidratato, o terreno nutritivo, o entrambi. Incubazione per 4 ore a 35°C e aggiunta, a determinate cupole di reagente cinnamaldeide con produzione di beta-naftilamide (colore rosa, rosso, porpora). Assegnazione di valori numerici ad ogni cupola con biocodice di 7 cifre. Il sistema è stato ritenuto non raccomandabile senza espansione di altri dati (78).

YBC-AMS (Yeast Biochemical Card-Vitek System). Esso è composto da 30 celle che contengono 26 tests convenzionali e quattro controlli negativi. Le Card vengono incubate per 24-48 ore a 30°C. con lettura automatica finale. Comparato con API 20 C mediante l'impiego di 398 stipti (9 generi e 26 specie), ha registrato solo 11 discrepanze e 97% di concordanza (22).

YIP (Baxter-Microscan-Yeast-Identification-Panel). Il sistema comprende 27 substrati disidratati. La positività è resa visibile mediante NaOH o con p-dimetilaminocinnamaldeide. Comparato con API 20 C ha presentato una concordanza del 92% (43).

CANDIFAST (Difco). Il sistema prevede identificazione dei principali lieviti e antimicogramma. Si avvale di un brodo contenente un indicatore di pH (rosso fenolo) il cui viraggio, a seguito dell'inoculo in galleria, esprime fermentazione del carboidrato presente nelle varie cupole. L'identificazione viene ottenuta valutando l'attività ureasica, la fermentazione di 7 carboidrati (Fig. 23) e l'eventuale resistenza all'acidione.

QUANTUM II YEAST IDENTIFICATION SYSTEM (Analybat). Consiste in una cartuccia di 20 camere, del perforatore di cartuccia e di un fotometro che misura il cambio colorimetrico di ogni camera. Il risultato biochimico, il numero di biocodice e l'informazione su tests addizionali sono automatici. Il sistema ha dato buoni risultati nell'identificazione di stipti poco comuni (69).

UNI-YEAST-TEK (Flow Laboratories). Si basa sull'impiego di 11 substrati e contemporaneamente di Corn-Meal-medium-Tween 80. Identificazione con biocodice.

PASTEUR YEAST SYSTEM (Pasteur). Sistema che prevede l'impiego di 7 cuvette contenenti substrati specifici che permettono l'identificazione dei principali lieviti di interesse clinico. Ad una prima incubazione di 3-4 ore che consente di determinare, attraverso sviluppo di tubi germinativi e attività ureasica, rispettivamente *C.albicans* e *C.neoformans*, segue una successiva incubazione di 18-24 ore per le altre reazioni (Fig. 24). A completamento e conferma dei risultati ottenuti, viene affiancato un test di assimilazione, in piastra, per 16 composti di carbonio con incubazione di 24-48 ore a 30°C. e successiva evidenziazione di aloni di crescita attorno alle pastiglie di carboidrati (Fig.21).

API ZYM (BioMerieux). Il sistema consente di rilevare la presenza di fosfatasi alcalina, esterasi, lipasi, leucina arilamidasi, valina arilamidasi, cistina arilamidasi, tripsina, chimotripsina, fosfatasi acida, naftol-fosfoidrolasi, -galattosidasi, -galattosidasi, -glucuronidasi,

N-acetil- -glucosaminidasi, -mannosidasi, -fucosidasi. Il sistema è stato ritenuto di scarso potere discriminante (37).

MYCOTUBE (Roche-Becton Dickinson). Mediante un contenitore a penna diviso in scomparti, 8 substrati vengono insemenzati simultaneamente. La lettura avviene dopo 24-48 ore di incubazione a 35°C. mediante decodifica di un codice numerico (Fig. 25). Il numero limitato di reazioni comporta, non di rado, l'impiego di tests aggiuntivi per la differenziazione di alcune specie.

c) Caratteristiche antigeniche e proprietà sierologiche

Nel 1961, sulla base di differenze antigeniche a livello di strutture di superficie, *C.albicans* venne suddivisa nei due sierogruppi A e B (32). Successivamente, mediante saggi di agglutinazione con adsorbimento crociato, fu possibile pervenire ad una formula antigenica



Figure 22-23-24-25. Sistemi commerciali.

relativa ai lieviti di maggiore interesse medico e proporre uno schema di identificazione di tali lieviti mediante un test di agglutinazione su vetrino. In epoca più recente, tale schema è stato sostituito a livello di alcuni fattori policlonali (5 e 6) e con la soppressione di altri (13b), ottenendo forti titoli di agglutinazione per *C.albicans*, *C.tropicalis* e per *T.glabrata*. E' stato inoltre accertato che il fattore antigenico 4, localizzato in superficie, sensibile all'azione del lisozima, comune ad alcune Candida (*C.albicans A e B*, *C.tropicalis*, *C.guilliermondii*) e non ad altre (*C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.pseudotropicalis*) si mantiene tale indipendentemente dal variare delle condizioni ambientali e dai processi di germinazione.

Un kit commerciale, denominato Candida Check (Jatron Laboratories) e costituito da 10 antisieri (1, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 13b), è stato da tempo proposto per l'identificazione dei lieviti di interesse clinico. Si tratta di saggi di agglutinazione su vetrino, cui si aggiunge il test di assimilazione del saccarosio per differenziare *C.albicans* da *C.stellatoidea* e il test di fermentazione del saccarosio per differenziare *C.albicans* da *C.tropicalis*. Comparato con Api 20 C, la corrispondenza dei risultati è stata in talune esperienze del 95% (85), in altre del 97,2% (3) (Tav.28).

Attualmente, oltre al test di agglutinazione in provetta di Hasenclever e Mitchell (32), che, con l'impiego di sieri originali (B311 anti-A e 207 anti-B), ha consentito interessanti rilievi epidemiologici in casi di immunosoppressione (7), e oltre al Candida Check, sono stati sperimentati saggi di agglutinazione su vetrino con l'impiego di anticorpi monoclonali (H9, IF6, AC3, CB6), ottenuti generalmente da topo. Tale impiego ha consentito di differenziare nettamente *C.albicans A* da *C.albicans B* e di confermare la prevalenza di *C.albicans B* in immunosoppressi rispetto agli immunocompetenti (6).

Sul piano tecnico, nel test di agglutinazione su vetrino si parte da brodocoltura di 24-48 ore in PYEG (peptone-yeast-extract-glucose): a 25 µl di essa (5×10^8 cellule/ml) si aggiunge una goccia di siero, si agita su rotore per 1-2' e si procede alla lettura. Comparazioni dei risultati ottenuti con l'impiego di sieri immuni corrispondenti ad antigeni diversamente allestiti sono state ritenute non valide. La sostituzione di anticorpi policlonali con anticorpi monoclonali è risultata infine vantaggiosa in saggi di identificazione sierologica mediante immunofluorescenza (75)

Specie	A	B
<i>C. albicans A</i>	1, 4, 5, 6	1, 4, 5b, 6
<i>C. albicans B</i>	1, 4, 5, 13b	1, 4, 5b
<i>C. tropicalis</i>	1, 4, 5, 6	1, 4, 5b, 6
<i>C. guilliermondii</i>	1, 4, 9	1, 4, 9
<i>C. krusei</i>	1, 5, 11	1, 11
<i>C. parapsilosis</i>	1, 5, 13, 13b	1, 13
<i>C. pseudotropicalis</i>	1, 8	1,8
<i>T. glabrata</i>	1, 4, 6, 34	1, 4, 6, 34

A= schema di Tsuchiya et al. (1965)
B= schema di Miyakawa et al. (1986)

Tavola 27. Formula antigenica di *Candida* spp. e di *T. glabrata*.

API 20C AUX	Fattori antigenici												N.	Candida Chek
	N.	1	4	5	6	8	9	11	13	13b	34	N.		
<i>C. albicans A</i>	55	+	+	+	+	-	-	-	V	V	-	-	52	<i>C. albicans A</i>
		+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	3	<i>C. albicans B</i>
<i>C. tropicalis</i>	14	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	14	<i>C. tropicalis</i>
<i>C. stellatoidea</i>	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1	<i>C. stellatoidea</i>
<i>C. pseudotropicalis</i>	4	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	4	<i>C. pseudotropicalis</i>
<i>C. parapsilosis</i>	7	+	-	V	-	-	-	-	+	+	-	-	4	<i>C. parapsilosis</i> *
<i>C. krusei</i>	7	+	-	V	-	-	-	+	-	-	-	-	7	<i>C. krusei</i>
<i>C. guilliermondii</i>	7	+	+	V	-	-	+	-	-	-	-	-	7	<i>C. guilliermondii</i> **
<i>C. lusitanae</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>C. inconspicua</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>S. cerevisiae</i>	8	-v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>T. beigelii</i>	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>T. glabrata</i>	18	+	+	V	+	-	-	-	-	-	-	+	18	<i>T. glabrata</i>

N.= numero di stipti; V= variabile;v= microagglutinazione (2 stipti)
*= mancata agglutinazione con 3 stipti
**= autoagglutinazione con 2 stipti, eliminata dopo 2 ore a 100°

Tavola 28. Identificazione biochimica (API 20C Aux) e sierologica (Candida Chek) di 128 stipti di lieviti isolati da materiali di provenienza umana. (Andreoni e Molinari, 1987).

Identificazione intraspecie

Nella diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti, la biotipizzazione intraspecie trova riscontro in una serie di esigenze clinico-epidemiologiche rivolte a definire:

- sorgente di infezione e vie di trasmissione;
- eventuale prevalenza e diffusione di determinati biotipi nelle forme invasive e sistemiche, nonché la loro persistenza in forme localizzate recidivanti;
- ruolo di biotipi in episodi epidemici soprattutto a livello intraospedaliero;
- correlazione tra biotipo e grado di virulenza.

L'argomento è stato trattato da Merz (53) in un'ampia rassegna, nella quale vengono distinti due sistemi di biotipizzazione: fenotipici e genotipici (Tav.29).

a) Tipizzazione fenotipica

Essa si basa su una serie di criteri classificati in: morfologico, biochimico, enzimatico, sierologico, nonché sul test resistogramma e sul sistema killer. Lo studio della variabilità proteica rientra in questo tipo di biotipizzazione.

1) Aspetti morfologici.

