

che viene chiamata “*sick building syndrome*”, dovuta all’inalazione di conidi (soprattutto di *Stachybotrys* spp.) da parte di persone che vivevano in ambienti pesantemente contaminati da questo micete. Alcuni ceppi di questo micete sono in grado di produrre micotossine molto potenti, che possono causare gravi disturbi e, in alcuni casi, portare a morte.

S8.2

LA BIOLOGIA MOLECOLARE IN MICOLOGIA

¹Faggi E., ²Andreoni S.

¹Dipartimento di Sanità Pubblica

- Sezione Microbiologia, Università di Firenze

²Azienda Ospedaliera Maggiore della Carità, Novara

La biologia molecolare, nell’ambito della micologia medica, può essere impiegata sia a scopo diagnostico che epidemiologico.

In campo diagnostico le biotecnologie possono essere utilizzate per la ricerca dei miceti direttamente nel materiale patologico permettendo di arrivare ad una diagnosi più rapida rispetto all’impiego delle metodiche classiche (esame colturale) e si possono rivelare particolarmente utili nella diagnosi di micosi profonde quali aspergillosi, candidosi, criptococcosi, istoplasmosi, pneumocistosi.

La PCR è la metodologia più ampiamente impiegata. Essa può essere utilizzata in combinazione con altre tecniche (PCR-ELISA, PCR-Restriction Enzyme Analysis ecc) o non in combinazione (semplice PCR, Nested PCR). I primers sono per lo più ricavati da sequenze di geni nucleari codificanti per proteine, sequenze di regioni ITS del DNA nucleare, sequenze rDNA nucleare, sequenze rDNA mitocondriale. La varietà di metodologie e la varietà di primers ha portato però a risultati non sempre ben confrontabili; inoltre un international consensus (Clin. Infect. Dis. 2002, 34, 7-14) sconsiglia l’impiego della PCR per la diagnosi di aspergillosi a causa delle false positività e di metodi commerciali non standardizzati. Nuove prospettive si aprono con l’impiego della real-time PCR.

In campo epidemiologico la biologia molecolare può essere utilizzata per identificare e tipizzare stipti funghi.

A partire dagli anni ‘80, con il presupposto che l’identificazione del genoma corrisponda alla identificazione di uno stipte, ha trovato un sempre più vasto favore la tipizzazione genotipica. Da allora, diversificazioni intraspecie tali da consentire una biotipizzazione genotipica sono state ottenute fondamentalmente: i) mediante cariotipizzazione, a seguito di separazione elettroforetica in campo pulsante di molecole di DNA di grandezza cromosomica; ii) ponendo in evidenza e

confrontando bande elettroforetiche di frammenti di DNA-ribosomale e di DNA-mitocondriale ottenuti con l’impiego di endonucleasi (DNA-polimorfismo da enzimi di restrizione); iii) mediante ibridizzazione con sonde DNA o RNA e, più recentemente, mediante iv) PCR fingerprinting e v) sequenziamento genomico.

I differenti approcci metodologici, le finalità degli indirizzi di ricerca, l’avvento di nuove tecnologie, rendono difficoltoso un inquadramento di questi sistemi di tipizzazione, così come eventuali correlazioni o confronti.

La validazione di un sistema di tipizzazione dovrebbe prevedere una valutazione delle prestazioni in base ai criteri di tipizzabilità, riproducibilità, stabilità, potere discriminante, nonché costo, rapidità e facilità di esecuzione. Nel considerare e selezionare il marcatore molecolare ottimale andrebbero attentamente considerati anche i concetti di spazio e tempo. Questi criteri dovrebbero essere valutati ogni volta che una nuova metodologia viene applicata o vengono modificati i parametri in un protocollo sperimentale.

S8.3

IL MONITORAGGIO DELLA TERAPIA ANTIFUNGINA

¹Manso E., ²Fazii P.,

¹Sezione di Microbiologia, Laboratorio di Analisi. Azienda Ospedaliero Universitaria. Ospedali Riuniti Umberto I°, G.M. Lancisi, G. Salesi. Ancona

²Sezione di Microbiologia, Laboratorio di Analisi. Ospedale Civile S. Spirito, Pescara

Dal 1970 il tasso di infezioni fungine è aumentato significativamente, in associazione con diversi cambiamenti nella pratica clinica (estensione delle terapie immunosoppressive, frequenza dell’uso di antibiotici ad ampio spettro a volte in modo indiscriminato, utilizzo di cateteri intravascolari) e con la comparsa dell’AIDS.

Inoltre, stanno diventando sempre più comuni le infezioni fungine opportunistiche da funghi resistenti agli antifungini. I test di laboratorio eseguiti con i farmaci antifungini servono a determinare la minima concentrazione del farmaco necessaria ad inibire lo sviluppo *in vitro* di un particolare fungo o per misurare le concentrazioni dell’antifungino nel siero dei pazienti in terapia. Gli agenti antifungini usati comunemente nel trattamento delle infezioni superficiali (ad es. nistatina e griseofulvina) non richiedono monitoraggio di laboratorio. Un grosso sforzo è stato eseguito per sviluppare metodi standardizzati, riproducibili e clinicamente rilevanti per studiare la suscettibilità dei funghi ai farmaci antifungini. La resistenza antifungina comprende nell’attualità l’emergenza di specie resistenti natural-

mente (come *C. krusei*) e la resistenza progressiva, dovuta ad alterazioni delle strutture o funzioni cellulari bersaglio degli antifungini, in pazienti sottoposti per tempi lunghi a questi farmaci (AIDS, trapiantati di midollo osseo).

