

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	2
Il trapianto di rene.....	4
Rischio di infezioni fungine nei pazienti trapiantati.....	7
Anticorpi verso il tubulo germinativo di <i>Candida albicans</i> .....	12
Anticorpi anti- <i>Aspergillus</i> .....	15
Anticorpi anti- <i>Cryptococcus</i> .....	17
<b>SCOPO DELLA TESI</b> .....	18
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	19
<b>RISULTATI</b> .....	32
<b>CONCLUSIONI</b> .....	37
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	41
<b>FIGURE, TABELLE E GRAFICI</b> .....	49

## **INTRODUZIONE**

Il trapianto di organo solido rappresenta un'opzione terapeutica in molte malattie umane. La qualità della vita e il tasso di sopravvivenza dopo trapianto d'organo sono notevolmente migliorate grazie ai progressi delle tecniche chirurgiche, delle terapie immunosoppressive e alla gestione medica dei pazienti. Tuttavia, complicazioni come infezioni e rigetto rimangono le principali cause di morbidità e di morte (1).

Dei diversi tipi d'infezioni che possono interessare questi pazienti critici, quelle causate da funghi determinano il più alto tasso di mortalità, nonostante abbiano un'incidenza minore rispetto alle infezioni batteriche e virali.

Le possibili spiegazioni sono:

1. la difficoltà di una prima diagnosi quando si verifica un basso indice di sospetto;
2. la mancanza di terapia efficace nelle infezioni causate, ad esempio, da alcune specie di funghi rari;
3. le difficoltà incontrate nell'utilizzo di alcuni antimicotici a causa della loro tossicità o interazioni con farmaci immunosoppressori, come la ciclosporina;

4. i dati limitati sulla efficace profilassi antifungina da seguire in caso di trapianto di organi.

L'incidenza delle infezioni fungine invasive (IFI) varia dal 5% tra i beneficiari di trapianto di rene a un massimo del 40% tra i destinatari di trapianto di fegato (2); nei pazienti neutropenici queste infezioni sono le principali cause di morbilità e di morte (1). *Candida* sp. e *Aspergillus* sp. determinano più dell'80% degli episodi di infezione fungina (2). Inoltre, oltre l'80% delle infezioni fungine si manifestano entro i primi 2 mesi dopo il trapianto, con una mortalità che risulta tra il 30% e il 100%.

La patogenesi dell'infezione e i fattori di rischio connessi dipendono dal tipo di trapianto e dal microrganismo infettante. Infatti, mentre il genere *Aspergillus* è maggiormente coinvolto nel trapianto di organi toracici (polmone o cuore), *Candida* risulta predominante nei trapianti di organi addominali. Queste differenze, relative all'organo trapiantato e ai funghi coinvolti, sono spiegate dalla varia complessità tecnica nell'eseguire il trapianto in relazione alla localizzazione degli organi, ma anche dall'intensità di immunosoppressione richiesta per prevenire il rigetto dell'organo (3, 4).

Nell'ultimo decennio, tuttavia, si sono aggiunti altri funghi opportunisti quali *Cryptococcus*, Zigomiceti e più raramente ialoifomiceti (*Fusarium*, *Scedosporium*) e feoifomiceti (*Alternaria*, *Exophiala* ed altri) (5).

## **IL TRAPIANTO DI RENE**

Il trapianto di rene è la terapia sostitutiva di scelta per i pazienti con insufficienza renale terminale. Infatti, a parità di età e altri fattori di rischio la sopravvivenza del paziente in dialisi è inferiore a quella del paziente trapiantato renale. Nell'ambito del trapianto renale, quello da vivente offre risultati ancor superiori a quello da cadavere.

Perché un paziente con insufficienza renale terminale venga considerato "idoneo" al trapianto deve essere esclusa la presenza di neoplasie in atto, mentre per quelle pregresse deve essere trascorso un congruo periodo libero da recidive (5 anni per la maggioranza delle neoplasie). Non devono esserci ovviamente infezioni acute in atto. Anche gravi coagulopatie incorreggibili rappresentano talora una controindicazione al trapianto.

Non deve esserci patologia coronarica attiva evidenziabile con indagini anamnestiche, ECG ed ecocardiogramma.

Fra tutti gli interventi di trapianto di organo solido, il trapianto di rene, rappresenta quello con la più bassa incidenza di infezioni fungine; di tutte le infezioni che si sviluppano in seguito ad un intervento di trapianto di rene, quelle a carico dei feghi risultano essere soltanto il 5% (6). *Candida* sp., *Aspergillus* sp. e *Cryptococcus neoformans* sono le specie fungine che vengono più frequentemente isolate (7, 8).

Il tratto urinario è la sede più comune di infezioni fungine (specialmente quelle causate da *Candida*), questa è una caratteristica che distingue il trapianto renale da altri tipi di trapianto (6, 9, 10).

Le infezioni da *Candida* possono comparire in qualsiasi momento durante il periodo post-operatorio, ma sono più frequenti durante i primi 6 mesi dal trapianto e in particolare nel primo mese (11). La presentazione clinica è principalmente associata con infezione del tratto urinario, sepsi da catetere, o esofagite (6).

L'infezione da *Aspergillus* colpisce principalmente i polmoni (con diffusione occasionale) e il sistema nervoso centrale. *Aspergillus*, *Cryptococcus* e *Listeria monocytogenes* causano tre quarti di tutte le infezioni del sistema nervoso centrale nei pazienti con problemi renali (11, 12).

L'infezione da *Aspergillus* è associata al più alto tasso di mortalità in questa popolazione (13, 7, 14, 15).

Inoltre la prognosi dell'infezione da *Aspergillus* può variare in base alla specie infettante. Per esempio, nel trapianto di fegato, è stato utilizzato con successo un approccio medico e chirurgico per trattare l'infezione polmonare dovuta a *Aspergillus* gruppo *terreus* ma non si è avuto lo

stesso successo nel curare l'infezione causata da *Aspergillus* gruppo *fumigatus*.

## **RISCHIO DI INFEZIONI FUNGINE NEI PAZIENTI TRAPIANTATI**

Il rischio di infezione nei pazienti trapiantati è determinato principalmente da due fattori: l'intensità di esposizione a potenziali patogeni (esposizione epidemiologica) e l'effetto combinato di tutti i fattori che contribuiscono alla predisposizione di un paziente alle infezioni (16, 17). Per esempio, la presenza di infezione in un paziente il cui sistema immunitario è stato pensato per essere quasi normale è la prova che si è verificata una eccessiva esposizione ambientale o che il livello di soppressione immunitaria è maggiore di quanto si pensasse.

In generale i fattori di rischio per l'insorgenza di IFI nei trapiantati possono essere riferiti in primo luogo al grado dell'immunosoppressione, derivante dalla terapia specifica e/o da infezioni virali (18, 19). Inoltre, tutto ciò che correla con la possibile sorgente dell'infezione, è stato riconosciuto come importante fattore di rischio per lo sviluppo di infezione fungina (20). Infatti, relativamente al genere *Candida*, ma anche per *Aspergillus* e *Cryptococcus*, risulta importante studiare e determinare l'intensità di colonizzazione con le relative specie coinvolte (21, 22, 23). Anche lo stile di vita, le infezioni subcliniche nel paziente e/o nell'organo trapiantato, la localizzazione geografica e l'aumento della carica conidiale nell'ambiente, sono fattori di rischio predisponenti

all'insorgenza di infezioni fungine (24). Infine un ruolo non trascurabile ha l'alterazione delle barriere muco-cutanee causata dalle procedure chirurgiche, dall'utilizzo di dispositivi per l'accesso vascolare, dai cateteri di drenaggio e dai tubi endotracheali.

Sulla base dei dati ottenuti da diversi studi epidemiologici, nell'ambito delle infezioni fungine si usa solitamente dividere il periodo post-trapianto in tre stadi, durante i quali i comuni agenti patogeni sono in grado di provocare infezioni per la presenza di particolari fattori predisponenti (3).

Il primo comprende il periodo che va dal trapianto al primo mese; il secondo racchiude il periodo dal primo al sesto mese dal trapianto ed infine il terzo che è rappresentato dal periodo che va oltre il sesto mese.

Ogni stadio è caratterizzato da distinti fattori di rischio propri dell'ospite e da tipici microrganismi responsabili di infezioni fungine (Figura 1).