Si basano sul paragone di colonie ottenute dai più svariati materiali, da colture invecchiate e da ripetute sottocolture con la colonia classica dei lieviti, contraddistinta da forma rotondeggiante, ben rilevata, liscia, di colore biancastro, aspetto cremoso, margini regolari. Da 14 biotipi stabiliti in passato, si è pervenuti alla descrizione di parecchie decine di morfotipi, tra cui quelli isolati da infezioni gravi e mortali presenterebbero più frequentemente irregolarità nei margini (37). Del tutto recentemente, su Sabouraud-trifeniltetrazolio-agar sono stati differenziati 16 morfotipi di *C.albicans*, 6 di *C.parapsilosis*, 4 di *C.guilliermondii* e 12 di *C.tropicalis*, confermandosi tale terreno negativo per *T.glabrata* (Tav. 30)(Fig. Xa-c)(72).

Metodo	Rilievo di:	Tempo (giorni)	Apparecchiature speciali	Terreni Reattivi
Morfotipizzazione	Colonie (codice)	10	Nessuna	1 speciale
Resistogramma	Crescita/non crescita	3-4	Inoculatore multiplo	5 speciali
Biotipizzazione	Crescita/non crescita	8	Inoculatore multiplo	9 speciali
Assimilazione	Crescita/non crescita	3	Nessuna	Kits commerciali
Profilo enzimatico	Variazione di colore	1	Nessuna	Kits commerciali
Killer-sensibilità	Inibizione di crescita	2-3	Nessuna	Stipiti-killer
Immunoblotting	Profilo di bande	2	Elettroforesi	Na-dodecil-solfato
Profilo isoenzimatico	Profilo di bande	2	Elettroforesi	Reagenti, coloranti-enzimi
Cariotipizzazione	Profilo di bande	3-4	Elettroforesi	Reagenti DNA-estrazione
RFLP*	Profilo di bande	3	Elettroforesi	Endonucleasi-restrizione

*= Polimorfismo da enzimi di restrizione

Tavola 29. Caratteristiche dei metodi di biotipizzazione di *C.albicans*. Merz, 1990 (sempl.) (55).

1. Struttura	S = liscia R = rugosa
2. Colore	P = rosa P1 (rosa chiaro) P2 (rosa scuro) V = viola V1 (viola chiaro) V2 (viola scuro) O = arancio W = bianco
3. Alone miceliale (ife, pseudoife)	Y = presente N = assente NG = assenza di crescita

Tavola 30. Tipizzazione morfologica di *C. albicans* e altre *Candide* codice numerico a 3 cifre ().

2) Profilo biochimico.

2a) *Biotipizzazione*. Nel 1980 è stato proposto un sistema di biotipizzazione basato sull'impiego di 9 substrati, ciascuno distribuito in capsula Petri, con la conseguenza, in teoria, di potere differenziare ben 512 biotipi (65). In questo sistema vengono impiegati inoculi di 10^5 - 10^6 cellule/ml e a ciascun risultato positivo corrisponde un valore numerico, la cui somma è da rapportarsi ad un codice a tre cifre. Uno sviluppo del metodo, elaborato dagli stessi autori, ha previsto l'inserimento di tests aggiuntivi (Tav. 31)

Biotipizzazioni di *C. albicans* sono state praticate con una certa frequenza in casi di vaginite sostenuta da questo lievito (63,66). E' emersa una serie di dati che hanno deposto per le seguenti possibilità:

- *C. albicans* può essere differenziata in numerosi biotipi di cui 7 sono stati isolati in circa la metà dei casi esaminati;
- ogni soggetto sarebbe portatore di un proprio biotipo, presente, inoltre, nelle forme recidivanti anche a distanza di vari mesi;
- presenza dello stesso biotipo in partners;
- il tratto intestinale rappresenta il serbatoio naturale più comune;
- esisterebbe una diversità tra biotipi isolati in casi di vaginite e biotipi isolati in soggetti senza manifestazioni cliniche, in ogni caso senza alcuna correlazione con il grado di resistenza agli antimicotici.

Tests primari	Tests aggiuntivi
pH 1.40 Produzione proteinasi Resistenza a 5 fluorocitosina Assimilazione urea Assimilazione sorbosio Assimilazione citrato Assimilazione glicina Tolleranza NaCl Resistenza safranina	pH 1.55* Resistenza sali di tetrazolio Resistenza periodato di sodio Resistenza ceftrime Resistenza ac.borico**
*test di screening per <i>C. albicans</i> ** in sostituzione del test di assimilazione glicina	

Tavola 31. Biotipizzazione di *C. albicans* e altre *Candide* .

Contemporaneamente, in altre indagini svolte soprattutto nei confronti di soggetti ospedalizzati, è stata prospettata l'esistenza di "stipiti ospedalieri" stante la frequenza del loro isolamento (60), mentre, sul piano tecnico, è stato dimostrato che questo sistema di biotipizzazione è ottimo per quanto riguarda la riproducibilità intralaboratorio, al contrario della concordanza interlaboratorio (67).

2b) Prove di assimilazione. Si basano sull'impiego di API 20C o, più recentemente, di ID32C che, con le loro prove di assimilazione di composti del carbonio, consentono di individuare un notevole numero di pattern di assimilazione. L'elevato numero di biotipi evidenziabili e la difficoltà di interpretazione di alcuni tests (soglia di crescita/non crescita) ne limita l'impiego come sistema di tipizzazione.

3c) Profilo enzimatico. Si basa sull'impiego del sistema API ZYM con i suoi 19 enzimi idrolitici, associato o meno all'API 20C AUX. In alcune indagini è stato osservato che taluni substrati (valina, leucina e cistina-arilamidasi, alfa-glucosidasi, N-acetil-beta-glucosaminidasi) agiscono da veri e propri discriminanti, mentre in altre è stata confermata la possibilità che in soggetti virus-immunodeficienti prevalga la presenza di biotipi dominanti.

4) Profilo sierologico.

Si basa sulla differenza dei sierotipi A e B di *C.albicans*, di cui ad una serie notevole di anticorpi policlonali e monoclonali verso antigeni di superficie.

5) Resistogramma.

Esprime la capacità o meno di lieviti di resistere all'azione di composti organici, o inorganici, o entrambi. Nelle prime osservazioni furono impiegati sei composti (verde di malachite, acido borico, sodio arsenato, solfato di rame, acrilamide, 4-clorosorcinolo) e fu stabilito che molti pazienti albergano stipiti con il medesimo resistogramma, così come fu rilevato in casi di vaginite recidivante e in infezioni, sempre da *C.albicans*, tra partners. Più tardi, vennero scelti altri composti, testati però a 4 concentrazioni diverse (sodio selenito, acido borico, cetrimide, sodio periodato, nitrato d'argento), da cui teoricamente 32 potenziali resistogrammi. In altre esperienze, al resistogramma viene aggiunta la ricerca di altre proprietà (proteinasì, lipasi, sensibilità alla 5-fluorocitosina) e recentemente è stato proposto un resistogramma (Microring YT), i cui composti (verde Janus,

bromuro di etidio, trifeniltetrazolio cloruro, verde brillante, cicloeximide, roda-mina 6G) sono confezionati e contenuti in un unico disco (84). Da varie osservazioni, in ogni caso, emerge la possibilità di pervenire alla individuazione di biotipi più frequentemente correlati con talune infezioni, anche se il metodo, sia pure di agevole applicazione, comporta ulteriori precisazioni ai fini di una sua soddisfacente riproducibilità (36).

6) Sistema killer.

Tossine di lieviti, come le batteriolisine, sono risultate in grado di uccidere altri lieviti, ma non lo stipite produttore. L'impiego di questi lieviti "killer" si traduce in una biotipizzazione di *C. albicans* (Tav. 32) espressa da alcune decine di biotipi. Il sistema è stato ritenuto valido, di agevole esecuzione, necessitando comunque una standardizzazione per la sua diffusione (55).

7) Variabilità proteica.

Mediante gel-elettroforesi-bidimensionale, sodio-dodecil-solfato-poliacrilamide-gel elettroforesi e immunoblotting sono stati posti in evidenza, in *C. albicans*, 168 antigeni citoplasmatici, 40 profili proteici nel sierotipo A e 31 profili proteici nel sierotipo B. Di rilievo il risultato che, su 16 distinti biotipi differenziati in 190 stipiti di *C. albicans*, un singolo biotipo sia stato identificato tra stipiti isolati da pazienti nel corso di una epidemia di candidosi sistemica in una unità ospedaliera di terapia intensiva (45). Lo studio del profilo proteico è ritenuto valido per la tipizzazione degli stipiti, ferme restando lunghezza del procedimento e la richiesta di speciali attrezzature.

Killer	Stipiti N.	Biotipi	Autore
<i>Torulopsis, Cryptococcus</i>	120	0	Kandel e Stern, 1979
<i>Hansenula, Pichia</i>	100	25	Polonelli et al., 1983
<i>Hansenula, Pichia</i>	100	27	Caprilli et al., 1985
<i>Candida, Saccharomyces, Pichia, Torulopsis, Hansenula</i>	80	33	Lehmann et al., 1987

Tavola 32. Tipizzazione di *C. albicans* mediante sistema killer.

b) Biotipizzazione genotipica

Diversificazioni intraspecie tali da consentire una biotipizzazione genotipica sono state ottenute a seguito della separazione di DNA-molecole di grandezza cromosomica (cariotipi) mediante elettroforesi in campo elettrico pulsante (55, 83). Con questa tecnica, al polimorfismo del cromosoma corrisponderebbero differenze nel numero di bande e i profili della loro mobilità. Ugualmente, una biotipizzazione genotipica è risultata rendersi possibile ponendo in evidenza variazioni nella struttura di frammenti di DNA ottenuti con endonucleasi (DNA-polimorfismo da enzimi di restrizione) o con processi di DNA-DNA ibridazione.

1) Cariotipi elettroforetici.

Mediante gel-elettroforesi, di cui alle sigle OFAGE (orthogonal-field-alternation-gel-electrophoresis), PFGE (pulsed-field-gradient-electrophoresis), CHEF (counter-clamped-homogenous-electric-field-electrophoresis), RFGE (routing-field-gel-electrophoresis) e TAGE (transverse-alternating-field-electrophoresis), è stato possibile stabilire che *C.albicans* possiede un minimo di 6-7 cromosomi, di grandezza variabile e in grado ciascuno di ibridizzare con un certo numero di DNA-probes (Tav.33)(48). Contemporaneamente, è stato osservato che *S.cerevisiae* possiede 16 cromosomi, portatori di 568 geni (58), mentre in *C.stellatoidea*, che presenta un forte grado di identità genetica con *C.albicans*, sarebbero presenti, oltre ai 7, altri 5 piccoli cromosomi, probabilmente derivati dal più grande cromosoma L (76).