La terapia delle candidosi può essere oggi guidata dai test di suscettibilità in vitro. I test di suscettibilità a *Candida* sono particolarmente utili quando si tratta di ceppi di *Candida non-albicans* isolati da infezioni profonde, soprattutto se i pazienti sono stati già trattati con azoli. Nelle vaginite complicate il test di suscettibilità al fluconazolo è inutile: 1) perché sono rari i ceppi di *C. albicans* resistenti, 2) perché non esiste una correlazione tra fallimento terapeutico e suscettibilità all'antifungino e 3) perché le specie non-*albicans* non devono essere trattate con fluconazolo e frequentemente rispondono invece all'acido borico o alla 5-fluorocitosina topica.

Per i lieviti, negli USA, il NCCLS ha sviluppato la metodologia di microdiluzione in brodo, descritta nel documento M27-A2 (2002), e più recentemente la disco-diffusione al fluconazolo nel documento NCCLS M44-P (2003). In Europa l'EUCAST (2002) ha descritto un metodo di microdiluzione in brodo, escludendo il test per l'amfotericina B (AMB), con alcune varianti rispetto al M27 (micropiastre a fondo piatto, inoculo maggiore, aggiunta del 2% di glucosio) e che presenta alcuni vantaggi rispetto al NCCLS, come la riduzione del tempo di incubazione per la maggior parte delle specie a 24 h e conseguente riduzione del fenomeno di trascinamento. Breakpoints interpretativi per *Candida* spp (non per *Cryptococcus* spp) sono stati segnalati per 5-fluorocitosina, fluconazolo e itraconazolo, ma non per l'AMB. La metodica NCCLS non è in grado di differenziare i ceppi resistenti da quelli sensibile all'AMB, e sembra che le metodiche in agar diluizione come l'Etest abbiano una maggiore potenzialità. Comunque la maggior parte delle *Candida* isolate rimangono suscettibili all'AMB anche se alcuni ceppi di *C. glabrata* e *C. krusei* richiedono la massima dose di AMB. La concordanza tra le metodiche NCCLS e altri metodi commerciali è in genere elevata con la metodica colorimetrica Yeast-One® e l'Etest®. Diversi studi di test di suscettibilità comparativa sono stati eseguiti anche con i nuovi triazolici (voriconazolo, posaconazolo e ravuconazolo) e con le echinocandine, in particolare con caspofungina. La determinazione della concentrazione minima inibente della caspofungina (lettura ad inibizione completa) presenta ancora problemi tecnici e risulta talvolta difficile da determinare con le metodiche in brodo.

I test di suscettibilità per alcuni funghi filamentosi sono descritti dal NCCLS nel documento M38-A (2002) con metodica di microdiluzione in brodo. Sono in corso studi comparativi con metodiche commerciali.

Le concentrazioni nel sangue dei farmaci antifungini vengono misurati per due ragioni: per assicurare una

adeguata concentrazione del farmaco e per evitare concentrazioni che possano causare effetti collaterali indesiderati. Le metodiche utilizzate per misurare le concentrazioni dei farmaci antifungini più precise si basano nella determinazione dei singoli antifungini, anche in presenza di terapia combinata, mediante high-performance liquid chromatography (HPLC) e risulta particolarmente importante quando si esegue la terapia con itraconazolo orale o con gli altri azoli (fluconazolo, voriconazolo) in associazione con farmaci che interagiscono con loro.

S8.4

SIEROLOGIA DELLE ASCARIDIASI LARVALI

Petithory J.C.*, Cutrupi V.

**Gonesse, Francia; Tione, Italia*

Nell'ascaridiasi umana da *Ascaris lumbricoides* i vermi divengono adulti nell'intestino e la diagnosi viene posta con la scoperta delle uova nelle feci.

Questa parassitosi è praticamente scomparsa nei paesi industriali, ed è in diminuzione nei paesi in via di sviluppo poiché le misure igieniche (eliminazione delle feci nelle latrine) hanno avuto notevole successo.

Diverse specie di nematodi facenti parte della superfamiglia ascaridoidea (Anderson) continuano ad infestare l'Uomo dopo ingestione di uova larvate.

I parassiti non raggiungono lo stadio adulto e le larve sono all'origine di diverse patologie. La difficoltà di trovare le larve e di identificarle ha portato allo sviluppo della diagnostica sierologica che risulta molto complessa per le parentele antigeniche tra i nematodi.

Le toxocarasi sono, attualmente, le più frequenti ascaridiasi larvali. Sono sostenute per i due terzi dei casi da *Toxocara canis* e per un terzo da *Toxocara cati*, rari casi sono dovuti a *T. vitulorum*. E' necessario utilizzare diversi antigeni Escretori - Secretori larvali per raggiungere la diagnosi della specie in causa, mediante immunoelettroforesi e/o immunoblot. Le larve di *Toxocara* sp. Dopo aver migrato nell'organismo s'incistano e rimangono vive per molto tempo fornendo una sierologia positiva per almeno 30 anni. I cuccioli dei cani vengono trattati (albendazolo, fenbendazolo, tiabendazolo...) a 2 e a 8 settimane dalla nascita ciò porterà alla scomparsa della toxocarasi canina negli anni prossimi. Tra i gatti il trattamento farmacologico meno frequente e le facili reinfestazioni causano il persistere della parassitosi.

Baylisascaris procyonis nematode dell'orsetto lavatore è all'origine nell'Uomo di frequenti e gravi infestazioni del sistema nervoso in America e recentemente in Europa (Germania). Le numerose larve permettono la loro scoperta ma la diagnosi è solo sierologica.