In particolare i principali fattori di rischio durante il primo mese dopo il trapianto sono collegati a complicanze chirurgiche (infezioni fungine della ferita chirurgica, utilizzo di cateteri urinari o di altri dispositivi medici, etc.). Circa il 90% di tutte le infezioni fungine rilevate in questo intervallo di periodo tempo, sono da attribuire al genere *Candida*, anche se alla fine di questo primo periodo, cominciano ad essere rilevate infezioni sostenute dal genere *Aspergillus*. Raramente si possono



manifestare infezioni preesistenti relative al donatore o al ricevente, con conseguenze estremamente dannose (25). Nel secondo stadio i maggiori fattori di rischio che predispongono allo sviluppo d'infezioni fungine invasive sono l'intensità dell'immunosoppressione con la concomitante presenza d'infezioni virali, ed in particolare quelle sostenute dal CMV, che ne favoriscono l'aumento (26, 27). Durante questo stadio le infezioni opportunistiche sono molto frequenti. Infatti, l'incidenza delle infezioni da *Aspergillus* aumenta gradualmente fino a raggiungere un picco massimo intorno al terzo mese, dopo il quale si osserva un lento declino (26, 28). In questo stesso stadio possono essere riscontrati anche altri comuni funghi patogeni come *Pneumocystis* e *Cryptococcus*. Infine, nel terzo stadio, quindi dopo sei mesi dal trapianto, i pazienti che al post-trapianto non hanno presentato grossi problemi relativi al rigetto e a patologie infettive e hanno quindi ridotto le terapie immunosoppressive, non sono più particolarmente a rischio e le manifestazioni infettive a cui andranno incontro sono simili a quelle presenti nella popolazione generale (18). I pazienti che dopo sei mesi dal trapianto sono ancora sottoposti ad alte dosi di terapie immunosoppressive per il rischio di rigetto acuto o cronico dell'organo, continuano a presentare le stesse problematiche infettive relative allo stadio precedente.

Nel terzo stadio, l'esposizione significativa a particolari funghi presenti prevalentemente nell'ambiente (*Histoplasma capsulatum* e *Coccidioides immitis*), può determinare l'insorgenza di infezioni fungine sostenute da queste specie in questa particolare categoria di pazienti.

Un aspetto da prendere in considerazione è quello della differente potenzialità diagnostica delle IFI nel trapianto di organo solido. Infatti, mentre nel trapianto di midollo sono stati selezionati indagini sia radiologiche che di laboratorio, quali la PCR e i test ELISA, che consentono rispettivamente il rilevamento di DNA e di antigeni fungini, mediante i quali si è standardizzata una buona diagnostica micologica, questo non è ancora realizzabile per i trapianti di organo solido. Pertanto, considerando le difficoltà relative a una accurata diagnosi di IFI in questa tipologia di pazienti, fatta in tempi accettabili per l'avvio di una appropriata ed efficace terapia, risulta di fondamentale importanza riuscire ad evidenziare markers di laboratorio che servano a differenziare i soggetti più a rischio per avviare, qualora le condizioni cliniche lo richiedano, un eventuale trattamento di profilassi o pre-emptivo. In tal senso, oltre ad alcuni esami di laboratorio, quali la ricerca dell'antigene galattomannano di *Aspergillus* e l'antigene beta-glucano, oramai inseriti tra i criteri per la diagnosi probabile di infezione fungina invasiva probabile, altri test sierologici che prevedono la ricerca di anticorpi

(*Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus*) sono stati studiati per valutare il ruolo che potrebbero avere ai fini diagnostici.

## **ANTICORPI VERSO IL TUBULO GERMINATIVO DI *CANDIDA ALBICANS***

*Candida albicans* IFA IgG è un kit recentemente commercializzato che permette la ricerca di anticorpi in immunofluorescenza diretti verso antigeni di superficie del tubulo germinativo di *Candida albicans*. Sono stati riportati valori di sensibilità e specificità del test rispettivamente pari a 84.4 e 94.7% e in associazione alle condizioni cliniche del paziente un titolo anticorpale  $\geq 160$  può supportare la diagnosi di candidosi invasiva probabile (29, 30).

In uno studio multicentrico prospettico osservazionale eseguito tra il 2005 e 2006 su pazienti critici ricoverati in terapia intensiva con specifici fattori di rischio è stato messo in evidenza come la presenza di anticorpi verso il tubulo germinativo di *Candida* fosse protettivo nei confronti dello sviluppo dell'infezione. Infatti, nel gruppo di pazienti che presentavano titoli  $\geq 160$  suggestivi per lo sviluppo di candidosi invasiva è stata evidenziata una diminuzione della mortalità (31).

Poche evidenze vi sono circa la presenza di anticorpi diretti verso il tubulo germinato in pazienti che non presentavano nessun segno clinico di infezione fungina invasiva. A tal proposito è stato recentemente pubblicato uno studio che analizza l'associazione tra i fattori di rischio per lo sviluppo di candidosi invasiva e i titoli anticorpali positivi, in

modo da poter selezionare i pazienti a rischio che potrebbero beneficiare dell'utilizzo di questa tecnica resa tra l'altro in tal senso più affidabile. Inoltre, oltre a identificare il precedente intervento chirurgico come principale fattore significativamente associato alla presenza di anticorpi a titoli elevati, questi autori hanno evidenziato come la tecnica non sia influenzata né dalla elevata colonizzazione da *Candida*, né dal trattamento antifungino. Prima della commercializzazione del kit, alcuni autori avevano già sviluppato un test di immunofluorescenza indiretta per la ricerca di anticorpi verso il tubulo germinativo di *C. albicans* utilizzandolo come biomarker utile per la diagnosi di candidosi invasiva in diverse categorie di pazienti a rischio (32). Oltre ad evidenziare una sensibilità complessiva del test del 77 – 89% e una specificità del 91 – 100%, hanno dimostrato come le prestazioni complessive del test erano simili sia nei pazienti immunocompetenti, sia in quelli immunocompromessi, nonostante in questi ultimi erano riscontrati titoli anticorpali inferiori. Inoltre, la presenza di anticorpi era presente anche in pazienti con candidosi invasive da altre specie “non-albicans”, ovvero *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida guilliermondii* e *Candida krusei*, anche se con titoli più bassi rispetto alle candidosi invasive da *Candida albicans* (33, 34, 35). In definitiva, considerando le

problematiche connesse alla possibilità di poter effettuare una diagnosi certa di candidosi invasiva, la ricerca di anticorpi verso la fase miceliale di *C. albicans*, in associazione ad altri parametri di laboratorio e ai dati clinici dei pazienti, potrebbe essere utile per supportare una diagnosi probabile di infezione fungina invasiva in diverse categorie di pazienti, tra cui i trapiantati, che presentano specifici fattori di rischio per lo sviluppo di infezione.

## **ANTICORPI ANTI-*ASPERGILLUS***

A partire dagli anni 70 si è cominciato a dare molta importanza all'aspetto umorale della risposta immunitaria verso le infezioni da *Aspergillus sp.* e di conseguenza alle tecniche sierologiche indirizzate verso la determinazione degli anticorpi. Certamente la tecnica della doppia diffusione in gel di agarosio (DD) è quella maggiormente utilizzata, nelle procedure di routine, per la determinazione degli anticorpi anti-*Aspergillus*. Si tratta di una metodica che presenta una buona specificità nell'ambito delle aspergillosi, ma con sensibilità variabili a seconda delle diverse patologie: 80 - 100% nei casi di aspergilloma, 70% nell'aspergillosi broncopolmonare allergica e molto meno nell'aspergillosi invasiva (36, 37).

Inoltre, non consente una facile quantificazione della risposta umorale, sebbene il numero delle bande di precipitazione spesso indichi il grado di interessamento clinico (38).

Anche altre tecniche come la controimmunolettroforesi (CIE), la fissazione del complemento, l'immunofluorescenza indiretta (IFA), l'immunoblotting e l'ELISA sono state sperimentate (39, 40) relativamente alla risposta anticorpale nell'ambito delle infezioni da *Aspergillus*. Ciascuna di queste tecniche presenta vantaggi ma talvolta anche limitazioni. Ad esempio, la CIE risulta più sensibile e rapida

grazie all'applicazione di un voltaggio costante, ma meno specifica rispetto ad altre tecniche. Ancora non si è fatta chiarezza circa l'utilizzo del metodo di fissazione del complemento, in seguito alle problematiche contrastanti emerse relativamente alla specificità (41, 42, 43). L'IFA, risulta essere una metodica sensibile, semplice ed economica che consente di quantificare la risposta anticorpale ma che presenta scarsa specificità, legata probabilmente al metodo utilizzato per la preparazione dell'antigene. In uno studio che prevedeva la ricerca di anticorpi anti-*Aspergillus* in diverse categorie di pazienti e su soggetti appartenenti alla popolazione sana (a diverse fasce d'età) è stato evidenziato come nella popolazione normale vi sia una diffusa risposta anticorpale verso *Aspergillus* (44). In particolare, la più alta frequenza di negatività si è osservata nella classe 0-10, mentre la più bassa nella classe 40-50 (Grafico 1). Inoltre è stato messo in evidenza come sia possibile ottenere risposte crociate verso generi fungini filogeneticamente vicini ad *Aspergillus*. Infine, un approccio più recente è stato avviato con l'ELISA che presenta sensibilità maggiori rispetto alla DD e maggiore oggettività nell'interpretazione del dato sierologico. È stato inoltre messo in commercio un kit in ELISA marcato IVD che consente la determinazione quantitativa nel siero e nel plasma umano di IgG e IgM verso *Aspergillus fumigatus*.



## **ANTICORPI ANTI-*CRYPTOCOCCUS***

Non sono molti i dati riportati in letteratura relativamente alla risposta anticorpale verso *Cryptococcus* e come questa possa incidere nella diagnosi precoce delle infezioni fungine sostenute da questo micete nei pazienti trapiantati. In un interessante lavoro eseguito su pazienti trapiantati di organo solido, sono stati confrontati i titoli anticorpali verso *Cryptococcus* ottenuti al pre e post trapianto. Dai dati riportati da questi autori, erano significativamente associati allo sviluppo della criptococcosi i pazienti che presentavano al pre trapianto titoli di IgM più bassi e al post trapianto titoli di IgG e IgM più alti (45).

