

# Diagnostica microbiologica delle infezioni fungine

Microbiological diagnostics of fungal infections

Corrado Girmenia <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Ematologia, Oncologia, Anatomia Patologica e Medicina Rigenerativa, Azienda Policlinico Umberto I, Roma

## Abstract

Laboratory tests for the detection of fungal infections are easy to perform. The main obstacle to a correct diagnosis is the correlation between the laboratory findings and the clinical diagnosis. Among pediatric patients, the most common fungal pathogen is *Candida*. The detection of fungal colonization may be performed through the use of chromogenic culture media, which allows also the identification of *Candida* subspecies, from which pathogenicity depends. In neonatology, this test often drives the decision to begin a empiric therapy; in this regard, a close cooperation between microbiologists and clinicians is highly recommended. Blood culture, if positive, is a strong confirmation of fungal infection; however, its low sensitivity results in a high percentage of false negatives, thus decreasing its reliability. Molecular diagnostics is still under evaluation, whereas the detection of some fungal antigens, such as  $\beta$ -D-glucan, galactomannan, mannoprotein, and cryptococcal antigen in the serum is used for adults, but still under evaluations for pediatric patients.

## Keywords

*Fungal infections; Diagnosis; Laboratory tests; Colonization; Blood culture; Molecular diagnostics; Fungal antigens*

### Corresponding author

Corrado Girmenia  
girmenia@bce.uniroma1.it

### Disclosure

Il presente Congress Report è stato supportato da Astellas Pharma SpA

## Difficoltà diagnostiche delle infezioni fungine

Gli esami microbiologici necessari per una adeguata diagnostica delle infezioni fungine sono attualmente limitati ad alcuni esami microscopici e colturali, e alla ricerca di pochi antigeni fungini (Tabella I).

La diagnostica molecolare avrà in futuro un ruolo molto rilevante, ma per il momento né le stesse metodiche di laboratorio né l'uso di tali indagini nel contesto delle strategie cliniche sono ancora standardizzati. Nonostante gli esami micologici siano di facile esecuzione, generalmente poco costosi e alla portata di gran parte dei laboratori di microbiologia, diagnosticare un'infezione fungina può essere difficile in alcune realtà. La difficoltà sostanziale è rappresentata dalla non facile correlazione del risultato microbiologico con il contesto clinico, e solo tenendo conto dei fattori di rischio del paziente, della sintomatologia clinica, delle indagini radiologiche e degli esami microbiologici è possibile formulare un'ipotesi diagnostica attendibile e utile per un adeguato approccio terapeutico.

Il lavoro del microbiologo, quindi, deve integrarsi con quello degli altri specialisti ed è necessario che anche il microbiologo abbia cognizioni cliniche al fine di poter applicare il dato di laboratorio al contesto clinico.

Le infezioni fungine più frequenti in ambito pediatrico sono le candidosi superficiali e invasive. Tali infezioni sono di gran lunga prevalenti nei neonati pretermine, nei soggetti affetti da immunodeficienze congenite, nei pazienti sottoposti a trapianto di organo solido e nei pazienti con patologie oncologiche non ematologiche.

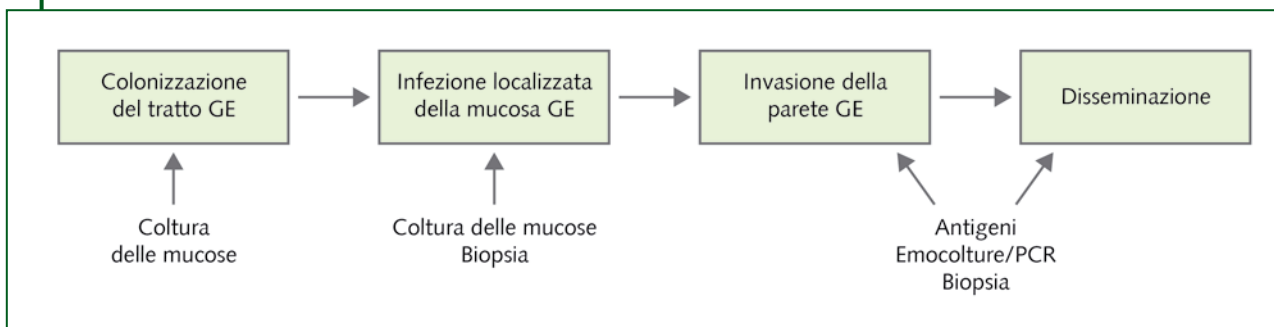
Nei bambini affetti da emopatie maligne o sottoposti a trapianto di cellule staminali vengono spesso documentate anche infezioni da funghi filamentosi, soprattutto aspergillosi. In questa breve monografia, tuttavia, faremo riferimento in particolare alla diagnostica microbiologica delle infezioni da *Candida*.

