

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	2
Epidemiologia delle infezioni fungine invasive.....	5
Fattori di rischio per lo sviluppo di candidosi invasiva.....	7
Definizione e diagnosi di infezione fungina invasiva certa e probabile.....	10
(1-3)- $\beta$ -D-GLUCANO .....	13
Antigene e anticorpi anti-mannano di <i>Candida</i> .....	15
Anticorpi verso il tubulo germinativo di <i>Candida albicans</i> .....	17
<b>SCOPO DELLA TESI</b> .....	20
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	21
<b>RISULTATI</b> .....	30
<b>CONCLUSIONI</b> .....	35
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	38
<b>TABELLE, FIGURE E GRAFICI</b> .....	48

## INTRODUZIONE

L'incidenza delle infezioni fungine invasive (IFI) è aumentata notevolmente negli ultimi anni soprattutto nei pazienti critici e immunodepressi in seguito all'aumento del numero di fattori di rischio che predispongono a tali infezioni per lo più opportunistiche. Tra i pazienti a più alto rischio di sviluppo di IFI vanno certamente considerati i trapiantati di organo solido e di midollo, i pazienti neutropenici con leucemia sottoposti a terapia con chemioterapici, neonati pretermine, pazienti riceventi corticosteroidi e pazienti con sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) (1,2).

Oltre alla patologia di base, anche altri fattori ad essa associati quali la presenza di catetere venoso centrale, l'emodialisi la nutrizione parenterale, la ventilazione meccanica, la chirurgia addominale, la somministrazione di antibiotici ad ampio spettro, predispongono maggiormente all'insorgenza di IFI (3).

I lieviti, ed in particolare quelli appartenenti al genere *Candida*, rappresentano i più comuni agenti responsabili di micosi nell'uomo. Le infezioni provocate da questo fungo presentano gravità differenti che vanno dalle forme mucocutanee alle candidosi invasive (CI) che possono successivamente coinvolgere i vari organi.

L'incidenza della CI, in particolare della candidemia, è aumentata significativamente negli ultimi anni e *Candida* occupa il quarto posto tra gli agenti eziologici isolati da colture di sangue negli Stati Uniti (4). In Europa si colloca tra i dieci patogeni più frequentemente isolati (5). La candidemia presenta un alto tasso di morbilità e mortalità che raggiunge il 50-60% nei pazienti che presentano particolari condizioni cliniche, sebbene la mortalità attribuibile può essere sostanzialmente inferiore (6,7). Diversi sono gli studi avviati per valutare la mortalità nei pazienti con candidosi invasiva che complessivamente risulta essere molto alta: 42.6% nell' EPIC II study (8), 35.2% nello studio PATH (9), 37.9% nell'ECMM study (10) e 53.4% nei pazienti non ricoverati in Unità di Terapia Intensiva (UTI) rispetto all' 85.9% evidenziato per quelli ricoverati in terapia intensiva come riportato nello SCOPE study (11). Inoltre, nello studio PATH, è stata riportata la più alta mortalità per i pazienti che presentavano infezione fungina invasiva da *Candida krusei* (52.9%) e la più bassa per quelli con infezione da *Candida parapsilosis* (23.7%); mortalità intermedie sono state evidenziate per *Candida albicans* (35.6%), *Candida glabrata* (38.1%) e *Candida tropicalis* (41.1%) (9). Differenze simili sono state riportate anche da altri studi (10). In definitiva, la mortalità attribuibile alla candidemia varia dal 5 al 49% a seconda del tipo di studio (retrospettivo vs prospettivo), dei

pazienti (UTI vs non UTI) e dei presidi ospedalieri (12). Naturalmente una sostanziale differenza della mortalità è stata riportata tra i pazienti che ricevono un'appropriate terapia antifungina (<5%) rispetto a quelli con shock settico in cui non è stato avviato un appropriato trattamento antifungino (13)

## EPIDEMIOLOGIA DELLE INFEZIONI FUNGINE INVASIVE

Le IFI mostrano tre indiscutibili caratteristiche epidemiologiche generali:

- a) l'aspergillosi è la più comune infezione fungina invasiva nel paziente con malattie ematologiche in seguito all'elevato grado di neutropenia evidenziato in questa tipologia di pazienti;
- b) la candidosi è la più comune infezione fungina nel paziente critico non neutropenico;
- c) infezioni fungine da patogeni emergenti che stanno diventando significativamente prevalenti in alcuni gruppi di pazienti.

Nei pazienti immunocompromessi ed in particolare in quelli con malattie ematologiche, l'uso diffuso di antimicotici come il fluconazolo in profilassi o la somministrazione di altri antifungini nelle terapie empiriche hanno contribuito alla diminuzione del numero di infezioni causate da *Candida* a favore delle infezioni causate da funghi filamentosi (14,15). Al contrario, i pazienti con grave multipla comorbidità sottoposti a chirurgia gastrointestinale o ricoverati in UTI costituiscono oggi la più grande popolazione a rischio di sviluppare candidemia (16). *Candida albicans* rappresenta la specie più frequentemente isolata ed è responsabile di più della metà dei casi di candidemia, anche se l'incidenza di altre specie "non *albicans*" è in aumento (17,18). In particolare, è stato evidenziato un aumento

dell'isolamento di queste specie soprattutto in pazienti adulti ricoverati in UTI dove sono responsabili di più del 50% delle candidemie. Tra le specie di *Candida* non *albicans* più comunemente isolate vi sono *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata*, seguite da *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (19 ,20 ). Rare specie riportate come causa di candidemia includono *Candida lusitaniae*, *Candida guilliermondii* e *Candida rugosa* (21 ,22). Nella tabella 1 sono riportati i fattori che, oltre alla somministrazione di fluconazolo in profilassi, hanno potuto contribuire alla variazione del trend epidemiologico. L'aumento dell'incidenza complessiva delle specie non *albicans* si riflette soprattutto nelle problematiche connesse alla resistenza che molte di queste specie, ed in particolare *Candida glabrata* e *Candida krusei*, presentano verso comuni farmaci antifungini utilizzati in profilassi. Pertanto, l'identificazione e la conoscenza dell'epidemiologia locale delle candidemie causate dalle diverse specie di *Candida* è fondamentale per poter guidare un appropriata terapia empirica.

## **FATTORI DI RISCHIO PER LO SVILUPPO DI CANDIDOSI INVASIVA**

La principale sorgente di infezione invasiva da *Candida* è quella endogena infatti, a partire dalla colonizzazione della cute e delle mucose, *Candida* può disseminare per via ematogena fino a raggiungere successivamente i diversi organi (23). Sono comunque stati riportati anche diversi casi di trasmissione esogena a partire da materiali contaminati (cateteri, protesi, etc.) o dal personale ospedaliero che può veicolare l'infezione da paziente a paziente (24, 25 ).