## **SCOPO DELLA TESI**

Scopo della tesi è stato valutare il significato che la ricerca di anticorpi verso antigeni del tubulo germinativo di *Candida albicans*, anticorpi anti-*Aspergillus* e anticorpi anti-*Cryptococcus* può avere in pazienti sottoposti a trapianto renale nell'ipotesi di poter utilizzare il dato sierologico nel complesso quadro sia diagnostico sia di sorveglianza in relazione allo sviluppo di una infezione fungina invasiva.

## **MATERIALI E METODI**

Utilizzando il sistema d'informatizzazione e di comunicazione telematica tra reparti e laboratorio è stato costruito un database di tutti i pazienti trapiantati sottoposti al monitoraggio sierologico dal 01.01.2008 al 30.09.2011.

### ***Pazienti***

Sono stati inseriti nello studio un totale di 181 pazienti sottoposti a trapianto di rene presso il Centro Trapianti all' A.O.U. Policlinico-Vittorio Emanuele di Catania per i quali sono state eseguite almeno quattro determinazioni durante il monitoraggio. Le caratteristiche demografiche dei pazienti sono riportate nella tabella 2.

### ***Monitoraggio sierologico:***

Il monitoraggio è stato effettuato a partire dal post trapianto con un intervallo di tempo compreso tra 30 e 300 giorni e prevedeva la ricerca su siero di anticorpi diretti verso il tubulo germinativo di *Candida albicans*, anticorpi anti-*Aspergillus* e anticorpi anti-*Cryptococcus* in IFA. In particolare, la ricerca degli anticorpi è stata effettuata per ciascun paziente al momento del ricovero, dopo 1 mese, a sei mesi e dopo sei mesi entro comunque i 300 giorni dal trapianto. Sono stati analizzati un

totale di 835 sieri con un numero medio per paziente pari a 4.4. Per la ricerca degli anticorpi verso il tubulo germinativo di *Candida albicans*, i dati sono stati analizzati utilizzando come cut-off di positività il titolo di 160 e di 320. Per un gruppo di pazienti (66) la ricerca degli anticorpi anti-*Aspergillus* è stata avviata oltre che in IFA, anche in ELISA, mediante dosaggio enzimatico, che prevedeva la determinazione quantitativa nel siero o nel plasma umano di IgG verso *Aspergillus fumigatus*. In base alle assorbanze ottenute e in relazione alla determinazione di una curva di calibrazione, i risultati sono stati espressi come negativi (< 12 U/ml) e positivi (> 12 U/ml). I titoli anticorpali ottenuti in questo gruppo di pazienti con entrambi i metodi, sono stati fra loro comparati. Inoltre, per i pazienti in cui sono stati ottenuti elevati titoli anticorpali in IFA, è stata avviata anche la ricerca di anticorpi precipitanti in gel di agarosio.

### ***Anticorpi anti-Candida***

Per la ricerca degli anticorpi anti-*Candida* è stato utilizzato un kit di immunofluorescenza indiretta (IFA) che permette la diagnosi sierologica di candidosi invasiva basata sulla determinazione di anticorpi IgG specifici diretti verso gli antigeni di superficie della parete cellulare della fase miceliale di *Candida albicans*. Secondo le indicazioni riportate nel kit, titoli anticorpali  $\geq 160$ , in associazione alle condizioni cliniche del paziente supportano una possibile diagnosi di candidosi invasiva. Per il rilevamento degli anticorpi ci siamo attenuti alle indicazioni fornite dal produttore. In particolare, per l'adsorbimento, 20  $\mu$ l di siero diluito 1 : 4 sono stati aggiunti in provette contenenti 80  $\mu$ l di cellule lievito di *Candida albicans*. Le provette sono state incubate in agitazione per 1 ora a temperatura ambiente. Quindi, dopo centrifugazione a 700 g per 5 minuti, il surnatante è stato utilizzato per le successive diluizioni scalari. In ogni pozzetto del vetrino sono stati dispensati 20  $\mu$ l di ciascuna diluizione più un controllo positivo e negativo. I vetrini sono stati incubati per 30 minuti a 37°C e successivamente è stato effettuato un lavaggio in PBS per 10 minuti in agitazione. Dopo aver asciugato il vetrino portaoggetti, sono stati dispensati in ogni pozzetto 20  $\mu$ l di anti-IgG umane. Quindi il vetrino è stato nuovamente incubato a 37°C per 30 minuti. Successivamente è stato effettuato un lavaggio per 10 minuti in

PBS ed uno finale di 3 minuti in acqua distillata sterile. Ai vetrini sono stati montati i vetrini copri oggetto utilizzando un liquido di montaggio a base di glicerolo e osservati a fluorescenza per il rilevamento del titolo anticorpale.

### ***Preparazione vetrini per la ricerca di anticorpi anti-Aspergillus in IFA***

Sono state eseguite diverse prove per la selezione del ceppo da utilizzare per la sensibilizzazione dei vetrini. Lo scopo è stato quello di ottenere il più alto numero di conidi germinati, ife relativamente corte e una appropriata quantità di cellule fungine in ogni pozzetto. In parallelo sono stati utilizzati un ceppo di *Apergillus flavus* 136/M, *Aspergillus fumigatus* 173/M e *Aspergillus terreus* 172/M (ceppi d'isolamento clinico). I problemi più importanti da superare hanno riguardato l'innesco della germinazione e il bilanciamento corretto dei diversi tempi per evitare la formazione di ammassi miceliali, che certamente avrebbero potuto interferire con la lettura dei risultati, e per ottenere una idonea germinazione dei conidi e una appropriata quantità di cellule fungine in ogni pozzetto del vetrino. Inizialmente la sospensione conidiale è stata effettuata sia su PBS che su PBS con lo 0,05% di Tween 20. Per l'induzione della germinazione sono stati utilizzati in parallelo BHI brodo ed RPMI-1640 (Sigma). Dai risultati ottenuti da queste prove preliminari, come ceppo per la sensibilizzazione dei vetrini è stato scelto l'*Aspergillus fumigatus*, considerando anche il fatto che esso rappresenta la specie più patogena, standardizzando la procedura di seguito descritta.

Dopo la crescita per 15 gg a 30°C su Potate Dextrose Agar (PDA) i conidi di *A. fumigatus* sono stati prelevati sterilmente mediante tampone sterile, sospesi in 90 ml di PBS + Tween 20 allo 0,05% (ICN Biomedicals) e mantenuti in agitazione a temperatura ambiente (26°C) per 12 ore. Successivamente sono stati aggiunti 10 ml di RPMI-1640 (10x-Sigma) protraendo l'incubazione in agitazione per altre 12 ore. Quindi sono stati effettuati, dopo centrifugazione a 2500 rpm per 10 minuti, due lavaggi in PBS ed uno finale in acqua distillata sterile. Il pellet ottenuto è stato risospeso in acqua bidistillata sterile in modo da ottenere una torbidità pari a 0.5 McFarland. Dopo sedimentazione spontanea per 5 minuti, dalla parte superiore della sospensione sono state prelevate aliquote di 10 µl e dispensate nei pozzetti dei vetrini per Immunofluorescenza (bioMérieux). I vetrini sono stati fissati in acetone freddo per 10 minuti e conservato in frigo.



***Adsorbimento dei sieri con conidi di *Aspergillus fumigatus* e ricerca di anticorpi anti-*Aspergillus* in IFA***

Per eliminare gli anticorpi diretti verso la parete conidiale, supportati dai dati ottenuti in un precedente studio (44), tutti i sieri saggiati sono stati inizialmente adsorbiti con i conidi dell'*Aspergillus fumigatus* utilizzato per la sensibilizzazione dei vetrini. In particolare, i conidi prelevati sterilmente dalle colture pure e sospesi in PBS sono stati inattivati al calore (1h a 80°C). Successivamente la sospensione è stata centrifugata a 2500 rpm per 10 minuti e il pellet di conidi è stato risospeso nella proporzione di 1:4 in PBS. Dopo aver diluito il siero 1/4 in PBS, ne sono stati prelevati 20 µl e aggiunti a 80 µl di sospensione conidiale con diluizione finale di 1:20. Dopo 1 ora di incubazione a temperatura ambiente in agitazione la sospensione è stata centrifugata a 5000 rpm per 5 minuti e il surnatante è stato utilizzato per le successive diluizioni scalari. In ogni pozzetto del vetrino sono stati dispensati 10 µl di ciascuna diluizione più un controllo negativo. I vetrini sono stati incubati per 30 minuti a 37°C e successivamente sono stati effettuati 2 lavaggi di sette minuti ciascuno in PBS ed un lavaggio in acqua distillata sterile. Dopo aver asciugato il vetrino portaoggetti, sono stati dispensati in ogni pozzetto 10 µl di anti-IgG umane. Quindi il vetrino è stato nuovamente incubato a 37°C per 30 minuti, e sono stati effettuati nuovamente i due

lavaggi in PBS e l'ultimo in acqua distillata sterile mantenendo gli stessi tempi. I vetrini sono stati montati con il liquido di montaggio a base di glicerolo e osservati a fluorescenza per il rilevamento del titolo anticorpale.

