



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

MYCOLOGY

SHORT MASTER



DIPARTIMENTO
MEDICINA
VETERINARIA



IL REGNO DEI FUNGHI E LA DIAGNOSI DI INFEZIONE FUNGINA

*Claudia Cafarchia, Dipartimento di Medicina
Veterinaria, Università degli Studi di Bari Aldo
Moro.*



Prokaryote

Bacteria

Thallus:

One-celled

Feeding:

Heterotrophic, diffusion

Eukaryote

Protista

One-celled

Heterotrophic, engulfment

Animalia

Multi-celled

Heterotrophic, engulfment

Fungi

X-celled

Heterotrophic, diffusion

Plantae

Multi-celled

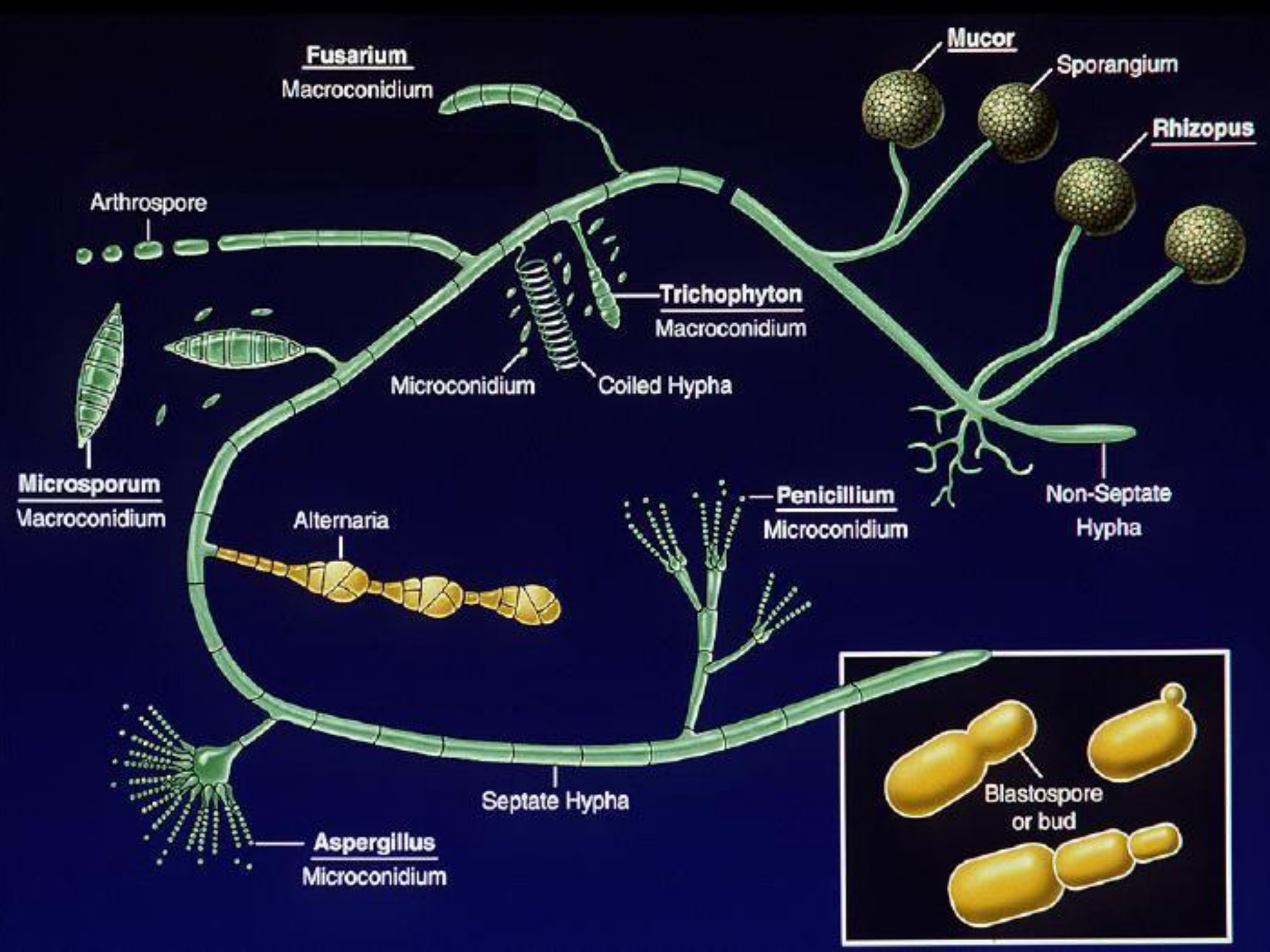
Autotrophic, diffusion



Protozoa
Mycetozoa
Mesomycetozoa
Chromista
Oomycota

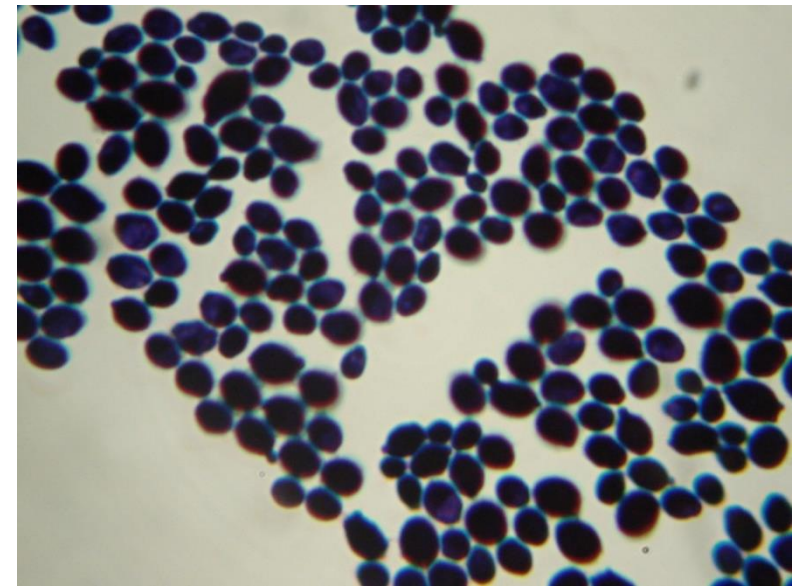
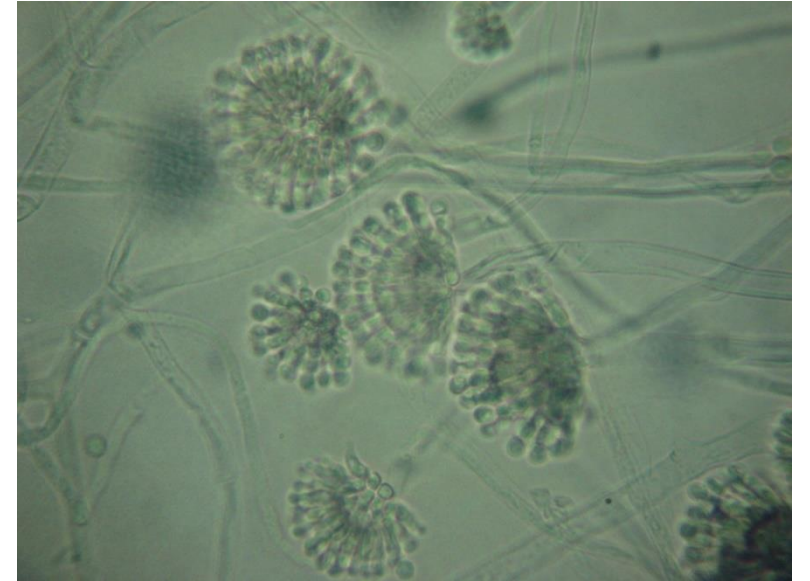
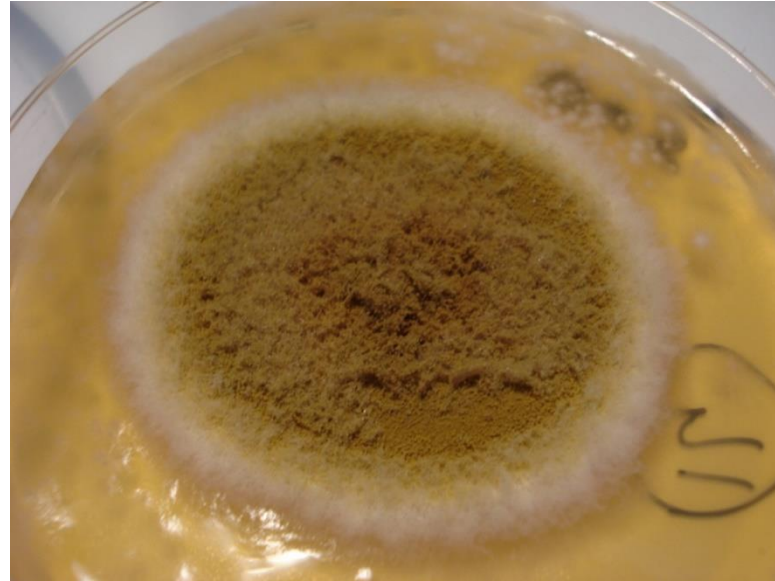
Eumycota

- Chytridiomycota*
- Zygomycota*
 - Zygomycetes*
 - Entomophthorales*
 - Mortierellales*
 - Mucorales*
- Ascomycota*
 - Archiascomycetes*
 - Pneumocystidales*
 - Hemiascomycetes*
 - Saccharomycetales*
 - Euascomycetes*
 - Chaetothyriales*
 - Clavicipitales*
 - Dothideales*
 - Eurotiales*
 - Hypocreales*
 - Leotiales*
 - Microascales*
 - Onygenales*
 - Ophiostomatales*
 - Phyllachorales*
 - Pleosporales*
 - Sordariales*
- Basidiomycota*
 - Hymenomycetes*
 - Agaricales*
 - Stereales*
 - Tremellales*
 - Urediniomycetes*
 - Sporidiales*
 - Ustilaginomycetes*
 - Microstromatales*
 - Tilletiales*
 - Ustilaginales*





REGNO DEI FUNGHI





MICOSI PRIMARIE

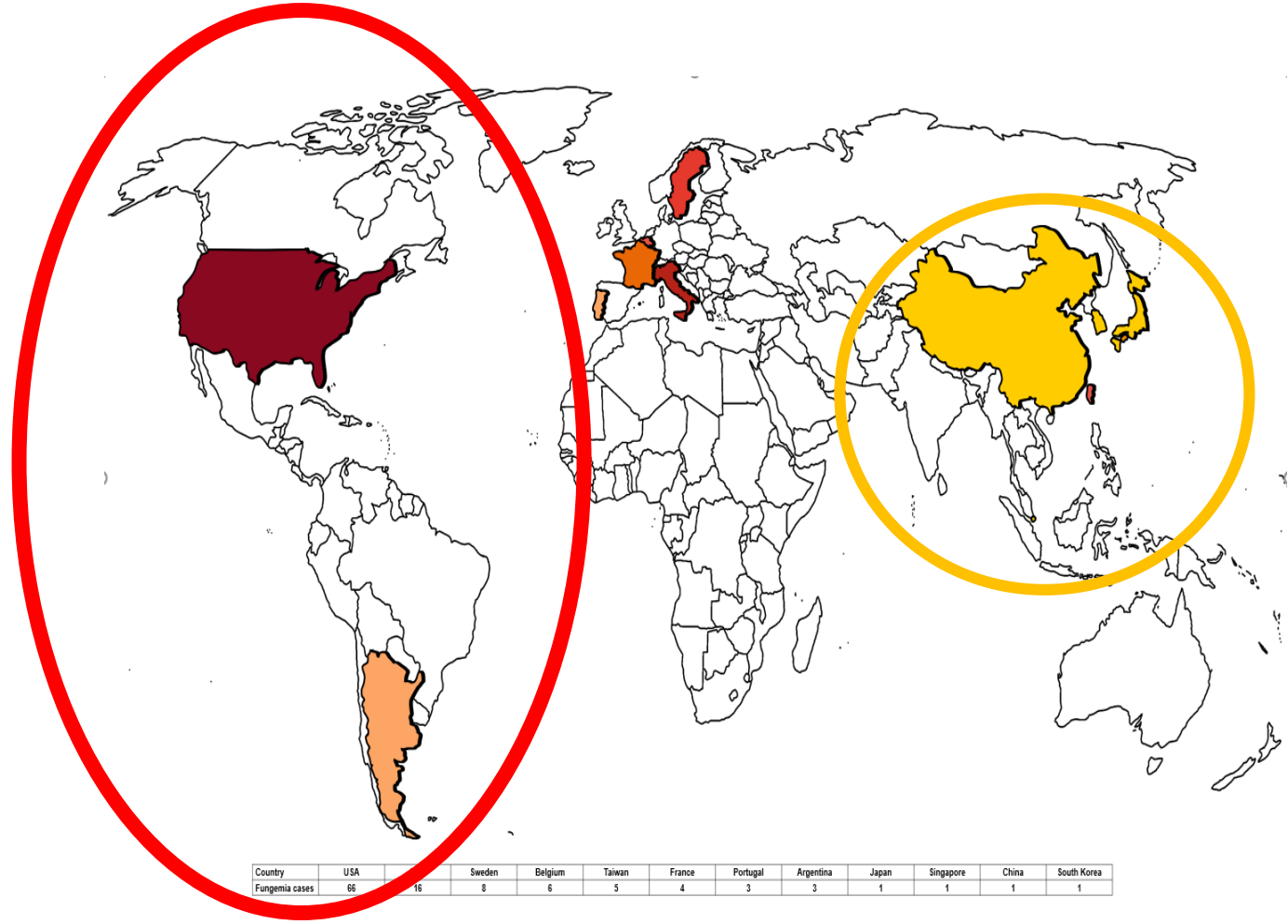
Emmonsia spp.

Coccidioides spp

Paracoccidioides spp.