La somministrazione di terapia antibiotica ad ampio spettro determina la soppressione della normale flora batterica del tratto gastrointestinale favorendo di fatto la proliferazione di *Candida* e determinando un aumento dell'intensità di colonizzazione che risulta essere uno dei fattori di rischio indipendenti associati allo sviluppo di candidosi invasiva (23 26, 27). In particolare, l'indice di colonizzazione (CI) da *Candida* studiato nel 1994 da Pittet in una popolazione chirurgica con l'obiettivo di predire i pazienti che avrebbero sviluppato la candidosi invasiva è stato utilizzato come base per l'avvio di una terapia pre-emptive ( 27 , 28). Successivamente nel 2006 Leon ha studiato e pubblicato dati relativi ad un sistema di punteggio definito "candida score" utilizzato per

selezionare i pazienti nei quali sarebbe stato utile avviare un precoce trattamento antifungino (29). Tale sistema è stato successivamente convalidato attraverso uno studio prospettico multicentrico che includeva 1107 pazienti ricoverati in terapia intensiva per almeno sette giorni (30). In particolare il *Candida* score prevedeva i seguenti calcoli:

- 1 punto per la presenza di nutrizione parenterale, chirurgia e colonizzazione multifocale da *Candida*;
- 2 punti per la presenza di sepsi severa;

Nei pazienti con candida score < 3 l'incidenza della candidosi invasiva era pari al 2,3% permettendo di fatto la sospensione del trattamento antifungino avviato empiricamente. Al contrario, uno dei quattro pazienti con candida score > 5 sviluppava candidosi invasiva. Un altro punteggio clinico di predizione del rischio di sviluppo di candidosi invasiva è stato studiato da Ostrosky-Zeichner e collaboratori. In questo studio, il trattamento antibiotico sistemico o la presenza del catetere venoso centrale, combinato con due o più di cinque fattori addizionali (nutrizione parenterale, dialisi, chirurgia maggiore, pancreatite, trattamento con steroidi o altri agenti immunosoppressivi) erano in grado di identificare i pazienti con candidemia con elevati valori di predittività negativa (31). Quindi certamente l'identificazione di specifici fattori di



rischio ha certamente contribuito alla selezione di pazienti ad alta probabilità di sviluppo di infezioni fungine invasive.

## **DEFINIZIONE E DIAGNOSI DI INFEZIONE FUNGINA INVASIVA CERTA E PROBABILE**

Nel 2008 sono state riviste e pubblicate dall' 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) le definizioni di infezione fungina invasiva certa e probabile nel paziente con malattie ematologiche. Nella tabella 1 sono riportati i criteri che definiscono un'infezione fungina certa (32). In particolare, tale diagnosi si basa principalmente sui due esami di laboratorio che rappresentano ancora oggi il fondamento della diagnostica micologica ovvero l'esame microscopico e l'isolamento in coltura da siti sterili ed in particolare dal sangue. In effetti l'emocoltura rappresenta ancora oggi il cardine per la diagnosi di candidemia nonostante le problematiche connesse alla sua bassa sensibilità attribuibile a diversi fattori tra cui:

- modalità del prelievo (n° di prelievi, tempistica e volume di sangue prelevato);
- permanenza di candida nel sangue;
- metodo utilizzato per l'esecuzione dell'emocoltura.

Oltre alle problematiche connesse alla sensibilità anche i tempi necessari alla moltiplicazione e identificazione di *Candida* nell'emocoltura hanno un impatto abbastanza rilevante considerando che il ritardo nell'inizio della terapia antifungina mirata aumenta notevolmente la mortalità. Diversi passi avanti sono stati fatti per cercare di limitare al massimo i tempi di risposta del laboratorio in modo da poter contribuire all'inizio precoce di una terapia mirata. In particolare, il sistema MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry) basato sulla spettrometria di massa è stato utilizzato inizialmente per l'identificazione rapida di diversi microrganismi tra cui i lieviti isolati in terreno solido (33, 34). Recentemente è stato utilizzato per identificare direttamente i lieviti dal flacone dell'emocoltura ottenendo ottimi risultati relativamente ai tempi di identificazione che sono stati di circa 1 ora (35). Inoltre è stata ottenuta una perfetta sovrapposibilità tra l'identificazione avviata con questo metodo e quella ottenuta utilizzando i metodi standard per l'identificazione, ovvero l'API ID 32 e il sequenziamento (35). Quando ci si sposta nell'ambito della diagnosi delle infezioni fungine definite probabili, oltre a considerare le condizioni cliniche del paziente, molti test di laboratorio sono oggi disponibili a supporto di tale diagnosi. In particolare, oltre alla microscopia e alla coltura oggi è possibile ricercare in diversi campioni

clinici l'antigene 1,3- beta-D-glucano e l'antigene galattomannano di *Aspergillus*. Inoltre, anche se non ancora inseriti tra i criteri per la diagnosi probabile di candidosi invasiva, la ricerca dell'antigene mannano di *Candida* associato alla ricerca di anticorpi anti mannano o anticorpi verso la fase miceliale di *Candida* si sono rivelati ottimi test che possono contribuire a tale diagnosi.

### **(1-3)- $\beta$ -D-GLUCANO**

L' (1-3)- $\beta$ -D-glucano è un componente della parete cellulare di molti funghi ad eccezione di zigomiceti e *Cryptococcus*. Si tratta quindi di un antigene pun-fungineo in grado di evidenziare e supportare la diagnosi di diverse infezioni fungine invasive sistemiche, tra cui *Candida*, *Aspergillus* e *P.jirovecii*. Infatti, pare non vi sia nessuna considerevole differenza della sensibilità per il rilevamento delle infezioni invasive da *Candida* e da *Aspergillus* (36). La ricerca di questo antigene viene avviata soprattutto per la sua elevata precocità (circa 14 giorni prima rispetto alla positività dell'emocoltura) e per il suo elevato valore predittivo negativo. Non sono ancora stati chiariti i criteri per la definizione di un risultato positivo al test ma molti studi cominciano a dare peso anche al valore di predittività positiva. In particolare è stato evidenziato come, rispetto al cut-off di positività stabilito per 80 pg/ml, l'utilizzo di un cut-off più elevato (160 pg/ml) abbia un'alta predittività per la candidemia (37). Ancora, l'utilizzo di questo test per il monitoraggio bisettimanale di pazienti critici ricoverati in UTI e pazienti con malattie ematologiche possa essere utile ai fini di una diagnosi precoce e per l'individuazione di eventuali risultati falsi positivi. Infatti molti sono i possibili fattori influenzanti la determinazione dell'(1-3)-beta-D-glucano tra cui: Emodialisi con

membrana di cellulosa, somministrazione di immunoglobuline o albumina, uso di antibiotici, sepsi batteriche, uso di garze, severa mucosite, campioni di siero bemozzati (36 ).

## **ANTIGENE E ANTICORPI ANTI-MANNANO DI *CANDIDA***

La ricerca dell'antigene mannano a supporto di una diagnosi di candidosi invasiva probabile ha trovato meno applicazione nella pratica clinica in seguito alle problematiche connesse alla sensibilità e specificità. I problemi legati alla sensibilità della ricerca di tale antigene sono stati in parte superati con l'introduzione in commercio di un kit in ELISA, che prevede il dosaggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa o semi-quantitativa dell'antigene mannano di *Candida* e rispetto al metodo in agglutinazione, ha dato risultati nettamente superiori. In una review che racchiude 14 lavori dal 1999 al 2009 sull'utilizzo di questo antigene da solo o in combinazione alla ricerca di anticorpi anti-mannano per la diagnosi di candidosi invasiva in pazienti con malattie ematologiche, sono stati riportati valori di sensibilità e specificità pari al 58 e 93% (38). Relativamente alla sensibilità non si può non considerare che essa varia in funzione delle diverse specie di *Candida*. In particolare risulta essere più bassa per *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*. Inoltre si deve tenere in considerazione come la sensibilità del test varia in presenza di anticorpi anti *Candida*. Infatti questo test ha trovato un buon riscontro per la diagnosi di candidosi invasiva probabile nei nati-pretermine, essendo essi privi di anticorpi anti-*Candida* in seguito all'imaturità del sistema immunitario (39).