### ***Ricerca di IgG anti-Aspergillus fumigatus in ELISA***

Per la ricerca di anticorpi anti *Aspergillus* in ELISA è stato utilizzato un kit IVD che prevede, mediante dosaggio enzimatico, la determinazione quantitativa nel siero e nel plasma umano di IgG verso *Aspergillus fumigatus*. Per il rilevamento degli anticorpi ci si è attenuti alle indicazioni fornite dal produttore di seguito elencate:

- Diluire il siero in tampone diluente nel rapporto 1:10;
- Pipettare 100 µl di standard e campione diluito nei rispettivi pozzetti della micro piastra, coprire con pellicola adesiva e incubare per 60 minuti a 18-25°C;
- Rimuovere la pellicola adesiva, eliminare la soluzione di incubazione e lavare la piastra tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio diluito 1:10;
- Rimuovere l'eccesso di soluzione picchiando la piastra capovolta su un foglio di carta bibula e pipettare 100 µl di coniugato enzimatico in ciascun pozzetto;
- Coprire la piastra con pellicola adesiva e incubare per 30 minuti a 18-25°C;

- Rimuovere la pellicola, eliminare la soluzione di incubazione e lavare la piastra tre volte con 300  $\mu$ l di tampone di lavaggio diluito;
- Pipettare 100  $\mu$ l di soluzione substrato TMB in ogni pozzetto e incubare per 20 minuti a 18-25°C al buio;
- Fermare la reazione substrato aggiungendo 100  $\mu$ l di soluzione stop TMB in ogni pozzetto e mescolare delicatamente il contenuto agitando leggermente la piastra;
- Misurare la densità ottica con fotometro a 450 nm.

In base alle assorbanze ottenute e in relazione alla determinazione di una curva di calibrazione, i risultati sono stati espressi come negativi (< 12 U/ml) e positivi (> 12 U/ml).

### ***Ricerca di anticorpi anti-Aspergillus in DD***

I gel per la DD sono stati preparati sciogliendo 2 g di agar purificato (Oxoid) in 100 ml di acqua e aggiungendo 100 ml di buffer riscaldato a 50°C [Borace  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  - 20g/L , Acido borico - 10g/L (Sigma), EDTA - 5g/L (Applichem) e acqua distillata pH 8.2]. Quindi, 14.5 ml di gel sono stati posti in capsule di Petri sterili da 90 cm posizionate in una superficie piana in modo da ottenere uno spessore uniforme pari a 2.3 mm. Avvenuta la solidificazione sono stati praticati i fori con dei punzoni calibrati in modo da creare i pozzetti in cui successivamente sono stati dispensati gli antigeni, l'antisiero e il siero del paziente. In particolare è stato creato un pozzetto centrale di 6 mm circondato in maniera equidistante da 6 pozzetti (2 del diametro di 4 mm contenenti i controlli e 4 del diametro di 2 mm contenenti gli antigeni). Ogni campione è stato saggiato contro antigeni di *A. fumigatus* somatico e metabolico, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger* e *A. terreus*. Nei pozzetti centrali sono stati dispensati 40  $\mu\text{l}$  di siero da testare, nel pozzetto inferiore e superiore 20  $\mu\text{l}$  del controllo positivo e 16  $\mu\text{l}$  degli antigeni tal quali e della loro diluizione 1:4 nei pozzetti posti l'uno di fronte all'altro a coppie. Le piastre, quindi, sono state riposte in camera umida al buio per 3-5 giorni e quindi lette sotto un fascio di luce incidente in modo da poter evidenziare le bande di precipitazione. Nei gel in cui sono state

osservate bande di precipitazione, è stato inizialmente effettuato un lavaggio in una soluzione costituita da tetraborato e cloruro di sodio. Dopo 2-3 giorni a bagno nella soluzione di lavaggio, i gel sono stati trasferiti in un contenitore contenente acqua di rubinetto per 10 minuti, quindi sono stati mantenuti per 10 min in una soluzione contenente il 2% di glutaraldeide a scopo precauzionale e infine in acqua di rubinetto per altri 10 minuti. A questo punto i gel sono stati riposti in termostato a 30° C, coperti di uno strato bagnato di carta bibula per evitare la formazione di crepe durante la fase di asciugatura. I gel asciutti sono stati colorati con soluzione di colorazione al blu di Coomassie brillante, ossia un colorante in grado di legare le proteine in maniera molto sensibile in modo da evidenziare anche le reazioni più deboli e consentendo, tra l'altro, la conservazione a lungo termine dei vetrini ottenuti.

### ***Allestimento vetrini per la ricerca di anticorpi anti-Cryptococcus in IFA***

Per la sensibilizzazione dei vetrini per la ricerca di anticorpi anti-*Cryptococcus*, è stato utilizzato un ceppo ATCC 34873 di *Cryptococcus neoformans* proveniente dall'Istituto Superiore di Sanità. In particolare, dopo la crescita per 4 gg a 30°C su Sabouraud Dextrose Agar è stata preparata una sospensione in 100 ml di RPMI-1640 (Sigma) incubando a 35°C in agitazione per altre 24 ore. Quindi sono stati effettuati, dopo centrifugazione a 2500 rpm per 10 minuti, due lavaggi in PBS ed uno finale in acqua distillata sterile. Il pellet ottenuto è stato risospeso in acqua bidistillata sterile in modo da ottenere una torbidità pari a 1 McFarland. Sono state prelevate aliquote di 10 µl e dispensate nei pozzetti dei vetrini per Immunofluorescenza (bioMèrieux). I vetrini sono stati fissati in acetone freddo per 10 minuti e conservato in frigo. Per la ricerca degli anticorpi è stata utilizzata la stessa procedura prevista per la ricerca degli anticorpi anti-*Aspergillus*, ma saltando il passaggio dell'adsorbimento dei sieri.

## RISULTATI

Nel grafico 2 è riportata la distribuzione generali dei titoli anticorpali ottenuta per *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus*. Dalla distribuzione generale dei titoli verso *Candida* si evidenzia come nella maggior parte dei sieri analizzati sono stati riscontrati titoli minori di 20, con valore mediano per i dati compresi tra 20 e 640, pari a 40. Relativamente alla distribuzione generale dei titoli anticorpali di *Aspergillus* si evidenzia un andamento unimodale, con picco a 80 e con valore mediano dei titoli, compresi tra 20 e 1280, pari a 80. Infine, per quanto riguarda la distribuzione generale dei titoli ottenuti per *Cryptococcus*, si evidenzia un picco modale a 160 e con valore mediano dei titoli, compresi tra 20 e 1280, pari a 80. Per quanto riguarda la ricerca di anticorpi verso il tubulo germinativo di *Candida albicans*, nel 23,7% (43/181) dei pazienti sono stati osservati titoli di 160 suggestivi, secondo le indicazioni del kit in associazione ai dati clinici, per una diagnosi di candidosi invasiva probabile. Questa percentuale scendeva al 9,4% (17/181) con cut-off di positività maggiore o uguale a 320. Analizzando la risposta anticorpale verso *Candida* rispetto alle quattro determinazioni sieriche eseguite al momento del ricovero, dopo 1 mese, a 6 mesi e dopo 6 mesi, sono stati ottenuti interessanti risultati. In particolare, utilizzando il cut-off di 320, sui pazienti che alla prima determinazione presentavano titoli anticorpali



minori o uguali a 160 (173/181), è stata evidenziata, al primo mese, una percentuale di siero-positività pari al 2.9% (5/173). Analizzando i dati a 6 mesi e dopo i sei mesi tale percentuale è scesa all' 1,7% e 1,1%, quindi perfettamente in linea con quella che è la tempistica riportata circa la probabilità di sviluppare candidosi invasiva, più alta al primo mese dopo il trapianto. Infatti, nell'unico paziente in cui è stata fatta diagnosi certa di candidosi invasiva in seguito all'isolamento di *Candida albicans* dal sangue, è stato evidenziato un incremento del titolo da 20, alla prima determinazione, a 320 dopo 1 mese. Il paziente ha mantenuto il titolo  $\geq$  a 320 fino al sesto mese per cominciare a decrescere dopo i sei mesi dal trapianto (grafico 3). Infine, facendo una comparazione tra i pazienti che avevano alla prima determinazione titoli pari a 160 (17/181) e maggiori o uguale a 320 (8/181) emerge come questi ultimi, diversamente ai primi, mantengono una frequenza pressoché costante (grafico 4). Relativamente alla ricerca di anticorpi anti-*Aspergillus* in IFA, considerando che nella popolazione normale sono stati riscontrati un numero comparabile di pazienti con titoli anticorpali di 160 e 320 (grafico 1), i dati sono stati analizzati utilizzando entrambi i cut-off come soglia di positività. In particolare, nel 36% (65/181) dei pazienti sono stati osservati titoli di 160 mentre nel 24,3% (17/181) titoli  $\geq$  a 320. Analizzando, così come fatto per *Candida*, la risposta anticorpale verso

