ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Funghi patogeni per l'uomo: generalità e prospettive

Francesca Mondello

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN 08/10

Istituto Superiore di Sanità
Funghi patogeni per l'uomo: generalità e prospettive.
Francesca Mondello
2008, iii, 51 p. Rapporti ISTISAN 08/10

Questo breve rapporto mira ad offrire una visione unitaria delle vecchie e nuove conoscenze nel campo della micologia medica di interesse umano. Tratta sia gli aspetti classici della tassonomia e della morfologia che gli aspetti moderni della diagnostica molecolare e della chemioterapia basata su sostanze naturali. Il tutto può essere utile agli operatori sanitari interessati al laboratorio micologico, ma anche agli studiosi che vogliono cimentarsi in questo affascinante, ma sempre poco esplorato, settore della microbiologia medica.
Parole chiave: Miceti, Funghi patogeni, Micologia medica

Istituto Superiore di Sanità
Fungal pathogens for humans: outlines and perspectives.
Francesca Mondello
2008, iii, 51 p. Rapporti ISTISAN 08/10 (in Italian)

This short report wishes to syntesize old and novel spots in the field of human medical mycology. Both classical taxonomic and morphological traits are dealt with together with new steps in the molecular diagnosis and chemotherapy potential based on natural compounds. This document may prove of usefulness for health personnel and laboratory workers as well as to students wishing to enter this fascinating yet little explored field within the medical microbiology discipline.
Key words: Fungi, Fungal pathogens, Medical mycology

Si ringraziano: Flavia De Bernardis per il sostegno dato a questa iniziativa, Antonietta Girolamo per l'aiuto fornito nella descrizione di alcuni protocolli tecnici, Sabrina Tocchio e Roberto Gilardi per il lavoro di editing e grafica rispettivamente.

Per informazioni su questo documento scrivere a: francesca.mondello@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:
Mondello F. *Funghi patogeni per l'uomo: generalità e prospettive.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/10).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro*, *Sara Modigliani* e *Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© *Istituto Superiore di Sanità 2008*

INDICE

Premessa iii

Generalità 1
Caratteristiche: tassonomia, struttura e riproduzione 1
Classificazione 5
Classificazione delle micosi umane 10
Patogenesi 11
Difese immunitarie dell'ospite 12
Epidemiologia: note generali 13
Epidemiologia: distribuzione e fattori di rischio 14
Diagnosi 18
Controllo delle infezioni fungine 24
Trattamento con antifungini 24
Resistenza agli antimicotici 28

Micosi superficiali e cutanee 29
Micosi superficiali 29
Pitiriasi Versicolor 29
Pitiriasi Nera (*Tinea Nigra*) 29
Pietra Bianca 30
Pietra Nera 31
Micosi cutanee 31
Micosi causate da funghi dermatofiti (dermatofitosi) 31
Onicomicosi causata da funghi non dermatofiti (dermatomicosi) 33

Micosi sottocutanee 35

Micosi sistemiche causate da funghi endemici dimorfici 36

Micosi opportunistiche 38
Candidosi 41
Criptococcosi 44
Micosi causata da altri lieviti 45
Aspergillosi 45
Zigomicosi 46
Pneumocistosi 48
Micosi opportunistiche causate da muffe ialine non pigmentate (ialoifomicosi) e da funghi pigmentati o dematiacei (feifomicosi): brevi cenni 49