Cromosoma	Grandezza (kb)	DNA-probes
L	3000	10
2	2500	7
3	2000	4
4	1800	1
5	1500	2
6	1300	2
7	1200	3

Tavola 33. Genoma cromosomiale di *C. albicans* FC 18 (Magee et al., 1988).

Sempre con questa metodica, il numero dei profili cariotipici, basato sull'ampiezza della migrazione espressa da gruppi di bande, è risultato poter variare anche sensibilmente, consentendo comunque di pervenire a talune valutazioni di carattere tassonomico, diagnostico e clinico-epidemiologico. Kwon-Chung et al. (42), dopo aver prospettato la possibilità di un rapporto tra cariotipo e virulenza, distinguono due tipi di *C.stellatoidea*: il primo (tipo II) presenta sette bande di DNA e un profilo simile a quello di *C.albicans A*, il secondo (tipo I), presenta 8-9 bande e un profilo simile a quello di *C.albicans B*. Mahrous et al. (49), comparando *C.albicans* tipiche con altre atipiche (assenza di tubi germinativi e di attività proteasiche, saccarosio-negatività, bassa virulenza per il topo), rilevano nelle prime la presenza di 7 bande, nelle seconde di 5-10 bande. Suzuki et al. (89), procedendo ad una comparazione tra biotipizzazione su base morfologica e biotipizzazione su base genotipica, rivelano in colonie contrassegnate dalla dissociazione bianco-opaca la comparsa di piccoli cromosomi, costituiti in parte da sequenze derivate dal ceppo originale e probabile espressione di un riarrangiamento cromosomico. Merz et al. (54), in 34 stipiti di *C.albicans* isolati da 17 pazienti, rilevano 14 distinti cariotipi elettroforetici e fanno osservare che 10 di 12 pazienti sono colonizzati da un solo biotipo, così come gli stipiti isolati dal sangue presentano lo stesso profilo di quelli isolati dalle zone colonizzate. Kauffmann e Merz (41), in 86 stipiti di *T.glabrata* isolati da 33 pazienti, pongono in evidenza 22 profili cariotipici: in 19 casi, lo stesso cariotipo viene isolato da sangue, urina ed essudato, mentre profili diversi sono rilevati negli altri casi per quanto si riferisce a stipiti isolati da disparate sedi anatomiche, oppure in tempi distanziati. Carruba et al. (10), stimano da 5 a 8 il numero di cromosomi in *C.parapsilosis* e di 16 stipiti isolati da materiale di provenienza umana (sangue, essudato vaginale) e dal suolo propongono la suddivisione in 7 classi.

In conclusione, secondo Merz (53), la cariotipizzazione elettroforetica offre sufficienti variazioni per delineare stipiti diversi.

Le sue limitazioni sono rappresentate dalla necessità di una strutturazione specializzata, dal lungo tempo di osservazione (minimo 3 giorni), nonché da altre esigenze tecniche.

2) Polimorfismo da enzimi di restrizione.

Un altro metodo di biotipizzazione genotipica è quello rivolto alla dimostrazione di variazioni nella struttura del DNA o polimorfismo da enzimi di restrizione. In sintesi, DNA estratto dal lievito viene ridotto

in frammenti da specifici enzimi e tali frammenti vengono separati mediante gel-elettroforesi in base alla grandezza molecolare: il gel con etidio bromuro e le bande sono visualizzate mediante luce UV. Con questo metodo, che si contraddistingue per stabilità e riproducibilità, in *C.albicans* sono state evidenziate 4 bande intense, di cui due polimorfiche (6-7, 2.5-3 kd) e due dimorfiche (3.7 o 4.5 kd) distribuite in 10 sottogruppi in base al loro profilo elettroforetico. In *C.tropicalis* sono stati evidenziati 5 sottogruppi, 2 e 1 in *C.parapsilosis*, 1 in *C.krusei* e *C.pseudotropicalis* (80). In indagini successive, nel corso delle quali sono stati distinti 29 biotipi in stipiti di *C.albicans*, è stato ritenuto, in base ai risultati, che stipiti isolati da ambienti ospedalieri sono assai polimorfi, che soggetti con candidosi con isolamento di più stipiti hanno lo stesso tipo individuale, così come lo hanno coppie di partners (81).

3) Ibridizzazione DNA-DNA.

Il metodo prevede la dimostrazione, mediante DNA-ibridazione con sonde specifiche, di un polimorfismo a livello di frammenti di DNA ottenuti con enzimi di restrizione. Dalle indagini in proposito, condotte con sempre maggiore frequenza in questi ultimi anni, è possibile una breve sintesi per lo meno su alcuni punti:

- a) esistono sonde, come quelle contenenti il gene actina di *C.albicans*, che non si prestano a biotipizzazione, in quanto ibridizzano il DNA di specie diverse di *Candida* e che, pertanto possono servire in senso specie-specificità;
- b) enzimi di restrizione per DNA mitocondriale (HaeIII, Taq1) si presterebbero meglio allo scopo rispetto a endonucleasi per DNA totale (EcoR1, PvuII, ecc.);
- c) esistono enzimi di restrizione (Msp1) che, nel processo di digestione del DNA totale di *C.albicans*, formano multipli frammenti con sequenze altamente ripetitive (18). Sonde con queste sequenze ripetitive (Ca3 e 27A per *C.albicans*, CT 13.5 per *C.tropicalis*) sono risultate stabili durante il periodo di moltiplicazione cellulare e anche dopo fenomeni di conversione (79).

Mediante il metodo di ibridizzazione DNA-DNA con sonde specifiche non sono mancati risultati assai dimostrativi. E' stato visto, ad esempio, che, nell'ambito di 63 pazienti, ben 60 erano portatori di *C.albicans* ciascuna con proprio profilo, senza diversità in rapporto alla sede di isolamento (25). Nel corso di indagini rivolte a stabilire

identità o diversità tra stipti di *C.albicans* e di *T.glabrata* isolati in processi di colonizzazione, nel corso di fungemia e dall'ambiente ospedaliero, viene confermato uno stesso DNA-profilo in ogni singolo paziente e nel 94 % dei casi, mentre viene contemporaneamente prospettata un'origine endogena dell'infezione (74). In altre indagini, si dimostra che stipti isolati da differenti sedi corporee di un individuo sano possono presentare lo stesso profilo o profili diversi, che da lesioni orali di partners vengono isolati gli stessi biotipi e che la forte omogeneità degli stipti isolati da soggetti immunocompromessi ospedalizzati da 2-5 mesi depone per la loro origine ospedaliera (82). Infine, sulla base di risultati ottenuti a seguito di indagini a livello di sedi diverse di donne sane, si conclude per una disomogeneità di profili di *C.albicans*, prospettandosi la possibilità che ogni stipte si adatti a sedi anatomiche diverse e che, in individui sani, ogni sede sia in grado di svolgere uno specifico processo di selezione (89).

In conclusione, per quanto riguarda la biotipizzazione genotipica dei lieviti e, in particolare quella basata sul polimorfismo da enzimi di restrizione e DNA-DNA ibridazione, è stato ritenuto che tale sistema sia relativamente semplice, altamente discriminante, altamente riproducibile e con esecuzione in tempi clinicamente validi. Contemporaneamente, in tema di svantaggi, è stato fatto osservare che non pochi problemi tecnici sono legati alla stessa elettroforesi con possibile alterazione dei profili, mentre gli enzimi di restrizione scelti non sempre possono rilevare differenze tra gli stipti. A ciò si aggiunga che è ancora sconosciuto tipo e numero di enzimi con i quali operare la migliore discriminazione, rendendosi inoltre indispensabile una standardizzazione dei metodi.

Risposta immunitaria e saggi sierologici

La risposta immunitaria nelle infezioni da lieviti si può configurare con aspetti diversi a seconda del quadro morboso, del distretto corporeo coinvolto e della specie di lievito in causa. Nelle forme invasive e sistemiche, che colpiscono di preferenza soggetti granulocitopenici, sono proprio i granulociti neutrofili che, attraverso la produzione di mieloperossidasi, attiva verso il micete, assumono un ruolo difensivo di primaria importanza (12). Nell'evoluzione di questa forma morbosa è stata considerata la possibilità che una proteina

citoplasmatica e non granulata, liberata a seguito della lisi del granulocita, sia in grado di inibire lo sviluppo di *C.albicans* senza determinarne la morte (86). Nella candidosi muco-cutanea cronica, per la quale è stato posto anche il quesito se essa si manifesta in quanto l'organismo è immunocompromesso (64), oppure se è la stessa *C.albicans* a favorire uno stato di immunosoppressione (Tav. 34) (63), il deficit di reattività cellulo-mediata, di cui ad una serie di tests in vitro e in vivo, risulterebbe manifesto nei monociti e nei T-linfociti, non disgiunto dalla induzione di prostaglandine e dalla attivazione di citochine ad opera del mannano o dei suoi metaboliti (61). Nella criptococcosi, la prima difesa a livello polmonare, si esprime attraverso il coinvolgimento di T-linfociti e di macrofagi alveolari. Le cellule NK (natural killer), che nel topo contribuiscono alla difesa legandosi mediante microvilli alla capsula e al cell-wall del lievito, intervengono nell'uomo solo in presenza di anticorpi, mentre polinucleati neutrofili e monociti sono risultati poter agire anche senza tale presenza (56).

Naturalmente, nell'ambito della risposta immunitaria nelle infezioni da *C.albicans*, ai processi di immunità cellulo-mediata si affiancano, in misura più o meno intensa, quelli di immunità umorale, cui spetterebbe il compito di collaborare con i primi mediante processi di opsonizzazione. Nella criptococcosi, in particolare, la fagocitosi, ad opera di polinucleati neutrofili e monociti, sarebbe promossa dal complemento, attivato attraverso la via alternativa.

La diagnostica sierologica delle candidosi invasive si basa sulla ricerca di anticorpi specifici e sulla dimostrazione di antigeni solubili, associata, talvolta, a quella di metaboliti circolanti. Nel primo caso, che per lungo tempo ha visto l'impiego di antigeni scarsamente caratterizzati e non sufficientemente standardizzati ai fini di precise comparazioni, il riscontro di anticorpi specifici, anche a titoli elevati, non sempre si è prestato ad agevoli interpretazioni di carattere clinico-diagnostico (Tav. 35).