Comunque, per cercare di superare le problematiche connesse alla sensibilità è stato introdotto in commercio un nuovo kit in ELISA in cui viene abbassato il cut-off di positività da 25 ng/ml a 62.5 pg/ml. Anche se, in un lavoro recentemente pubblicato in cui vengono confrontati i risultati della ricerca dell'antigene mannano di candida ottenuti con i due kit su pazienti con candidosi provata, non si evince nessuna differenze significativa in termini di sensibilità e tempo di rilevamento. Inoltre, è stata evidenziata una riduzione del 50% della specificità, probabilmente in seguito alla possibilità di poter rilevare l'antigene mannano con il nuovo kit anche nei pazienti con candidosi superficiali (40). Certamente l'associazione tra la ricerca dell'antigene mannano con gli anticorpi anti-mannano ha determinato un aumento della sensibilità e specificità relativamente alla diagnosi probabile di candidosi invasiva. In particolare sono stati riportati valori di sensibilità e specificità pari all'83% e 86% rispettivamente (38).



## **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 pari a 84.4 e 94.7% rispettivamente e in associazione alle condizioni cliniche del paziente un titolo anticorpale  $\geq 160$  può supportare la diagnosi di candidosi invasiva probabile (41).

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 (42).

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 (43). 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* (43, 44, 45, 46). In definitiva, considerando le

problematiche connesse alla possibilità di non 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 sia in pazienti con malattie ematologiche, sia nei trapiantati, sia in quelli ricoverati in terapia intensiva che presentano specifici fattori di rischio per lo sviluppo di infezione.

## **SCOPO DELLA TESI**

Scopo della tesi è stato valutare il ruolo diagnostico della ricerca di anticorpi verso antigeni del tubulo germinativo di *C. albicans* in diverse tipologie di pazienti a rischio per lo sviluppo di candidosi invasiva. In particolare, sono stati reclutati pazienti sottoposti a trapianto di rene (TRAP), pazienti critici ricoverati presso l'Unità di Terapia Intensiva (UTI) e pazienti oncoematologici (EMAT) che presentavano fattori di rischio compatibili con l'eventuale sviluppo di candidosi 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 sottoposti al monitoraggio sierologico dal 01.01.2011 al 30.09.2011.

### ***Pazienti***

Sono stati selezionati e inseriti nello studio un totale di 124 pazienti afferenti all' A.O.U. Policlinico- Vittorio Emanuele di Catania per i quali sono state eseguite almeno due determinazioni durante il monitoraggio. In particolare, 53 pazienti ricoverati in UTI, 36 pazienti con malattie ematologiche (EMAT) e 35 pazienti trapiantati di rene (TRAP). Le caratteristiche demografiche dei pazienti sono riportate nella tabella 2.

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

Per i pazienti ricoverati in UTI, il monitoraggio è stato effettuato due volte la settimana su pazienti che presentavano fattori di rischio per lo sviluppo di candidosi invasiva attraverso la ricerca su siero di anticorpi diretti verso il tubulo germinativo di *Candida albicans* e lo studio della colonizzazione mediante l'esecuzione di colture di sorveglianza su

tampone faringeo o aspirato bronchiale, urine e tampone rettale. Per i pazienti ricoverati in Ematologia, non sono state eseguite colture di sorveglianza ma è stata valutata solamente la risposta anticorpale. Infine, per i pazienti sottoposti a trapianto di rene il monitoraggio è stato effettuato a partire dal post trapianto con un intervallo di tempo compreso tra 30 e 60 giorni. Per lo studio della colonizzazione sono state eseguite indagini micologiche su tampone faringeo, urine ed è stato inoltre analizzato il liquido di trasporto del rene. Per tutti i pazienti, sulla base delle condizioni cliniche, sono state eseguite emocolture secondo le procedure standard. Sono stati analizzati per la ricerca degli anticorpi verso il tubulo germinativo di *Candida albicans* un totale di 543 sieri con un numero medio per paziente pari a 5.2 in EMAT, 5.7 in UTI e 2.5 nei trapiantati di rene. I dati sono stati analizzati utilizzando come cut-off di positività 160 e 320.

### ***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  $\frac{1}{4}$  sono stati aggiunti in provette contenenti 80  $\mu$ l di cellule lievito di *Candida albicans*. Le provette sono state incubate per 1 ora in agitazione 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, è stato successivamente effettuato un lavaggio per 10 minuti in

PBS ed uno finale di 3 minuti in acqua distillata sterile. I vetrini sono stati montati con il liquido di montaggio a base di glicerolo e osservati a fluorescenza per il rilevamento del titolo anticorpale.



### ***Trattamento aspirato bronchiale***

L'aspirato bronchiale è stato inizialmente fluidificato con N-acetil-L-cisteina (NAC) in rapporto 1:1. In particolare, dopo l'aggiunta del fluidificante le provette sono state agitate mediante vortex e poste in frigorifero per almeno 10 minuti in modo da far avvenire la fluidificazione. Quindi sono state nuovamente agitate al vortex e centrifugate per 15 minuti a 3000 rpm. . Il surnatante è stato eliminato e il pellet risospeso soluzione salina sterile. Dopo centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti, il pellet è stato seminato in su agar Sabouraud (SAB) al 2% di glucosio ed è stato allestito un vetrino per l'osservazione a fresco.

Le piastre sono state incubate a 30°C per almeno 10 giorni.

### *Trattamento tampone faringeo e tampone rettale*

Per entrambi i campioni clinici è stata eseguita la medesima procedura.

In particolare, il tampone è stato sospeso in 0,5 ml di soluzione salina sterile e quindi un'aliquota di 50µl è stata seminata su agar Sabouraud (SAB) al 2% di glucosio ed è stato allestito un vetrino per l'osservazione a fresco.

Le piastre sono state incubate a 30°C per almeno sette giorni.

### ***Trattamento urine***

Per le urine è stata innanzitutto effettuata la semina di 10 µl di campione tal quale (in modo da poter risalire alla carica micotica presente nel campione) su piastre di Petri da 90 mm contenente *Candida* BCG agar da noi così modificato: destrosio 2% (Oxoid), peptone micologico 1% (Oxoid), estratto di lievito 0,1% (Oxoid), agar batteriologico N.1 (Oxoid) 1,5%, verde di bromocresolo (Sigma) 0,002%, cloramfenicolo (Sigma) 0,005%, gentamicina (ICN) 0,002%. L'utilizzo di questo terreno consente una differenziazione macroscopica delle colonie di *Candida*, grazie alla presenza dell'indicatore verde di bromocresolo.

Successivamente le urine sono state centrifugate a 3500 rpm per 10 minuti e 10µl di sedimento sono state seminate sempre in BCG Agar.

Sono stati allestiti preparati microscopi sia dalle urine tal quali che dal sedimento. Entrambe le piastre sono state incubate a 35°C per 1 settimana.