Bibliografia 50

Testi specialistici 51

PREMESSA

Gli studi e le ricerche di micologia medica e dei relativi patogeni hanno visto, negli ultimi vent'anni, un'esplosione di interesse sia in campo medico che veterinario. Ciò sembra dovuto a varie cause inerenti ai progressi della medicina di base, l'infezione da HIV, le nuove tecniche chirurgiche invasive, i trapianti d'organo e l'uso massivo degli antibiotici antibatterici. In altre parole, la micologia medica è cresciuta di pari passo con la crescita in numero e gravità degli ospiti immunocompromessi. Difatti, quasi una nuova disciplina medica, quella dell'ospite debole o fragile, cui corrisponde quella del patogeno opportunista, è entrata nel dizionario della Sanità Pubblica. Mentre il campo si espande, i cultori della disciplina restano pochi e l'insegnamento della stessa continua ad essere relativamente secondario rispetto a quello della batteriologia e della virologia medica. Questo è testimoniato dalla relativa scarsità di articoli, rassegne e libri specificamente dedicati a questo settore. In contrasto, l'attenzione di studenti ed operatori sanitari è forte per questa disciplina come testimoniato dal successo di partecipazione ai Corsi ISS. Meritorio è quindi questo rapporto tecnico, scritto con passione e dovizia di dettagli pur nella doverosa sintesi, dalla Dott.ssa Francesca Mondello, del Reparto Micosi Superficiali e Sistemiche del MIPI (Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate). Il rapporto da un lato sintetizza quanto presentato all'ultimo corso effettuato nel nostro istituto e dall'altro espande le finalità del corso, includendo molta teoria e pratica su tutti gli agenti fungini di infezione nell'uomo, anche trattando aspetti, quale quello dell'uso delle sostanze naturali come alternativa ed integrazione alla terapia antifungina, insoliti in rassegne del genere e di cui l'autrice è una riconosciuta esperta. Nel complesso, si tratta di una rassegna di sostanza scientifica e con dettagli anche operativi che potranno rivelarsi utili sia a chi vuole approfondire alcune conoscenze peculiari della disciplina, ma anche allo studente che vuole iniziare ad occuparsi di questi straordinari microorganismi.

Antonio Cassone

Direttore
Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate

GENERALITÀ

La micologia si occupa dello studio dei funghi o miceti che includono sia organismi macroscopici (come funghi eduli e non), sia organismi microscopici (come lieviti e muffe). I funghi sono organismi "eucarioti" (presenza di membrana nucleare con più di un cromosoma), chemiosintetici, eterotrofi, diversi dai batteri, che sono invece "procarioti" (assenza di membrana nucleare e presenza di un solo cromosoma). Altre differenze fra funghi e batteri riguardano la diversa composizione della parete cellulare, la struttura dei ribosomi, le dimensioni cellulari (che nella stragrande maggioranza dei casi sono più grandi nei funghi che nei batteri) e la riproduzione. Si stima che oltre 200.000 differenti specie di funghi partecipino al riciclo delle sostanze organiche in natura, ma fortunatamente solo pochi di questi causano malattie negli uomini. I funghi possono danneggiare la salute dell'uomo inducendo:

1. *Ipersensibilità*
   Reazione allergica a sostanze dei funghi e relative spore in seguito a sensibilizzazione per inalazione o ingestione di materiale fungino.
2. *Micotossicosi*
   Avvelenamento dovuto a cibo contaminato da miceti che producono tossine (ad esempio, aflatossine).
3. *Micetismo*
   Avvelenamento da ingestione diretta di funghi tossici ritenuti erroneamente eduli (basidiomiceti come *Amanita phalloides).*
4. *Micosi*
   Malattia fungina dovuta ad invasione e danno dei tessuti dell'ospite.

La micologia medica è lo studio di quei funghi che provocano malattia (micosi) negli uomini e negli animali.

Caratteristiche: tassonomia, struttura e riproduzione

I funghi non possiedono clorofilla, non sono mobili (con l'eccezione di alcuni tipi di spore) e possono crescere come singole cellule (lieviti) e/o come strutture pluricellulari (muffe). Il soma cellulare fungino è chiamato tallo che nei funghi multicellulari è organizzato in micelio, massa di filamenti strettamente intrecciati (ife). Il micelio è immerso nella sostanza organica ambientale o nel tessuto di un organismo vivente da cui le cellule, tramite il rilascio di enzimi, assorbono i nutrienti. La parete cellulare della maggior parte dei funghi contiene glucani, mannani e chitina, un polisaccaride che si trova anche nell'esoscheletro di artropodi. La membrana citoplasmatica è ricca di ergosterolo. Tutti i funghi hanno enzimi lisosomiali che digeriscono cellule danneggiate e aiutano i funghi parassiti ad invadere l'ospite. Molti miceti sintetizzano e conservano granuli di glicogeno e alcuni, come i lieviti, possiedono plasmidi. Le cellule che costituiscono il filamento ifale possono avere uno o due nuclei, molte sono separate da setti ricchi di pori che permettono lo scambio di citoplasma e nuclei tra le varie cellule (ife settate). Alcuni miceti presentano filamenti senza setti fra una cellula e l'altra (ife cenocitiche). Altri funghi, con un singolo poro nel setto, hanno un organello chiamato **"**corpo di Woronin" che impedisce la penetrazione di materiale di una cellula danneggiata in un'altra. I funghi con soma unicellulare (lieviti) possiedono anche delle strutture chiamate pseudoife, perché somiglianti alle ife, costituite da catene di cellule allungate e da grappoli di cellule nei punti di giunzione, ottenute per gemmazione cellulare.