Colonizzazione	
<b>Secrezioni respiratorie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esame microscopico</li> <li>• Coltura</li> <li>• Ricerca del galattomannano (GM)</li> </ul>
<b>Esame colturale</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sangue</li> <li>• Urine</li> <li>• Liquor (esame microscopico, antigeni)</li> <li>• Altri campioni da siti sterili</li> </ul>
<b>Ricerca antigeni fungini nel siero</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GM</li> <li>• <math>\beta</math>-D-glucano (BDG)</li> <li>• Antigene criptococcico</li> </ul>
<b>Diagnostica molecolare: ancora in fase di sviluppo</b>	

**Tabella I.** Esami microbiologici per la diagnosi di infezione fungina

## Patogenesi dell'infezione fungina

L'interpretazione del dato microbiologico dovrebbe partire dalla comprensione della pa-



**Figura 1.** Fasi delle infezioni endogene da *Candida* e da altri lieviti nella mucosa gastrointestinale e relativi metodi diagnostici

GE = gastrointestinale; PCR = *Polymerase Chain Reaction*

togenesi dell'infezione. Per quanto riguarda le infezioni da *Candida*, come schematizzato nella Figura 1, è importante comprendere come da una normale colonizzazione il microrganismo possa causare un'infezione superficiale, poi profonda fino alla disseminazione. In ognuna di queste fasi è rilevante il fattore di rischio e il dato micologico assume un significato specifico.

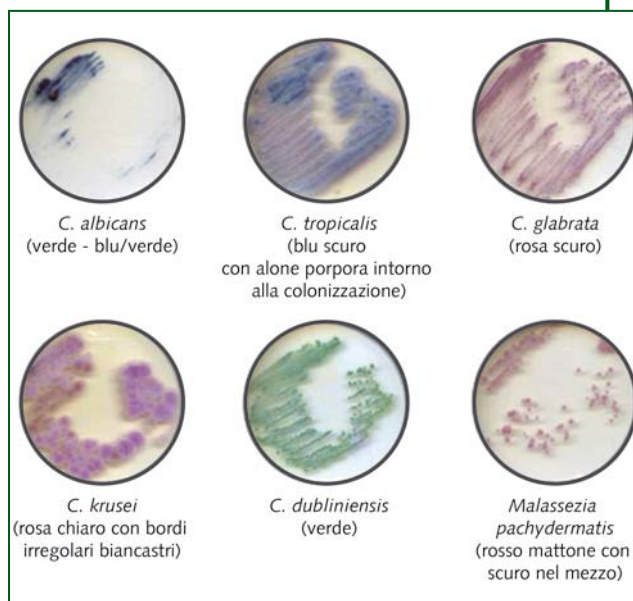
## Elementi per diagnosticare un'infezione fungina

### Colonizzazione fungina

Lo studio della colonizzazione è molto semplice da un punto di vista laboratoristico. Da un tampone rettale o del cavo orale è facile isolare dei lieviti e, grazie anche all'impiego di terreni di coltura cromogeni (Figura 2), è possibile in 24-

48 ore fornire la tipizzazione del microrganismo a livello di specie, con un'accuratezza accettabile. I dati della colonizzazione e della specie di microrganismo che la sostiene hanno una rilevanza clinica variabile in base alle caratteristiche del paziente (Tabella II).