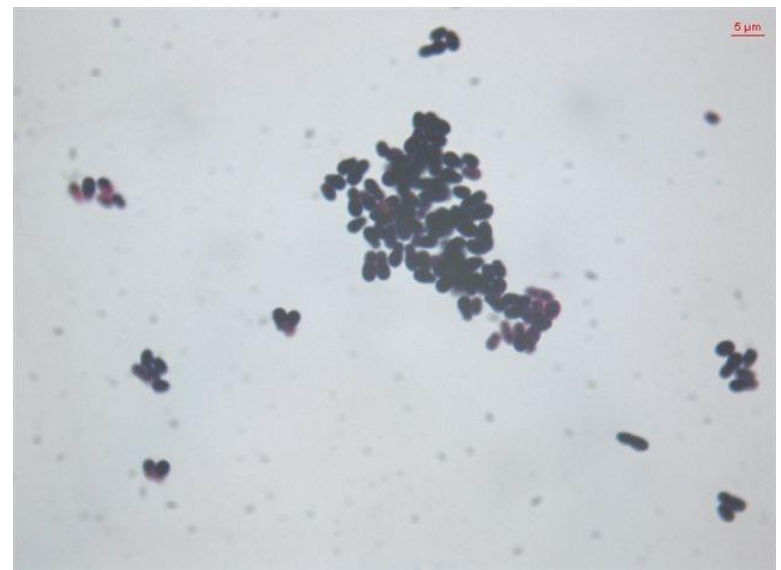
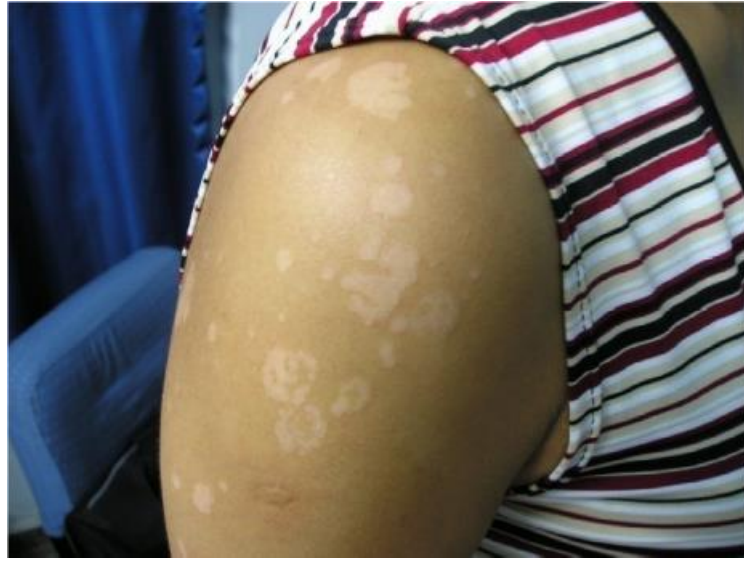
Talaromyces marneffeii

Blastomyces spp



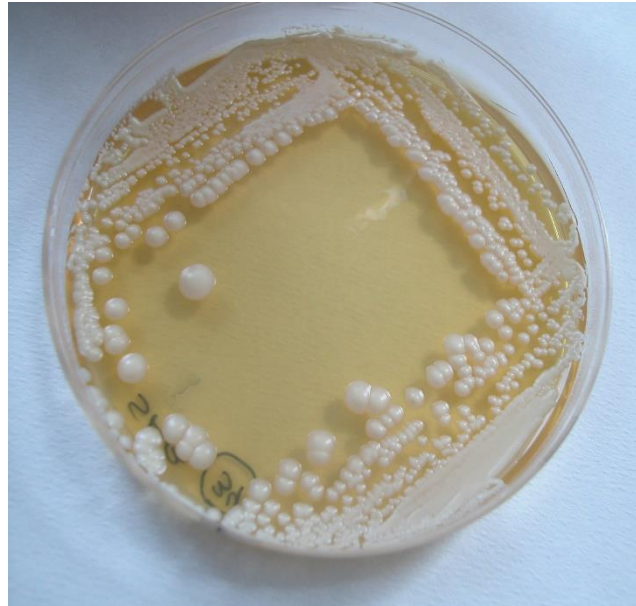


MICOSI SUPERFICIALI



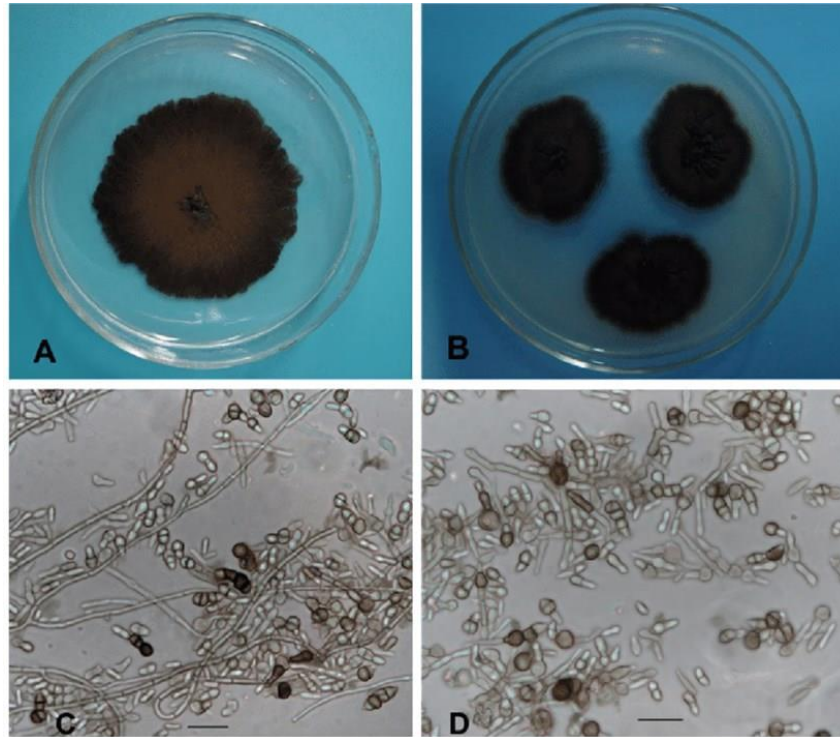


MICOSI SUPERFICIALI





MICOSI SUPERFICIALI

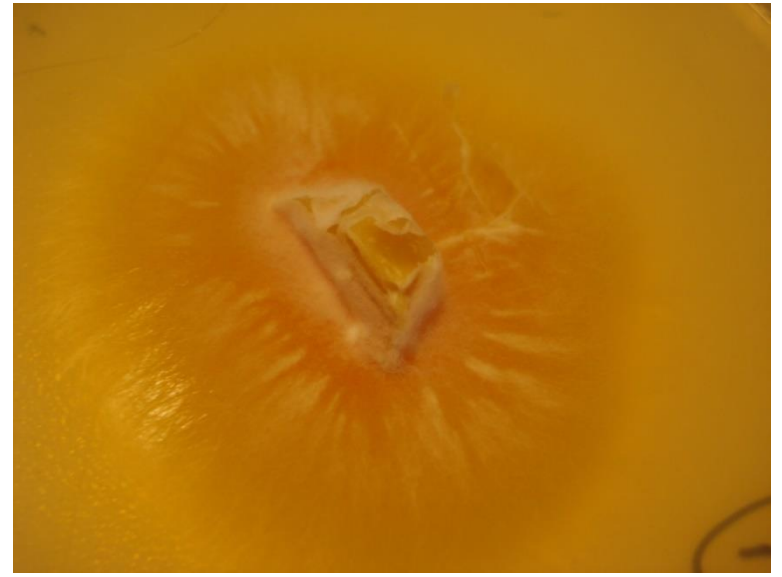


Exophiala werneckii

Micosi di importazione: America Meridionale



MICOSI CUTANEE



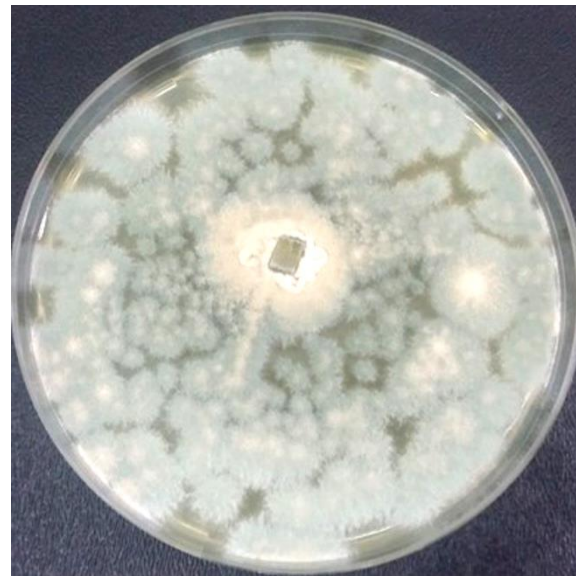


MICOSI SOTTOCUTANEE



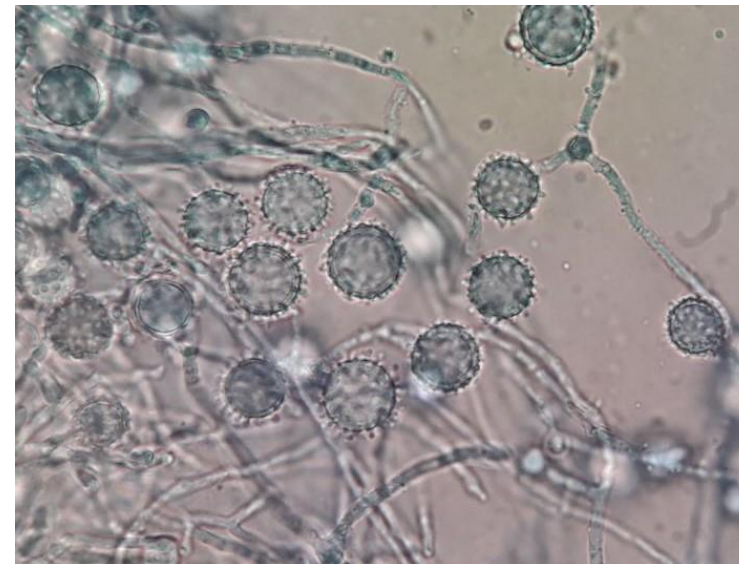


MICOSI PROFONDE



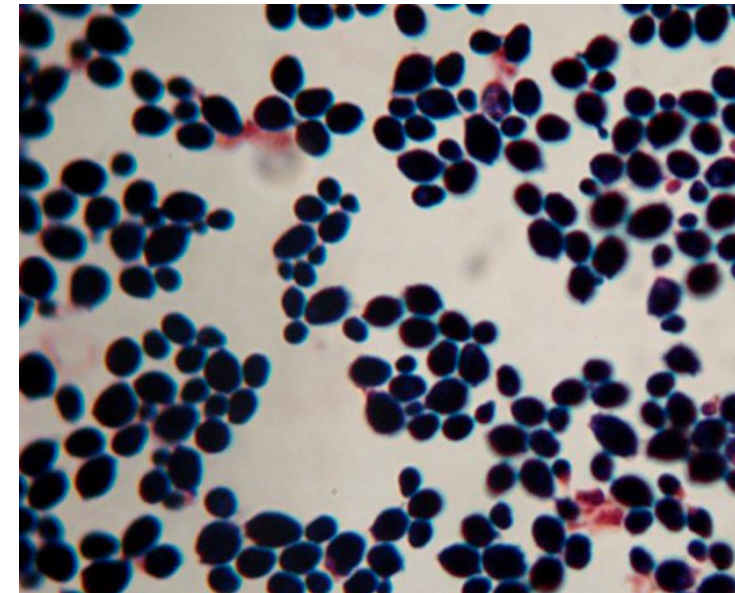
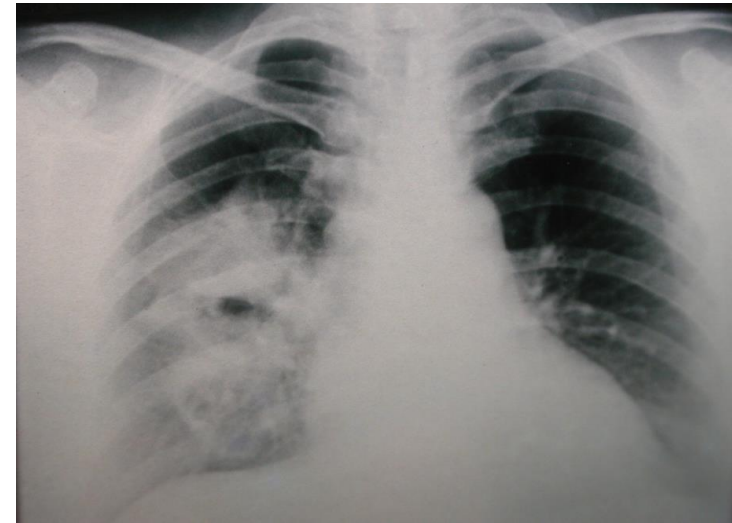


MICOSI PROFONDE





MICOSI PROFONDE





MICOSI PROFONDE

NIH National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information Log in

PubMed.gov malassezia fungemia X Search Advanced Create alert Create RSS User Guide

NIH National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information Log in

PubMed.gov candida fungemia X Search Advanced Create alert Create RSS User Guide

Save Email Send to Sorted by: Publication date Display options

Save Email Send to Sorted by: Publication date Display options

RESULTS BY YEAR 86 results

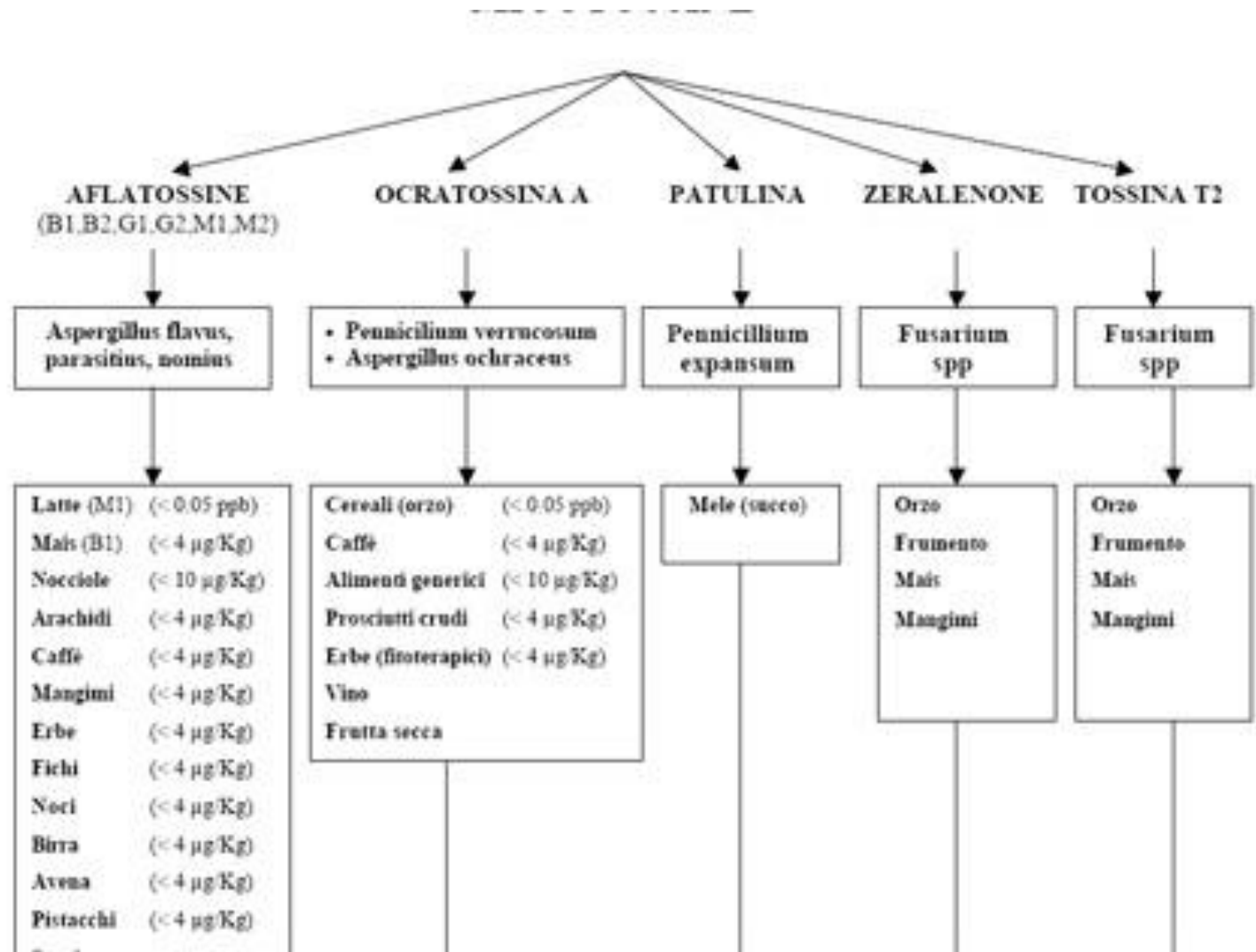
Year	Number of Publications
1984	1
1985	2
1986	3
1987	4
1988	5
1989	6
1990	7
1991	8
1992	9
1993	10
1994	11
1995	12
1996	13
1997	14
1998	15
1999	16
2000	17
2001	18
2002	19
2003	20
2004	21
2005	22
2006	23
2007	24
2008	25
2009	26
2010	27
2011	28
2012	29
2013	30
2014	31
2015	32
2016	33
2017	34
2018	35
2019	36
2020	37