In questo tipo di riproduzione un progenitore o una cellula madre estroflette una porzione cellulare dopo divisione mitotica e genera una cellula figlia (Figura 1).

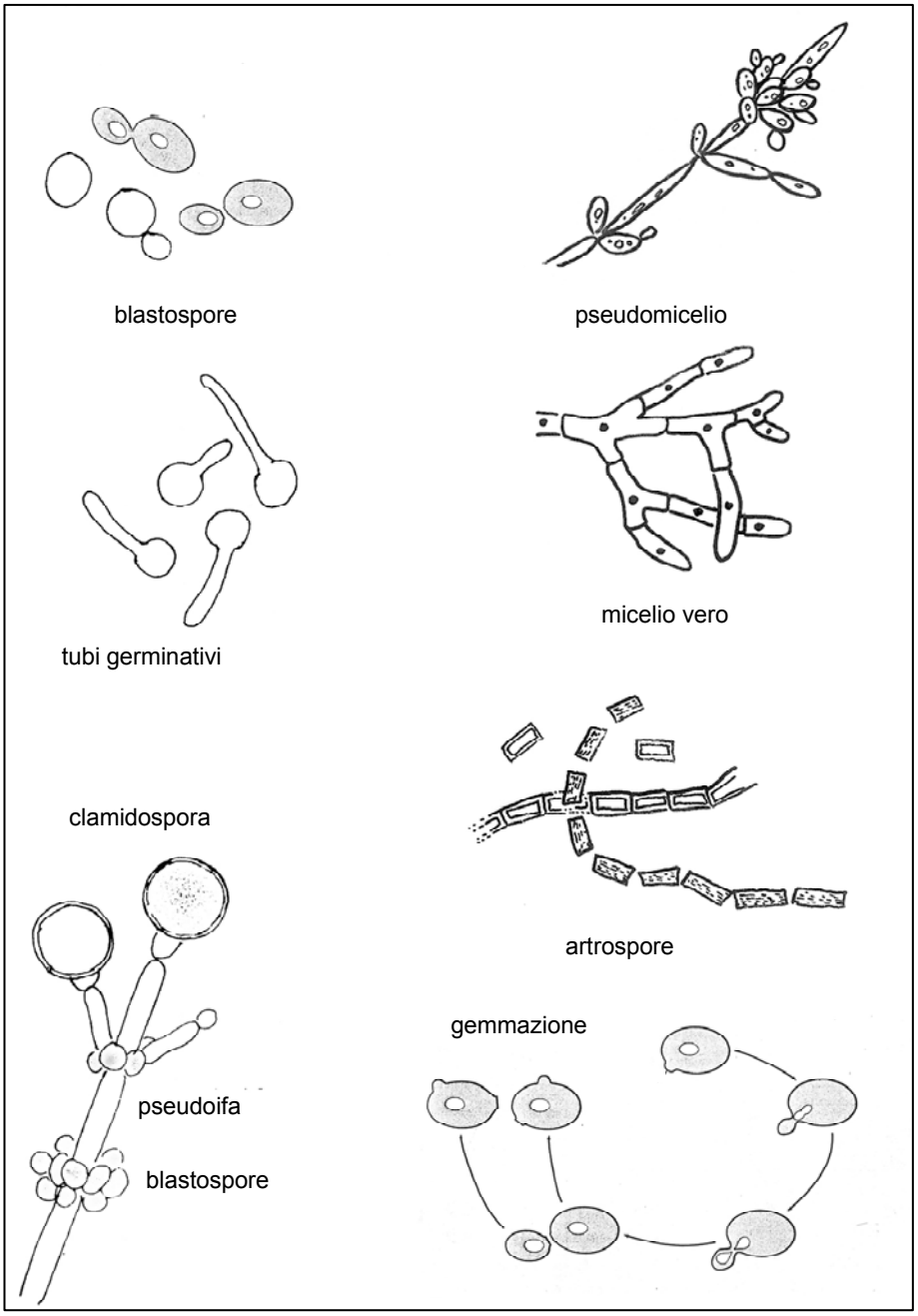


Figura 1. Forme riproduttive dei funghi

Molti funghi si riproducono sia sessualmente (fase perfetta, teleomorfica) che