Ancora recentemente, infatti, è stata posta in discussione l'importanza diagnostica di tale ricerca (39). Nel secondo caso, che dovrebbe prevedere una espressività antigenica costante, il risultato deve tener conto, invece, della transitorietà e della irregolarità dell'antigenemia (92). Il cell-wall, infatti, non è antigenicamente costante: esso è una struttura dinamica con caratteristiche antigeniche che variano in rapporto alle condizioni di crescita e all'età delle cellule. Lo stesso può valere per gli antigeni dei tubi germinativi e di ife, ritenute, queste strutture, responsabili di invasività tessutale, anche se non è

Reattività cutanea ad antigeni di Candida
Proliferazione linfocitaria Candida dipendente
Produzione di MIF (migration inhibitory factor)
Attività killing dei linfociti
Determinazione del livello di anticorpi nel siero
Determinazione del livello di autoanticorpi

Tavola 34. Tests di immunità cellulare nella candidosi mucocutanea cronica (Nelson, 1991).

Presenza di anticorpi anti-mannano anche a titoli elevati in individui normali o colonizzati senza manifestazioni cliniche
Presenza di anticorpi a titoli assai bassi in immunocompromessi
Presenza di anticorpi espressione di "cicatrice sierologica" da pregressa infezione
Possibilità di reazioni crociate per correlazioni antigeniche

Tavola 35. Difficoltà interpretative del risultato sierologico.

stato stabilito se antigeni fase specifici rappresentino la sintesi di nuove proteine o un riarrangiamento topologico di antigeni da una sede profonda ad una superficiale del cell-wall. Per quanto riguarda quest'ultima importante struttura, essa si identifica, in *C. albicans*, in una complessa glicoproteina, costituita da catene esterne di mannosio-fosfato e da un core, in cui i polimeri di mannosio sono legati tra di loro e, mediante N-acetil-D-glucosamina, alla asparagina del polipeptide. Altre unità mannosio sono legate alla catena polimerica, così come oligomeri sono legati a serina e treonina del polipeptide (Fig. 26-27) (8).

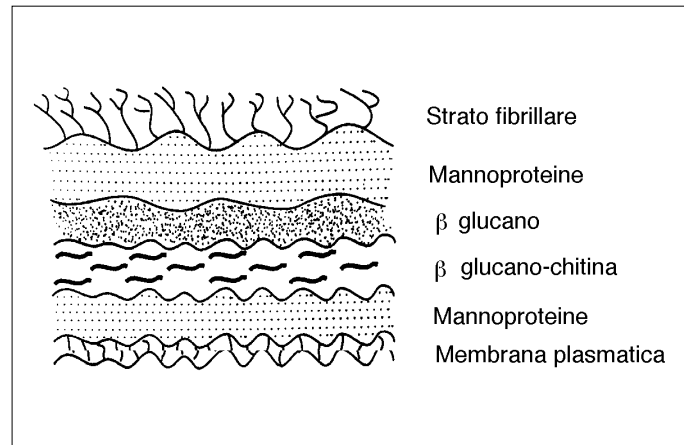


Figura 26. Diagramma schematico della parete di *C.albicans*.

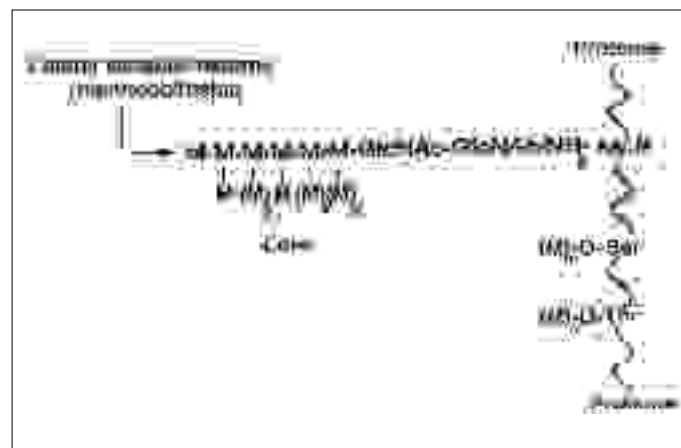


Figura 27. Mannano-proteine di *C.albicans*.

1) Ricerca di anticorpi specifici

Essa si serve di antigeni somatici o cellulari, di antigeni metabolici e di estratti citoplasmatici, nonché di antigeni rappresentati da mannano del cell-wall (CWM). I metodi di determinazione vanno da immunoprecipitazione, immunofluorescenza indiretta ed emoaagglutinazione indiretta contro estratti antigenici variamente caratterizzati, a sistemi ELISA e RIA contro antigeni specifici.

a) *Immunoprecipitazione*. Questa tecnica su gel di agar o acetato di cellulosa consente di visualizzare linee o bande o archi di precipitazione che si formano allorchè avviene il contatto tra antigeni e anticorpi specifici presenti nel siero. Il test ha valore diagnostico in base alla presenza o meno di più bande, nonché valore prognostico basato sulla persistenza o scomparsa di tali bande. Il limite è rappresentato da possibili reazioni crociate, fermo restando però il vantaggio che con un buon antigene di *C.albicans* possono essere diagnosticate anche forme di candidosi sostenute da altre specie (38).

Le tecniche di immunoprecipitazione sono a loro volta rappresentate da doppia immunodiffusione secondo il classico metodo di Outchterlony, dove la lettura si effettua dopo tre giorni di diffusione a temperatura ambiente, immunoelettroforesi, basata sulla migrazione in un primo tempo degli estratti antigenici e in un secondo tempo su quella di anticorpi con lettura delle linee di precipitazione dopo 4 giorni e coelettrosinnesi, dove si realizza una migrazione simultanea, su membrana di cellulosa in campo elettrico, di gamma globuline verso il catodo e di antigene verso l'anodo. In questo caso, si ha sviluppo della reazione antigene-anticorpo in modo accelerato, tenendo presente che la distanza della linea di precipitazione dal punto di deposizione del siero e l'intensità della linea stessa aumentano proporzionalmente alla concentrazione anticorpale. Nell'allestimento della reazione è previsto naturalmente l'impiego di siero di controllo per rilevare da un lato reazioni aspecifiche o reazioni crociate, dall'altro, reazioni di coalescenza, ossia di identità immunologica della linea del siero di controllo con quella del siero in esame. La reazione è da considerarsi positiva in presenza di coalescenza delle linee di precipitazione.

b) *Immunofluorescenza indiretta*. Nel test, anticorpi specifici presenti nel siero (IgG,IgM) si legano all'antigene rappresentato da sospensioni di lievito fissate su vetrini e vengono resi evidenti al microscopio a fluorescenza con aggiunta di un antisiero appropriato (globulina antiumana marcata con fluorescina isotiocianato)(Fig.XI).

Il test evidenzia più anticorpi sia di tipo IgG che di tipo IgM e per-tanto titoli elevati (> 1:160) possono comparire tardivamente, soprattutto per indicare una conversione sierologica.

c) *Emoagglutinazione passiva*. Si tratta di una reazione rapida, in cui diluizioni di siero vengono poste a contatto con emazie sensibilizzate con estratto antigenico di *C.albicans*. Il test, la cui soglia significativa è stata valutata a 1:320, presenta una maggiore sensibilità per il rilievo delle IgM.

d) *ELISA - RIA*. L'impiego di questi due metodi ha consentito di stabilire che anticorpi anti-mannano (anti-CWM) sono diffusamente e ubiquitariamente presenti in una definita popolazione con titoli che si distribuiscono attorno ad un valore medio. In soggetti con candidosi invasiva, tale titolo si presenta generalmente più elevato con uno spostamento del valore medio verso l'alto.

2) Ricerca di antigeni solubili

La ricerca di antigeni solubili circolanti presenta indubbi vantaggi nella diagnostica delle candidosi invasive e sistemiche, fermi restando i presupposti che: I) gli antigeni rilasciati in vivo non differiscono sostanzialmente da quelli usati per preparare l'antisiero diagnostico; II) siano ben definiti e caratterizzati quegli antigeni che sono specifici per le forme ifali di crescita. Accertato, infatti, che antigeni solubili circolanti possono essere rappresentati da mannano, il maggiore polisaccaride di superficie di *C.albicans*, da proteine di superficie, da proteine citoplasmatiche, da glicoproteine termolabili e da metaboliti, è sempre stata evidente la problematica relativa all'allestimento di sieri le cui immunoglobuline (anticorpi monoclonali) presentassero la più alta specificità verso strutture e prodotti del lievito soprattutto nella sua fase germinativa. Al riguardo, una serie non indifferente di indagini sperimentali ha consentito di pervenire a risultati di notevole interesse per le loro proiezioni in campo diagnostico. In alcune di esse è stato rilevato che:

- durante la formazione di tubi germinativi, numerosi nuovi componenti, per quanto riguarda natura chimica, funzione e antigenicità, sono espressi alla superficie della parete (13). Inoltre, l'espressione antigenica può variare in rapporto al tempo di incubazione, al mezzo di coltura e al sierotipo per cui i tests sierologici possono avere solo valore presuntivo (7);

- anticorpi monoclonali ottenuti con partigeni di *C.albicans* possono reagire con talune specie di Candida e non con altre (15), così come antigeni monoclonali, attivi verso antigeni di superficie, possono reagire con lo strato interno del cell-wall, con la membrana cellulare e con le proteine del citoplasma (68);

- manno-proteine non sono un componente passivo del cell-wall, ma, al contrario, hanno un ruolo morfogenetico nella modulazione della organizzazione dei costituenti del cell-wall, nonché nella modulazione di risposte immunitarie;

- da IgG1, classe MAb, è stato ottenuto il frammento Fab in grado di reagire con l'antigene espresso da tubi germinativi e da ife di *C.albicans* e di inibire la formazione degli stessi tubi germinativi (11);

- diversamente da altri miceti, *C.albicans* e altre specie, tranne *C.krusei*, posseggono beta-legami a livello del mannano simili a quelli trovati nell'antigene 6,7 di Salmonelle di gruppo C1 (62);

- è possibile costruire un antigene, unendo oligosaccaridi ad un lipide, in grado di dare risposte immunologiche che equivalgono a quelle provocate da antigeni naturali di *C.albicans* (23).