RESULTS BY YEAR 2,978 results

Year	Number of Publications
1960	0
1961	0
1962	0
1963	0
1964	0
1965	0
1966	0
1967	0
1968	0
1969	0
1970	0
1971	0
1972	0
1973	0
1974	0
1975	0
1976	0
1977	0
1978	0
1979	0
1980	0
1981	0
1982	0
1983	0
1984	0
1985	0
1986	0
1987	0
1988	0
1989	0
1990	0
1991	0
1992	0
1993	0
1994	0
1995	0
1996	0
1997	0
1998	0
1999	0
2000	1
2001	2
2002	3
2003	4
2004	5
2005	6
2006	7
2007	8
2008	9
2009	10
2010	11
2011	12
2012	13
2013	14
2014	15
2015	16
2016	17
2017	18
2018	19
2019	20
2020	21



MICOTOSSICOSI





UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

MYCOLOGY

SHORT MASTER



DIPARTIMENTO
MEDICINA
VETERINARIA



LA DIAGNOSI MICROSCOPICA DI INFEZIONE FUNGINA

*Claudia Cafarchia, Dipartimento di Medicina
Veterinaria, Università degli Studi di Bari Aldo
Moro.*



MICETI E SEDE DI ISOLAMENTO

	Cute ed annessi	SNC	Respiratorio	Digerente	Urinario	Genitale	Sottocutaneo	Sangue
Dermatofiti e <i>Malassezia</i>	📄						(📄)	📄 Malassezia
Agenti micetomi e feoifomicosi	📄	📄	📄	📄			📄	
<i>Sporothrix</i>	📄		📄				📄	
<i>Candida</i>	📄	📄	📄	📄	📄	📄		📄
<i>Cryptococcus</i>	📄	📄	📄		📄			📄
<i>Aspergillus</i>	📄	📄	📄	📄				(📄)
Mucorales		📄	📄	📄				📄
<i>Histoplasma</i>	📄	📄	📄					📄



DIAGNOSI INFEZIONI FUNGINE

ANTE MORTEM

Anamnesi: Specie, età, sesso, convivenza con animali, habitat, contatto, Patologia (superficiale, sottocutanea, profonda). Nella dermatite, assenza e presenza di prurito. Presenza di patologia immunosoppressive o endocrine. Trattamento (cortisone, antibiotico, antifungino). Durata trattamento.

Esame clinico

Diagnosi di laboratorio

POST MORTEM

Esame anatomico

Diagnosi di laboratorio



ASPETTO CLINICO

MICOSI SUPERFICIALI E CUTANEE

- Aspetto ben delimitato lesioni
- Dermatite generalizzata
- Presenza di una reazione eritematosa o squamosa
- Presenza di ipercheratosi e lichenificazione
- Presenza di alopecia e Prurito



MICOSI SOTTOCUTANEE:

- Suppurazione Cronica,
- Fistole e Ulcere
- Grani



MICOSI PROFONDE:

- Assenza e/o presenza di febbre
- Febbre intermittente
- Sintomi respiratori

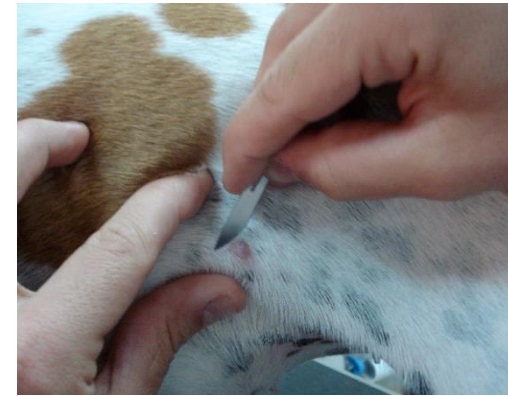




PRELIEVO DEL CAMPIONE

CUTE

- Pulire le lesioni con alcool al 70%.
- Raccogliere il materiale raschiando i bordi delle lesioni, idealmente con un bisturi smussato. In alternativa, utilizzare il bordo di un vetrino da microscopio,
- È possibile utilizzare un tampone per raccogliere campioni da dermatiti generalizzate che non mimano una dermatofitosi
- La cute può essere campionata con un nastro adesivo trasparente, che viene poi attaccato a un vetrino da microscopio. Nota: questo impedisce che venga effettuata la cultura.
- La cute può essere campionata con contact plate: questo impedisce esame microscopico
- Per cute secca ed ipercheratosi il campione può essere prelevato bagnando un tampone con SF sterile





PRELIEVO DEL CAMPIONE

MUCOSE

Quando si raccolgono campioni dalle mucose (ad es. Bocca e vagina):

- La raschiatura è migliore dei tamponi se il materiale viene processato immediatamente.
- Se il materiale non verrà processato immediatamente, utilizzare tamponi inumiditi con acqua sterile o soluzione salina, poiché i lieviti perderanno rapidamente la vitalità sui tamponi asciutti. In alternativa, i tamponi possono essere trasportati in un mezzo di trasporto ad es. Amies medium.





PRELIEVO DEL CAMPIONE

MICOSI SOTTOCUTANEE O NODULI

- Rimuovere l'essudato di superficie pulendo con soluzione salina sterile o alcool al 70%.
- Il pus proveniente da ascessi sottocutanei non drenati deve essere raccolto in modo asettico con un ago e una siringa sterili.
- Il pus proveniente da ascessi sottocutanei drenati deve essere raccolto in modo asettico con un Tampone sterile.
- Eventuali grani fungini devono essere inclusi nel campione.





PRELIEVO DEL CAMPIONE

SECRETO PREPUZIALE

SECRETO VAGINALE

SECRETO URETRALE

SECRETO RESPIRATORIO

(faringeo e nasale)

TAMPONE STERILE

URINA

X cistocentesi, circa
20ml, centrifugare
(2500rpm x 15 min) e
utilizzare sedimento



PRELIEVO DEL CAMPIONE

Il sangue può essere usato per microscopia e / o coltura

- La microscopia diretta su uno striscio di sangue viene spesso eseguita per diagnosticare l'istoplasmosi disseminata.

I funghi visti nei globuli bianchi nel sangue possono essere *Istoplasma capsulatum*, *Talaromyces (Penicillium) marneffe* e *Cryptococcus neoformans*, così come *Candida spp.*

- La maggior parte delle emocolture sono ora automatizzate e sono disponibili flaconi speciali. La pelle può essere contaminata con *Candida spp.*, quindi pulire accuratamente l'area di raccolta. Dovrebbero essere raccolti da 3-10ml di sangue.



LA FUNGEMIA PO' ESSERE INTERMITTENTE



2 CAMPIONI A 30 min DI DISTANZA

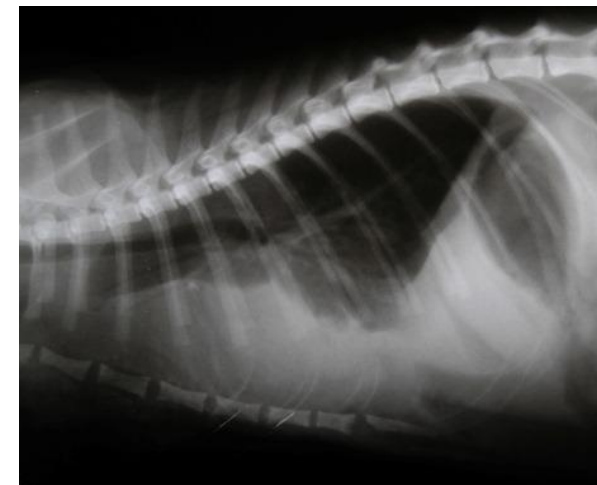
SIERO
PREVIA COAGULAZIONE DEL SANGUE A T
ambiente



PRELIEVO DEL CAMPIONE

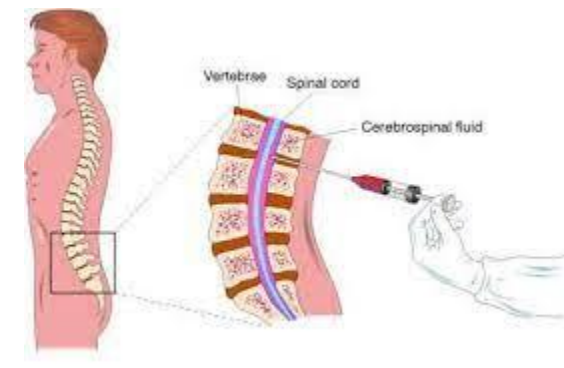
PLEURICO
PERITONEALE

IN PROVETTE EPARINATE
IL MATERIALE NON PURULENTO →
CONCENTRATO MEDIANTE
CENTRIFUGAZIONE (2500rpm x 15 min) →
Sedimento per esami diretti e colturali



LIQUIDO CEFALO -
RACHIDIANO

3ml x rachicentesi
CENTRIFUGATO a 2000 rpm x 15 min
→ Sedimento per esami diretti e
colturali





PRELIEVO DEL CAMPIONE

CATETERE VENOSO:

Rimozione

Incisione con forbici sterile a 5 cm dalla punta

PUNTA in contenitore sterile con brodo nutritivo ANTIBIOTATO LABORATORIO



CATETERE VESCICALE:

Rimozione

Incisione con forbici sterile a 2-3 cm dalla punta

PUNTA in contenitore sterile con brodo nutritivo ANTIBIOTATO LABORATORIO





PRELIEVO DEL CAMPIONE

BIOPSIA: Sterilizzare con 70% di alcool etilico effettuare biopsia con (Bisturi; Punch; Escissione Chirurgica)

RACCOLTA: tessuto raccolti sterilmente devono essere mantenuti umidi con soluzione salina o brodo BHI e messi in un sacchetto di polietilene sigillato

TRASPORTO: Immediato o refrigerato

IMPORTANTE: Non effettuare biopsia se si sospetta sporotricosi la infezione si dissemina e la guarigione si prolunga





PRELIEVO DEL CAMPIONE

- Non è necessario utilizzare dei terreni di trasporto
- eccezioni:
prelievi corneali (semina immediata)
tessuti (in soluzione fisiologica)
- Conservare a + 4° C (se non è possibile effettuare rapidamente la coltura)
- Non congelare i prelievi prima della coltura





DIAGNOSI

Metodi microbiologici convenzionali:

- Microscopia diretta (colorazioni Gram, Giemsa, KOH e calcofluor)
- Coltura
- Identificazione
- Test di suscettibilità

Metodi istopatologici

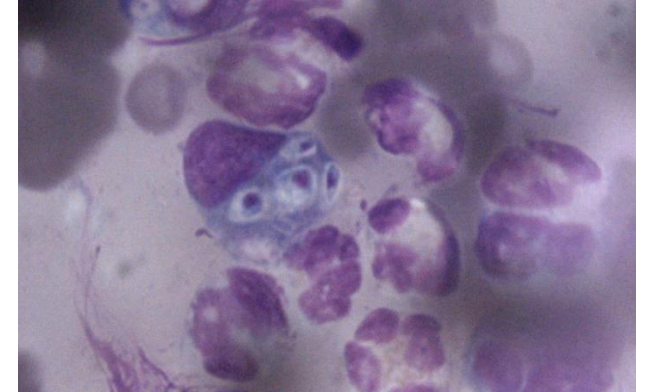
- Microscopia convenzionale
- Immunofluorescenza diretta

Metodi immunologici e biochimici

- Test dell'antigene criptococcico
- Test galattomannano
- (1r3) test del b-d-glucano

Metodi molecolari

- Rilevazione diretta
- Identificazione

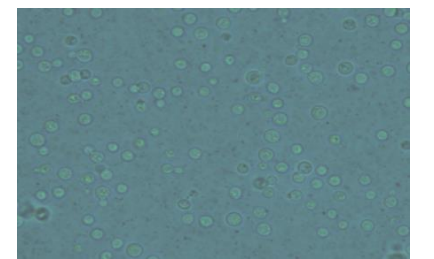
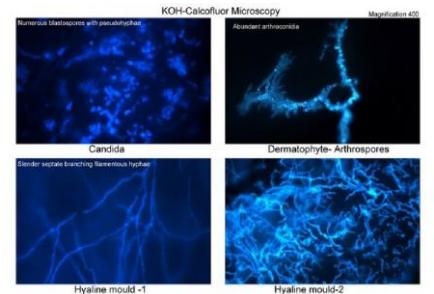
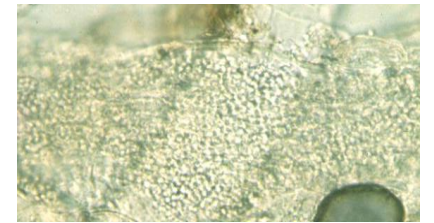
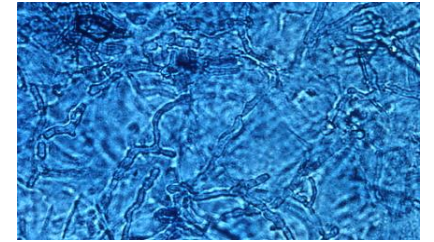




DIAGNOSI MICROSCOPICA

TECNICHE

- Esame a fresco: blu di lattofenolo;
Svantaggi: artefatti
- Preparazione con KOH Materiale: pus, escreato, materiale cheratinizzato
Scopo: macerare e chiarificazione il materiale patologico. Tempo: 5-10 min.
Svantaggi: artefatti, cristalli
- CALCOFLOUR
- Colorazioni per citologia (GIEMSA; DIF QUICK)
- Colorazioni con inchiostro di kina





DIAGNOSI ISTOLOGICA

Table 1
Common histological stains used for diagnosis of fungal infections

Stain ^a	Fungal elements	Background
GMS	Brown to black	Green to blue
PAS	Pink to red	Pale pink to pale purple
GF	Pink to red to purple	Yellow
H&E	Pink to red to purple	Pink