asessualmente (fase imperfetta, anamorfica) e pochi miceti hanno solo la riproduzione asessuata (Figura 2).

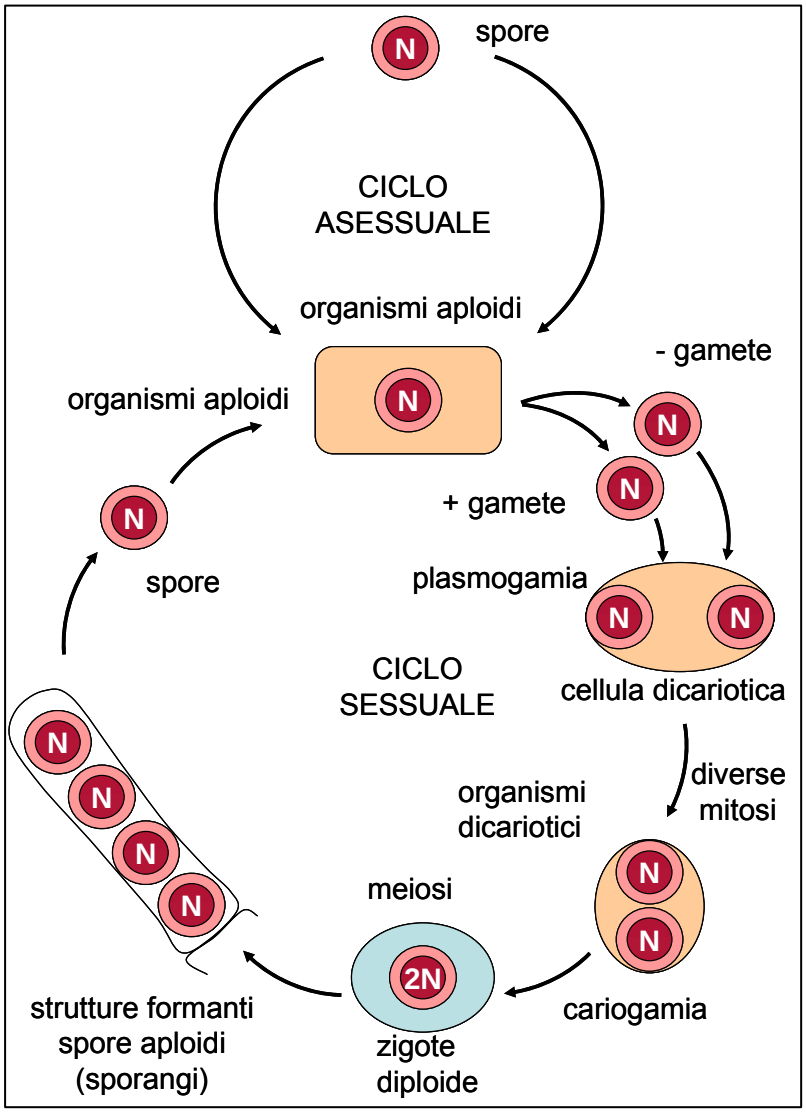
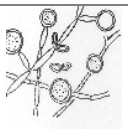
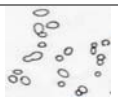
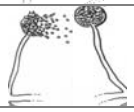
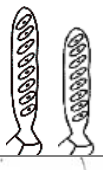