Nelle infezioni sistemiche da *C.albicans* possono concorrere alla diagnosi la ricerca nel siero dell'antigene polisaccaridico (test di agglutinazione al lattice: Pastorex Candida, Pasteur), di antigeni citoplasmatici (Immunoassay: Directigen, Becton-Dickinson), di antigeni non precisati (test di agglutinazione al lattice: Cand-Tec, Medical System) e di mannano (ELISA, RIA). In tali infezioni, è stata proposta anche la ricerca di metaboliti nel siero e di antigeni nell'urina. La ricerca di antigeni è stata contemplata anche in casi di candidosi vaginale.

a) *Test al lattice* (Cand-Tec). Le particelle al lattice, sensibilizzate con siero di coniglio immunizzato per via intramuscolare con blastoconidi uccisi al calore, reagiscono con antigeni sino ad un titolo significativo di agglutinazione di 1:8. Secondo Jones (38), il test può esprimere la presenza di un neoantigene che ha richiesto l'intervento di cellule dell'ospite prima di essere liberato, oppure di materiale prodotto dall'ospite durante l'infezione e rilevato da anticorpi stimolati nel coniglio dal lievito ucciso con il calore. In ogni caso, in forme di candidosi invasiva, la specificità è risultata piuttosto elevata, mentre la sensibilità si è espressa in un "range" di valori assai ampio. E' stato inoltre osservato che la positività del test si accompagna ad un

elevato titolo di creatinina e che, in alcuni casi, questo titolo aumenta con il persistere della positività del test.

b) Test al lattice (Pastorex Candida). Le particelle al lattice sono rivestite da anticorpi monoclonali anti-mannano e reagiscono con l'antigene polisaccaridico dando una agglutinazione ben visibile. Il siero viene pretrattato a 100°C., indi filtrato per dissociare eventuali immunocomplessi ed evitare reazioni aspecifiche. Il test è risultato altamente specifico e frequentemente positivo in casi in cui non erano stati posti in evidenza anticorpi specifici. La negatività del test non esclude inoltre una candidosi diffusa stante la possibilità di antigenemie transitorie, eventualità, che, tuttavia, può essere attenuata praticando ripetuti controlli in ogni singolo caso (34).

c) Ricerca di antigeni citoplasmatici (Directigen) L'antigene è un enzima glicolitico, posto in evidenza, tra 18 componenti antigenici separati mediante elettroforesi, in elevata percentuale in casi di candidosi invasiva. Nella reazione, anticorpi monoclonali, inseriti su membrana, sono in grado di immobilizzare eventuali antigeni presenti nel siero fatto scorrere sulla membrana stessa. Si aggiungono poi IgG specifiche di coniglio che, legandosi all'antigene intrappolato, aumentano il numero di siti reattivi e, successivamente, anti-anticorpi di coniglio coniugati con particelle liposomiche colorate in modo da evidenziare la positività della reazione, che si realizza in pochi minuti. Il test, che consente la determinazione qualitativa di antigeni citoplasmatici di più specie di Candida (*C.albicans A e B, C.tropicalis, C.parapsilosis, C.guilliermondii, C.krusei, C.kefir, C.stellatoidea*) non presenta reazioni crociate con *C.neoformans* e *T.glabrata*.

d) ELISA - RIA. La ricerca di antigeni nel siero (mannano) con il metodo RIA si è risolta in alcune esperienze con conferma di candidosi invasiva nel 47-55% dei casi esaminati (39). Una maggiore frequenza di positività è risultata con il metodo ELISA, la ricerca di antigene *C.albicans*-mannano risultando positiva anche in forme sostenute da *C.tropicalis* e quella di antigene *C.krusei*-mannano, anche in forme sostenute da *C.parapsilosis* e da *C.guilliermondii* (27).

e) Ricerca di metaboliti. Mannoso e arabinitolo sono metaboliti di *Candida spp.* che possono essere rilevati nel siero mediante gas-

cromatografia o mediante metodo enzimatico fluorimetrico. Premesso che questi metaboliti sono presenti nel siero di soggetti sani, il loro titolo è risultato poter aumentare, oltrechè nel diabete e nel corso di trattamento con antibiotici, anche in infezioni disseminate da *C.albicans*. Di rilievo il dato, che, in questi ultimi casi, oltre all'aumento dei due metaboliti, è stato registrato anche un aumento del rapporto arabinolo-creatinina, in quanto, risultando arabinolo con caratteristiche simili a creatinina a livello di filtrazione renale, l'aumento dei tassi serici di quest'ultimo possono essere legati a deficit renali.

f) *Ricerca di antigeni nell'urina.* E' stato previsto l'impiego di anticorpi di coniglio indotti da estratto citoplasmatico di *C.albicans*. Mediante Western-blotting, antigenuria è stata posta in evidenza in quasi tutti i soggetti con candidosi disseminata, salvo nel caso in cui la terapia con amfotericina aveva avuto una durata superiore ai 5 giorni (24).

g) *Ricerca di antigeni in essudati vaginali* (Biocard Candida). Particelle al lattice sono rivestite con anticorpi anti-Candida e poste a contatto, su vetrino, con essudato vaginale diluito. In caso di positività, si verifica una agglutinazione colorata in blu di agevole valutazione.

Nelle infezioni da *C.neoformans*, la diagnostica sierologica di laboratorio si basa sulla ricerca nel siero e nel liquor dell'antigene rappresentato dal polisaccaride capsulare. Il test, usato da tempo, è quello di agglutinazione al lattice su vetrino, in cui, particelle al lattice, sensibilizzate con immunoglobuline specifiche di coniglio, reagiscono con l'antigene capsulare. Vari trattamenti sono stati proposti per eliminare false positività causate dal fattore reumatoide e da altri fattori, tra cui l'impiego di pronasi. Più tardi si è visto che questa sostanza elimina il fenomeno della prozona, ma, soprattutto, che, se essa è aggiunta in eguale volume ai campioni (siero, liquor), induce un forte aumento del titolo, pari in media da 1:45 a 1:588 (Tav.36)(31).

Considerata, infine, la possibilità in AIDS di positività ad alti titoli per mancata eliminazione dell'antigene capsulare, sono stati preparati anticorpi monoclonali verso antigene citoplasmatico, in grado di riconoscere, mediante immunofluorescenza, antigeni di stipiti capsulati e non capsulati (52).

		Reciproco del titolo dopo trattamento con pronasi															
		neg	N.D.	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384
16384																	**
8192																***	**
4096	*														**	***	**
2048	***													****	****		*
1024	***							**		*		***	****	****	o *		
512	***						*	*	*	*	*	o	****	****	o		
256	**					*	***	**	*	o	o						
128	***	*			*	**	**		o	o	o						
64	**	*	*	*	*	**	**	o	o	o							
32	***	*	*	*	*		o	o	o	o							
16	**					*	o										
8	*					oo	ooo	o									
4	*					o											
2																	
N.D.																	
neg																	

Reciproco del titolo prima del trattamento con pronasi

Tavola 36. Confronto tra titolo antigenico criptococcico di 97 campioni di siero (*) e 42 campioni di liquor (°) testati con kit Meridian prima e dopo trattamento con pronasi. Hamilton et al. (1991) (semp.).

Individuazione dei fattori di virulenza

E' stato fatto presente che, diversamente dagli organismi batterici e ad eccezione del polisaccaride di parete di *C.neoformans*, i lieviti non risulterebbero possedere specifici requisiti di patogenicità (79). Le stesse tossine di *C.albicans*, in grado, come le endotossine batteriche, di svolgere un'azione pirogenica e letale e di indurre in animali uno stato di shock anafilattico, non sarebbero comunque paragonabili alle prime per intensità e potenza. Tutto ciò non ha escluso il fatto che talune specie, in particolare *C.albicans*, siano in possesso di determinati fattori di virulenza (adesine, recettori del complemento, enzimi) che depongano per una intrinseca patogenicità di tali organismi (29).

Quale organismo commensale, *C.albicans* è in grado di svolgere un'azione invasiva allorchè si modificano gli aspetti immunologici dell'ospite. In questo caso, i fattori di virulenza entrerebbero in attività attraverso un susseguirsi di eventi, progressivamente condizionati da quanto rimane delle capacità reattivali dell'organismo ospite. In altri termini, nella patogenesi dell'infezione si è voluto sottolineare che:

- il cell-wall del lievito è indispensabile affinché il micete eserciti con successo la sua virulenza, in quanto è tale struttura che stabilisce il contatto tra micete e ospite;
- recettori di superficie, attraverso una serie di legami, promuovono la colonizzazione dei tessuti;
- un enzima proteolitico, allorchè si realizza la conversione da blastoconidio a forma filamentosa, diventa responsabile dell'invasione tessutale;
- La reazione micete ospite è estremamente complessa, stante appunto il possibile susseguirsi di fenomeni di conversione;
- La risposta dell'ospite è parimenti complessa, stante l'estrarsi di processi di immunità cellulo-mediata e umorale;
- Variazioni fenotipiche del lievito possono comportare variazioni nella sua adesività e nelle sue proprietà antigeniche.

1) Adesività

Le indagini sull'adesività di *C.albicans* hanno avuto inizio nei primi anni dell'80 e si sono continuate negli anni successivi con una serie innumerevole di risultati, tali comunque da consentire alcune fondamentali precisazioni sui rapporti tra questo lievito da un lato e cellule epiteliali, cellule endoteliali, corneociti, fibrina, substrati plastici dall'altro. Come è stato recentemente sintetizzato da Calderone e Braun (8), da tutta questa serie di indagini è emerso che:

- esiste una gerarchia tra Candide, di cui talune, come *C.albicans* e *C.tropicalis*, aderiscono in vitro a vari tipi di cellule con una estensione anche assai maggiore di altre, come *C.krusei* e *C.guilliermondii*;
- l'ambiente colturale, in particolare il tipo di carboidrato presente in esso, condiziona marcatamente il grado di adesività di *C.albicans*, mentre taluni carboidrati, come galattoso, possono aumentare l'adesività di talune specie (*C.albicans*, *C.tropicalis*) e non di altre (*C.stellatoidea*, *C.parapsilosis*, *C.pseudotropicalis*, *C.guilliermondii*);
- stipti che hanno perso le proprietà adesive non presentano più virulenza nei confronti di animali di laboratorio;
- l'adesività in vitro è correlata con la produzione in superficie di uno strato flocculo-fibrillare con un significato simile a quello di adesine batteriche. Questo strato di materiale extracellulare polimerico, costituito da carboidrati, proteine, fosforo, glucosamina è stipte specifico, è prodotto in presenza di forti concentrazioni di esosi, può essere isolato nel supernatante di colture, reagisce con concavallina A e rosso rutenio e produce aderenza anche verso sostanze acriliche. Se impiegato come materiale estraneo, esso impedisce l'adesione del micete a cellule epiteliali della bocca e della vagina.
- l'adesività è risultata maggiore con stipti isolati in casi di infezioni in atto, mentre stipti isolati da portatori asintomatici non avrebbero la capacità di aumentare la loro adesività in risposta ad alte concentrazioni di carboidrati;
- per quanto si riferisce ai recettori di membrana delle cellule ospiti si ritiene che essi siano rappresentati da glicosidi contenenti L-fucoso, oppure N-acetil-glucosamina: pertanto, per interpretare il meccanismo d'azione delle adesine di *C.albicans* sono state chiamate in causa proteine di superficie, tipo lecitina, in grado di riconoscere L-fucoso di glicoproteine di membrana, nonché altre particolari proteine, di cui una capace di legarsi al complemento (26);

- le forme filamentose del lievito aderiscono molto più intensamente ai vari substrati rispetto alle clamidospore. La superficie dei tubuli germinativi ha inoltre strutture che si legano alla fibronectina, larga glicoproteina presente in forma solubile nel siero e in forma insolubile nella membrana cellulare e alla laminina, il maggiore componente della membrana basale (4);

- cellule dei vari tessuti possono presentarsi diversamente ai processi di adesività (17).