*Aspergillus* rispetto alle quattro determinazioni sieriche eseguite al momento del ricovero, dopo 1 mese, a 6 mesi e dopo 6 mesi, anche in questo caso sono stati ottenuti risultati in linea con quella che è la tempistica riportata circa la probabilità di sviluppare aspergillosi invasiva soprattutto entro i sei mesi dal trapianto. In particolare, utilizzando il cut-off di 320, sui pazienti che alla prima determinazione presentavano titoli anticorpali  $\leq$  a 160 (162/181), è stata evidenziata, al primo mese, una percentuale di siero-positività pari al 5,5% (9/173). Analizzando i dati a 6 mesi tale percentuale è aumentata all' 8,7% per poi riscendere al 3,8%, dopo i sei mesi. Di fatto, proprio nel periodo in cui si ha la maggiore probabilità di sviluppare infezione da *Aspergillus* è stato osservato un aumento della frequenza di siero-positività (da  $\leq$  a 160 a  $\geq$  di 320). Facendo una comparazione tra i pazienti che avevano alla prima determinazione titoli anticorpali pari a 160 (34/181) e  $\geq$  a 320 (19/181) emerge come questi ultimi, diversamente ai primi, mantengono una frequenza pressoché costante (grafico 5). Per quanto riguarda la ricerca di anticorpi in ELISA avviata su 66 pazienti in cui sono stati trovati a sei mesi titoli anticorpali in IFA pari a 160 (41) e  $\geq$  a 320 (25) è stata valutata una possibile associazione tra i dati ottenuti in IFA e in ELISA, considerando negativi in IFA i sieri con titoli anticorpali pari a 160. In particolare, è stata evidenziata un' associazione statisticamente

significativa ( $\chi^2=12.649$ ,  $P<0.01$ ) tra i sieri positivi in ELISA e quelli con titolo anticorpale in IFA  $\geq$  a 320 (tabella 2). Inoltre è stata ottenuta una concordanza tra IFA ed ELISA del 68,2%. Infine, relativamente alla ricerca degli anticorpi anti-*Aspergillus* in DD avviata su 5 campioni di siero in cui sono stati ottenuti a sei mesi titoli anticorpali pari a 640, in tre pazienti sono stati evidenziati anticorpi precipitanti in gel d'agarosio verso antigene metabolico e somatico di *Aspergillus fumigatus* (tabella 3).

Per quanto riguarda la ricerca di anticorpi anti-*Cryptococcus*, considerando che nella popolazione normale sono stati riscontrati diversi soggetti con titoli anticorpali di 160 e 320 e il fatto che, a differenza della ricerca di anticorpi anti-*Candida* e anticorpi anti-*Aspergillus*, il siero non è stato adsorbito prima della determinazione, i dati sono stati comparati utilizzando come soglia di positività il cut-off di 320 e 640. In particolare, nel 23,2% (42/181) dei pazienti sono stati osservati titoli anticorpali di 320 mentre nel 17,1% (31/181) titoli  $\geq$  a 640. Analizzando, la risposta anticorpale verso *Cryptococcus* rispetto al tempo (prima determinazione, dopo 1 mese, a 6 mesi e dopo 6 mesi), è stato osservato un aumento della frequenza di siero-positività dopo i sei mesi dal trapianto. In particolare, utilizzando il cut-off di 640, sui pazienti che alla

prima determinazione presentavano titoli anticorpali  $\leq$  a 320 (168/181), è stata evidenziata, al primo mese, una percentuale di siero-positività pari al 3,6% (6/168). Analizzando i dati a 6 mesi tale percentuale è scesa al 2,9% per poi risalire al 5,3%, dopo i sei mesi. Di fatto, proprio nel periodo in cui si ha la maggiore probabilità di sviluppare infezione da *Cryptococcus* è stato osservato il valore più alto della frequenza di siero-positività (da  $\leq$  a 320 a  $\geq$  di 640). Facendo una comparazione tra i pazienti che avevano alla prima determinazione titoli anticorpali pari a 160 (44/181), a 320 (31/181) e a 640 (13/181) emerge come questi ultimi, diversamente ai primi (160 e 320), mantengono una frequenza pressoché costante soprattutto a 6 mesi e dopo i 6 mesi dal trapianto (grafico 6). Infine, in un paziente sottoposto a trapianto di rene, ma purtroppo non inserito nel monitoraggio, è stata fatta diagnosi certa di criptococcosi, in seguito alla positività su siero dell'antigene criptococcico e all'isolamento in coltura, da lesioni cutanee disseminate, di *Cryptococcus neoformans*. L'infezione si è sviluppata dopo 10 mesi dal trapianto ed è stato riscontrato un titolo anticorpale pari a 1280.

## CONCLUSIONI

Le infezioni fungine invasive (IFI) nel paziente trapiantato sono in genere associate ad un alto tasso di mortalità e rappresentano, ancora oggi, una grande sfida per la difficoltà nell'effettuare una precoce ed accurata diagnosi. E' stato evidenziato come nell'ambito delle infezioni fungine si è soliti dividere il periodo post-trapianto in tre stadi, durante i quali i comuni agenti patogeni sono in grado di provocare infezioni per la presenza di particolari fattori predisponenti. Considerando in particolare i funghi che in questi stadi possono causare infezione, abbiamo valutato il ruolo che la ricerca di anticorpi verso *Candida albicans*, verso *Aspergillus* e *Cryptococcus*, potrebbero avere nella diagnosi delle infezioni fungine invasive probabile e nella gestione dei pazienti.

Innanzitutto, dall'analisi della distribuzione della frequenza relativa delle siero-positivizzazione per *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus* è emerso come, a seconda del periodo e del genere fungino considerato, vi siano variazioni ben specifiche che coincidono con quella che è la distribuzione nel tempo della probabilità di sviluppare candidosi e/o aspergillosi e/o cryptococcosi invasiva rispettivamente nel primo mese, fino a sei mesi e dopo i sei mesi dal trapianto (grafico 7). Per quanto

riguarda la ricerca degli anticorpi verso il tubulo germinativo di *Candida albicans* potrebbe essere particolarmente utile soprattutto il monitoraggio dei pazienti che alla prima determinazione hanno titoli anticorpali parecchio al di sotto del cut-off di positività, in modo da poter evidenziare un eventuale siero-positivizzazione che può, come osservato nel paziente con candidosi invasiva provata, coincidere con la diagnosi certa dell'infezione. Considerando che, solamente nel 35,3% (6/17) dei pazienti che alla prima determinazione presentavano titoli anticorpali pari a 160 si è mantenuto questo titolo (tra l'altro non superato) fino a sei mesi, e che nessuno di questi ha manifestato segni clinici di sospetta candidosi invasiva, potrebbe essere opportuno proporre una modifica del cut-off di positività da utilizzare (da 160 a 320). Inoltre, è stato evidenziato, anche se su pazienti critici ricoverati in terapia intensiva con specifici fattori di rischio, che la presenza di anticorpi verso il tubulo germinativo di *Candida* possa essere anche un fattore protettivo nei confronti dello sviluppo dell'infezione (32).

Relativamente alla ricerca di anticorpi anti-*Aspergillus*, nell'ambito delle indagini di laboratorio eseguite per il monitoraggio di pazienti dopo trapianto di polmone con diagnosi clinica di aspergillosi invasiva, è stata rilevata una buona correlazione tra la ricerca di IgG specifiche verso *A. fumigatus* e i segni radiologici, citologici e microbiologici. Nel nostro

caso specifico non abbiamo potuto valutare il ruolo diagnostico della ricerca degli anticorpi anti-*Apergillus* nell' aspergillosi invasiva in quanto non abbiamo avuto nessun caso di infezione fungina provata. Certamente, considerando i dati ottenuti nella popolazione normale e l'associazione statisticamente significativa evidenziata tra la positività in ELISA e il titolo anticorpale  $\geq$  a 320, i titoli inferiori a tale soglia possono essere considerati assolutamente nella norma. Sulla base dei dati ottenuti riteniamo che possa essere utile iniziare il monitoraggio sierologico dei pazienti con la tecnica in IFA, per la sua maggiore sensibilità e il minor costo. Nei pazienti con titoli elevati o variazione significativa rilevata in IFA associare la ricerca in ELISA, considerando la sua maggiore specificità e per particolari quadri clinici avviare anche la ricerca delle precipitine in gel di agarosio.

Per quanto riguarda la ricerca degli anticorpi anti-*Cryptococcus*, come valore soglia in IFA potrebbe essere più appropriato l'utilizzo del cut-off di 640, sia per i dati ottenuti, sia per i titoli particolarmente elevati (1280) riscontrati nel paziente con criptococcosi provata. Ad eccezione del paziente con candidosi invasiva provata in cui è stato possibile valutare come la siero-positivizzazione (da 20 a 320) sia coincisa con l'isolamento di *Candida* dall'emocoltura, nel paziente con criptococcosi non è stato possibile valutare se, anche in questo caso, l'eventuale

variazione del titolo anticorpale sarebbe coincisa con la diagnosi certa di infezione.

