

SHORT COMMUNICATIONS

Italian survey on subcutaneous and deep infections by moulds

Claudio Farina^{1,2}, Stefano Andreoni^{1,5}, Marco Conte^{1,8}, Paolo Fazii^{1,7}, Gianluigi Lombardi^{1,6}, Esther Manso^{1,4}, Silvana Sanna^{1,3} e Gruppo di Lavoro AMCLI-CoSM su 'Micosi sottocutanee e da Miceti Filamentosi'

¹Comitato Studio Micologia (CoSM) - Associazione Microbiologi Clinici Italiani

²UOC Microbiologia, AO "Ospedale S. Carlo Borromeo", Milano

³Istituto Microbiologia, Università di Sassari, Sassari

⁴Laboratorio Analisi e Microbiologia, AO "Ospedali Riuniti, Ancona"

⁵Lab Microbiologia, AOU "Maggiore della Carità", Novara

⁶Lab Microbiologia e Virologia, AO "Niguarda-Ca Granda", Milano

⁷Laboratorio Analisi e Microbiologia, PO "Santo Spirito", Pescara

⁸Laboratorio Analisi e Microbiologia, AO "Ospedale Cotugno", Napoli)

⁹Verna G, Ancona; Passera M, Bergamo; Russello G, Milano; Gesu G, Milano; Bramati S, Monza; Fanello M.R, Novara; Cavanna C, Pavia; Mura E, Sassari; Andrini S, Torino; Barbui A, Torino; Grandesso S, Treviso; Arzese R, Udine; Luzzaro F, Varese; Casella P, Vimercate)

Key Words: Mould, Mycoses, Survey

Micosi sottocutanee e profonde da funghi filamentosi: sorveglianza italiana

SUMMARY

Invasive fungal infections are an important cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients. Improvements in the management of critical care and neoplastic diseases, and development of newer antimicrobial agents have contributed to the emergence of new fungi and the resurgence of older. The Medical Mycology Division (CoSM) of the Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI) proposed the institution of 1. a national register (2006-2008) of all cases of infection by uncommon moulds, implicated as aetiological agents in subcutaneous and deep mycoses and 2. a fungal library, to perform in vitro epidemiological typing. The strains isolated at each Laboratory have been identified by the means of standard procedures and confirmed by sequencing a fragment encoding the ribosomal large subunit RNA and by comparing in the GenBank. 14 Italian Centers sent 87 strains. The survey confirmed *Aspergillus* (36/87), *Fusarium* (17/87), zigomycetes (15/87), dematiaceae (12/87), *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (3/87) and other jaline moulds (3/87). Sequencing can be considered a confirmatory technique only for unusual moulds difficult to identify.

Received March 8, 2009

Accepted June 8, 2009

INTRODUZIONE

Sempre più frequente è il riscontro di micosi opportuniste non solo in pazienti neoplastici, sottoposti a trapianto d'organo solido e di midollo osseo, o in Rianimazione, ma anche in soggetti non immunocompromessi.

In particolare, oltre ad *Aspergillus fumigatus* ed alle altre specie di aspergilli, un crescente numero di miceti filamentosi come *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, gli zigomiceti, *Scedosporium* ed i funghi dematiacei possono causare infezioni invasive di difficile gestione terapeutica.

Tra gli Aspergilli, specie diverse da *A. fumigatus* sono ritrovate con sempre crescente frequenza: alcune specie (in particolare, ma non solo, *A. terreus*) possono mostrare resistenza naturale ad Anfotericina B meglio rispondendo ai nuovi triazolici.

Nota è la rilevanza degli zigomiceti, responsabili di forme rapidamente evolutive soprattutto in pazienti diabeti, traumatizzati o immunodepressi, scarsamente responsivi alle molecole oggi disponibili.