^aGMS Gomori methenamine silver, PAS periodic acid-Schiff, GF Gridley fungus, H&E hematoxylin and eosin

MUCICARMINIO: Capsula di *Cryptococcus* rossa
Nuclei da blu a verde
Altri componenti del tessuto Giallo

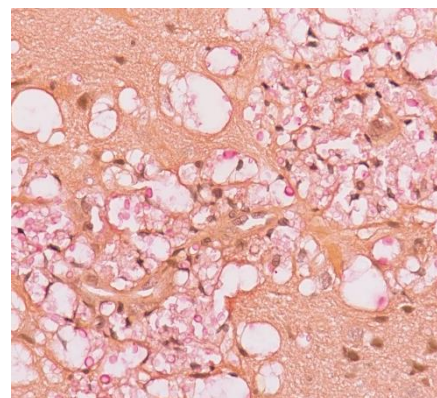
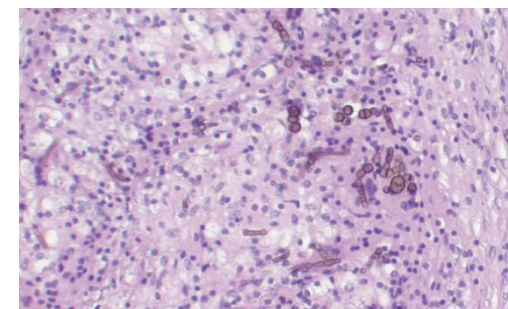
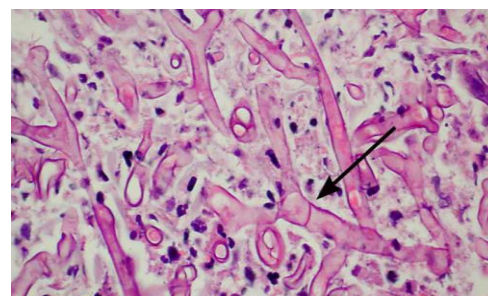
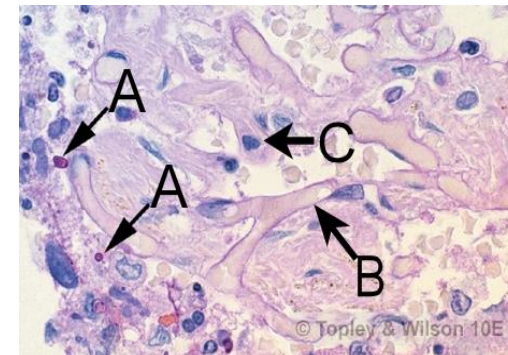
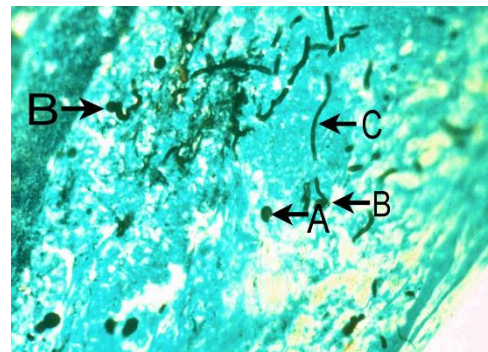


Fig.2: *Ematossilina eosina*

- A: lievito
- B: sono capillari.
- C: nuclei cellule epiteliali,



DIAGNOSI ISTOLOGICA

PAS: colora anche componenti tissutali (glicogeno, fibrina...)

GMS: se la colorazione è troppo intensa si possono colorare anche eritrociti, nuclei cellule dell'ospite.....

Mucicarminio : oltre a *C.neoformans* può colorare anche altri funghi (*Rhinosporidium seeberi*, *B.dermatitidis*) → distinzione su base morfologica

PAS, GMS, Mucicarminio:

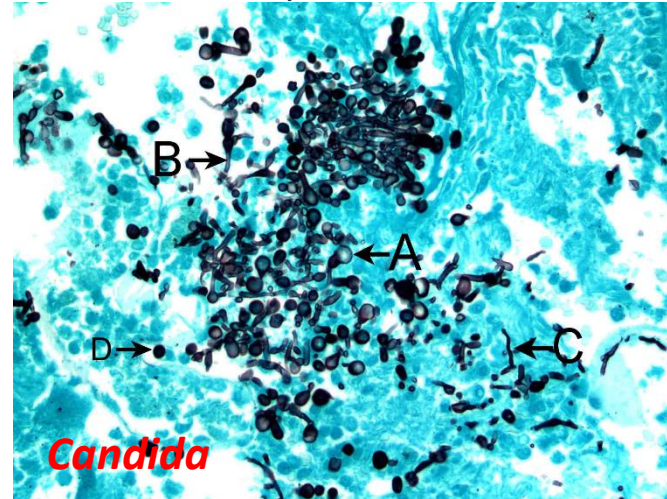
1. non distinguono fra miceti ialini e dematiacei : colorazioni specifiche per la melanina (es Fontana-Masson)
2. non valutano la risposta tissutale

Associare Ematossilina-Eosina come colorazione di contrasto (es GMS+EE)

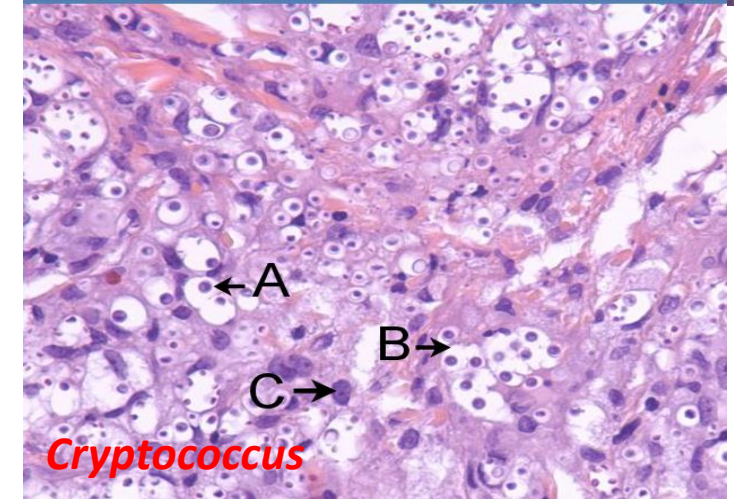
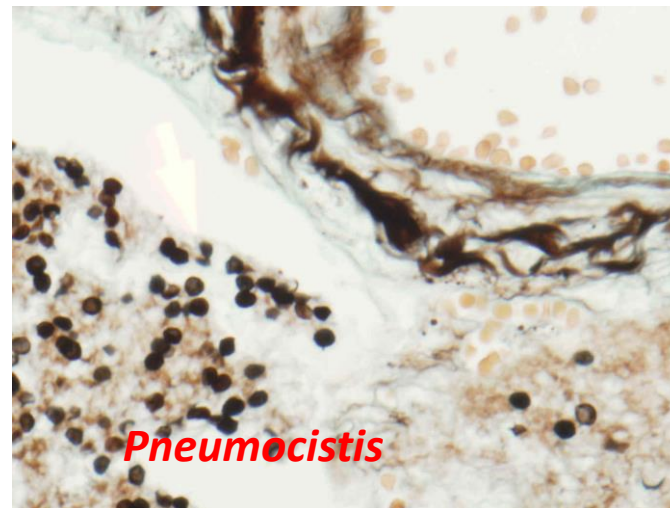
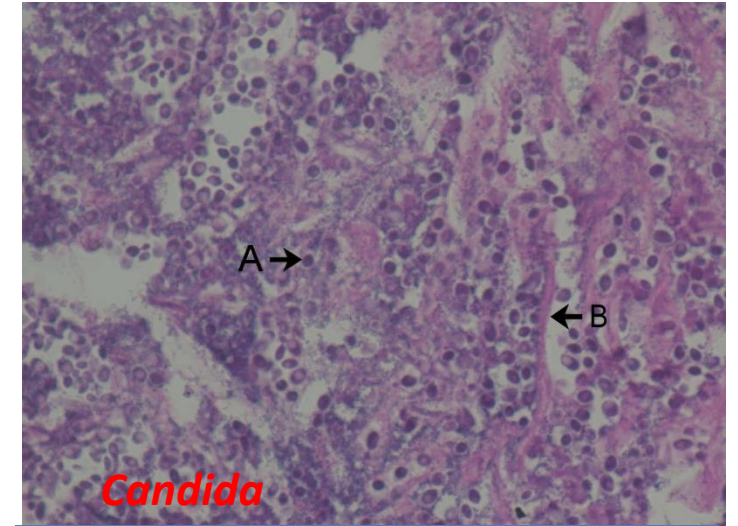


DIAGNOSI ISTOLOGICA

GMS stain, Polmone

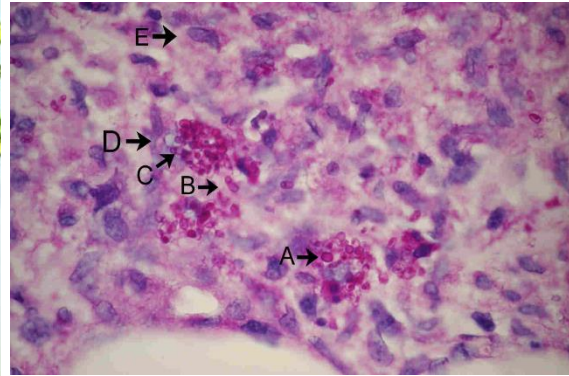


H&E stain, Polmone



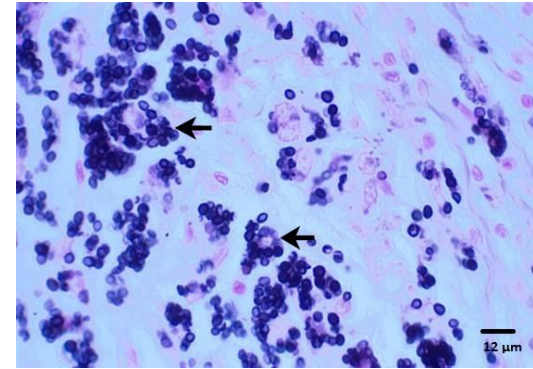


DIAGNOSI ISTOLOGICA



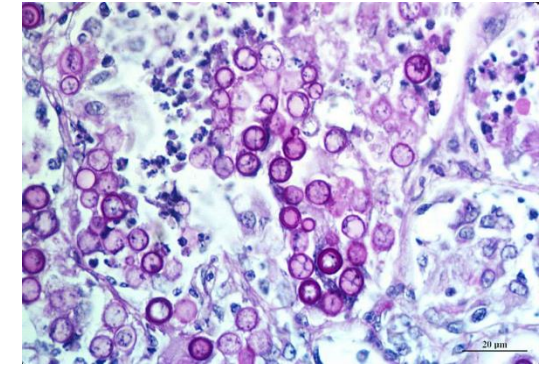
Penicillium marneffeii

Cellule di lievito ovali intracellulari divise in due con un setto



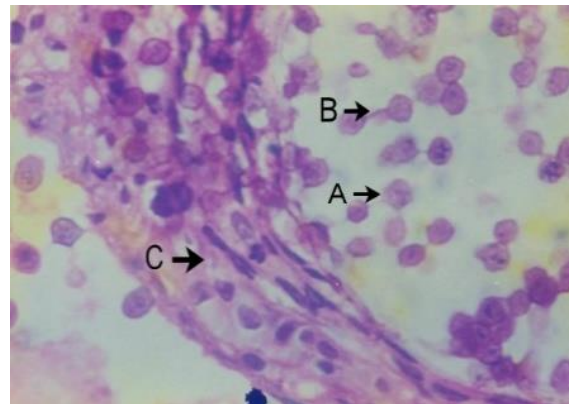
Histoplasma

H&E: Lieviti piccoli ovali in gemmazione, 2-4 mm di diametro, intracellulari



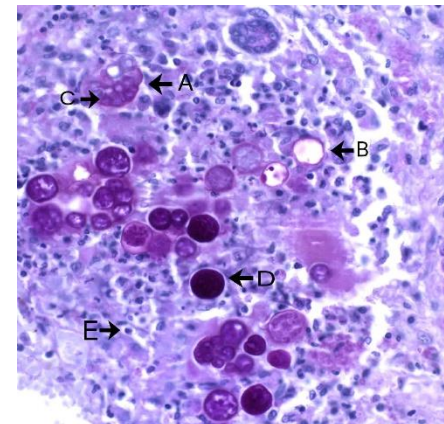
Blastomyces

H&E: Cellule di lievito in gemmazione grandi, 8-15 mm di diametro, con pareti spesse.



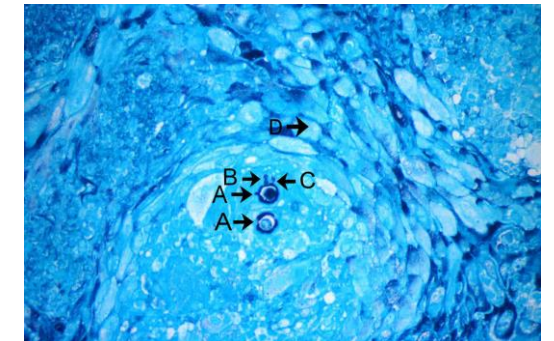
Rhinosporidium seeberi.

Sferule grandi arrotondate o a (450 um) endospore (7-15um)



Coccidioides

Sferule a parete spessa, (diametro 20-200 µm). Piccoli endospore (2-5 µm).