### *Trattamento liquido di trasporto del rene*

Il liquido di trasporto del rene è stato trasferito in 3 provette da 15 ml e centrifugato a 3500 rpm per 10 minuti. Quindi 50 µl di sedimento ottenuto da ciascuna provetta è stato seminato in BCG Agar e le piastre sono state incubate a 35°C per almeno sette giorni.

### ***Identificazione dei ceppi isolati***

L'identificazione dei ceppi è stata effettuata mediante il saggio di produzione del tubulo germinativo, l'allestimento della microcoltura su vetrino e il sistema API ID 32 C (bioMerieux).

Il saggio di produzione del tubulo germinativo è una metodica molto rapida che può essere utilizzata per un'identificazione presuntiva di *Candida albicans*. L'esecuzione del saggio prevede l'inoculo, in 0.5 ml di siero bovino fetale sterile, di una porzione di colonia ben isolata in piastra di SAB e l'incubazione a 37°C per circa due ore. Un'aliquota della sospensione viene posta su vetrino portaoggetto e osservata al microscopio.

L'allestimento della microcoltura su vetrino su Corn meal agar e Rice extract agar addizionati rispettivamente con lo 0.5% e lo 0.3% di tween 80, permette di evidenziare le caratteristiche micromorfologiche delle colonie dei lieviti fornendo indicazioni sulla identificazione presuntiva.

Per l'identificazione definitiva della specie si è proceduto all'utilizzo del sistema API ID 32 C che prevede l'identificazione mediante 32 test di assimilazione standardizzati e miniaturizzati.

## **RISULTATI**

Dalla distribuzione generale dei titoli anticorpali ottenuta nelle tre categorie di pazienti si evidenzia un andamento bimodale, con un picco a 20 e uno a 160 e con valore mediano dei titoli, compresi tra 20 e 1280, pari a 80 (grafico 1). In particolare, nella categoria dei pazienti ricoverati in UTI è stato evidenziato il più alto numero di determinazioni con elevati titoli anticorpali (mediana, 320), seguita dai pazienti ricoverati in EMAT (mediana, 80) ed infine dai pazienti trapiantati (mediana, 40). La distribuzione dei titoli anticorpali ottenuta nelle tre categorie di pazienti è riportata nel grafico 2. Nel 69,8% (37/53) dei pazienti ricoverati in UTI sono stati osservati titoli anticorpali di 160 suggestivi, secondo le direttive del kit, per una diagnosi di candidosi invasiva probabile in associazione ai dati clinici. Questa percentuale scendeva al 56,6% (30/53) con cut-off di positività maggiore o uguale a 320. Inoltre, il 67,5% (25/37) dei pazienti UTI aveva titoli anticorpali  $\geq 160$  al momento dell'arruolamento nello studio, mentre il 32,4% (12/37) li raggiungeva nel corso del monitoraggio. Nei pazienti ematologici, la percentuale di positività è stata del 47,2% (17/36) con cut-off di 160 e 25% (9/36) con cut-off di 320. La percentuale di pazienti EMAT con titoli  $\geq 160$  al momento dell'arruolamento è stata del 53% (9/17) quindi quasi sovrapponibile al gruppo di pazienti (8/17) che raggiungevano tali titoli

durante il monitoraggio. Infine, nei pazienti trapiantati è stato osservato il più basso numero di pazienti positivi con entrambi i cut-off (28,5% e 14,2%). Di questi pazienti, il 60% (6/10) aveva titoli  $\geq$  a 160 già al primo controllo sierologico. Nel grafico 3 è riportata la distribuzione dei pazienti positivi con entrambi i cut-off. Solamente in due pazienti ricoverati in UTI è stata fatta diagnosi di candidosi invasiva certa in seguito all'isolamento dal sangue rispettivamente di *Candida albicans* e *Candida guilliermondi*. In particolare, nel paziente con candidemia da *Candida albicans* sono stati riscontrati titoli anticorpali  $\geq$  640 solamente dopo una settimana dall'isolamento di *Candida* dal sangue (grafico 4). In questo paziente il test di laboratorio che si è dimostrato più precoce rispetto alla risposta anticorpale e all'isolamento di *Candida* dall'emocoltura, è stato l'antigene (1-3)- $\beta$ -D-glucano che è risultato positivo una settimana prima della diagnosi provata di candidosi invasiva. Nel paziente con candidemia da *Candida guilliermondii* non sono stati evidenziati titoli anticorpali  $\geq$  160 neanche dopo la diagnosi di candidosi invasiva (grafico 5). Sulla base di criteri clinici (32) e microbiologici (due consecutive positività all'antigene (1-3)- $\beta$ -D-glucano più DNA fungino positivo), sono stati individuati 13/53 pazienti UTI e 13/36 pazienti EMAT con candidosi invasiva probabile. Dall'analisi dei dati relativa ai pazienti UTI con candidosi invasiva

provata e probabile (15) e senza candidosi (38) è stata ottenuta una sensibilità e specificità della ricerca di anticorpi anti-Candida con cut-off di 160 pari a 80% e 34,2%, con valore predittivo positivo (VPP) e negativo (VPN) di 35,4% e 81,2% rispettivamente. Utilizzando il cut-off di 320 sono stati ottenuti valori di sensibilità e specificità pari a 80% e 52,6% con VPP e VPN di 40% e 87%. Inoltre l'uso del cut-off a 320 è risultato significativamente associato ( $\chi^2=4,662$ ,  $P<0.05$ ) allo sviluppo di candidosi invasiva provata e probabile rispetto all'utilizzo del cut-off a 160 (tabella 3 e 4). Nel paziente EMAT è stata ottenuta una sensibilità e specificità del test con cut-off di 160 pari a 69,2% e 65,2%, con VPP e VPN di 53% e 79% rispettivamente. Utilizzando il cut-off di 320 sono stati ottenuti valori di sensibilità e specificità pari a 38,5% e 82,5% con VPP e VPN di 55,5% e 70,3%. Quindi, nel paziente EMAT sono stati ottenuti valori di sensibilità del test nettamente più bassi soprattutto utilizzando il cut-off di 320. Inoltre, diversamente a quanto osservato nel paziente UTI, è stata evidenziata un'associazione statisticamente significativa ( $\chi^2=3,954$ ,  $P<0.05$ ) tra la presenza di anticorpi a titoli di 160 rispetto allo stato di candidosi probabile (tabella 5 e 6). Nei pazienti trapiantati non è stato possibile determinare il valore di sensibilità e specificità del metodo considerando che non vi è stato nessun episodio di candidosi invasiva provata e probabile.



Relativamente ai dati di colonizzazione, il 69,8% dei pazienti ricoverati in UTI sono risultati colonizzati da *Candida* ed in particolare, il 59,4% con CI >0.5. Nel grafico 6 è riportata la percentuale dei pazienti colonizzati dalle diverse specie di *Candida*. *Candida albicans* è stata la specie che ha colonizzato il più alto numero di pazienti, seguita da *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*. Inoltre, il 19% dei pazienti sono risultati contemporaneamente colonizzati da diverse specie di *Candida* o nello stesso sito o in siti non contigui. Nel grafico 7 è riportata la distribuzione dei titoli anticorpali con cut-off di 160 e 320 nei pazienti UTI non colonizzati, con CI<0.5 e CI>0.5. Dall'analisi dei dati si evince come non vi sia una significativa correlazione tra la colonizzazione e la risposta anticorpale qualunque sia il cut-off di positività utilizzato, anche se questo si riflette in maniera meno evidente nei pazienti con CI<0.5. Relativamente ai pazienti trapiantati, la percentuale di colonizzazione è stata del 17,1%. Anche in questo caso *Candida albicans* è stata la specie più frequentemente isolata. Solamente in uno dei pazienti colonizzati da *Candida* è stato raggiunto titolo anticorpale di 160. Infine, per quanto riguarda il controllo eseguito sul liquido di trasporto del rene, solo in un campione è stata isolata contemporaneamente una *Candida albicans* e *Candida krusei*. Questo

paziente non è risultato colonizzato da *Candida* ma ha presentato titolo anticorpale  $\geq$  a 320.