Reports recenti indicano *Fusarium* come il secondo fungo causa di micosi profonda dopo *Aspergillus* (3). Un'elevata percentuale di funge-

Corresponding author: Claudio Farina

UOC Microbiologia e Virologia - AO "Ospedale San Carlo Borromeo"

Via Pio II, 3 - 20153 Milano, Italy - Tel: 02.40222456 - Fax: 02.40222829

E-mail: farina.claudio@sancarlo.mi.it

mie e di metastatizzazioni secondarie sono rilevabili soprattutto in pazienti neutropenici. I nuovi triazoli hanno mostrato qualche attività nei suoi confronti. *Acremonium* può essere causa di cheratomicosi o di micetoma in soggetti immunocompetenti, al pari di *Trichoderma* in soggetti trapiantati. Forme invasive sono state osservate in pazienti neutropenici. I miceti dematiacei costituiscono un gruppo di miceti emergenti: le feoifomicosi sono in costante aumento. Un gruppo di questi organismi è neurotropo causando singole o multiple lesioni cerebrali.

Tra questi *Cladophialophora*, *Exophiala* e *Xylohypha* ma *Bipolaris* ed *Exserohilum* spp. possono essere causa di sinusite.

Infine, *Scedosporium* spp. è agente di micetoma, polmonite, infezioni disseminate specie in soggetti immunodepressi e non. Voriconazolo ha dimostrato attività *in vitro* nei suoi confronti.

OBIETTIVI

L'identificazione eziologica dei miceti è oggi momento fondamentale, non solo per la definizione epidemiologica del caso, ma per l'impostazione della terapia più corretta.

Fusarium spp., *Scedosporium* spp. e gli altri funghi filamentosi sono patogeni emergenti anche in Italia, anche se di segnalazione spesso solo aneddotica.

Per questa ragione il Comitato Studio Micologia (CoSM) dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI) propone l'istituzione di una "sorveglianza nazionale" di tutti i casi di infezione da *Fusarium*, *Scedosporium* e da altri miceti filamentosi jalini e dematiacei implicati in micosi sottocutanee e profonde.

Primo obiettivo

È l'ausilio diagnostico fornito ai laboratori periferici nell'identificazione fungina, per confermare le capacità diagnostiche 'sul campo', in continuità con la mission educativa del CoSM dal 1989.

Secondo obiettivo

È la costituzione di una 'banca-dati' nazionale concernente l'epidemiologia delle micosi 'inconsuete' da funghi filamentosi isolati da pazienti con micosi sottocutanea o sistemica.

Terzo obiettivo

È la creazione di una 'ceppoteca' nazionale, finalizzata alla tipizzazione e alla valutazione *in vitro* di molecole antifungine.

COORDINAMENTO

Centro Coordinatore

Il registro è gestito da Comitato Studio Micologia

(CoSM), Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI), via Carlo Farini, 81 20159 Milano, tel +39.0266801190

Durata dello studio

1 aprile 2006 – 31 marzo 2008

Criteri di inclusione

Sono inclusi tutti i casi che rispondano alle definizioni diagnostiche sotto riportate (in accordo con le definizioni di infezioni invasive fungine proposte da De Pauw e Coll. (2).

1. infezione confermata:

- infezione sistemica fungina confermata istologicamente o citologicamente;
- coltura positiva di materiale biologico proveniente - con procedura di prelievo sterile - da sito sterile (escluse urine e membrane mucose) e con segni di infezione clinicamente dimostrata o basata su imaging positivo;
- fungemia (esclusa quella da *Aspergillus* spp. e *Penicillium* diverso da *P. marneffeii*) associata a segni e sintomi compatibili;

2. infezione probabile:

- positività di un 'criterio d'ospite' (neutropenia o febbre persistente o GVHD, o prolungato uso di steroidi) con positività microbiologica (coltura positiva o esame microscopico positivo o positività antigenica) con positività di un criterio clinico maggiore (o di due minori) a carico dell'apparato respiratorio, dei seni paranasali, del SNC.

MATERIALI E METODI

Centri

Sono stati arruolati 22 centri. Di questi sono stati aperti 14 nel periodo considerato (2006-2008).