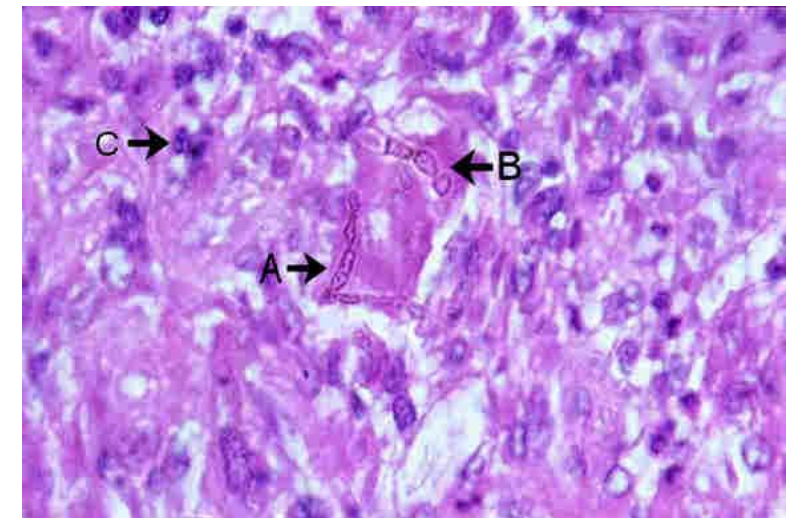
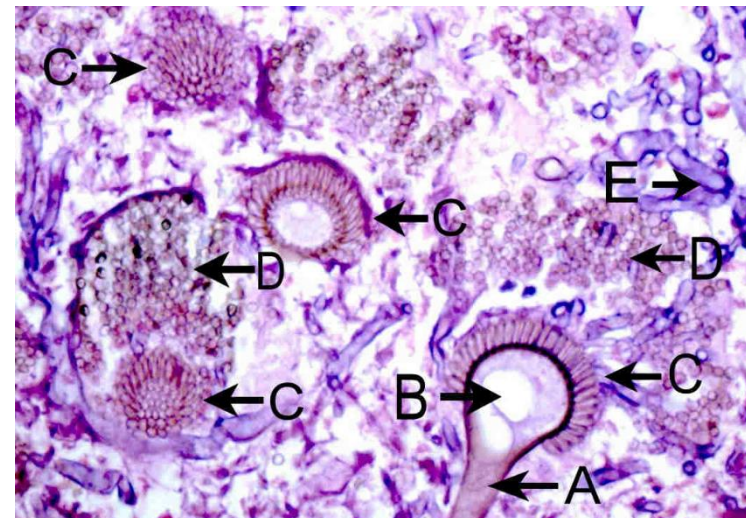
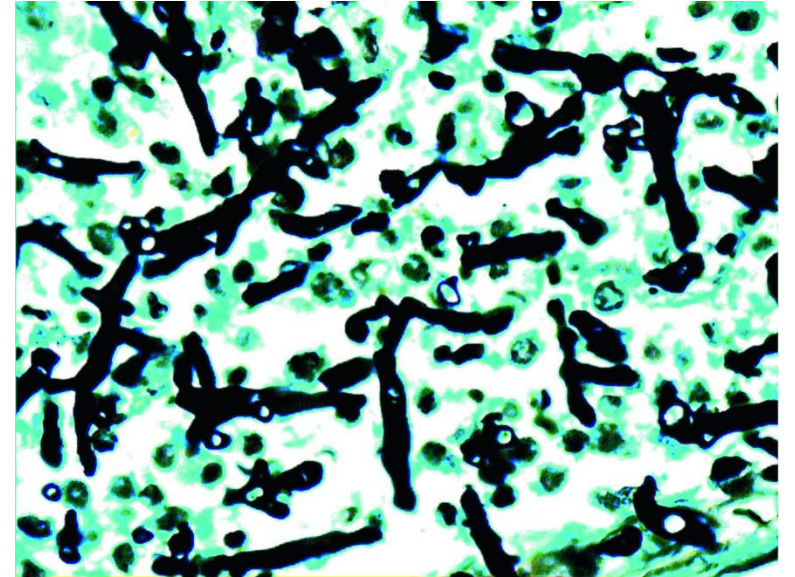
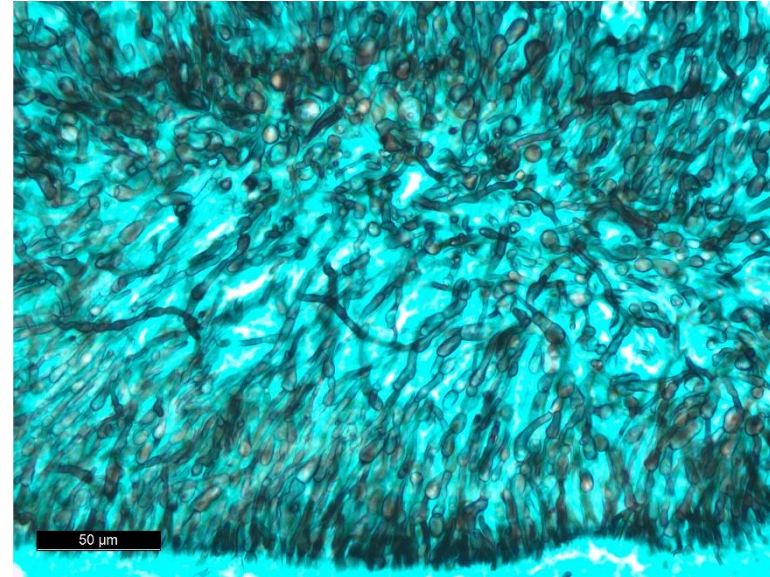


Paracoccidioides

Grandi lieviti sferici 5-60 µm. Aspetto di un "volante"



DIAGNOSI ISTOLOGICA





DIAGNOSI ISTOLOGICA

Are there yeasts present? If so, what is their size?

- *Histoplasma* and *Pneumocystis* 2-4 μm
- *Cryptococcus* 3-8 μm
- *Candida* 4-8 μm
- *Blastomyces* 5-20 μm

Are the yeasts budding?

- Narrow based budding or broad based budding?
- Number and shape of buds?
- Thickness of cell wall?
- Has the yeast got a capsule?
- Is there any pigmentation?

Are there hyphae present?

- Note the shape and size of the hyphae.
- Are there arthroconidia or pseudohyphae?
- Are there septations and if so, what is their frequency?
- Pattern and orientation of branching?
- Presence of absence of natural brown pigmentation?

- *Aspergillus*:

Hyphae with parallel walls

Acute angle branching

Presence of septa

- Mucoraceous moulds:

Irregular shaped hyphae with non-parallel sided walls

Few or no septa



DIAGNOSI ISTOLOGICA

Elemento fungino	Aspetto
<i>Candida spp.</i>	Lieviti ovali in gemmazione di 2–6 mm di diametro. Possono essere presenti pseudoife e ife vere.
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Lieviti sferici in gemmazione, 2–15 mm di diametro. La capsula può essere presente o assente. No ife o pseudoife.
<i>Trichosporon spp.</i>	Artroconidi ialini, blastoconidi e pseudoife, 2-4 x 8 mm
<i>Malassezia spp.</i>	Lieviti ovali in gemmazione unipolare aspetto “birillo da bowling” con collaretto, 2-4 x 8 mm. Ife e forme di lievito in raschiati cutanei.
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Lieviti piccoli ovali in gemmazione, 2-4 mm di diametro, intracellulari,
<i>Sporothrix spp.</i>	Cellule di lievito allungate o “a forma di sigaro” di varie dimensioni. La reazione tissutale forma corpi di asteroidi
<i>Coccidioides immitis/posadasii</i>	Sferule sferiche a parete spessa, 20-30 mm di diametro. Le sferule mature contengono piccole endospore 2-5 mm in diametro. Le endospore rilasciate possono essere scambiate per lieviti.
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Cellule di lievito in gemmazione grandi, 8–15 mm di diametro, con pareti spesse. La giunzione tra madre e cellule figlie è tipicamente a base ampia. Le cellule possono apparire multinucleate
<i>Penicillium marneffei</i>	Cellule di lievito ovali intracellulari divise in due con un setto (divisione per fissione).
<i>Pneumocystis spp</i>	Le cisti rotonde, collassate o a forma di mezzaluna
<i>Aspergillus spp</i>	Ife ialine, settate, ramificate dicotomicamente ad angolo acuto di larghezza uniforme (3–6 mm). Le teste conidiali possono essere presenti in alcuni tipi di lesione (lesioni cavitarie).
Zigomiceti	Ife pauci-settate larghe, a parete sottile, 6-25 mm, con lati non paralleli e ramificazione casuale.
Funghi ialini	Ife ialine, settate, ramificate dicotomicamente. Indistinguibile dalle specie di <i>Aspergillus</i>
Funghi dematiacei	Ife pigmentate (marroni, marrone chiaro o nere), larghe 2-6 mm. Può essere ramificato o non ramificato.



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

MYCOLOGY

SHORT MASTER



DIPARTIMENTO
MEDICINA
VETERINARIA



LA DIAGNOSI DI INFEZIONE FUNGINA ESAME COLTURALE

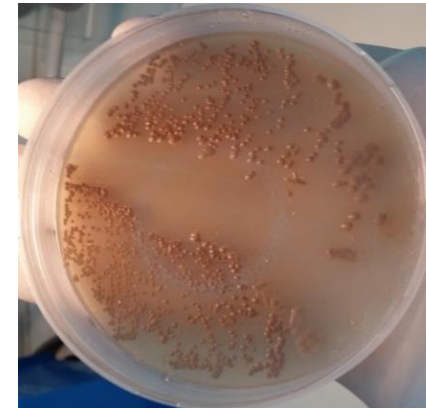
*Claudia Cafarchia, Dipartimento di Medicina
Veterinaria, Università degli Studi di Bari Aldo
Moro.*



DIAGNOSI ESAME COLTURALE

Terreni colturali in micologia clinica

- Sabouraud destrosio agar o brodo.
- Mycobios selective agar (*actidione*: *inibizione funghi ad alta velocità di crescita*):
- Potato destrosio agar (*Induce sporulazione, produzione di strutture morfologiche necessarie per il l'identificazione dei funghi*)
- Dixon agar o brodo (*Isolamento lieviti lipido-dipendenti*)
- Dermatophyte test medium (*Isolamento di dermatofiti; Rosso fenolo: Indicatore di pH*)
- Czapeck Agar (*Aspergillus x tassonomia*)
- Niger seed agar (*C. neoformans possiede un enzima fenolossidasi capace di metabolizzare acido caffeico producendo melanina*)
- Terreno cromogeno per *Candida* spp (*C. albicans - Verde; C. tropicalis - Blu metallico; C. krusei - colonie con bordi bianchi*)
- Acqua peptonata

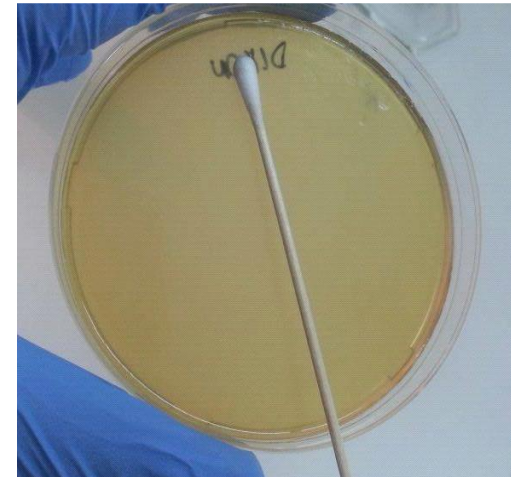




SI ESAME CULTURALE



Semina di campioni "solidi"





DIAGNOSI ESAME COLTURALE

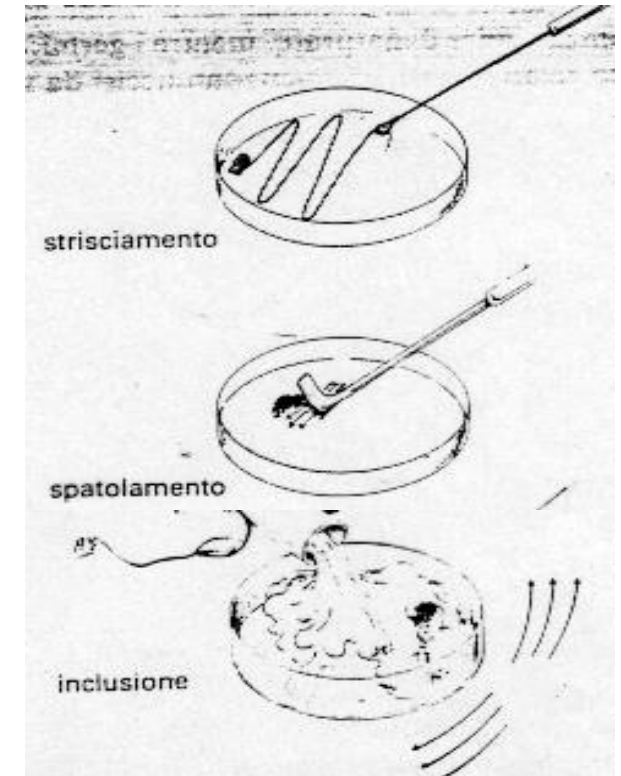
Semina di campioni liquidi:

- Semina per strisciamento o spatolamento in superficie

- Semina per inclusione:

l'inoculo deve essere di 1 ml per piastra a cui va aggiunto il terreno di coltura, mantenuto a 45° C in b.m.

Lasciare solidificare il terreno





DIAGNOSI ESAME COLTURALE

Incubazione

Per i funghi filamentosi a 25° C fino a 14-30 giorni

Per i lieviti a 32° C fino a 10 giorni

Osservare le piastre giornalmente a partire dal 3 giorno





DIAGNOSI ESAME COLTURALE

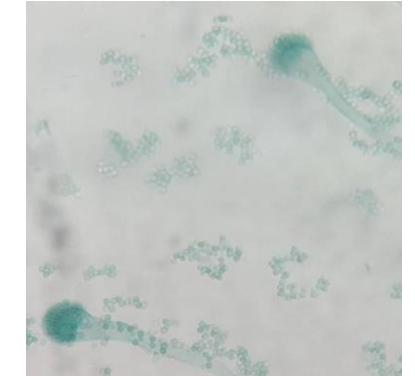
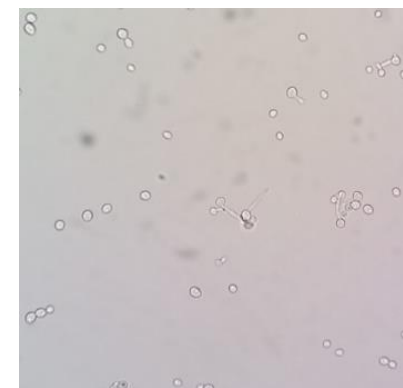
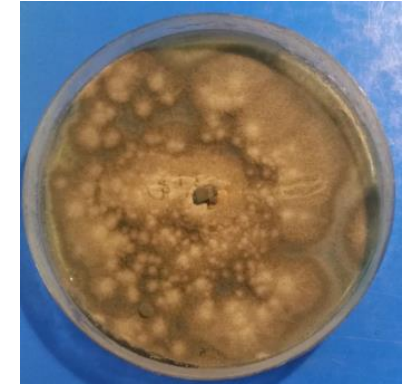
1° fase → **isolamento**

2° fase → **identificazione**



DIAGNOSI IDENTIFICAZIONE

- Osservazione dei caratteri macroscopici delle colonie (i.e., dimensioni, forma, colore, altezza, opacità, consistenza)
- Esame microscopico (i.e., morfologia, disposizione, affinità tintoriali)
- Prove biochimiche