Figura 2. Un tipo di riproduzione sessuale nei funghi

La riproduzione asessuata richiede sempre la formazione delle spore asessuate (conidi e sporangiospore) derivanti solo da processi mitotici. Le sporangiospore sono prodotte in una struttura detta sporangio e sono caratteristiche dei generi appartenenti alla classe Zygomycetes come *Rhizopus* e *Mucor* spp. I conidi si riproducono su strutture specializzate (vedi *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., dermatofiti). La riproduzione sessuale si svolge in diversi modi attraverso la fusione di spore sessuate differenziate (ascospore, basidiospore, oospore, zigospore), risultanti da processi meiotici. Gameti aploidi si uniscono e il loro citoplasma si fonde in un processo chiamato plasmogamia. Se il nucleo fallisce la fusione si hanno cellule dicariotiche per diverse divisioni. A volte il nucleo si fonde in un processo chiamato cariogamia per produrre una cellula diploide. Tali cellule o la loro progenie producono nuove cellule aploidi. Alcuni funghi possono anche riprodursi sessualmente durante la fase diploide del loro ciclo vitale. In generale i funghi attraversano la fase aploide, dicariotica e diploide durante il loro ciclo vitale (Tabella 1).

Tabella 1. Spore fungine

Nome	Tipo	Gruppo fungino	Morfologia	Aspetto microscopico
Artroconidi	asessuato	*Geotrichum Coccidioides*	Derivanti dalla frammentazione di ife settate in singole cellule con parete ispessita	
Clamidoconidi	asessuato	Presenti in tutti i funghi	Conidi ispessiti formati all'interno di segmenti di ife o conidi terminali di un filamento ifale	
Blastoconidi	asessuato	Presenti in tutti i lieviti	Appaiono come gemme sulla cellula madre	
Microconidi	asessuato	Presenti nella maggior parte dei funghi eccetto Zygomycetes	Prodotti dalla costrizione dell'ifa, nascono su un conidioforo e possono essere singoli o in catene	
Macroconidi	asessuato	Presenti nei dermatofiti	Conidi multisettati grandi prodotti in un conidioforo	
Sporangiospore	asessuato	Zygomycetes	sporangioforo	
Zoospore	sessuato	Chytridiomycota	Come le sporangiospore ma mobili per mezzo di flagelli	
Ascospore	sessuato	Ascomycota	Spore che si formano all'interno di una struttura chiamata asco	
Zigospore	sessuato	Zygomycota	Spore dormienti risultanti dalla fusione di due cellule simili morfologicamente	
Basidiospore	sessuato	Basidiomycota	Spore prodotte in una struttura detta basidio	

Classificazione

La classificazione dei funghi è soggetta a cambiamenti periodici non appena si acquisiscono nuove conoscenze ultrastrutturali, biochimiche e molecolari (1). In genere sono classificati (Tabelle 2, 3) in base alla morfologia del tallo, al genotipo e allo stadio riproduttivo del loro ciclo vitale.

Tabella 2. Tassonomia: esseri viventi secondo la teoria dei 5 Regni

Regno	Organizzazione cellulare	Esempio
Monera unicellulari foto- o chemo-autotrofi, fissione binaria, riproduzione asessuata	Procarioti assenza di membrana nucleare ed apparato mitotico e mitocondri, un solo cromosoma circolare	Batteri Actinomiceti
Protista fotoautotrofi o eterotrofi unicellulari o pluricellulari, mobili tramite ciglia o flagelli	Eucarioti presenza di membrana nucleare, più cromosomi ed apparato mitotico, mitocondri	Protozoi
Fungi eterotrofi unicellulari o pluricellulari con parete con chitina, beta-glucani, mannani	Eucarioti presenza di membrana nucleare, più cromosomi ed apparato mitotico, mitocondri	Funghi
Plantae autotrofi con clorofilla, diploidi, con parete con cellulosa	Eucarioti presenza di membrana nucleare, più cromosomi ed apparato mitotico, mitocondri	Piante
Animalia eterotrofi, pluricellulari, diploidi	Eucarioti presenza di membrana nucleare, più cromosomi ed apparato mitotico, mitocondri	Artropodi Mammiferi Uomo

Tabella 3. Caratteristiche rappresentative morfologiche e riproduttive di funghi patogeni