Nei saggi rivolti alla biotipizzazione di stipiti in rapporto al loro grado di adesività, volumi uguali di lievito (cellule ottenute da colture su Sabouraud-dextrose-agar e su Yeast-nitrogen-agar, lavate e portate alla concentrazione di 10^7) e di cellule (epiteliali della guancia, vaginali, ecc.) sono posti a contatto per due ore, filtrate e trasferite su vetrino dove vengono colorate con cristalvioletto. La percentuale di aderenza è determinata dal numero di cellule cui sono adese più di 10 elementi fungini su un totale di 100 cellule.

2) Recettori del complemento

Un prodotto del complemento (iC3b) è in grado di legarsi a recettori (CR3, CR4) di cellule fagocitarie (polinucleati neutrofili, macrofagi, monociti, cellule NK) mediando il processo di endocitosi di svariati microrganismi (Tav. 37)(Fig.28a).

Recentemente è stato dimostrato che *C.albicans* presenta sulla sua superficie analoghi recettori per iC3b (catene alfa) e che l'interazione è più marcata in presenza di elevate concentrazioni di glucosio (30, 34). E' stato anche osservato che tale interazione non si realizza con mutanti di *C.albicans* capaci di sfuggire all'azione di antisieri specifici (95). Queste proprietà da parte del lievito sono risultate potersi prestare ad una duplice valutazione. Da un lato, tenuto conto che le integrine CR3 e CR4 mediano l'adesione cellulare a matrici extracellulari (fibronectina, laminina, collagene), a *C.albicans* sono state riconosciute le medesime proprietà adesive a superfici epiteliali ed endoteliali. D'altro canto, una volta dimostrato che la fagocitosi di un organismo opsonizzato dal complemento dipende dalla deposizione covalente dei frammenti di C3 e che il legame di iC3b con gli analoghi CR3 e CR4 di *C.albicans* è risultato non covalente, in quest'ultimo caso, in pratica, il consumo del complemento si accompagnerebbe ad una inibizione della fagocitosi (Fig.28b) (34).

Recettore del complemento	Cellula portatrice	Azione
recettore tipo 1 (CR1)	leucocita, eritrocita macrofago, podocita	fagocitosi, degradazione complessi immuni
recettore tipo 2 (CR2)	linfocita B	risposta anticorpale
recettore tipo 3 (CR3)	leucocita, macrofago monocita, natural killer	fagocitosi, adesività, chemiotassi, diapedesi
recettore tipo 4 (CR4)	leucocita, macrofago, monocita, natural killer	fagocitosi, adesività, chemiotassi, diapedesi

Tavola 37. Recettori complementari C3 di cellule umane.

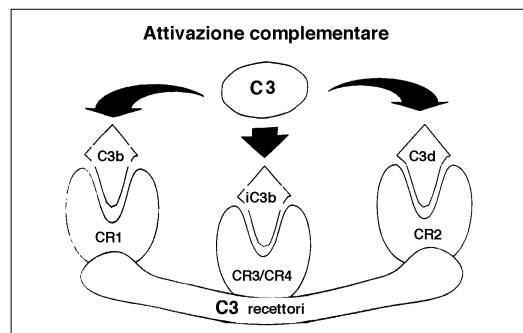


Figura 28a. Attivazione complementare: legame di frammenti C3 attivati a specifici recettori cellulari (CR1-CR2-CR3-CR4).

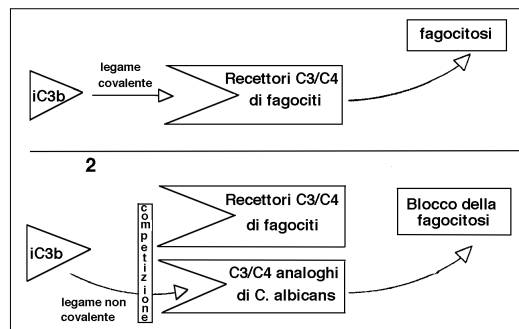


Figura 28b. Intervento di recettori C3/C4 analoghi di C.albicans nell'inibizione della fagocitosi.

3) Enzimi: fosfolipasi e proteinasi

Dei 14 enzimi idrolitici descritti in *C.albicans*, solo due sono stati considerati alla stregua di fattori di virulenza: fosfolipasi e proteinasi. Il primo, correlato con la mortalità nel topo e con l'adesività all'epitelio del cavo orale, è stato riscontrato più frequentemente in stipiti isolati mediante emocoltura, oppure correlati con gravi infezioni. Le ricerche su questo enzima e sulle diverse proprietà fosfolipasiche sono peraltro tuttora assai scarse per attribuirne un significato preciso di fattore di virulenza.

Per quanto riguarda la proteinasi, specificatamente attiva a pH acido (3.5 - 4.5) nei confronti di albumina, emoglobina, caseina, IgA1 e IgA2 (catene pesanti), questo enzima extracellulare è risultato essere prodotto da *C.albicans*, *C.stellatoidea* e *C.tropicalis* in misura superiore a quella evidenziata in *C.parapsilosis* e *C.guilliermondii*, mentre non sarebbe prodotta da altre specie di Candida (*C.krusei*) (73). Riscontrata nel fluido vaginale in casi di candidosi vulvovaginale in concentrazione significativamente più elevata che in forme asintomatiche (14,19), nonché in casi di vaginite correlata etiologicamente con *C.parapsilosis* (20), la proteinasi acida è ritenuta un importante fattore di virulenza, in grado anche di provocare la formazione di anticorpi specifici. Mutanti sprovvisti del gene che codifica per questa proteina o di geni che concorrono a questa proprietà, sono risultati più facilmente fagocitati dai leucociti e sperimentalmente meno adatti alla colonizzazione vaginale in animali.

Sul piano tecnico, la proteinasi acida può essere ricercata su agar-caseina o agar-albumina (pH 4.5) con il rilievo di aloni chiari attorno alle colonie dopo l'azione di acido tricloroacetico: oltre ad albumina bovina e caseina, sono stati impiegati vantaggiosamente emoglobina, cheratina bovina, collagene (73).



Figure I-II. Colorazione di Gram: blastoconidi e pseudoife di *C.albicans*



Figura III. PAS: blastoconidi di *Candida* spp.



Figura IV. GMS: blastoconidi di *Candida* spp.

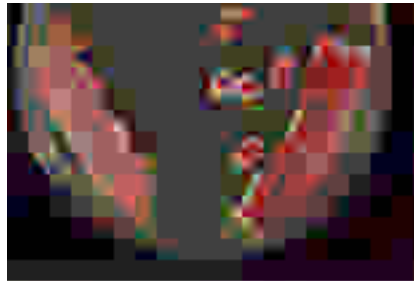


Figura V-VI. Terreno di Pagano-Levin: colonie di lieviti del genere *Candida*.



Figura VII. Switching di *C.albicans*: variante liscia e variante "ifale".



Figura VIII. Switching di *C.albicans*: variante liscia e variante puntiforme.

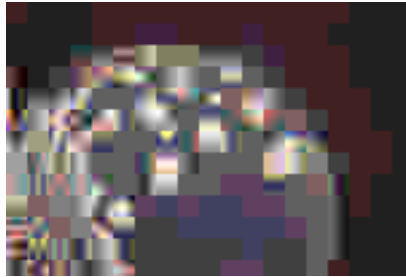


Figura IX. Switching di C.albicans: variante liscia e variante "a medusa".

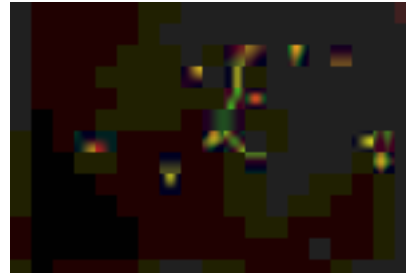


Figura XI. Immunofluorescenza indiretta: ricerca anticorpi anti-Candida.