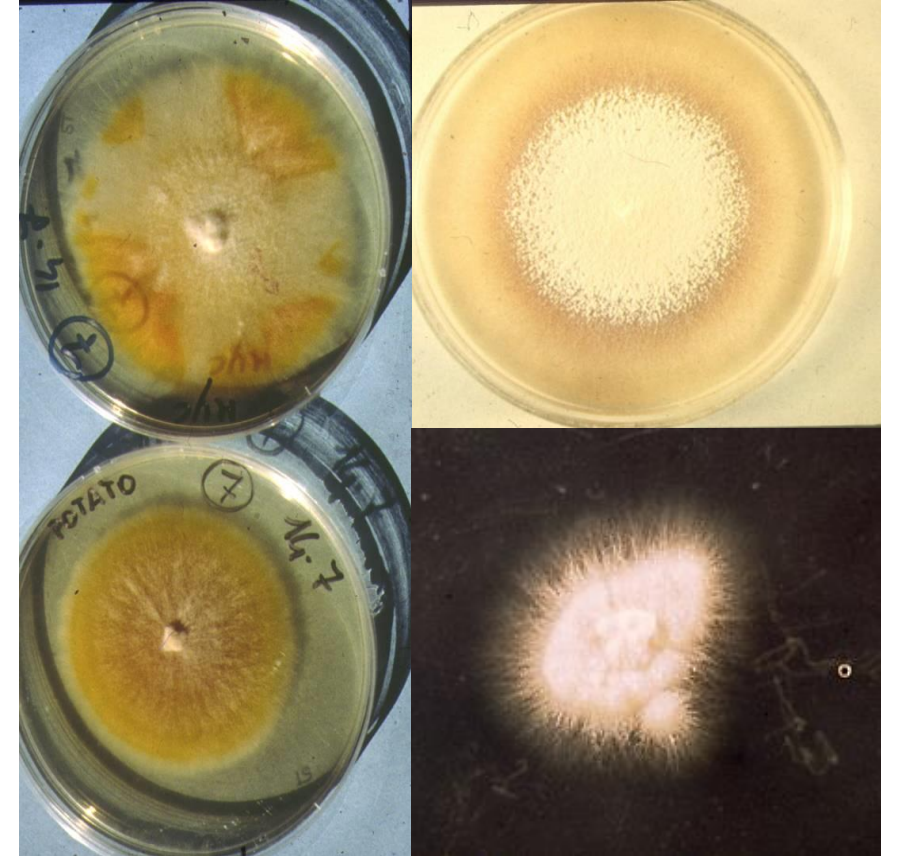




DIAGNOSI IDENTIFICAZIONE

MUFFE: CARATTERI MACROSCOPICI

- VELOCITÀ DI CRESCITA
- TESSITURA DEL MICELIO
- PRESENZA DI ESSUDAZIONE
- COLORE FRONTE/RETRO DELLA COLONIA

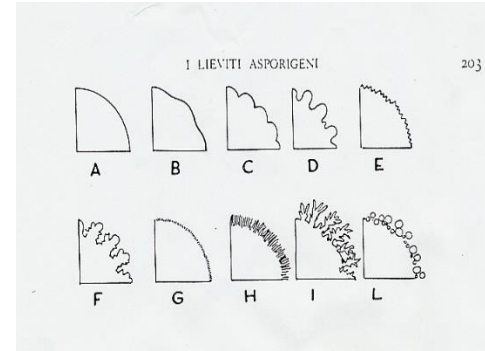




DIAGNOSI IDENTIFICAZIONE

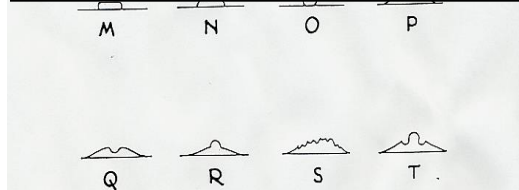
LIEVITI: CARATTERI MACROSCOPICI

- COLORE E MARGINI COLONIA
- CORPO COLONIA



- A) Liscio
- B) Ondulato
- C) Festonato
- D) lobato
- E) Dentellato
- F) Lobato-dentato
- G) Piumato
- H) filamentoso

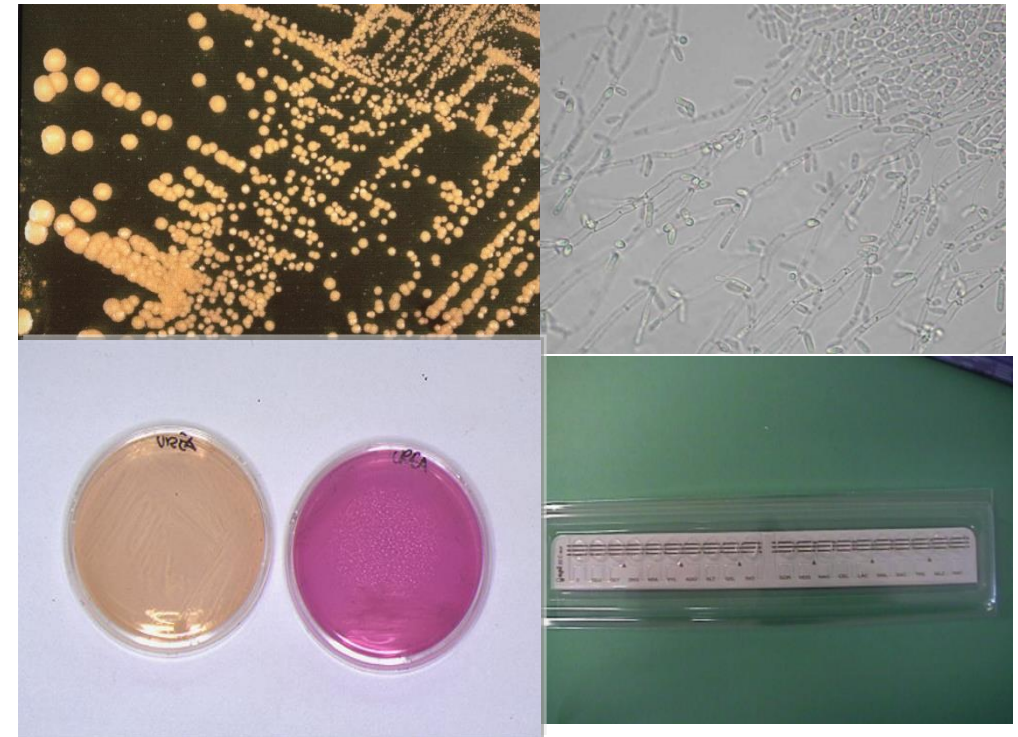
M)	Piano
N)	Convesso
O)	Sferoidale
P)	Lenticolare
Q)	Crateriforme
R)	Umbonato
S)	Cerebroide





DIAGNOSI IDENTIFICAZIONE

- Es. macroscopico/
microscopico
- Prova ureasi
- Assimilazione zuccheri
- Fermentazione
zuccheri





DIPARTIMENTO
MEDICINA
VETERINARIA



DIAGNOSI ESAME COLTURALE

Table 4
Manual comprehensive yeast identification methods

Product (vendor)	No. strains	% Correct	% NoID	% MisID	Author
api* Candida (bioMérieux*)	609	97.4	0.7	2.0	Fricker-Hidalgo et al.
	198	91.4	5.1	3.5	Bernal et al. (37)
	156	82.7	4.5	12.8	Buchaille et al. (38)
	159	91.8	0.6	7.5	Campbell et al. (39)
	202	97.0	2.5	0.5	Paugam et al. (40)
api* 20C AUX (bioMérieux*)	505	96.2	0.0	3.8	Buesching et al. (41)
	1,093	97.3	2.7	0.0	Land et al. (42)
	126	77.0	19.8	3.2	Bergan et al. (43)
	178	89.3	5.6	5.1	Schuffenecker et al. (44)
	206	94.7	0.0	5.3	Willemsen et al. (45)
	243	93.0	6.2	0.8	Ramani et al. (46)
	171	96.5	1.2	2.3	Sand and Rennie (47)
	201	100.0	0.0	0.0	Wadlin et al. (48)
	116	99.1	0.0	0.9	Gündes et al. (49)
	Auxacolor™ (Bio-Rad)	178	88.8	5.6	5.6
97		79.4	15.5	5.2	Milan et al. (50)
206		62.1	NR	NR	Willemsen et al. (45)
156		85.9	10.3	3.8	Buchaille et al. (38)
105		91.4	4.8	3.8	Sheppard et al. (51)
159		91.2	8.2	0.6	Campbell et al. (39)
202		94.1	4.9	1.0	Paugam et al. (40)
100		94.0	6.0	0.0	Romney et al. (52)
Candifast® (ELITech Group)	178	51.1	25.3	23.6	Schuffenecker et al. (44)
	116	88.8	5.2	6.0	Gündes et al. (49)
Fungichrom® (ELITech Group)	156	84.6	10.9	4.5	Buchaille et al. (38)
	202	92.1	5.4	2.5	Paugam et al. (40)
	116	95.7	2.6	1.7	Gündes et al. (49)
Fungifast® (ELITech Group)	156	77.6	19.9	2.6	Buchaille et al. (38)
	202	88.1	10.9	1.0	Paugam et al. (40)
ID 32 C (bioMérieux*)	69	76.8	0.0	23.2	Latouche et al. (53)
	156	98.1	1.9	0.0	Buchaille et al. (38)
	243	88.9	10.3	0.8	Ramani et al. (46)
	250	93.6	0.8	5.6	Marklein et al. (54)
	300	99.3	0.0	0.7	Kitch et al. (55)
RapID™ Yeast Plus (Remel)	156	78.2	5.8	16.0	Buchaille et al. (38)
	447	90.6	2.5	6.9	Espinel-Ingroff et al. (56)
	133	94.0	0.0	6.0	Heclan et al. (57)
	201	99.0	0.0	1.0	Wadlin et al. (48)
	750	95.5	2.4	2.1	Sanguinetti et al. (58)
	623	99.8	0.0	0.2	Bowman and Ahearn
	229	99.1	0.0	0.9	Bowman and Ahearn
Uni-Yeast™ Tek® (Remel)	206	94.2	NR	NR	Cooper et al. (61)
	126	88.7	0.0	11.3	Bergan et al. (43)
	489	37.2	49.7	13.1	Salkin et al. (62)

Table 5
Automated comprehensive yeast identification methods

Product (vendor)	No. strains	% Correct	% NoID	% MisID	Reference
Biolog YT Microplate™ (Biolog)	129	48.8	12.4	38.8	(63)
	171	48.5	8.8	42.7	(47)
MicroScan® Rapid YS (Siemens)	437	85.4	NR	8.2	(64)
	357	96.6	0.6	2.8	(65)
	150	85.3	NR	NR	(66)
Sherlock® MIS (MIDI, Inc.)	550	68.0	16.2	15.8	(67)
	477	70.2	6.1	23.7	(68, 69)
Vitek® YBC (bioMérieux*)	253	95.7	0.0	4.3	(70)
	352	84.9	0.0	15.1	(80)
	1,106	93.4	NR	NR	(71)
	221	83.3	2.7	14.0	(81)
	398	97.2	1.3	1.5	(72)
	222	80.6	14.4	5.0	(74)
	150	95.0	NR	NR	(66)
	409	89.7	3.2	7.1	(73)
	55	87.3	0.0	12.7	(53)
	171	96.5	0.6	2.9	(47)
201	91.0	4.0	5.0	(48)	
Vitek® 2 YSI (bioMérieux*)	97	99.0	0.0	1.0	(75)
	172	93.6	3.5	2.9	(76)
	623	98.6	0.5	0.9	(77)
	750	98.4	0.5	1.1	(58)
	136	94.1	1.2	4.7	(78)
	68	97.1	0.0	2.9	(79)



DIAGNOSI ESAME COLTURALE

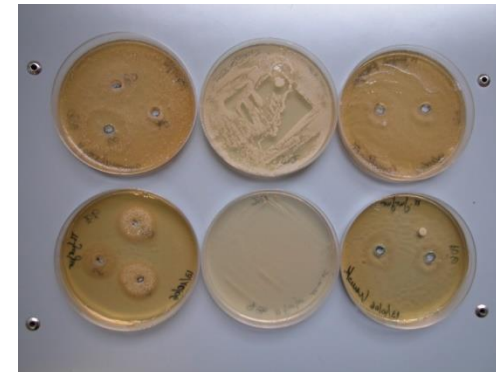
C. Cafarchia et al / Molecular and Cellular Probes 25 (2011) 1–7

3

Table 2
Morphological, physiological and biochemical characteristics of the 14 currently recognized species of *Malassezia*.

Species	Morphology	SDA (32 °C)	TDT using Tween				Chromophor EL	Catalase	Tryptophan	β-glucosidase	Growth on Dixon's agar at		
			20	40	60	80					32 °C	37 °C	40 °C
<i>M. furfur</i> [5]	G E C	–	+ [–]	+ [–]	+ [–]	+ [–]	+ [–]	+	– or ±	+	+	+	
<i>M. obtusa</i> [5]	E C	–	–	–	–	–	+	–	+	+	– or ±	–	
<i>M. globosa</i> [5]	G	–	–	–	–	–	+	–	–	+	– or ±	–	
<i>M. slooffiae</i> [5]	E C	–	+ or ± [–]	+	+	–	+	–	–	+	+	+	
<i>M. sympodialis</i> [5]	E	–	– or ±	+	+	–	– or ±	+	+	+	+	+	
<i>M. restricta</i> [5]	G E	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+ or –	–	
<i>M. dermatis</i> [13]	G E	–	+	+	+	± or +	+	?	–	+	+	+	
<i>M. japonica</i> [14]	G	–	–	±	+	–	?	?	?	+	+	–	
<i>M. nana</i> [16]	E	–	v	+	+	±	–	+	?	–	+	+	+ or –
<i>M. yamatoensis</i> [15]	E	–	+	+	+	+	?	+	?	?	+	+	–
<i>M. equina</i> [17]	G E	–	±	+	+	+	–	+	?	– [+]	+	±	–
<i>M. caprae</i> [17]	G E	–	–	+	+	+ [–]	–	+	?	+ [–]	+	– or ±	–
<i>M. cuniculi</i> [18]	G	–	–	–	–	–	–	+	?	+	– or ±	+	+
<i>M. pachydermatis</i> [5]	E	+ or ±	+	+	+	+	+	+ or ±	–	+ [–]	+	+	+

Globose (G); ellipsoidal (E); cylindrical (C); Sabouraud dextrose agar (SDA); weakly positive (±); rare deviation from usual pattern ([]); unknown (?). Tween diffusion test (TDT); Tryptophan consumption; Chromophor EL; Catalase; Tryptophan; β-glucosidase [34–37].





UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

MYCOLOGY

SHORT MASTER



DIPARTIMENTO
MEDICINA
VETERINARIA



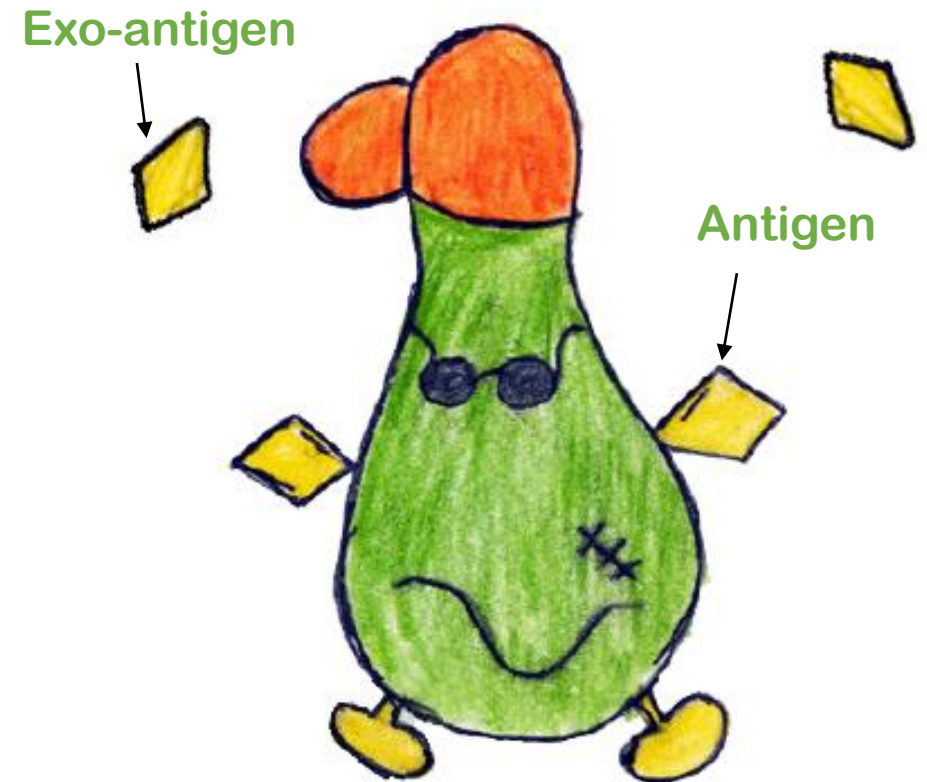
LA DIAGNOSI SIEROLOGICA E MOLECOLARE DI INFEZIONE FUNGINA

*Claudia Cafarchia, Dipartimento di Medicina
Veterinaria, Università degli Studi di Bari Aldo
Moro.*



TARGET SIEROLOGICI

- ANTICORPI (Uso di antigeni)
- ANTIGENI (Uso di anticorpi specifici)



TEST DISPONIBILI



ANTICORPI

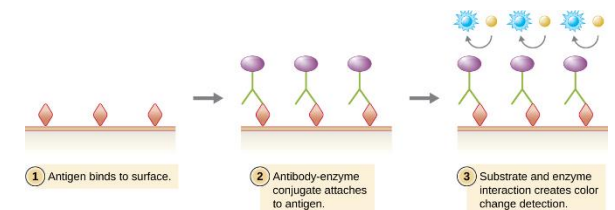
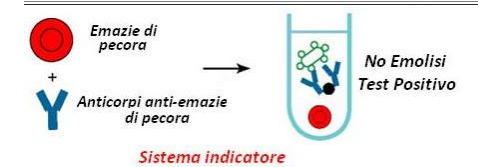
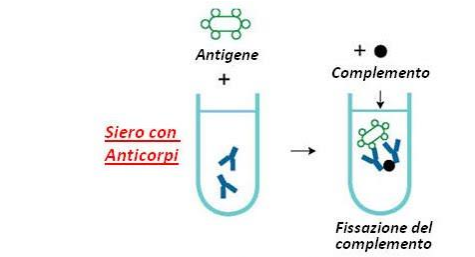
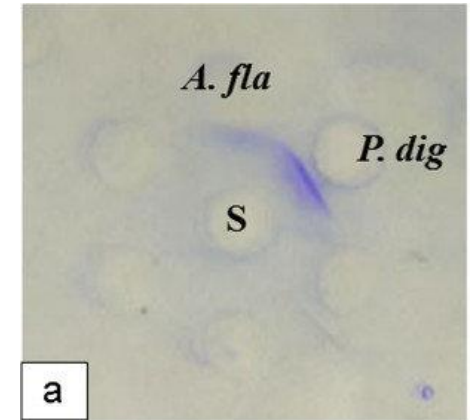
- Immunodiffusion
- Radioallergosorbent Test (RAST)

ANTIGENI

- Latex Agglutination (LA)
- Test immunoenzimatici (EIA)
- Test Immuno-cromatografico :“lateral flow assay” (LFA).

ANTIGENI ED ANTICORPI

- Complement fixation
- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
- Test immunoenzimatici (EIA)





MISURE DI ACCURATEZZA

- **Sensibilità.** Quantifica il numero di falsi negativi: 80% di sensibilità = 80/100 pazienti con campione positivo alla coltura produce un risultato positivo nel test
- **Specificità:** Quantifica il numero di falsi positivi 80% di specificità = 20/100 volontari sani senza malattia producono un risultato del test positivo

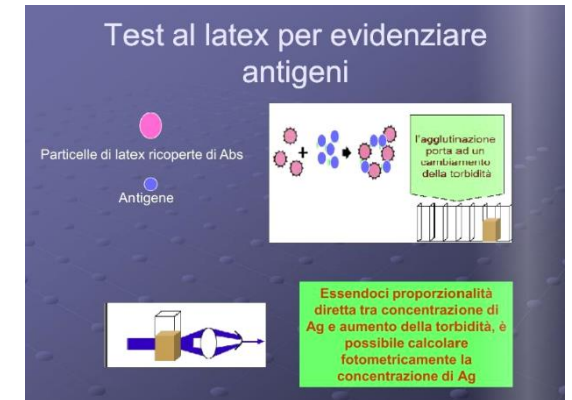


RICERCA DI ANTIGENI CIRCOLANTI

- **Indagine utilizzata in:**
- Criptococcosi
- Aspergillosi
- Candidemia
- Istoplasmosi

- **Metodiche:**
- Agglutinazione al latex
- Saggi immunoenzimatici
- Saggi radioimmunologici

- **Problematiche:**
- Incostanza dell'antigene nei vari fluidi biologici
- Falsi negativi / falsi positivi
- Necessità di una maggiore sperimentazione





RICERCA DI ANTICORPI

- **Indagine utilizzata in:**

- Aspergillosi
- Blastomicosi
- Coccidioidomicosi
- Istoplasmosi
- Paracoccidioidomicosi

Test Platelia™ Candida Ab
Anticorpi anti-mannano
Sensibilità fino a 85–90%

Vircell Microbiologists (Granada, Spagna)
Mannoproteina situata sulla parete cellulare del
tubo germinativo
Se: dell'83–85%; Sp: dell'86-95%

- **Metodiche:**

- Immunoprecipitazione,
- Fissazione Complemento
- Saggi immunoenzimatici
- Immunofluorescenza indiretta
- Agglutinazione

Platelia™ Aspergillus IgG (Bio-Rad)
IgG anti- Aspergillus

The VIRION/SERION ELISA
Aspergillus fumigatus IgG/IgM/IgA

- **Problematiche:**

- Scarsa o mancanza di anticorpi nell' immunocompromesso
- Reazioni crociate fra varie specie fungine
- Necessità di maggiore standardizzazione delle metodiche



RICERCA DI ANTIGENI CIRCOLANTI

GALATTOMANNANO (GM) PER LA DIAGNOSI DI ASPERGILLOSI

- GM è un polisaccaride della parete cellulare specifico dell'*Aspergillus*
- Test positivo: OD di 0,5 e due risultati di test positivi

VARIABILITÀ DIPENDE

Fungo

- Carica fungina e stadio di crescita,
- Perdita dell'antigene dal sito di infezione
- Legame dell'antigene da sostanze ematiche

(il GM viene sequestrato ed eliminato dai macrofagi e dai reni)

Ospite

- Antifungini (riducano la circolazione di GM)
- Piperacillina-tazobactam e amoxicillina-clavulanato (FALSI POSITIVI)

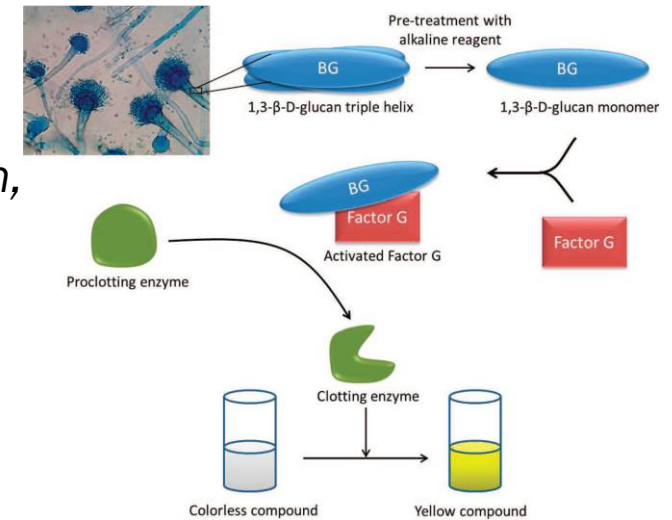




RICERCA DI ANTIGENI CIRCOLANTI

TEST DEL (1-3) -B-D-GLUCAN (BG)

- BG è un componente della parete cellulare di molti funghi patogeni
- Diagnosi di malattia invasiva causata da *Aspergillus*, *Candida spp*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* e *Acremonium*,
- Non rileva infezione da specie *Cryptococcus* o *Zygomycetes* a causa delle basse quantità di BG nelle pareti cellulari
- Specificità del 90% per un singolo risultato positivo del test
- Non identifica il fungo infettante,
- Dosaggio BG tende a diventare positivo prima del saggio GM per aspergillosi
- BG è onnipresente nell'ambiente (ad es. In alcuni tipi di garza e amido di bucato) e potrebbero esserci risultati falsi positivi a causa da una contaminazione dei campioni.



Fungitell process.

1,3-b-D-glucan (BG) is in fungal cell wall. BG is released in a soluble form as triple helices. The triple helices to form monomers. Monomeric BG binds to a serine protease zymogen (factor G). Activated factor G then activates a clotting enzyme, Conversion a colorless reagent to a yellow compound, which can be measured with spectrophotometry



RICERCA DI ANTIGENI CIRCOLANTI

Test Gucuronoxylomannano, GXM

- Rilevamento dell'antigene criptococcico
- Se: 97-99% Sp: 86-100%
- Utile per Infezione polmonare criptococcica e meningite.

FALSI POSITIVI

- Fattore reumatoide (uso della pronasi).
- Presenza di *Trichosporon*,
- Uso di amido, alcuni disinfettanti e sapone
- Uso di fiale anaerobiche Port-A-Cul™ BBL per trasporto dei campioni.

FALSI NEGATIVI

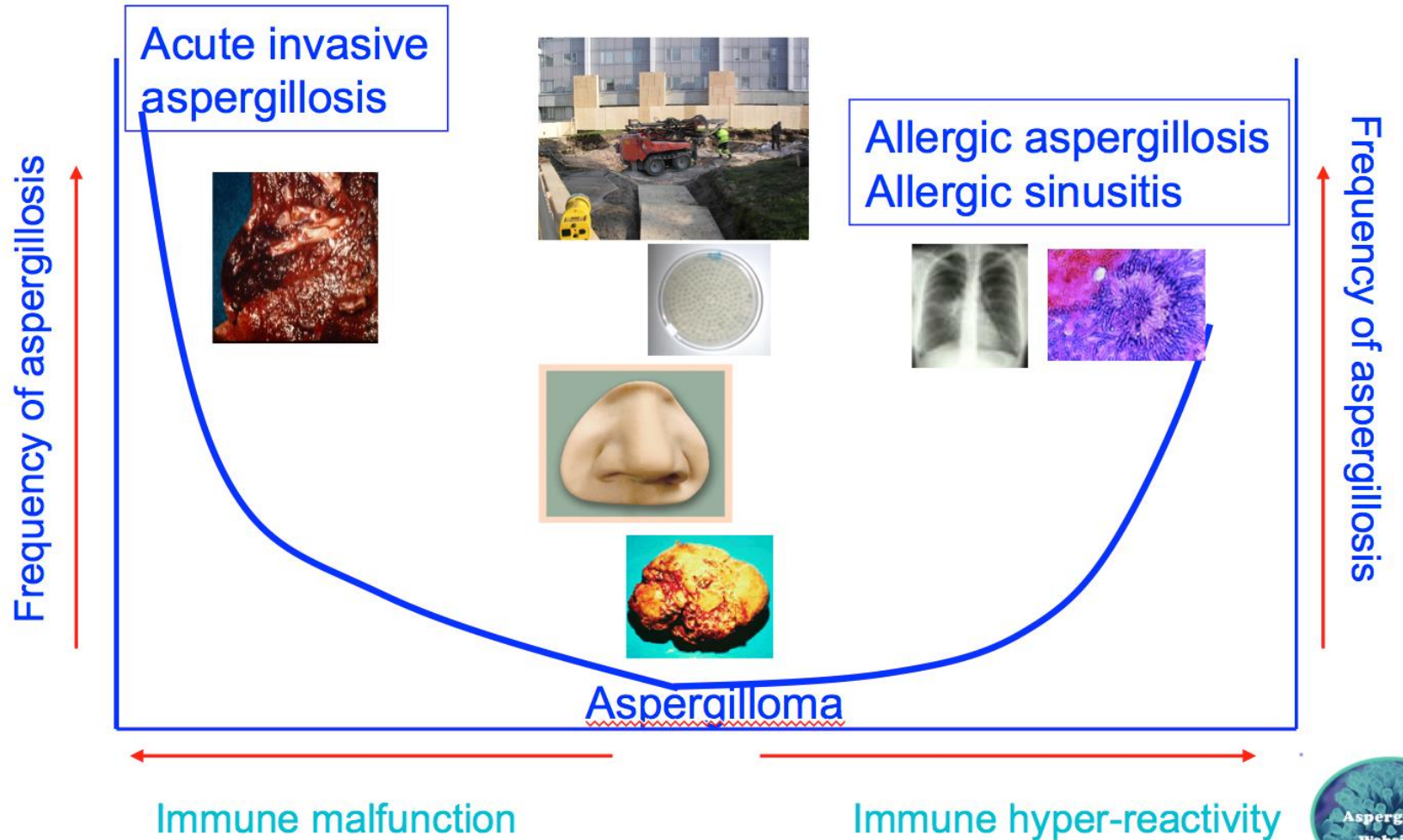
- Aumento del pH
- Alte temperature

METODI

- Latex agglutination
- Cryptococcal Antigen Latex Agglutination System (CALAS®) Latex-Cryptococcus Antigen Test
- Pastorex™ Crypto Plus
- Cryptococcus Antigen Test
- Crypto-LA®
- Eiken Latex test
- Enzymatic Immuno-Assay
- Premier™ Cryptococcal Antigen



ASPERGILLOSI





ASPERGILLOSI

- **DIAGNOSI DI MALATTIA INVASIVA:** rilevazione degli antigeni di *Aspergillus* Kit ELISA per rilevare Galattomannano e Beta d-Glucano

- **DIAGNOSI DI MALATTIA ALLERGICA:** Rilevazione di IgE mediante RAST/ELISA, fissazione del complemento o Immunodiffusione.



ASPERGILLOSI: Galactomannano

CUT OFF 0.5

Altamente Immunogeno;
 Presente in tutti gli Aspergilli
 Siero, BAL e CSF
 ELISA Tests (Platelia,
 Pastorex)

- Sensibilità e specificità variabile
- Risultati falsi positivi con terapia antibiotica (Ampicillina, Amoxicillina, amoxicillina - acido clavulonico)
- *La positività del test nel siero precede frequentemente, di almeno 1 settimana, lo sviluppo dei segni clinici*

Patient group	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Allo HSCT, neutropenia, all on steroids	96	99
Neutropenia, suspected IA, GVHD, steroids	100	93
Allo HSCT	81	89
Haematologic malignancy	80	82
Neutropenia, Cut Off 1.5	88	90

Kedzierska et al, Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2007) 26:755

Wheat L.J, Transplant Infect Dis (2006), 8:128



ASPERGILLOSI: Galactomannano

Serum and urine Aspergillus GMA ELISA for the diagnosis of disseminated aspergillosis in dogs when a cutoff GM of ≥ 1.5 is used.