Classe	Genere rappresentativo	Forme e Riproduzione
Zygomycetes	*Rhizopus* *Mucor* *Absidia* *Basidiobolus*	Ife cenocitiche grandi con pareti sottili, 6-25 µ con lati non paralleli; spore contenute in uno sporangio; strutture chiamate rizoidi caratteristiche di qualche genere. *Riproduzione asessuale*: produzione di sporangiospore all'interno dello sporangio. *Riproduzione sessuale*: produzione di zigospore formate dalla fusione di ceppi compatibili sessualmente.
Ascomycetes	*Saccaromyces* *Aspergillus* *Histoplasma* *Trichophyton*	Lieviti gemmanti, ife settate spore (conidi) prodotti su conidiofori. *Riproduzione asessuale:* produzione di conidi. *Riproduzione sessuale*: ascospore prodotte in strutture specializzate dette aschi.
Archiascomycetes	*Pneumocystis*	Trofozoiti e oocisti. *Riproduzione asessuale:* fissione binaria *Riproduzione sessuale*: fusione di ceppi compatibili per formare zigote, compartimentalizzazione di spore all'interno di cisti.
Basidiomycetes	*Filobasidiella* (forma sessuale di *Cryptococcus neoformans*)	Ife che producono basidiospore (non rilevate in natura o nei pazienti). *Riproduzione sessuale*: fusione di nuclei compatibili seguiti da meiosi per formare basidiospore.
Deuteromycetes	*Candida,* *Cryptococcus* *Coccidioides* *Aspergillus* *Bipolaris*	Lieviti gemmanti, ife settate, pseudoife, conidi asessuati prodotti su ife specializzate o all'interno di ife. *Riproduzione asessuale:* produzione di blastoconidi per gemmazione da una cellula madre o all'interno di un frammento ifale. *Riproduzione sessuale*: non identificata.

Tale classificazione è complicata da due problemi: 1) nessun ciclo sessuato è stato osservato per alcuni funghi; 2) è spesso difficile riconoscere gli stadi sessuati e asessuati di alcuni funghi. Per esempio un ricercatore può lavorare su una fase asessuata e dare un nome ad un fungo, un altro ricercatore può lavorare ad una fase sessuata e dare allo stesso fungo un nome differente. Poiché la correlazione tra fase sessuata e fase asessuata non è sempre manifesta, una particolare specie di funghi può avere due nomi, fino a quando qualcuno scopre che le due fasi sono presenti nello stesso organismo: caso classico è quello del binomio *Cryptococcus- Filobasidiella*. Un altro problema è che molti funghi appaiono completamente differenti quando crescono nei tessuti (in genere, forma lievito) e quando crescono nel loro habitat naturale (in genere, forma ifale). La capacità di un organismo di alterare la propria struttura quando si cambia habitat è chiamato dimorfismo**,** una caratteristica posseduta da molti patogeni umani (vedi *Candida, Blastomyces* ecc.). I miceti appartengono al super-regno *Eucaryota* e al regno *Fungi* che è filogeneticamente più vicino al regno *Animalia***.** A sua volta tale regno *Fungi* è organizzato in *Phyla* o Divisioni, Classi, Ordini, Famiglie, Generi e Specie e relative varietà (Tabella 4). Solo quattro *Phyla* contengono funghi patogeni per l'uomo, e perciò la discussione sarà ristretta a quegli organismi classificati nelle seguenti divisioni:

1. Ascomycota
   Includono sia i lieviti che muffe con micelio settato. Le spore asessuate sono prodotte da cellule conidiogene generate sui conidiofori (strutture ifali specializzate). Le spore sessuate sono ascospore prodotte all'interno di strutture dette aschi ([1]) (Figura 3).
2. Basydiomycota
   Funghi unicellulari o con tallo filamentoso con micelio settato con riproduzione asessuata con conidi. La riproduzione sessuata avviene tramite fusione di nuclei compatibili, seguiti da meiosi per formare basidiospore in strutture dette basidi (Figura 4).
3. Zygomicota
   Funghi filamentosi o muffe con ife di ampio diametro (6-25µ) settate, cenocitiche. Producono sporangiospore asessuate in un sacchetti chiamati sporangi. Gli sporangi si formano sulla cima di ife aeree (sporangiofori) che si estendono al di sopra della superficie del micelio vegetativo. I sacchetti esplodono e ogni sporangiospora è in grado di formare una nuova muffa su un appropriato substrato. Nella riproduzione sessuata le ife di due miceli diversi compatibili per l'accoppiamento si fondono e formano una zigospora sessuata. La zigospora dà origine poi a spore asessuate che formano a loro volta altre muffe. *Rhizopus* è un esempio di questa classe (Figura 5).
4. Deuteromycota (Fungi Imperfecti)
   Includono sia lieviti che muffe con lo stadio di riproduzione sessuale sconosciuto. Molti di questi funghi patogeni per l'uomo sono stati inclusi in questa classe. In generale possono avere sia pseudoife che ife settate e producono conidi da conidiofori e cellule conidiogene**.** I lieviti si riproducono per gemmazione e le muffe si riproducono tramite conidi per gemmazione o per frammentazione del tallo (artroconidi). Alcuni sono stati riclassificati come Ascomiceti. *Candida* è un membro di questa divisione (Figura 6).

([1]) **Archiascomycota** è una nuova divisione che è nata per includere un organismo *Pneumocystis carinii* che era stato precedentemente considerato un protozoo. La riclassificazione di *Pneumocystis* è basata sulla correlazione evidente a livello molecolare con l'ascomicete *Schizosaccharomyces pombe*. Ulteriori studi molecolari hanno rinominato i ceppi derivati dall'uomo come *Pneumocystis jiroveci* mentre quelli prima conosciuti come specie *carinii* sono del ratto. L'organismo esiste in forma vegetativa e si riproduce per scissione o fissione binaria. La fusione di talli compatibili porta alla formazione di una ciste sferica che contiene otto spore allo stato maturo.

Tabella 4. Suddivisione tassonomica dei più importanti funghi patogeni

Regno	Divisione/Classe	Ordine*	Patologia
FUNGHI	Zygomycota/ Zygomycetes	• Mucorales *Rhizopus, Mucor*	Zigomicosi opportunistica in pazienti con diabete, leucemia, gravi ustioni, malnutrizione, infezioni rinocerebrali
		• Entomophthorales *Basidiobolus*	Zigomicosi sottocutanea e gastrointestinale
	Archiascomycota/ Archiascomycetes	*Pneumocystis jirovecii (carinii)*	Polmonite in soggetti HIV+
	Basidiomycota/ Basidiomycetes	*Amanita, Agaricus*	Avvelenamento da funghi
		Filobasidiella (teleomorfo di *Cryptococcus neoformans*)	Criptococcosi
	Ascomycota/ Ascomycetes	• Endomycetales *Saccharomyces, Pichia*	Numerose micosi
		• Onygenales *Arthroderma* (teleomorfo di *Tricophyton e Microsporum)*	Dermatofitosi
		Ayellomyces (teleomorfo di *Blastomyces e di Histoplasma*)	Micosi sistemiche
		• Eurotyales teleomorfi di alcuni *Aspergillus* e *Penicillium*	Aspergillosi, ialoifomicosi
	Deuteromycota/ Deuteromycetes	• Cryptococcales lieviti imperfetti come *Candida, Cryptococcus, Trichosporon, Malassezia*	Numerose micosi
		• Moniliales - Famiglia: Moniliaceae *Epidermophyton, Coccidioides, Paracoccidioides, Sporothrix, Aspergillus* - Famiglia: Dematiaceae *Phialophora, Fonsecaea, Exophiala, Wangiella, Bipolaris, Alternaria*	Numerose micosi Cromoblastomicosi, micetoma e feoifomicosi