Stipiti fungini

I ceppi, isolati da campioni clinici (sangue, biopsie cutanee, materiali respiratori, liquido cefalorachidiano), inviati al laboratorio per sospetta micosi sottocutanea o profonda sono stati considerati eleggibili per l'arruolamento nello studio solo in caso di provata o probabile micosi sottocutanea o profonda da miceti filamentosi, definita in accordo con le raccomandazioni ISHAM. Tale valutazione era effettuata autonomamente a cura del CoSM sulla base dei dati forniti dai Centri periferici.

Gli stipiti fungini isolati in sede periferica sono stati identificati sulla base dei criteri fenotipici standard.

Conferma diagnostica

I ceppi sono stati esaminati i setup presso tutti i

Centri CoSM al fine di verificare, sulla base di criteri fenotipici (coltura su vetrino sec. Riddell) l'identificazione effettuata in sede periferica.

La diagnostica molecolare è stata centralizzata presso il Centro di Sassari.

DNA è stato estratto da colture ripassate su Sabouraud's agar come descritto da Aljanabi e Martinez (1). Tre microlitri di DNA estratto sono stati utilizzati per l'amplificazione utilizzando i primers fungini universali ITS 1 (forward primer) [50-TCC GTA GGT GAA CCT GCC-30] e ITS 4 (reverse primer) [50- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-30]. Questi primers amplificano il DNA ribosomiale 5.8S (rDNA) e l'internal transcribed spacer 1 (ITS 1) e la regione fungina ITS 2. I prodotti PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel dopo purificazione con il Qiaquick purification PCR kit (Qiagen, Germany) ed a sequenziamento. La sequenza DNA è stata valutata per la definizione del livello di omologia con il software BLAST nel database di Gen-Bank. ClustalW è stato utilizzato per allineare la sequenza multipla per la comparazione.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Tredici Centri Italiani hanno inviato 85 ceppi fungini. Come indicato in Tabella 1.

I miceti del genere *Aspergillus* (36/87) erano i più frequenti, seguiti da *Fusarium* (17/87) e dagli zigomiceti (15/87). I miceti dematiacei (12/87) e 3 i casi di altri miceti filamentosi jalini.

Devono essere segnalati 3 casi di infezione da *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*.

La Tabella 1 compendia i risultati comparativi delle identificazioni fenotipica e genotipica.

I risultati dell'identificazione molecolare hanno mostrato un ottimo livello di omologia (100%), con l'eccezione di miceti del genere *Fusarium* per i quali l'omologia con i dati fenotipici è solo parziale. Ciò è verosimilmente dovuto ai primers ITS1/ITS4 che presentano un incompleto effetto discriminante che non permette di differenziare tra *F. verticillioides* e *F. pseudonygamai*/ *F. fujikuroi*. L'ottima concordanza dei risultati ottenuti utilizzando i criteri fenotipici e ricorrendo a tecniche biomolecolari induce a rivalutare il ruolo del sequenziamento nella diagnostica routinaria, ribadendone il significato di *test* di conferma per i miceti inusuali di difficile identificazione.

I risultati della sorveglianza evidenziano l'emergenza di miceti inusuali, quali *Fusarium* e zigomiceti, oltre che dematiacei e *Histoplasma*.

Le diagnosi effettuate in sede periferica sono di buona qualità per la caratterizzazione di genere. La conferma di specie ha evidenziato la necessità