## CONCLUSIONI

Considerando ancora oggi le difficoltà nell'effettuare una diagnosi provata di infezione fungina invasiva, diventa sempre più importante selezionare categorie di pazienti con fattori di rischio predisponenti per lo sviluppo di tali infezioni in modo da poter avviare un monitoraggio sierologico stretto che consenta di supportare una precoce diagnosi di infezione fungina invasiva provata e probabile. Diversi sono stati gli studi pubblicati circa il ruolo che la ricerca di anticorpi verso il tubulo germinativo di *Candida albicans* potrebbero avere nella diagnosi della candidosi invasiva probabile. Nel nostro studio, sono stati ottenuti buoni valori di sensibilità e VPN soprattutto nel paziente critico ricoverato in terapia intensiva. Inoltre, in questa categoria di pazienti, l'aumento del cut-off a 320 ha consentito di ottenere valori di specificità più alti senza interferire con la sensibilità del test. Tra l'altro è stata evidenziata un'associazione statisticamente significativa tra la presenza di anticorpi a titoli  $\geq$  a 320 e lo stato di candidosi certa e probabile rispetto all'utilizzo del cut-off a 160. Relativamente all'utilizzo del cut-off, risultati opposti sono stati ottenuti per il paziente ematologico, in cui i più alti valori di sensibilità sono stati naturalmente ottenuti utilizzando il cut-off di 160 che è risultato significativamente associato allo stato di candidosi probabile. In tal senso potrebbe essere opportuno utilizzare cut-off

differenti in base al tipo di paziente monitorato in modo da poter ottenere il massimo in termini di sensibilità e specificità. Certamente, la ricerca degli anticorpi verso il tubulo germinativo di *Candida albicans*, non si è dimostrato un test precoce, come rilevato nel paziente con candidosi invasiva provata in cui, sono stati raggiunti significativi titoli anticorpali (640) circa una settimana dopo l'isolamento in coltura. In tal senso, la ricerca di anticorpi dovrebbe essere associata ad altri esami di laboratorio certamente più precoci, quali ad esempio la ricerca dell'antigene (1-3)- $\beta$ -D-glucano e dell'antigene mannano di *Candida*. L'uso di questa metodica in IFA, ha consentito di superare alcuni dei problemi connessi alla possibilità di evidenziare alti titoli anticorpali in pazienti colonizzati e bassi titoli nei pazienti immunocompromessi. Infatti, in questo studio è stato evidenziato come non vi sia nessuna correlazione tra la colonizzazione e la presenza di anticorpi ed inoltre, come lo stato di immunodepressione, tipico del paziente ematologico, non abbia interferito significativamente con il rilevamento di anticorpi, considerando che il 69,2% dei pazienti EMAT con candidosi invasiva probabile aveva titoli pari a 160. Infine, per quanto riguarda i pazienti trapiantati potrebbe essere utile selezionare quelli con particolari fattori di rischio in modo da poter valutare e consolidare il ruolo che questo test

potrebbe avere nella diagnosi di candidosi invasiva probabile anche in questa categoria di pazienti.

## **BIBLIOGRAFIA:**

1. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, et al. National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;31:289-96
2. Ruhnke M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. *Curr Drug Targets* 2006; 7(4):495-504
3. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* 2003; 3:685-702
4. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB: Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004, 39:309-317.
5. Bouza E, Munoz P: Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int J Antimicrob Agents* 2008, 32 Suppl 2:S87-91.
6. Bougnoux ME, Kac G, Aegerter P, d'Enfert C, Fagon JY: Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to

intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intensive Care Med* 2008, 34:292-299.

7. Marriott DJ, Playford EG, Chen S, Slavin M, Nguyen Q, Ellis D, Sorrell TC: Determinants of mortality in non-neutropenic ICU patients with candidaemia. *Crit Care* 2009, 13:R115.
8. Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, Vincent JL: Candida bloodstream infections in intensive care units: Analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit Care Med* 2011, 39:665-670.
9. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, et al: Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 2009, 48:1695-1703.
10. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R: Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2006, 27:359-366.
11. Marra AR, Camargo LF, Pignatari AC, Sukiennik T, Behar PR, Medeiros EA, et al: Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective

- nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol* 2011, 49:1866-1871.
12. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R: Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2006, 27:359-366.
  13. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, et al: Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 2009, 136:1237-1248.
  14. Malani AN, Kauffman CA. Changing epidemiology of rare mould infections: implications for therapy. *Drugs* 2007;67:1803–12.
  15. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, Ito J, Andes DR, Baddley JW, Brown JM, et al: Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis* 2010,50:1091-1100.
  16. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM:



- Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 2009, 48:1695-1703.
17. Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, Coffman SL, Doern GV, Herwaldt LA, Pfaller MA: Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol* 2002, 40:1298-1302.
  18. Hachem R, Hanna H, Kontoyiannis D, Jiang Y, Raad I: The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer* 2008, 112:2493-2499.
  19. Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, Pallavicini FB, Viscoli C: Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis* 2006, 6:21.
  20. Pereira GH, Muller PR, Szeszs MW, Levin AS, Melhem MS: Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans* *Candida* species. *Med Mycol* 2010.
  21. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, Marr KA, Pfaller MA, Chang CH, Webster KM: Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients:

- data from the prospective antifungal therapy alliance registry. Clin Infect Dis 2009, 48:1695-1703.
22. Krcmery V, Barnes AJ: Non-albicans Candida spp. Causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect 2002, 50:243-260.
  23. Pfaller MA: Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. Clin Infect Dis 1996, 22 Suppl 2:S89-94.
  24. Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Haraldsson G, Guo H, Xu J, Gottfredsson M: Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. Clin Infect Dis 2008, 47:e17-24.
  25. Vazquez JA, Sanchez V, Dmuchowski C, Dembry LM, Sobel JD, Zervos MJ: Nosocomial acquisition of Candida albicans: an epidemiologic study. J Infect Dis 1993, 168:195-201. PMID:8515108
  26. Richet HM, Andreumont A, Tancrede C, Pico JL, Jarvis WR: Risk factors for candidemia in patients with acute lymphocytic leukemia. Rev Infect Dis 1991, 13:211-215.

27. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 1994, 220:751-758.
28. Piarroux R, Grenouillet F, Balvay P, Tran V, Blasco G, Millon L, Boillot A: Assessment of preemptive treatment to prevent severe candidiasis in critically ill surgical patients. *Crit Care Med* 2004, 32:2443-2449.
29. Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Almirante B, Nolla-Salas J, Alvarez-Lerma F, Garnacho-Montero J, Leon MA: A bedside scoring system ("Candida score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with Candida colonization. *Crit Care Med* 2006, 34:730-737.
30. Leon C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Galvan B, Blanco A, Castro C, Balasini C, Utande-Vazquez A, Gonzalez de Molina FJ, Blasco-Navalproto MA, et al: Usefulness of the "Candida score" for discriminating between Candida colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: a prospective multicenter study. *Crit Care Med* 2009, 37:1624-1633.
31. Ostrosky-Zeichner L, Sable C, Sobel J, Alexander BD, Donowitz G, Kan V, Kauffman CA, Kett D, Larsen RA, Morrison V, et al: Multicenter retrospective development and validation of a clinical

- prediction rule for nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007, 26:271-276.
32. Ben De Pauw, Thomas J. Walsh, J. Peter Donnelly, David A. Stevens *et. all.* 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.
33. Alispahic, M., et al. 2010. Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis. *J. Med. Microbiol.* 59:295–301.
34. Drancourt, M. 2010. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:1620–1625.
35. Yingjun Yan, Ying He, Thomas Maier, Criziel Quinn, Gongyi Shi, Haijing Li, Charles W. Stratton, Markus Kostrzewa, and Yi-Wei Tang. Improved Identification of Yeast Species Directly from Positive Blood Culture Media by Combining Sepsityper Specimen

- Processing and Microflex Analysis with the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Biotyper System. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, July 2011, p. 2528–2532.
36. Drosos E, Karageorgopoulos, Evridiki K, Vouloumanou, Fotinie Ntziora, Argyris Michalopoulos.  $\beta$ -D-Glucan Assay for the Diagnosis of Invasive Fungal Infections: A Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* 2011; 52(6):750–770.
37. Del Bono V, Delfino E, Furfaro E, Mikulska M, Nicco E, Bruzzi P, Mularoni A, Bassetti M, Viscoli C. Clinical performance of (1-3)-beta-D-glucano assay in early diagnosis of nosocomial Candida blood stream infections. *Clin Vaccine Immunol.* 2011 Oct 12 doi:10.1128/CVI.05408-1
38. Małgorzata Mikulska, Thierry Calandra, Maurizio Sanguinetti, Daniel Poulain, Claudio Viscoli, the Third European Conference on Infections in Leukemia Group. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Critical Care* 2010, 14:R222.
39. S. Oliveri, L. Trovato, P. Betta, M. G. Romeo and G. Nicoletti. Experience with the Platelia Candida ELISA for the diagnosis of

- invasive candidosis in neonatal patients. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 391–393.
40. Verduyn Lunel FM, Peter Donnelly J, van der Lee HA, Blijlevens NM, Verweij PE. Performance of the new Platelia Candida Plus assays for the diagnosis of invasive Candida infection in patients undergoing myeloablative therapy. *Med Mycol*. 2011 Nov;49(8):848-55
41. 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.
42. 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.
43. 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.

44. 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.
45. 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.
46. 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

## **Tabelle, Figure e Grafici**



**Tabella 1.** Fattori di rischio per le diverse specie di *Candida*

<i>Candida</i> species	Risk factor
<i>Candida</i> in general	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prior abdominal surgery</li> <li>• Intravascular catheters</li> <li>• Parenteral nutrition</li> <li>• Use of broad-spectrum antibiotics</li> <li>• Immunosuppression, including corticosteroid therapy</li> <li>• Acute renal failure</li> <li>• Diabetes</li> <li>• Transplantation</li> <li>• Haemodialysis</li> <li>• Pancreatitis</li> </ul>
<i>C. tropicalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neutropenia and bone marrow transplantation</li> </ul>
<i>C. krusei</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fluconazole use</li> <li>• Neutropenia and bone marrow transplantation</li> </ul>
<i>C. glabrata</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fluconazole use</li> <li>• Surgery</li> <li>• Vascular catheters</li> <li>• Cancer</li> <li>• Older age</li> </ul>
<i>C. parapsilosis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Parenteral nutrition and hyperalimentation</li> <li>• Vascular catheters</li> <li>• Being neonate<sup>2</sup>*</li> </ul>
<i>C. lusitaniae</i> and <i>C. guilliermondii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Previous polyene use</li> </ul>
<i>C. rugosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Burns</li> </ul>

**Tabella 2.** Caratteristiche demografiche dei pazienti inseriti nello studio

	<b>PAZIENTI</b>		
	<b>UTI</b>	<b>EMAT</b>	<b>TRAP</b>
<b>Maschi</b>	36	16	24
<b>Femmine</b>	17	20	11
<b>Mediana Età</b>	69	54	48

**Tabella 3.** Distribuzione dei pazienti UTI con candidosi invasiva provata e probabile e senza candidosi, con titoli anticorpali  $\geq$  a 320.

	<b>Cut-off 320</b>	
	<b>Positivi</b>	<b>Negativi</b>
<b>Pazienti con candidosi provata e probabile</b>	12	3
<b>Pazienti senza candidosi</b>	18	20
<b>Totale</b>	30	23

$\chi^2=4,662$ ;  $P<0.05$

**Tabella 4.** Distribuzione dei pazienti UTI con candidosi invasiva provata e probabile e senza candidosi, con titoli anticorpali a 160

	<b>Cut-off 160</b>	
	<b>Positivi</b>	<b>Negativi</b>
<b>Pazienti con candidosi provata e probabile</b>	12	3
<b>Pazienti senza candidosi</b>	25	13
<b>Totale</b>	<b>37</b>	<b>16</b>

$\chi^2=1,030$ ; NS

**Tabella 5.** Distribuzione dei pazienti EMAT con candidosi invasiva probabile e senza candidosi, con titoli anticorpali a 160

	<b>Cut-off 160</b>	
	<b>Positivi</b>	<b>Negativi</b>
<b>Pazienti con candidosi probabile</b>	9	4
<b>Pazienti senza candidosi</b>	8	15
<b>Totale</b>	17	19

$\chi^2=3,954$ ;  $P<0.05$

**Tabella 6.** Distribuzione dei pazienti EMAT con candidosi invasiva probabile e senza candidosi, con titoli anticorpali  $\geq$  a 320

	<b>Cut-off 320</b>	
	<b>Positivi</b>	<b>Negativi</b>
<b>Pazienti con candidosi probabile</b>	5	13
<b>Pazienti senza candidosi</b>	4	23
<b>Totale</b>	9	27

$\chi^2=1,967$ ; NS

**Figura 1.** Criteri dell' EORTC/MSG per la diagnosi di infezione fungina invasiva provata

Analysis and specimen	Molds <sup>a</sup>	Yeasts <sup>a</sup>
Microscopic analysis: sterile material	Histopathologic, cytopathologic, or direct microscopic examination <sup>b</sup> of a specimen obtained by needle aspiration or biopsy in which hyphae or melanized yeast-like forms are seen accompanied by evidence of associated tissue damage	Histopathologic, cytopathologic, or direct microscopic examination <sup>b</sup> of a specimen obtained by needle aspiration or biopsy from a normally sterile site (other than mucous membranes) showing yeast cells—for example, <i>Cryptococcus</i> species indicated by encapsulated budding yeasts or <i>Candida</i> species showing pseudohyphae or true hyphae <sup>c</sup>
Culture		
Sterile material	Recovery of a mold or "black yeast" by culture of a specimen obtained by a sterile procedure from a normally sterile and clinically or radiologically abnormal site consistent with an infectious disease process, excluding bronchoalveolar lavage fluid, a cranial sinus cavity specimen, and urine	Recovery of a yeast by culture of a sample obtained by a sterile procedure (including a freshly placed [ $<24$ h ago] drain) from a normally sterile site showing a clinical or radiological abnormality consistent with an infectious disease process
Blood	Blood culture that yields a mold <sup>d</sup> (e.g., <i>Fusarium</i> species) in the context of a compatible infectious disease process	Blood culture that yields yeast (e.g., <i>Cryptococcus</i> or <i>Candida</i> species) or yeast-like fungi (e.g., <i>Trichosporon</i> species)
Serological analysis: CSF	Not applicable	Cryptococcal antigen in CSF indicates disseminated cryptococcosis