Per esempio, conoscere il tipo di colonizzazione in un bambino affetto da immunodeficienza congenita o sottoposto a un trapianto di rene può essere di scarsa utilità sia a fini diagnostici sia prognostici. Al contrario, la conoscenza della colonizzazione fungina è fondamentale in un neonato pretermine o in un bambino affetto da leucemia acuta durante la fase di neutropenia, in quanto in questi pazienti la presenza di una *Candida* nelle mucose può essere predittiva di una successiva infezione invasiva. In particolare nel neonato pretermine di basso peso l'assenza di colonizzazione da *Candida* è predittiva di basso rischio di infezione invasiva, mentre la colonizzazione si associa a una successiva infezione in circa il 25% dei casi o addirittura in una percentuale maggiore se la colonizzazione è estesa a più siti non contigui [1]. Come già accennato, la conoscenza della specie di *Candida* che colonizza il paziente è importante in quanto la patogenicità, cioè la probabilità che da una colonizzazione superficiale si sviluppi un'infezione invasiva, varia molto da specie a specie. Particolarmente elevata è la patogenicità di *C. tropicalis* o *C. albicans*, mentre più contenuta è quella di *C. parapsilosis*.



**Figura 2.** Capsule di Petri con terreni cromogeni, che consentono un rapido riconoscimento delle specie di *Candida* e di alcuni altri funghi

Specie	Neonato pretermine	Onco-ematologico	Immunodef. congenita	Trapianto organo
<i>C. albicans</i>	+++ / +++	++ / +++	++ / ++	+++ / ++
<i>C. tropicalis</i>	+++ / +	+++ / ++	+ / +	+++ / +
<i>C. glabrata</i>	+++ / ++	++ / ++	+ / +	++ / ++
<i>C. krusei</i>	+++ / +	++ / +	+ / +	++ / +
<i>C. parapsilosis</i>	+ / +++	+ / +++	+ / ++	+ / ++

**Tabella II.** Patogenicità e impatto epidemiologico delle diverse specie di *Candida*

Considerando, quindi, quanto sia importante conoscere l'eventuale colonizzazione fungina nei pazienti ad alto rischio, è facile comprendere la rilevanza di una stretta collaborazione tra pediatra e microbiologo per pianificare la strategia di monitoraggio della colonizzazione definendo i pazienti nei quali tali indagini possono essere utili, i siti corporei da monitorare e la frequenza degli esami.

## Emocoltura

La documentazione di una colonizzazione da *Candida* non è sufficiente per porre diagnosi di infezione invasiva, ma è ugualmente utile per guidare a una strategia preventiva o a un trattamento di un'infezione sospettata clinicamente. L'esame microbiologico di riferimento per la diagnosi di un'infezione da *Candida* in atto è invece rappresentato dalle emocolture con le quali è possibile documentare una candidemia. La coltura del sangue è il riferimento diagnostico, in quanto le indagini microbiologiche da altri siti implicano in genere manovre invasive di difficile esecuzione. Negli ultimi anni i sistemi colturali del sangue sono molto cambiati e la sensibilità è migliorata, tuttavia, ancora oggi molte candidosi disseminate non vengono documentate o vengono documentate tardivamente in quanto la sensibilità delle emocolture, anche con i sistemi automatizzati attualmente disponibili, continua a essere insoddisfacente (non superiore al 50%). La sensibilità, comunque non è data solo dal sistema colturale impiegato, ma anche dalla quantità di sangue che viene coltivata. Le recenti linee guida della *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) prevedono che per i neonati sia necessario prelevare un volume minimo di 2-4 ml di sangue nelle 24 ore, che potrebbe voler dire 2-4 prelievi da 1 ml ciascuno.

Un secondo aspetto importante nella diagnostica microbiologica delle infezioni da *Candida* è rappresentato dalla tempestività della comunicazione del referto da parte del laboratorio. Se già la notizia di una colonizzazione in un neonato andrebbe comunicata non appena disponibile, l'isolamento di una *Candida* dal sangue rappresenta un dato da considerare immediatamente. Anche la sola documentazione microscopica di un lievito nel sangue deve essere comunicata subito al clinico per permettere un trattamento precoce in attesa dell'isolamento e della tipizzazione definitiva, che potrebbero richiedere anche giorni.

## Diagnostica molecolare e ricerca di antigeni fungini

Per quanto riguarda la diagnostica molecolare, la sua applicazione nella pratica clinica non è ancora possibile e si è in attesa di adeguati studi clinici su ampie casistiche. Tuttavia, soprattutto in Europa, diversi gruppi di ricerca stanno lavorando intensamente sui test molecolari per *Candida* e *Aspergillus* e probabilmente nei prossimi anni saranno disponibili in commercio test standardizzati, economicamente accettabili e supportati da adeguati studi clinici che ne abbiano validato la modalità di impiego. Gli antigeni fungini che vengono impiegati nella diagnosi delle infezioni fungine sono:

- $\beta$ -D-glucano;
- galattomannano;
- mannosproteina;
- antigene criptococcico.