Tabella 1. Risultati comparativi delle identificazioni fenotipica e genotipica

Genere	Identificazione fenotipica	Identificazione molecolare con ITS1/ITS4
36 <i>Aspergillus</i> spp	23 <i>A. fumigatus</i>	23 <i>A. fumigatus</i>
	6 <i>A. terreus</i>	6 <i>A. terreus</i>
	3 <i>A. flavus</i>	3 <i>A. flavus</i>
	2 <i>A. nidulans</i>	2 <i>A. nidulans</i>
	2 <i>A. niger</i>	2 <i>A. niger</i>
17 <i>Fusarium</i> spp	12 <i>F. verticillioides</i>	12 <i>F. verticillioides</i> / <i>F. pseudonygamai</i> / <i>F. fujikuroi</i>
	4 <i>F. solani</i>	4 <i>F. solani</i>
	1 <i>F. oxysporum</i>	1 <i>F. oxysporum</i>
15 Zigomiceti	6 <i>Absidia corymbifera</i>	6 <i>Absidia corymbifera</i>
	1 <i>Mucor hiemalis</i>	1 <i>Mucor hiemalis</i>
	5 <i>Rhizopus arrhizus</i>	5 <i>Rhizopus arrhizus</i>
	3 <i>Rhizomucor pusillus</i>	3 <i>Rhizomucor pusillus</i>
12 Dematiacei	3 <i>Alternaria</i> spp.	2 <i>Alternaria tenuissima</i>
	1 <i>Bipolaris spicifera</i>	1 <i>A. infectoria</i>
	1 <i>Curvularia lunata</i>	1 <i>Bipolaris spicifera</i>
	1 <i>Curvularia sengalensis</i>	1 <i>Curvularia lunata</i>
	1 <i>Phialoacremonium</i> spp.,	1 <i>Curvularia sengalensis</i>
	4 <i>Scedosporium apiospermum</i>	1 <i>Phialoacremonium</i> spp.,
	1 <i>S. prolificans</i>	4 <i>Scedosporium apiospermum</i>
4 Miceti filamentosi jalini	1 <i>Beauveria bassiana</i>	n. d.
	2 <i>Geotrichum candidum</i>	1 <i>Beauveria bassiana</i>
	1 <i>Paecilomyces lilacinus</i>	1 <i>Paecilomyces lilacinus</i>
3 Dimorfi	3 <i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i>	n. d.
Totale	87	

di un perfezionamento diagnostico a livello biomolecolare in particolare per i microrganismi del genere *Fusarium*.

I risultati evidenziano che, oltre ai riscontri di *Fusarium* spp. da emocoltura, anche la cute, l'occhio ed il sistema nervoso centrale costituiscono la sede iniziale dell'infezione. *Fusarium* rappresenta la seconda eziologia (17/87, 19.54%) dopo *Aspergillus* (41.38%) (3). I test genotipici confermano, non senza qualche criticità meritevole di approfondimenti tecnici ed interpretativi, l'identificazione di specie eseguita avvalendosi dei complessi criteri fenotipici disponibili.

In particolare, per quanto concerne le caratteristiche dei casi di fusariosi, isolamento di *Fusarium* spp. è stato ottenuto complessivamente in 17 casi, pari al 19.5% del totale delle micosi registrate. In sette circostanze *Fusarium* è stato riscontrato da pazienti affetti da patologie oncoematologiche, dei quali cinque presentavano sepsi e due polmonite. In questi, l'isolamento è stato possibile da emocolture (4 casi), da biopsia cutanea (1 caso), e da materiali di origine respiratoria (BAL: 1 caso; liquido pleurico: 1 caso). In tre pazienti *Fusarium* si è reso responsabile di forme localizzate ai tessuti molli: si trattava di pazienti affetti da imponente sarcoma di Kaposi all'arto inferiore (1 caso), da vasculopatia periferica con necrosi delle falangi del piede (1 caso) e da politraumatismo (1 caso).

In tutti i casi è stato possibile isolare *Fusarium* da materiale purulento, in isolamenti ripetuti. In due pazienti lo scraping oculare ha consentito la diagnosi eziologica di cheratite fungina in soggetti portatori di lenti a contatto. Si segnala inoltre il riscontro di *Fusarium* da emocoltura in un paziente settico sottoposto a trapianto renale, da BAL in due soggetti politraumatizzati con segni di polmonite, da pus in un soggetto con sinusite cronica ed, infine, da liquor cefalorachidiano in un paziente con meningite. L'esito della fusariosi è per lo più associato con la risoluzione della leucopenia ed all'attività di voriconazolo.

BIBLIOGRAFIA

1. Aljanabi S.A, Martinez I: Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques- *Nucleic Acids Research*, 1997, vol 25, n° 22
2. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical Infectious Diseases* 2008; 46: 1813-21
3. Nucci M, Anaisse E: *Fusarium* infection in Immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct 2007, p. 695-704