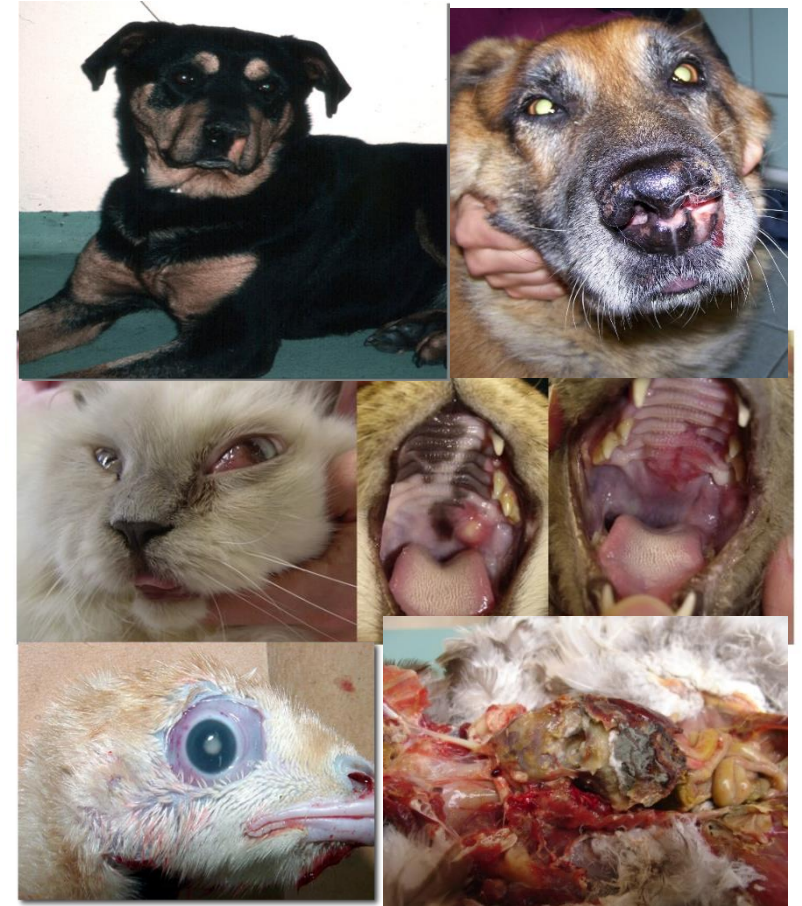
Garcia et al., J Vet Intern Med. 2012

Serum GMA measurement (cutoff GM of ≥ 1.5) has a poor sensitivity (23%) but is a moderately specific (78%) to rule out infection in cats with suspected feline upper respiratory tract aspergillosis.

Whitney et al., Vet Microbiol. 2013

Serum galactomannan (index of 0.5) and protein electrophoresis (increased beta and/or gamma globulin concentrations) may be valuable tools in the diagnosis of avian aspergillosis.

Cray et al., J Avian Med. Surg. 2009





ASPERGILLOSI: (1→3)-β-D-glucan

CUT OFF 60 pg/ml

- Altamente distribuito in natura e (funghi piante, alghe)
- Usato per diagnosticare Candidosi e Fusariosi, aspergillosi e altri funghi.
- **No Cryptococcus** o **Zigomiceti**
- Test: Fungitec-G, Fungitell; Sensibilità e specificità variabile
- falsi positivi in pazienti batteriemici (60%)

Patient group	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Haematologic disease	88	85
Neutropenia, suspected IA, GVHD, steroids	55	95
Neutropenia, Cut off 120 pg/ml	88	90



ASPERGILLOSI: (1→3)-β-D-glucan

CUT OFF 60 pg/ml

- Utilizzo di materiale e ambiente “glucan-free”;
- 2 determinazioni seriali (almeno 2 a settimana);
- cut-off indicati sono = 80 pg/mL per la positività e <60 pg/mL per la negatività.
- i valori tra 60 e 80 pg/mL sono considerati borderline

Patient group	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Haematologic disease	88	85
Neutropenia, suspected IA, GVHD, steroids	55	95
Neutropenia, Cut off 120 pg/ml	88	90



ASPERGILLOSI: (1→3)-β-D-glucan

Optimized avian cut-off value of ≥ 461 pg/dl for positive disease.

TEST DEL (1R3) -B-D-GLUCAN (BG)
(Fungitell; Associates of Cape Cod)

- BG concentrations are highly variable between and within different avian groups,
- It could serve as a useful adjunctive diagnostic test for aspergillosis particularly as a negative predictor of infection
- The overall sensitivity and specificity of the BG test for diagnosis of aspergillosis in birds was 60.0 and 92.7%,

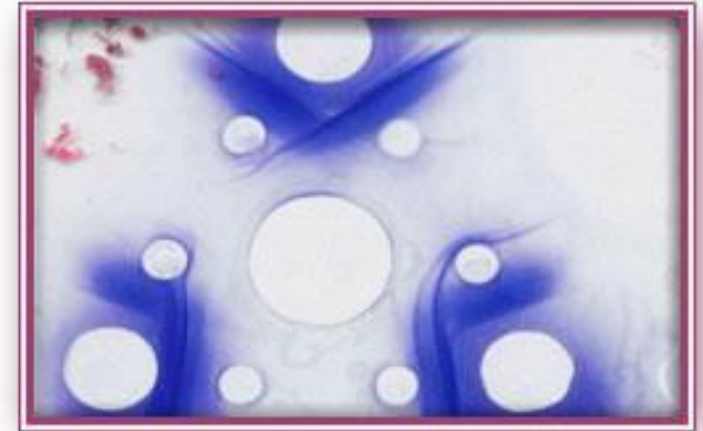
Burco et al., Avian Diseases, 2012





ASPERGILLOSI: ANTICORPI

- *Gli anticorpi contro l'Aspergillus possono essere rilevati solo nei pazienti con Aspergillosi Bronco-Polmonare Allergica, Aspergilloma e Chronic pulmonary aspergillosis (CPA).*
- Meno affidabili dei test antigenici a causa della presenza di anticorpi anti-Aspergillus in individui sani.
- Un alto livello di anticorpi precipitanti non dimostra la presenza di una malattia in corso



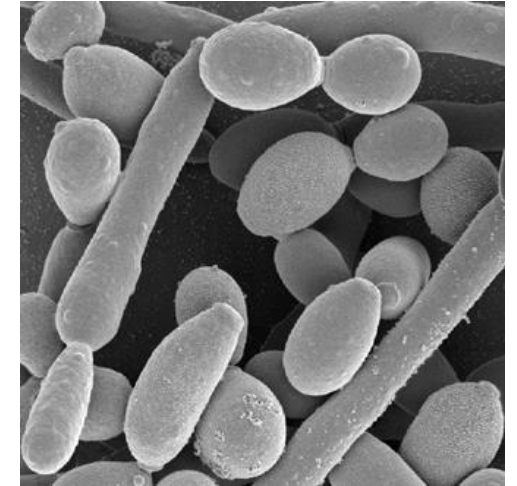
ImmunoCAP

CANDIDIASI



Agenti eziologici primari:

- *C. albicans*,
- *C. parapsilosis*,
- *C. glabrata*,
- *C. tropicalis*.



Diagnosi Basata sul rilevamento di:

- β -glucano (Fungitec-G – saggio enzimatico)
- Mannan (Pastorex, Platelia - ELISA)
- anticorpo (IgA, IgG – ELISA, Immunodiffusione)



CANDIDIA

Candidiasis

Test	Sensitivity (%)	Specificity (%)
LA mannan (Pastorex) ^{MAb}	25-28	100
ELISA mannan (Platelia) ^{MAB}	42	93-98
ELISA mannan (Platelia) ^{PAb}	21-84	98-100
β -glucan (enzymatic – Fungitec-G)	71-97	54-96

MAb – monoclonal antibody

PAb – polyclonal antibody

Yeo & Wong, Clin Micro Rev (2002) 15:465

Candidiasis

Antibody Test

Sensitivity ~80% in immunocompetent individuals

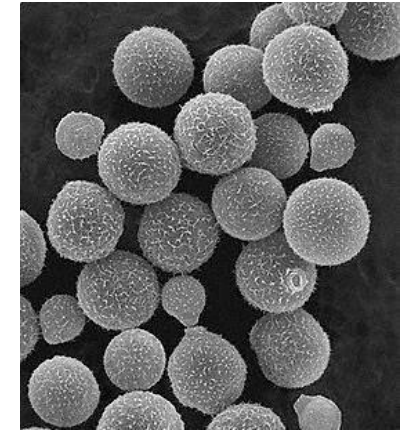
Anti-Candida antibodies may also be present in healthy individuals and cause false positive results

Sensitivity may not be relevant in immunocompromised individuals



Cryptococcus

- Diagnosi basata solo sulla rilevazione dell'antigene del polisaccaride capsulare (**glucuronoxilomannano**)
- Nessun test anticorpale
- Latex agglutination (PREMIER Cryptococcal antigen assay)
- Enzyme Immunoassay (Pastorex Crypto Plus, IMMY Latex-Cryptococcus antigen assay)
- Test immunoenzimatici (EIA)
- Test Immuno-cromatografico :“lateral flow assay” (LFA).



Cryptococcosis

Antigen Test

- detection in serum, BAL or CSF

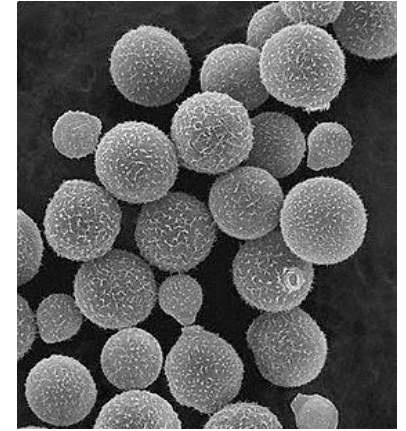
- false-positive results may be caused by rheumatoid factor or cross-reactive organisms (*Trichosporon asahii*)

Test	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Latex Agglutination	90	95
ELISA ^{MAb}	90	70-80



Cryptococcus

- Diagnosi basata solo sulla rilevazione dell'antigene del polisaccaride capsulare (**glucuronoxilomannano**)
- Utilizzato nel liquor, nel siero e nelle urine.
- La sensibilità di alcuni test nel siero aumenta quando questo viene pretrattato con pronase
- Il monitoraggio del titolo dell'Ag di *Cryptococcus* nel siero di pazienti HIV-positivi si è dimostrato inefficace



Cryptococcosis

Antigen Test

- detection in serum, BAL or CSF

- false-positive results may be caused by rheumatoid factor or cross-reactive organisms (*Trichosporon asahii*)

Test	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Latex Agglutination	90	95
ELISA ^{MAb}	90	70-80



Cryptococcus

- A commercial cryptococcal antigen latex agglutination test was used to evaluate sera from **20 cats** with cryptococcosis and **184 cats without cryptococcosis**. Cryptococcal antigen was detected in the sera from 19 of 20 cats with cryptococcosis. The antigen was not detected in sera from any of the cats without cryptococcosis. **The test had sensitivity of 95% and specificity of 100%.**

(Medleau et al., J Am Vet Med Assoc. 1990)

- Monitoring serum latex agglutination **test** results in dogs with CN involvement may provide a safe, less invasive means of **monitoring response to treatment**
- O'Toole et al., J Am Vet Med Assoc. 2003*

- Antigen assays alone may not be sufficient for diagnosis of cryptococcosis in cats and dogs.

Trivedi et al., Am Vet Med Assoc. 2011





DIAGNOSI MOLECOLARE

- PCR utilizzata per la diagnosi di candidemia e aspergillosi disseminata
- Siero o sangue intero, per Candida e Aspergillus,
- Espettorato o BAL per aspergillosi
- Le sequenze target: geni ribosomiali 18S rRNA; o ITS
- Se: dal 78% al 100% per candidosi e dal 33% al 100% per aspergillosi
- Sp: varia

[Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens.](#) Van Burik JA, et al. J Clin Microbiol. 1998

[Usefulness of panfungal PCR for the diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients.](#) Adam O, et al. Pathol Biol (Paris). 2004

[A prospective study of real-time panfungal PCR for the early diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients.](#) Jordanides NE, et al. Bone Marrow Transplant. 2005.

DIAGNOSI MOLECOLARE



Table 8
Main features of the different molecular biology-based tests, commercially available, for fungal detection

Assay (manufacturer)	Species claimed	Sample type (volume)	Main features for		
			Sample preparation	PCR	Final identification
LightCycler® SeptiFast Test M ² ™ (Roche Diagnostics GmbH)	<i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , and <i>Aspergillus fumigatus</i>	Whole blood (1.5 ml)	Isolation of total DNA Mostly manual*	Broad-range ITS PCR	Fluorescence real-time PCR signals and melting curves
Vyoo® Assay (SIRS-Lab GmbH)	Idem as above	Whole blood (up to 5 ml)	Selective enrichment of microbial DNA Automated process	Broad-range rDNA PCR	Fluorescence signals read on an automated array ^b
Magicplex™ Sepsis Real-Time Test (Seegene Inc.)	Idem as above	Whole blood	Selective human cell lysis and degradation of human DNA Manual or automated	Broad-range rDNA PCR	Fluorescence real-time PCR signals
SepsitTest™ Molzym GmbH & Co. KG)	Pan-yeast assay	Whole blood, heart valve tissue, and synovial fluid		Broad-range rDNA PCR	Sequencing of amplicons
Affigene® Aspergillus tracer (Cepheid AB)	<i>Aspergillus</i> spp.	Whole blood and plasma samples (0.5 ml)	Not specified*	Broad-range rDNA PCR	Fluorescence real-time PCR signal
MycAssay™ Aspergillus (Myconostica Ltd.)	<i>Aspergillus</i> spp.	Respiratory and serum samples	MycXtra DNA extraction for respiratory specimens Roche High Pure Template DNA kit for serum Manual processing	Broad-range 18S rDNA PCR	Fluorescence real-time PCR signal
MycAssay™ Pneumocystis (Myconostica Ltd.)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Respiratory samples	MycXtra DNA extraction Manual processing	Mitochondrial large subunit PCR	Fluorescence real-time PCR signal

*Some published reports combine it with automated methods such as MagNA Pure® (Roche Diagnostics GmbH) or EasyMAG® (bioMérieux®)

^bFormer format used electrophoretic separation of amplicons

*Published report used Roche HighPure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH) (131)



Conclusioni

- La sierologia è uno strumento utile per la diagnosi rapida delle malattie fungine
- I risultati possono essere ottenuti in poche ore senza bisogno di coltura
- I risultati possono essere ottenuti anche diversi giorni prima che si sviluppino i sintomi clinici
- È necessario lavorare di più sui test sierologici per la candidosi
- Lo screening continuo consente ai medici di seguire il progresso della malattia, tuttavia può essere difficile ottenere campioni appropriati
- I kit sono costosi e rendono difficile il monitoraggio continuo