Bibliografia

- 1) Anaissie E.J., Bodey G.P., Rinaldi M.G. "Emerging fungal pathogens" Eur. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8-323/330-1989
- 2) Andreoni S. "Genere Candida in materiali patologici" Microbiologia Medica 6-82/83-1991
- 3) Andreoni S., Molinari G.L. "Identificazione sierologica (Yatron Serological Candida Chek Kit) di Candida spp. Microbiologia Medica 2-181/183-1987
- 4) Bouchara J.P., Tronchin G., Annaix V., Robert R., Senet J.M. "Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes " Infect. Immun. 58-48/54-1990
- 5) Brawner D.L., Anderson G.L., Yuen K.Y. "Serotype prevalence of *Candida albicans* from blood cultures isolates" J. Clin. Microbiol. 30-149/153-1992
- 6) Brawner D.L., Cutler J.E. "Oral *Candida albicans* isolates from nonhospitalized normal carriers, immunocompetent hospitalized patients, and immunocompromised patients with or without acquired immunodeficiency syndrome" J. Clin. Microbiol. 27-1335/1341-1989
- 7) Brawner D.L., Cutler J.E., Beatty W.L. "Caveats in the investigation of from- specific molecules of *Candida albicans*" Infect. Immun. 58-378/383-1990
- 8) Calderone R.A., Braun P.C. "Adherence and receptor relationship of *Candida albicans*" Microbiol. Rev. 55-1/20-1991
- 9) Caprilli F., Prignano G., Latella C., Tavarozzi S. "Amplification of the killer system for differentiation of *Candida albicans*" Mikosen 28-569/573-1985
- 10) Carruba G., Pontieri E., De Bernardis F., Martino P., Cassone A. "DNA fringerprinting and electrophoretic karyotype of environmental and clinical isolates of *Candida parapsilosis*" J.Clin.Microbiol. 29-916/922-1991
- 11) Casanova M., Martinez J.P., Chaffin W.L. "Fab fragments from a monoclonal antibody against germ tube mannoprotein block

- the yeast-to-mycelium transition in *Candida albicans*" Infect.Immun. 58-3810/3812-1990
- 12) Cassone A. "Candida e candidosi" Federazione Medica 38-1018/1030-1985
 - 13) Cassone A. "Cell wall of *Candida albicans*: its functions and its impact on the host" Curr. Top. Med. Mycol. 3-248/314-1989
 - 14) Cassone A., De Bernardis F., Mondello F., Ceddia T., Agatensi L. "Evidence for correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis" J. Infect.Dis. 156-777/783-1987
 - 15) Cassone A., Torosantucci A., Boccanero M., Pellegrini G., Palma C., Malavasi F. "Production and characterization of a monoclonal antibody to a cell-surface glucomanno-protein constituent of a *Candida albicans* and other pathogenic *Candida* species" J. Clin.Microbiol. 27-233/238-1988
 - 16) Cooper B.H., Silva-Hutner M. "Yeast of medical importance" in Lennette H., Balows A., Hausler V.I., Shadomy H.J., "Manual of Clinical Microbiology" Vol. 4 Am.Soc.Microbiol. Washington D.C., 1985
 - 17) Cutler J.E., Brawner D.L., Hazen K.C., Jutila M.A. "Characteristics of *Candida albicans* adherence to mouse tissues" Infect.Immun. 58-1902/1908-1990
 - 18) Cutler J.E., Glee P.M., Horn H.L. "*Candida albicans* and *Candida stellatoidea*-specific DNA fragment" J.Clin.Microbiol. 26-1720/1724-1988
 - 19) De Bernardis F., Agatensi L., Ross I.K., Emerson G.W., Lorenzini R., Sullivan P.A., Cassone A. "Evidence for a role for secreted aspartate proteinase of *Candida albicans* in vulvovaginal candidiasis" J.Infect.Dis. 161-1276/1283-1990
 - 20) De Bernardis F., Lorenzini R., Verticchio R., Agatensi L., Cassone A. "Isolation, acid proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida parapsilosis* from outpatients with vaginitis" J.Clin.Microbiol. 27-2598/2603-1989
 - 21) Dixon D.M., Fromtling R.A. "Morphology, taxonomy and classification of fungi" in Wentworth "Diagnostic procedures for micotic and parasitic infections" Am. Publ. Health Ass., Inc. Washington D.C., 1988
 - 22) El-Zaatari M., Pasarell L., Mc Ginnis M.R., Buckner J., Land

- G.A., Salkin I.F. "Evaluation of the updated Vitek yeast identification data base" J. Clin. Microbiol. 28-1938/1941-1990
- 23) Faille C., Michalski J.C., Strecker G., Mackenzie D.W.R., Camus D., Poulain D. "Immunoreactivity of neoglycolipids constructed from oligomannosidic residues of the *Candida albicans* cell wall" Infect. Immun. 58-3537/3544-1990
- 24) Ferreira R.P., Yu B., Niki Y., Armstrong D. "Detection of *Candida* antigenuria in disseminated candidiasis by immunoblotting" J. Clin. Microbiol. 28-1075/1078-1990
- 25) Fox B.C., Mobley H.L.T., Wade J.C. "The use of DNA probe for epidemiological studies of candidiasis in immunocompromised hosts" J. Infect. Dis. 159-488/494-1989
- 26) Fukayama M., Calderone R.A. "Adherence of cell surface mutants of *Candida albicans* to buccal epithelial cells and analyses of the cell surface proteins of the mutants" Infect. Immun. 59-1341/1345-1991
- 27) Fujita S.I., Hashimoto T. "Detection of serum *Candida* antigens by enzyme-linked immunosorbent assay and a latex agglutination test with anti-*Candida albicans* and anti-*Candida krusei* antibodies" J. Clin. Microbiol. 30-3132/3137-1992
- 28) Gargani G., Azzi A. "Attualità in tema di criptococcosi" Microbiologia Medica 1-81/86-1986
- 29) Gargani G., Faggi E., Casadei B., Martelli L. "I fattori patogenetici dei funghi" Microbiologia Medica 6-23/25-1991
- 30) Gilmore B.J., Retsinas M., Lorenz J.S., Hostetter M.K. "An iC3b receptor on *Candida albicans*: structure, function and correlates for pathogenicity" J. Infect. Dis. 157-38/46-1988
- 31) Hamilton A.R., Noble A., Denning D.W., Stevens D.A. "Performance of Cryptococcus antigen latex agglutination kits on serum and cerebral fluid specimens of AIDS patients before and after praziquantel treatment" J. Clin. Microbiol. 29-333/339-1991
- 32) Hasenclever H.F., Mitchell W.O. "Antigenic studies of *Candida*. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*" J. Bacteriol. 82-570/573-1961
- 33) Herent P., Stynen D., Hernando F., Fruit J., Poulain D. "Retrospective evaluation of two latex agglutination tests for

- detection of circulating antigens during invasive candidosis"
J.Clin.Microbiol. 30-2158/2164-1992
- 34) Hostetter M.K. "Complement receptors in *Candida albicans*"
Clinic.Immunol.Newletter 11-1/5-1991
 - 35) Huahua T.,Rudy J.,Kunin C.M. "Effect of hydrgen peroxide on
growth of Candida, Cryptococcus, and other yeasts in simulated
blood culture bottles" J.Clin.Microbiol. 29-328/332-1991
 - 36) Hunter P.R.,Fraser C. "Use of modified resistogram from
cases of vaginitis and from faeces in same geographical area"
J. Clin.Pathol. 40-1159/1161-1987
 - 37) Hunter P.R.,Fraser C.A.M. "Application of a numerical index of
discriminatory power to a comparison of four physiochemical
typing methods for *Candida albicans*" J.Clin.Microbiol. 27-
2156/2160-1989
 - 38) Jones J.M."Laboratory diagnosis of invasive candidiasis"
Clin.Microbiol.Rev. 3-32/45-1990
 - 39) Jungkind D.,Millan J.,Allen S.,Dyke J.,Hill E. "Clinical
comparison of a new automated infrared blood culture system
with the BACTEC 460 System" J.Clin.Microbiol. 23-262/266-
1986
 - 40) Kandel J.S.,Stern T.A. "Killer phenomenon in pathogenic
yeast" Antimicrob. Agents Chemother. 15-568/571-1979
 - 41) Kaufmann C.S.,Merz W.G. "Electrophoretic karyotypes of
Torulopsis glabrata" J.Clin.Microbiol. 27-2165/2168-1989
 - 42) Kwong-Chung K.J.,Riggsby W.S.,Uphoff R.A.,Hicks
J.B.,Whelan W.L., Reiss E.,Magee B.B.,Wickes B.L. "Genetic
differences between type I and type II *Candida stellatoidea*"
Infect.Immun. 57-527/532-1989
 - 43) Land G.A.,Salkin I.F.,El-Zaatari M.,McGinnis M.R.,Hashem
G. "Evaluation of the Baxter-MicroScan 4-hour enzyme-based
yeast identification system" J.Clin.Microbiol. 29-718/722-1991
 - 44) Larone D.H. "Medically important fungi. A guide to identification"
Elsevier-New York, 1987
 - 45) Lee W.,Burnie J.,Matthews R. "Fingerprinting *Candida albicans*"
J.Immunol.Methods 93-177/182-1986
 - 46) Lehmann P.F.,Cowan L.E.,Jones R.M.,Ferencak W.J. "Use of
killer fungi and antifungal chemicals in characterization of

- yeast species and biotypes" *Trans.Brit.Mycol.Soc.* 88-199/
206-1987
- 47) Lodder J., Kreger-VanRij N.J.W. "The yeast" North Holland
Publ.-Amsterdam, 1952
- 48) Magee B.B., Koltin Y., Gorman J.A., Magee P.T. "Assignment
of cloned genes to the seven electrophoretically separated
Candida albicans chromosomes" *Mol.Biol.Cell.* 8-4721/4726-
1988
- 49) Mahrous M., Lott T.J., Meyer A., Sawant A.D., Ahearn D.G.
"Electrophoretic karyotyping of typical and atypical *Candida*
albicans" *J.Clin.Microbiol.* 28-876/881-1990
- 50) Mazzoni A., Nanetti A. "Gli agenti fungini" *Microbiologia Medica*
5-38/41-1990
- 51) McGinnis M.R. "Laboratory handbook of medical micology"
Acad.Press New York, 1980
- 52) Melcher G.P., Reed K.D., Rinaldi M.G., Lee J.W., Pizzo
P.A., Walsh T.J. "Demonstration of a cell wall antigen cross-
reacting with cryptococcal polysaccharide in experimental
disseminated trychospronosis" *J.Clin.Microbiol.* 29-192/196-
1991
- 53) Merz W.G. "*Candida albicans* strain delineation" *Clin.*
Microbiol.Rev. 3-321/334-1990
- 54) Merz W.G., Karp J.E., Schron D., Saral L. "Increased incidence
of fungemia caused by *Candida krusei*" *J.Clin.Microbiol.* 24-
581/584-1986
- 55) Merz W.G., Connely C., Hieter P. "Variation of electrophoretic
karyotypes among *Candida albicans*" *J.Clin.Microbiol.* 26-
842/845-1988
- 56) Miller M.F., Mitchell T.G. "Killing of *Cryptococcus neoformans*
strains by human neutrophils and monocytes" *Infect.Immun.*
59-24/28-1991
- 57) Miyakawa Y., Kagaya K., Fukazawa Y., Soe G. "Production and
charecterization of agglutinating monoclonal antibodies against
predominant antigenic factors for *Candida albicans*" *J. Clin.*
Microbiol. 23-881/886-1986
- 58) Mortimer R.K., Schild D. "Genetic map of *Saccharomyces*
cerevisiae. Edition" *Microbiol.Rev.* 49-181/212-1985