Tra questi, solo il  $\beta$ -D-glucano e la mannosproteina possono essere impiegati nella diagnosi delle infezioni da *Candida*, mentre l'antigene galattomannano e l'antigene criptococcico sono utili quasi esclusivamente per documentare rispettivamente infezioni da *Aspergillus* spp. e *Cryptococcus neoformans*.

Mentre il dosaggio dell'antigene criptococcico rappresenta lo standard diagnostico e prognostico della criptococcosi in quanto molto sensibile e specifico, l'uso degli altri antigeni fungini è molto più complesso in quanto molti falsi positivi e falsi negativi ne rendono spesso difficile l'interpretazione. Per ottimizzare l'uso degli antigeni fungini è importante conoscere la loro cinetica in relazione alle caratteristiche e allo stato immunitario del paziente. Il galattomannano è un antigene secretorio che viene liberato

con la crescita delle ife di *Aspergillus* ed è quindi indice di angioinvasione; al contrario il  $\beta$ -D-glucano e la mannoproteina sono antigeni strutturali che vengono liberati in genere quando il fungo muore, o spontaneamente, oppure a causa della somministrazione di antifungini [2]. Sia il galattomannano sia la mannoproteina risentono fortemente del numero dei granulociti neutrofili che possono operare la clearance di queste macromolecole. Nei pazienti neutropenici, nei quali i funghi causano infezioni tissutali e angioinvasive, gli antigeni vengono liberati in grande quantità nel torrente circolatorio; al contrario, nei pazienti non neutropenici la liberazione degli antigeni da parte del fungo infettante è contrastata dalla risposta flogistica. Per tale motivo, spesso la sensibilità dei test del galattomannano aspergillare e della mannoproteina di *Candida* è limitata nei pazienti non neutropenici, come i neonati pretermine, i bambini affetti da immunodeficienza congenita o i pazienti sottoposti a trapianto d'organo solido. Al contrario, in corso di leucemia acuta o dopo trapianto di cellule staminali, la diagnostica micologica fa in larga misura affidamento sul dosaggio sierico degli antigeni fungini.

Per quanto riguarda il test del  $\beta$ -D-glucano sierico, l'utilità diagnostica è invece molto promettente nei pazienti non neutropenici e ancora poco studiata in corso di neutropenia. Questo test risulta affidabile nei pazienti adulti per la diagnosi precoce di diverse micosi invasive. In pediatria, invece, non esistono ancora studi sulla performance di questo test, in termini di sensibilità, specificità, valore predittivo, *likelihood ratio* [3], ma soltanto segnalazioni, su casistiche limitate, che valori elevati o molto elevati correlano con la presenza di micosi invasive [4]. Al momento non è quindi possibile considerare la ricerca dell'1-3- $\beta$ -D-glucano come un utile strumento diagnostico in età pediatrica ma solo come elemento di studio [5].

## Bibliografia

1. Manzoni P, Farina D, Leonessa M, et al. Risk factors for progression to invasive fungal infection in preterm neonates with fungal colonization. *Pediatrics* 2006; 118: 2359-64; <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2006-1311>
2. Girmenia C, Martino P, De Bernardis F, et al. Assessment of detection of *Candida* mannoproteinemia as a method to differentiate central venous catheter-related candidemia from invasive disease. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 903-6
3. Mokaddas E, Burhamah MH, Khan ZU, et al. Levels of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan, *Candida* mannan and *Candida* DNA in serum samples of pediatric cancer patients colonized with *Candida* species. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 292; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-10-292>
4. Mularoni A, Furfaro E, Faraci M, et al. High Levels of beta-D-glucan in immunocompromised children with proven invasive fungal disease. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17: 882-3; <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00038-10>
5. Marchetti O, Lamoth F, Mikulska M, et al; European Conference on Infections in Leukemia (ECIL) Laboratory Working Groups. ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant* 2012; 47: 846-54; <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2011.178>