Alla luce di questi dati ottenuti e considerando le difficoltà nell'effettuare una diagnosi provata d'infezione fungina invasiva, ci sembra che la ricerca degli anticorpi verso *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus*, abbia ancora oggi un suo ruolo, sia dal punto di vista diagnostico, anche se con peso minore, sia per la selezione di pazienti nei quali iniziare un monitoraggio diagnostico stretto con altri marcatori o anche una profilassi. I titoli da noi proposti come cut-off per i tre generi di funghi coincidono nelle rispettive distribuzioni con il percentile 0.95; sono quelli che vengono più stabilmente mantenuti nel tempo e infine ci hanno permesso di evidenziare una distribuzione di incidenza della siero-positività sovrapponibile alla distribuzione nel tempo della probabilità di sviluppare candidosi e/o aspergillosi e/o criptococcosi invasiva rispettivamente nel primo mese, fino a sei mesi e dopo i sei mesi dal trapianto.



## **BIBLIOGRAFIA**

1. Patterson TF. New agents for treatment of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2002;35:367—9.
2. Dictar MO, Maiolo E, Alexander B, Jacob N, Veron MT. Mycoses in the transplanted patient. *Med Mycol* 2000;38:251—8.
3. Kubak, B.M. 2002. Fungal infections in lung transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* 4:S24-S31.
4. American Society of Transplant Surgeons and American Society of Transplantation. 2004. Fungal infections. *Am. J. Transplant.* 4:S110-S134.
5. Marr, K. A., Carter, R. A., Crippa, F., Wald, A. & Corey, L. 2002. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 34, 909–917.
6. Cohen J, Hopkin J, Kurtz J. Infectious complications after renal trans-plantation. In: Morris PJ, ed. *Kidney transplantation. Principles and practice.* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1988:533-73.

7. Scroggs MW, Wolfe JA, Bollinger RR, Sanfilippo F. Cause of death in renal transplant recipients: a review of autopsy findings from 1966 through 1985. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111:983-7.
8. Anandi V, John TJ, Walter A, et al. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Chaetomium globosum* in a renal transplant recipient. *J Clin Microbiol* 1989;27:2226-9.
9. Ramsey DE, Finch WT, Birtch AG. Urinary tract infections in kidney transplant recipients. *Arch Surg* 1979;114:1022-5.
10. Ho M, Dummer JS, Peterson PK, Simmons RL. Infections in solid organ transplant recipients. In: Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, eds. *Principles and practice of infectious diseases*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1990:2294-303.
11. Rubin RH, Wolfson JS, Cosimi AB, Tolkoff-Rubin NE. Infection in the renal transplant recipient. *Am J Med* 1981;70:405-11.
12. Hooper DC, Pruitt AA, Rubin RH. Central nervous system infection in the chronically immunosuppressed. *Medicine (Baltimore)* 1982;61:166-88.
30. Rifkind D, Marchioro TL, Schneck SA, Hill RB Jr. Systemic fungal infections complicating renal transplantation and immunosuppressive therapy: clinical,

microbiologic, neurologic and pathologic features. *Am J Med* 1967;43:28-38.

13. Rubin RH. Infection in the organ transplant recipient. In: Rubin RH, Young LS, eds. *Clinical approach to infection in the compromised host*. 3rd ed. New York: Plenum Publishing, 1994:629-705

14. Weiland D, Ferguson RM, Peterson PK, Snover DC, Simmons RL, Najarian J S. Aspergillosis in 25 renal transplant patients: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and management. *Ann Surg* 1983; 198:622-9

15. Gustafson TL, Schaffner W, Lavelly GB, Stratton CW, Johnson HK, Hutcheson RH Jr. Invasive aspergillosis in renal transplant recipients: correlation with corticosteroid therapy. *J Infect Dis* 1983; 148:230-8.

16. Laghi F., Yeldandi V., MacCabe M., Garrity ERJ. 1993. Common infections complicating lung transplantation. *N J Med*. 90:313-319

17. Kubak, B.M. 2002. Fungal infections in lung transplantation. *Transpl. Infect. Dis*. 4:S24-S31.

18. Fishman, J.A. and R.H. Rubin. 1998. Infection in organ-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 338:1741-1751
19. Singh N., Gayowski T., Wagener MM., Doyle H., Marino IR. 1997. Invasive fungal infections in liver transplant recipients receiving tacrolimus as the primary immunosuppressive agent. *Clin Infect Dis.* 3:203-211
20. Mari Mizuta, M.D., Emily A. Blumberg, M.D. 2005. Impact of Fungal Infections on Solid-Organ Transplant Recipients. *Clinical Microbiology Newsletter.* 27:16
21. Eggimann, P., Garbino, J. & Pittet, D. 2003. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* 3, 685–702.
22. Patel R, Portela D, Badley AD, et al. Risk factors of invasive *Candida* and non-*Candida* fungal infections after liver transplantation. *Transplantation* 1996; 62: 926–934.
23. CAHILL BC, HIBBS JR, SAVIK K, et al. *Aspergillus* airway colonization and invasive disease after lung transplantation. *Chest* 1997; 112: 1160–1164.
24. Marr, K. A., Carter, R. A., Crippa, F., Wald, A. & Corey, L. 2002. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 34, 909–917.

25. Rubin, R.H. 2002. Overview: pathogenesis of fungal infections in the organ transplant recipient. *Transpl. Infect. Dis.* 4:S12-S17.
26. Hagerty, J. A., Ortiz, J., Reich, D. & Manzarbeitia, C. (2003). Fungal infections in solid organ transplant patients. *Surg Infect (Larchmont)* 4, 263–271.
27. Singh, N., Avery, R. K., Munoz, P. & 10 other authors (2003). Trends in risk profiles for and mortality associated with invasive aspergillosis among liver transplant recipients. *Clin Infect Dis* 36, 46–52.
28. Husain, S., Alexander, B. D., Munoz, P. & 12 other authors 2003. Opportunistic mycelial fungal infections in organ transplant recipients: emerging importance of non-Aspergillus mycelial fungi. *Clin Infect Dis* 37, 221–229.
29. Moragues MD, Ortiz N, Iruretagoyena JR, Garcia-Ruiz JC, Amutio E, Rojas A, et al: Evaluation of a new commercial test (Candida albicans IFA IgG) for the serodiagnosis of invasive candidiasis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004,22:83-88.
30. Zaragoza, R., J. Pema'n, G. Quindo's, J. R. Iruretagoyena, M. Cuetara, P. Ramirez, D. Gomez, J. Camarena, A. Viudes, and J. Ponto'n on behalf of the Candida albicans Germ Tube Antibody Detection in Critically Ill Patients (CAGTAUCI) Study Group.

2009. Clinical significance of *Candida albicans* germ tube antibody detection in critically ill patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 15:592–595.
31. Pontón J, Quindós G, Arilla MC, Mackenzie DW: Simplified adsorption method for detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes. *J Clin Microbiol* 1994, 32:217-219.
32. Moragues MD, Ortiz N, Iruretagoyena JR, Garcia-Ruiz JC, Amutio E, Rojas A, et al: Evaluation of a new commercial test (*Candida albicans* IFA IgG) for the serodiagnosis of invasive candidiasis. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2004, 22:83-88.
33. Iruretagoyena JR, Regulez P, Quindós G, Pontón J: Antibodies to *Candida albicans* germ tubes in two intensive care patients with invasive candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 2000, 17:93-96.
34. Salesa R, Moragues MD, Sota R, Pemán J, Quindós G, Pontón J: Specific antibody response in a patient with *Candida dubliniensis* fungemia. *Rev Iberoam Micol* 2001, 18:42-44
35. Schaefer J.C., B. YU, and D. Amstrong. 1976. An *Aspergillus* immunodiffusion test in the early diagnosis of aspergillosis in adult leukemia patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 113:325-329.