- 59) Munoz P., De Quiros B., Berenguer J., Creixems M.R., Picazo J.J., Bouza E. "Impact of the BACTEC NR system in detecting *Candida fungemia*" J.Clin.Microbiol. 28-639/641-1990
- 60) Neely A.N., Odds F.C., Basatia B.K., Holder I.A. "Characterization of *Candida* isolates from pediatric burn patients" J.Clin.Microbiol 26-1645/1649-1988
- 61) Nelson R.D., Shibata N., Podzorski R.P., Herron M.J. "*Candida* mannan: chemistry, suppression of cell-mediated immunity, and a possible mechanisms of action" Clin.Microbiol.Rev. 4-1/19-1991
- 62) Nnalue N.A., Weintraub A., Lindberg A.A. "Properties of a rat monoclonal antibody reactive with both the mannan of *Candida species* and the O-antigen 6,7 polysaccharide of serogroup C1 *Salmonellae*" Infect.Immun. 59-229/233-1991
- 63) O'Connor M.I., Sobel J.D. "Epidemiology of recurrent vulvovaginal candidiasis: identification and strain differentiation of *Candida albicans*" J.Infect.Dis. 154-358/363-1986
- 64) Odds F.C. "*Candida* and candidosis" 2nd Ed.Bailliere Tindall-London, 1988
- 65) Odds F.C., Abbott A.B. "A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species" Sabouraudia 18-301/317-1980
- 66) Odds F.C., Abbott A.B., Reed T.A.G., Wilmott F.E. "*Candida albicans* strain types from the genitalia of patients with and without *Candida* infection" Eur.J.Obstet. Gynecol.Reprod.Biol. 15-37/43-1983
- 67) Odds F.C., Auger P., Krogh P., Neely A.N., Segal E. "Biotyping of *Candida albicans*: results of an international collaborative survey" J.Clin.Microbiol. 27-1506/1509-1989
- 68) Ollert M.W., Calderone R.A. "A monoclonal that defines a surface antigen on *Candida albicans* hyphae cross-reacts with yeast cell protoplasts" Infect.Immun. 58-625/631-1990
- 69) Pfaller M.A., Preston T., Bale M., Koontz F.P., Body B.A. "Comparison of the Quantum II, API yeast Ident., and Auto-Microbic systems for identification of clinical yeast isolates" J. Clin.Microbiol. 26-2054/2058-1988

- 70) Polacheck I., Melamed M., Bercovier H., Salkin I.F. "Beta-glucosidase in *Candida albicans* and its applications in yeast identification" *J.Clin.Microbiol.* 25-907/910-1987
- 71) Polonelli L., Archibusacci C., Sestiti M., Morace G. "Killer system: a simple method differentiating *Candida albicans* strains" *J. Clin.Microbiol.* 17-774/780-1983
- 72) Quindos G., Fernandez-Rodriguez M., Burgos A., Tellaetxe M., Cisterna R., Ponton J. "Colony morphotype on Sabouraud-triphenyltetrazolium agar: a simple and inexpensive method for *Candida* subspecies discrimination" *J.Clin.Microbiol.* 30-2748/2752-1992
- 73) Ray T.L., Payne C.D. "Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures" *Infect.Immun.* 58-508/514-1990
- 74) Reagan D.R., Pfaller M.A., Hollis R.J., Wenzel R.P. "Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe" *J. Clin.Microbiol.* 28-2733/2738-1990
- 75) Reiss E., De Repentigny L., Kuykendall R.J., Carter A.W., Galindo R., Auger P., Bragg S.L., Kaufman L. "Monoclonal antibodies against *Candida tropicalis* mannan: antigen detection by enzyme immunoassay and immunofluorescence" *J. Clin. Microbiol.* 24-796/802-1986
- 76) Rikkerink E.H., Magee B.B., Magee P.T. "Opaque-withe phenotype transition: a programmed morphological transition in *Candida albicans*" *J.Bacteriol.* 170-895/899-1988
- 77) Roberts G.D., Goodman N.L., Land G.A., Larsh H.V., McGinnis M.R. "Detection and recovery of fungi in clinical specimens" in Lennette H., Balows A., Hausler W.I., Shadomy H.J. "Manual of clinical microbiology" Vol. 4 Am.Soc.Microbiol. Washington D.C., 1985
- 78) Salkin I.F., Land G.A., Hurd N.I., Goldson P.R., McGinnis M.R. "Evaluation of Yeast Ident and Uni-Yeast-Tek yeast identification systems" *J. Clin. Microbiol.* 25-624/627-1987
- 79) Scherer S., Magee P.T. " Genetics of *Candida albicans*" *Microbiol.Rev.* 54-226/241-1990

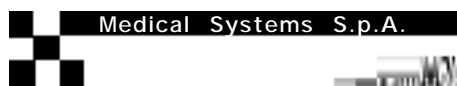
- 80) Scherer S.,Stevens D.A. "Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida species*" J.Clin.Microbiol. 25-675/679-1987
- 81) Scherer S.,Stevens D.A. "A *Candida albicans* dispersed, repeated gene family and its epidemiologic applications" Proc. Natl. Acad.Sci. USA 85-1452/1456-1988
- 82) Schmid J.,Voss E.,Soll D.R., "Computer-assisted methods for assessing strain relatedness in *Candida albicans* by fringerprinting with the moderately repetitive sequence Ca3" J.Clin.Microbiol. 28-1236/1243-1990
- 83) Schwartz D.C.,Cantor C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis" Cell 37-67/75-1984
- 84) Shankland G.S.,Hopwood V.,Forster R.A.,Evans E.G.V., Richardson M.D., Warnock D.W. "Multicenter evaluation of microring YT, a new method of yeast identification" J. Clin. Microbiol. 28-2808/2810-1990
- 85) Shinoda T.,Kaufman L.,Padhye A.A. "Comparative evaluation of the latron serological Candida Chek kit and the API 20 C kit for identification of medically important *Candida species*" J.Clin.Microbiol. 15-513/518-1981
- 86) Sohnle P.G.,Collins Lech C. "Comparison of candidacidal and candidastatic activities of human neutrophils" Infect.Immun. 58-2698/2698-1990
- 87) Soll D.R. "High-frequency switching in *Candida albicans*" Clin. Microbiol.Rev. 5-183/203-1992
- 88) Soll D.R.,Galask R.,Schmid J.,Hanna C.,Mac K.,Morrow B. "Genetic dissimilarity of commensal strains of *Candida spp.* carried in different anatomical locations of the same healthy women" J.Clin.Microbiol. 29-1702/1710-1991
- 89) Suzuki T.,Kobayashi I.,Kanbe T.,Tanaka K. "High frequency variation of colony morphology and chromosome reorganization in the pathogenic yeast *Candida albicans*" J. Gen. Microbiol. 135-425/434-1989
- 90) Tsuchiya T.,Fukazawa Y.,Kawakita S. "Significance of serological studies on yeasts" Mycopathol. Mycol. Appl. 26-1/15-1985

- 91) Viviani M.A., Tortorano A.M. "Micologia medica e actinomiceti aerobi" Ghedini Ed.-Milano,1986
- 92) Viviani M.A., Tortorano A.M. "Anticorpi monoclonali in micologia medica" Microbiologia Medica 2-91/94-1987
- 93) Warren N.G., Shadomy J. "Yeast of medical importance" in Wentworth "Diagnostic procedures for mycotic and parasitic infections" Am. Publ. Health Ass. Inc. Washington D.C.,1988
- 94) Weinstein M.P., Mirrett S., Reller R.B., "Comparative evaluation of Oxoid Signal and BACTEC radiometric blood culture systems for the detection of bacteremia and fungemia" J.Clin.Microbiol. 26-962/964-1988
- 95) Whelan W.L., Delga J.M., Wadsworth E., Walsh T.J., Kwon-Chung K.J., Calderone R., Lipke P.N. "Isolation and characterization of cell surface mutants of *Candida albicans*" Infect. Immun. 58-1552/1557-1990

Indice

Editoriale	pag. 3
Introduzione	» 5
Aspetti tassonomici e classificazione.....	» 5
Aspetti clinico-epidemiologici.....	» 9
Diagnostica di laboratorio.....	» 15
Raccolta e preparazione del materiale	» 15
Esame microscopico diretto.....	» 18
Isolamento: emocolture	» 21
Isolamento: esami colturali di altri materiali	» 21
Identificazione a livello di specie.....	» 29
Proprietà morfologiche	» 29
Proprietà biochimico-colturali	» 39
Caratteristiche antigeniche e proprietà sierologiche.....	» 46
Identificazione intraspecie	» 49
Tipizzazione fenotipica	» 49
Aspetti morfologici.....	» 49
Profilo biochimico	» 51
Profilo sierologico.....	» 52
Resistogramma	» 52
Sistema killer	» 53
Variabilità proteica.....	» 53
Biotipizzazione genotipica	» 54
Cariotipi elettroforetici	» 54
Polimorfismo da enzimi di restrizione.....	» 55
Ibridizzazione DNA-DNA.....	» 56
Risposta immunitaria e saggi sierologici.....	» 57
Ricerca di anticorpi specifici.....	» 61
Ricerca di antigeni solubili.....	» 62
Individuazione dei fattori di virulenza	» 67
Bibliografia	» 74
Indice	» 83

Collana Caleidoscopio - Ed. Italiana



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'obesità*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovario*. 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 b-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 enzimologico 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. Cafiero 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 coriagonadotropina 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., e 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. Biordi 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., Basaglia 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*. Luglio '92.

72. Cordido F. , Peñalva A. , De la Cruz L. F. , Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Agosto '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*. Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Ipertensione Arteriosa*. Febbraio '93.
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin*. Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.
81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.
82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.

Stefano Andreoni

Diagnostica di laboratorio
delle infezioni da lieviti



Caleidoscopio

Rivista mensile di Medicina

anno 11, numero 82

Direttore Responsabile

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

Responsabile Commerciale

Alessandra Pater



Editore

Medical Systems S.p.A.



Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Giovanna Nieddu

Servizio Abbonamenti

Fina Grandeppieno
Flavio Damarciasi

Via Rio Torbido, 40

16165 Genova (Italy)

Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 801005 (senza prefisso);

Telex 270310 Ideal I.

Telefax (010) 809737- 809070.

La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio Español, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Caleidoscopio literario, 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: Ottobre 1993

Sped. in Abb. Post. gr. III/70%

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.

Associata all'USPI

Unione Stampa Periodica Italiana



Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:

"L'ECO DELLA STAMPA"

Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/8/6 DPR 627/78)