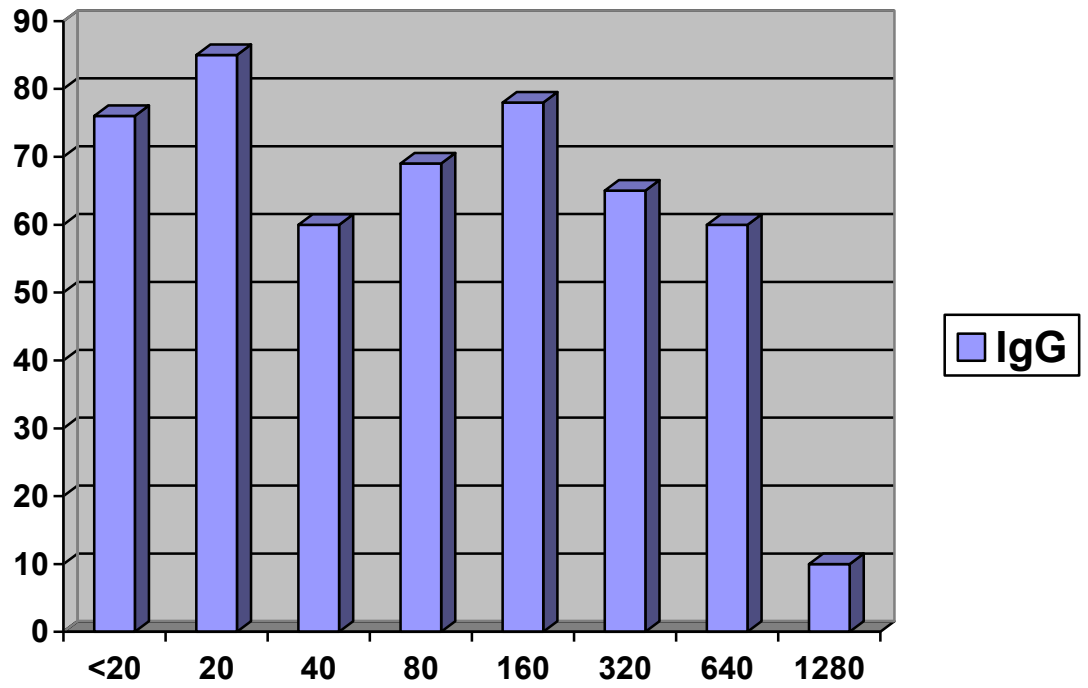
<sup>a</sup> If culture is available, append the identification at the genus or species level from the culture results.

<sup>b</sup> Tissue and cells submitted for histopathologic or cytopathologic studies should be stained by Grocott-Gomori methenamine silver stain or by periodic acid Schiff stain, to facilitate inspection of fungal structures. Whenever possible, wet mounts of specimens from foci related to invasive fungal disease should be stained with a fluorescent dye (e.g., calcofluor or blankophor).

<sup>c</sup> *Candida*, *Trichosporon*, and yeast-like *Geotrichum* species and *Blastoschizomyces capitatus* may also form pseudohyphae or true hyphae.

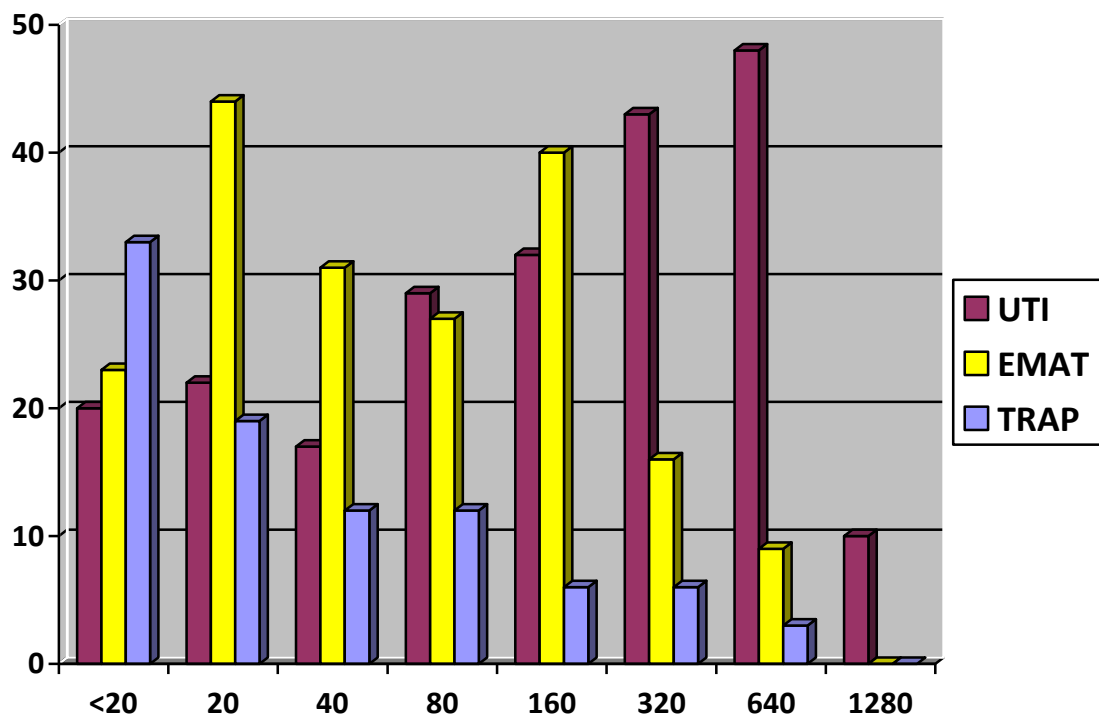
<sup>d</sup> Recovery of *Aspergillus* species from blood cultures invariably represents contamination.