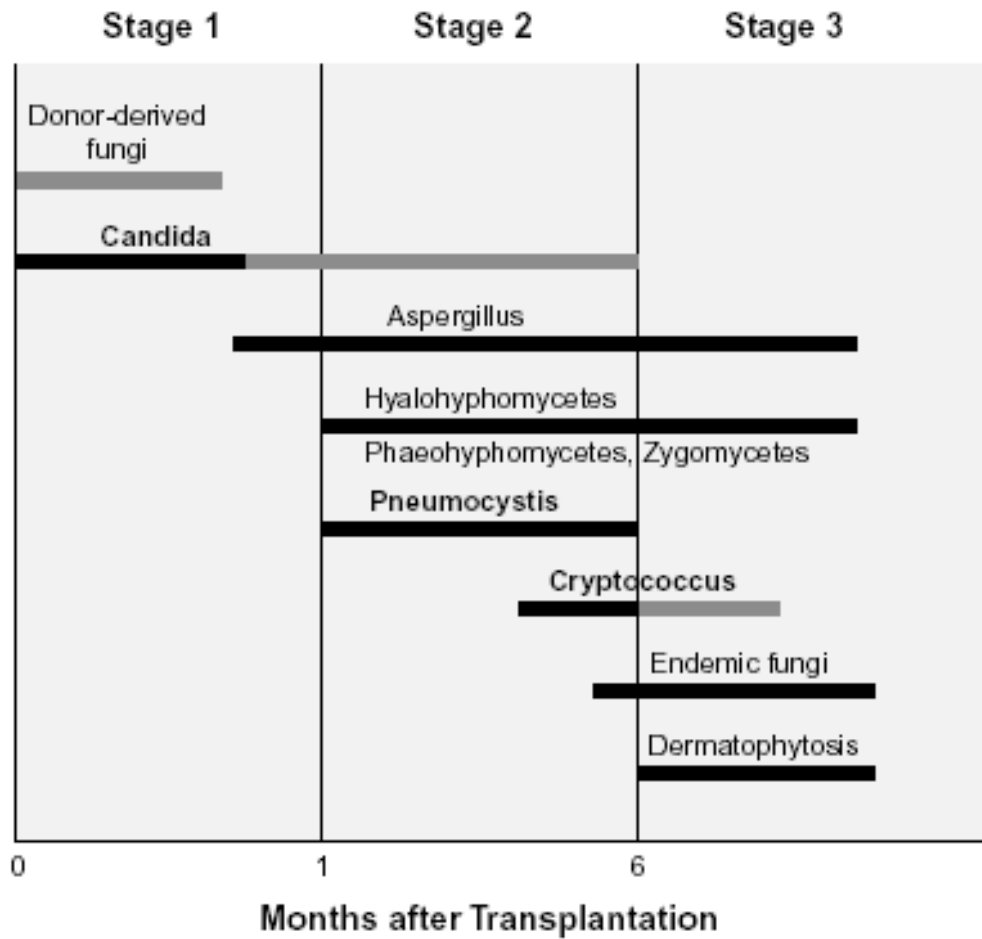
- 36.M.A. Gordon, E.W. Lapa, and J. Kane. 1977. Modified Indirect Fluorescent-Antibody Test for Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, Aug., p. 161-165, vol. 6 n°2.
- 37.D.W.R. Mackenzie, C.M. Philpot, A.G.J. Proctor. 1980. Basic Serodiagnostic Methods for Diseases caused by Fungi and Actinomycetes. Public Health Laboratory Service, n° 12.
- 38.Hamilton AJ. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis, and penicilliosis marneffeii: current status and future,trends. *Med Mycol* 1998;36:351—64.
- 39.Einsele H, Hebart H, Roller G, Loëffler J, Rothenhofer I, Muller CA, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997;35:
- 40.Edvotek. Antigen-Antibody Interaction: The Ouchterlony Procedure. P.O. Box 1232. West Bethesda.
- 41.Viswanath P. Kurup and Anoop Kumar. 1991. Immunodiagnosis of Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct., p. 439-456, vol. 4 n° 4.
- 42.Kaufman L. 1974. Serodiagnosis of fungal diseases. *Manual of clinical microbiology*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p.557-558.

43. Parker J.D., G.A. Sarosi, I.L. Doto, and F.E. Tosh. 1970.  
Pulmonary aspergillosis in sanatorium in the south central United States. *Am. Rev. Respir. Dis.* 101:551-557.
44. Baglieri R., Rapisarda M.F., Trovato L., Greco A.M., Oliveri S.  
Rilevamento di Anticorpi Anti Aspergillus mediante IFA in Diverse Tipologie Di Pazienti. Sezione Poster 35° Congresso Nazionale della SIM.
45. Ziba Jalali, Lucky Ng, Nina Singh, and Liise-anne Pirofski.  
2006. Antibody Response to Cryptococcus neoformans Capsular Polysaccharide Glucuronoxylomannan in Patients after Solid-Organ Transplantation. *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY*, July 2006, p. 740–746



## **FIGURE, TABELLE E GRAFICI**

**Figura 1.** Stadi post trapianto con i più comuni miceti patogeni in grado di provocare infezione.



**Tabella 1.** Caratteristiche demografiche dei pazienti

<b>Carat. demografiche</b>	<b>Numero</b>
<b>Maschi</b>	115
<b>Femmine</b>	66
<b>Mediana età</b>	48

**Tabella 2.** Distribuzione dei pazienti con ELISA positiva e negativa rispetto ai titoli anticorpali di 160 (IFA negativa) e  $\geq 1\ 320$  (IFA positiva) a sei mesi dal trapianto.

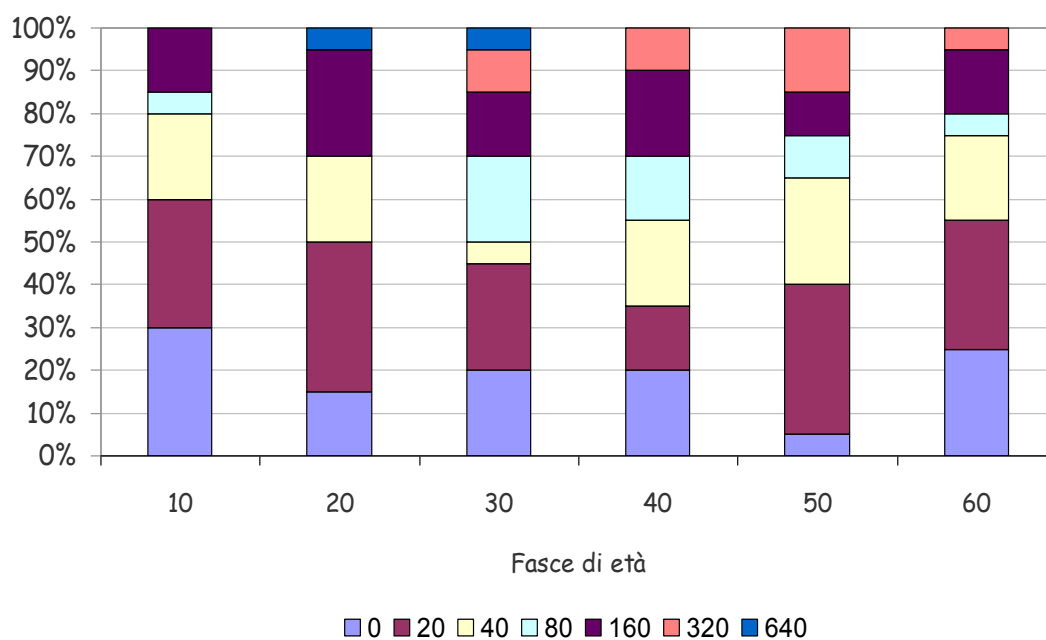
	<b>ELISA NEGATIVA</b>	<b>ELISA POSITIVA</b>
<b>IFA NEGATIVA (titolo 160)</b>	23	18
<b>IFA POSITIVA (titolo <math>\geq 320</math>)</b>	3	22
<b>TOTALE</b>	26	40

$\chi^2=12.649$ ,  $P<0.001$

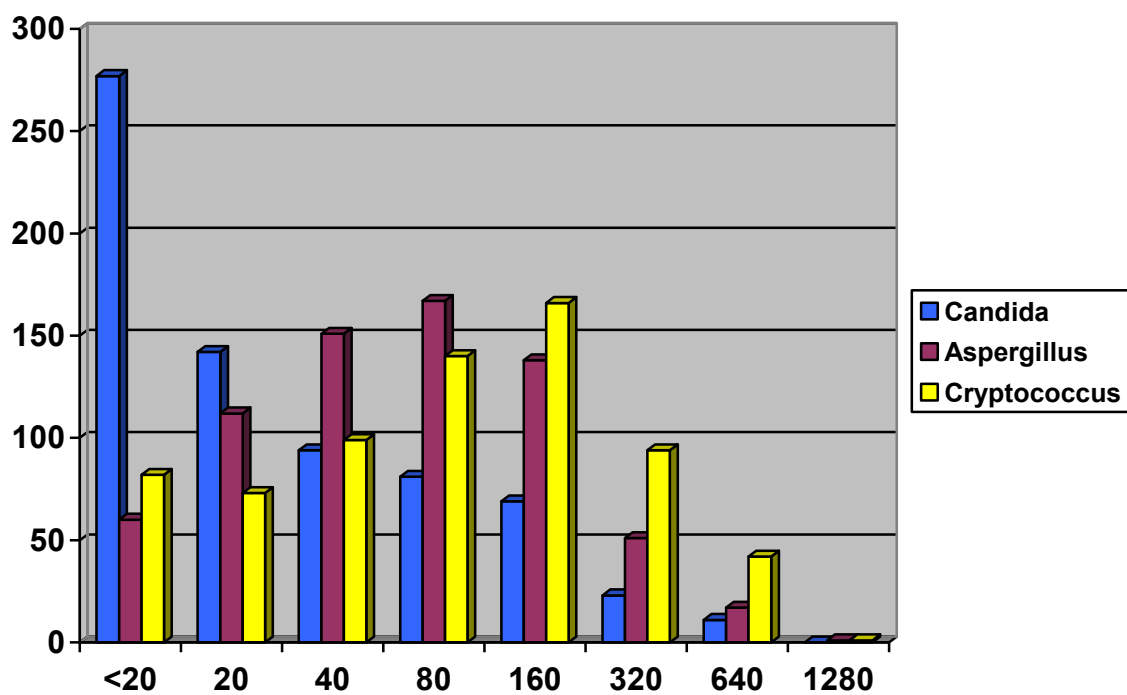
**Tabella 3.** Risultati di DD ottenuti in 5 pazienti con titolo anticorpale di 640.

	<b>DOPPIA DIFFUSIONE (DD)</b>					
<b>IFA</b>	<i>A.fumigatus</i> somatico	<i>A.fumigatus</i> metabolico	<i>A.flavus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A.niger</i>	<i>A.terreus</i>
<b>Paziente 1 640</b>	(- - - -)	(- - - -)	(- - - -)	(- - - -)	(- - - -)	(- - - -)
<b>Paziente 2 640</b>	(+ + - -)	(+ + - -)	(- - - -)	(- - - -)	(- - - -)	(- - - -)
<b>Paziente 3 640</b>	(- - - -)	(- - - -)	(- - - -)	(- - - -)	(- - - -)	(- - - -)
<b>Paziente 4 640</b>	(+ - - -)	(+ - - -)	(- - - -)	(- - - -)	(- - - -)	(- - - -)
<b>Paziente 5 640</b>	(+ - - -)	(+ - - -)	(- - - -)	(- - - -)	(- - - -)	(- - - -)

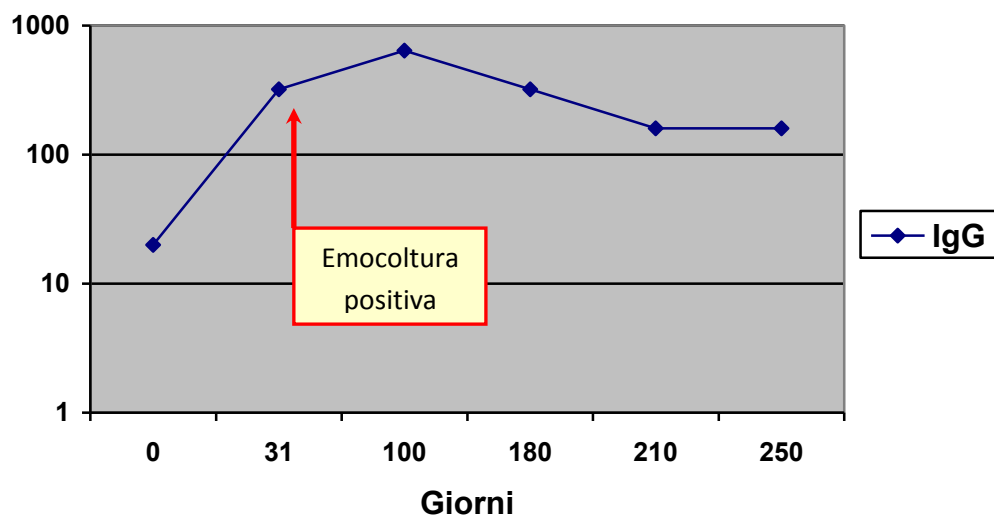
Grafico 1. Distribuzione dei titoli anti-*Aspergillus* per fasce d'età



**Grafico 2.** Distribuzione generali dei titoli anticorpali ottenuta per *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus*

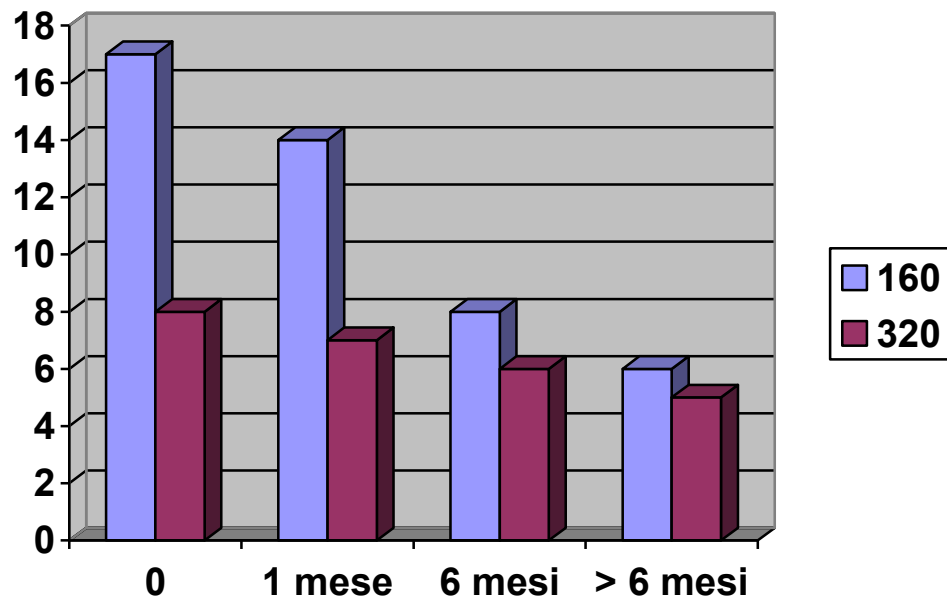


**Grafico 3.** Andamento del titolo anticorpale nel paziente con candidemia da *Candida albicans*

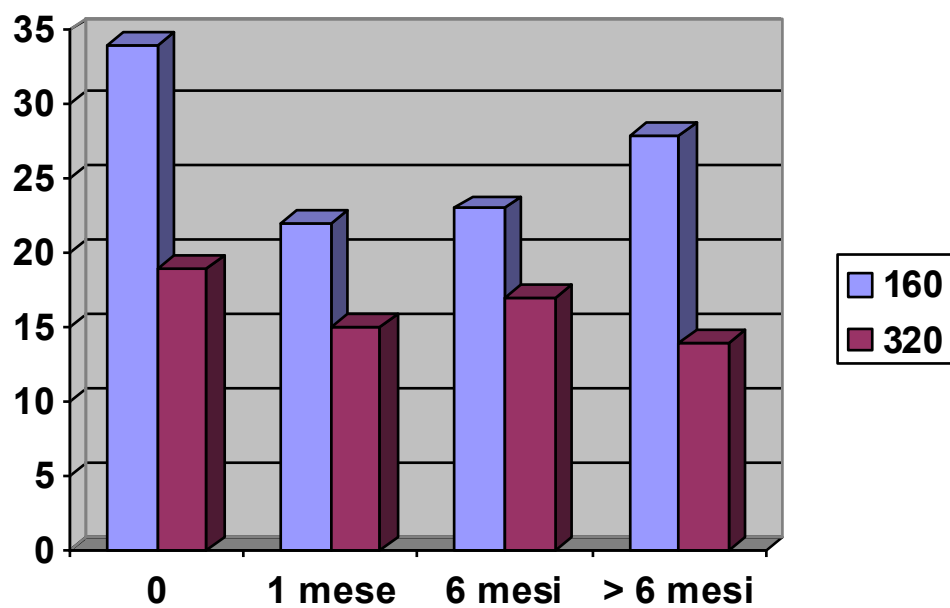




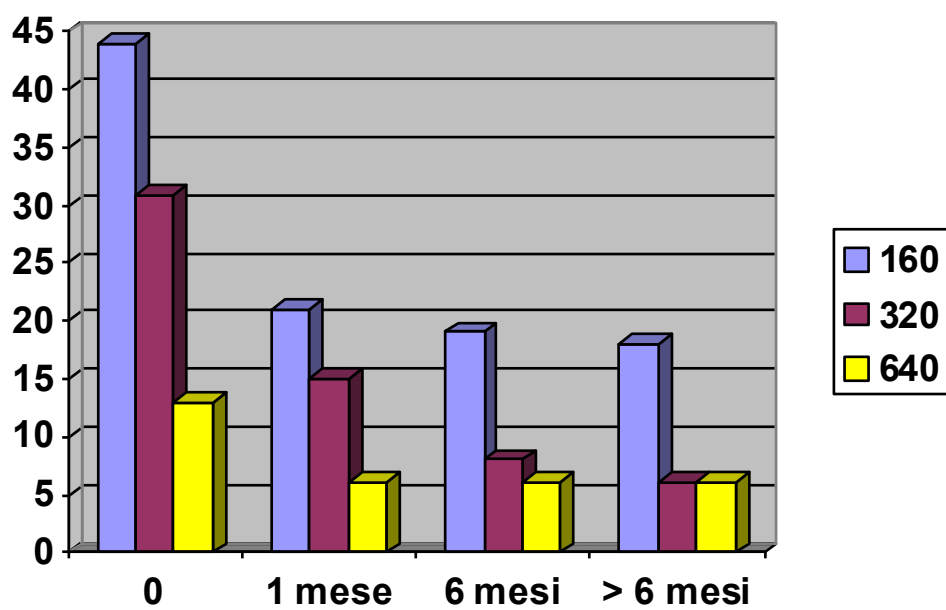
**Grafico 4.** Variazione della frequenza assoluta dei pazienti che alla prima determinazione presentano titolo anticorpale verso *Candida* di 160 e  $\geq 320$  dalla prima determinazione a dopo 6 mesi.



**Grafico 5.** Variazione della frequenza assoluta dei pazienti che alla prima determinazione presentano titolo anticorpale verso *Aspergillus* di 160 e  $\geq$  a 320 dalla prima determinazione a quella eseguita dopo 6 mesi.



**Grafico 6.** Variazione della frequenza assoluta dei pazienti che alla prima determinazione presentano titolo anticorpale verso *Cryptococcus* di 160, 320 e 640 dalla prima determinazione a quella eseguita dopo 6 mesi.



**Grafico 7 .** Distribuzione della frequenza relativa delle sieropositivizzazione per *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus*