**Grafico 1.** Distribuzione generale dei titoli anticorpali

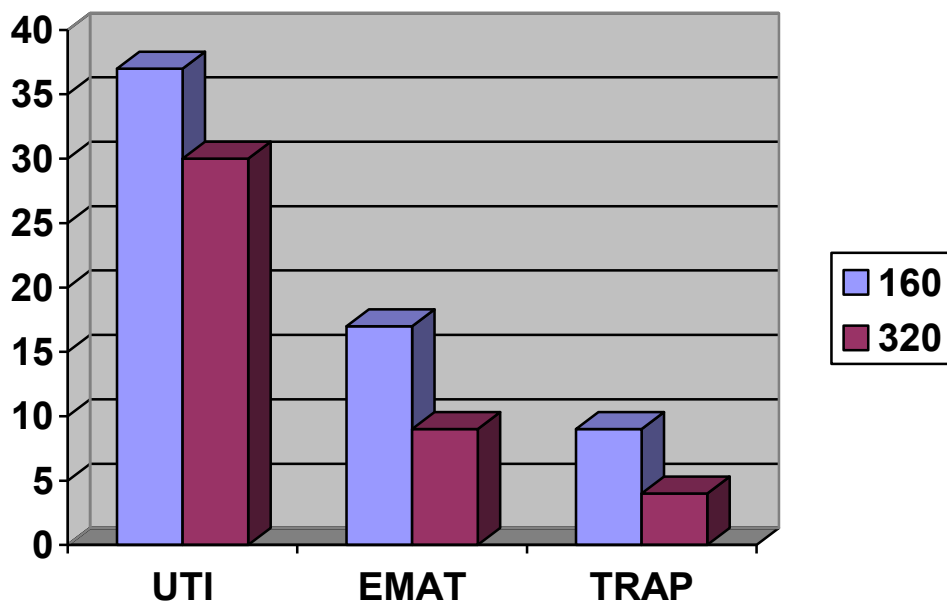




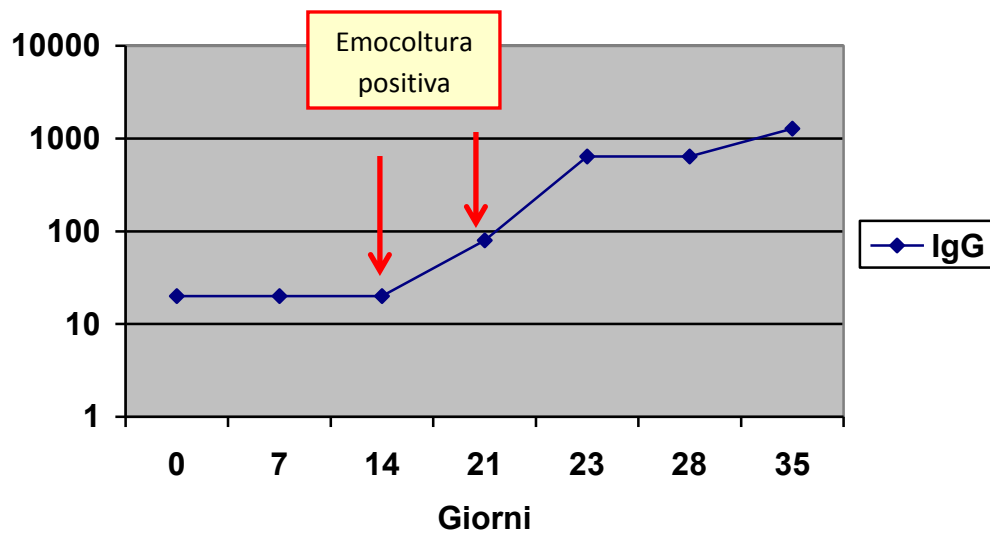
**Grafico 2.** Distribuzione dei titoli anticorpali nei pazienti UTI, EMAT e TRAP



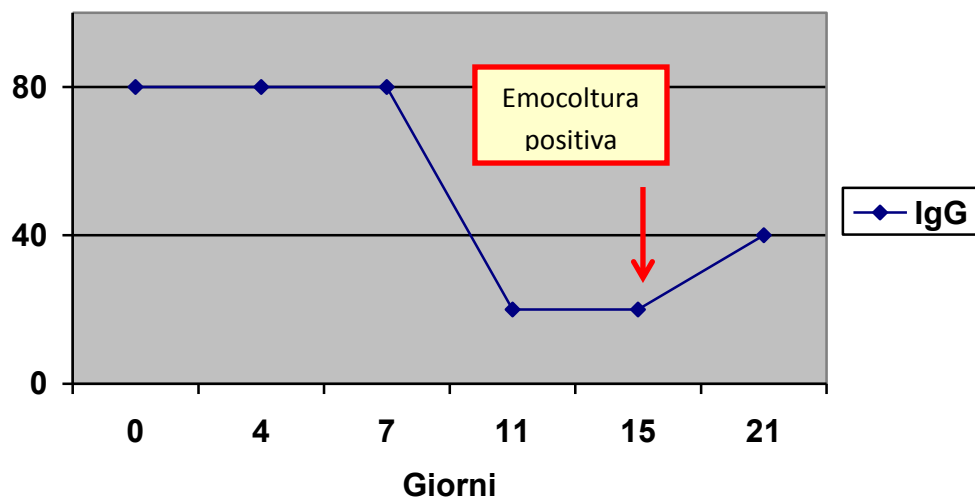
**Grafico 3.** Distribuzione dei pazienti positivi con cut-off di 160 e 320



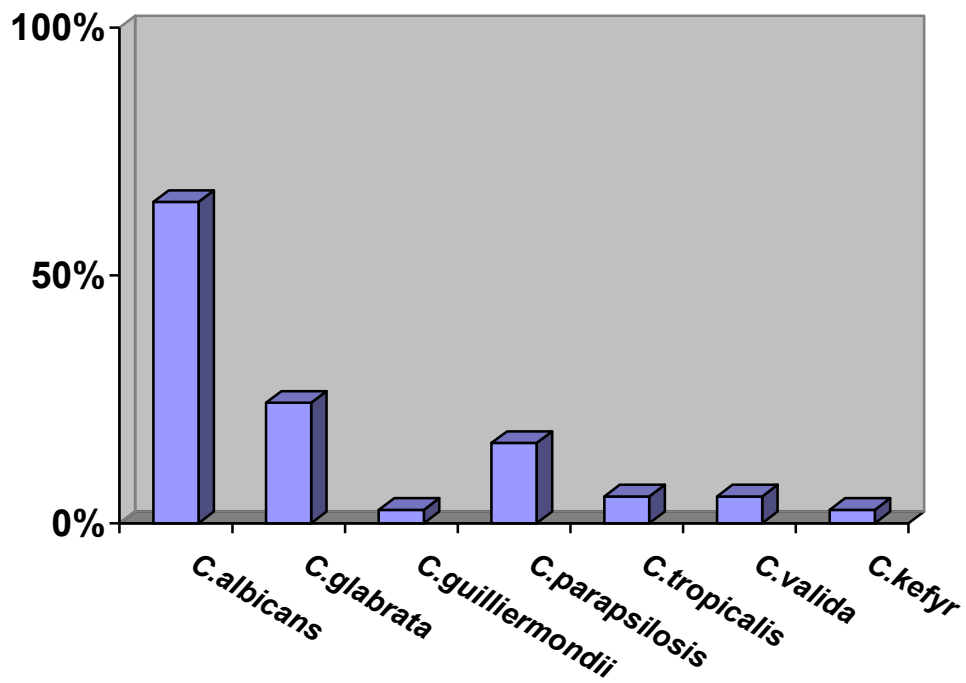
**Grafico 4.** Andamento del titolo anticorpale nel paziente con candidemia da *Candida albicans*



**Grafico 5.** Andamento del titolo anticorpale nel paziente con candidemia da *Candida guilliermondii*



**Grafico 6.** Percentuale dei pazienti UTI colonizzati dalle diverse specie di *Candida*



**Grafico 7.** Distribuzione dei titoli anticorpali con cut-off a 160 e  $\geq$  a 320 nei pazienti UTI non colonizzati, con CI<0.5 e CI>0.5