*con alcuni generi rappresentativi

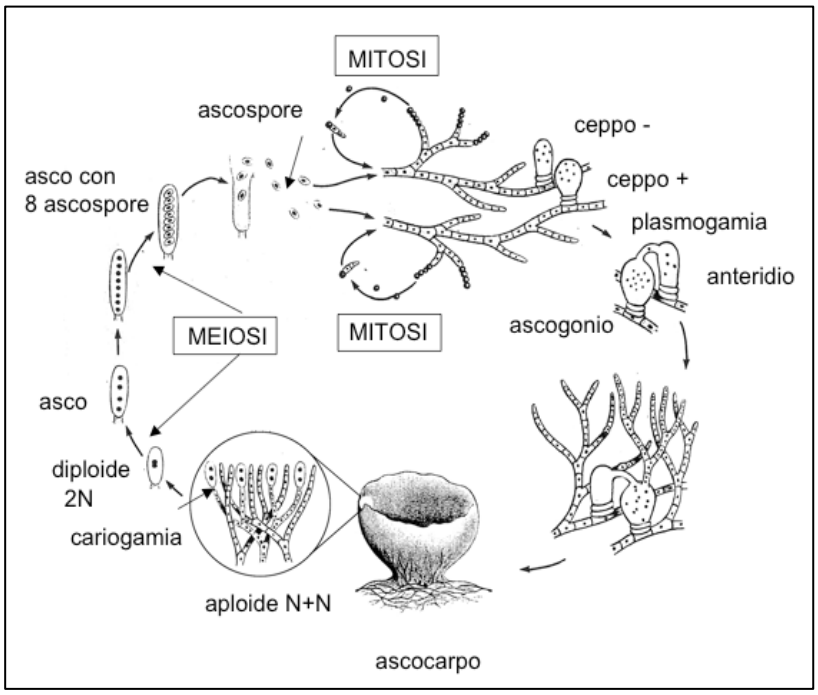


Figura 3. Ciclo vitale degli Ascomycetes

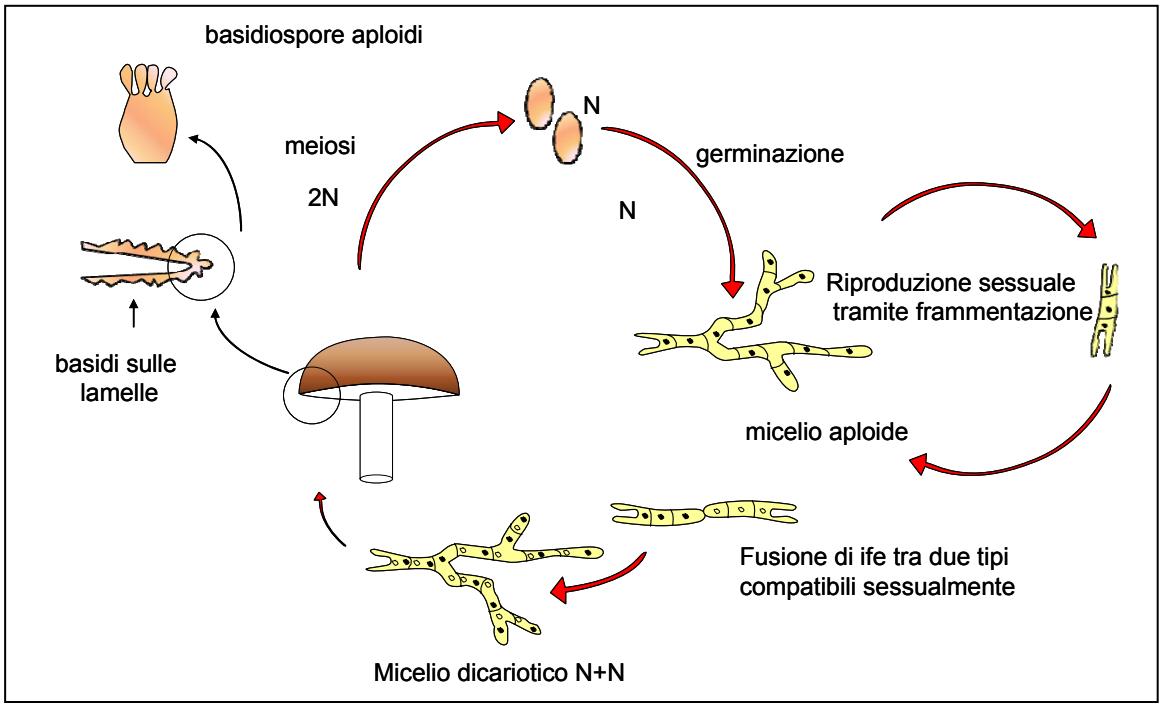


Figura 4. Ciclo vitale dei Basydiomycetes

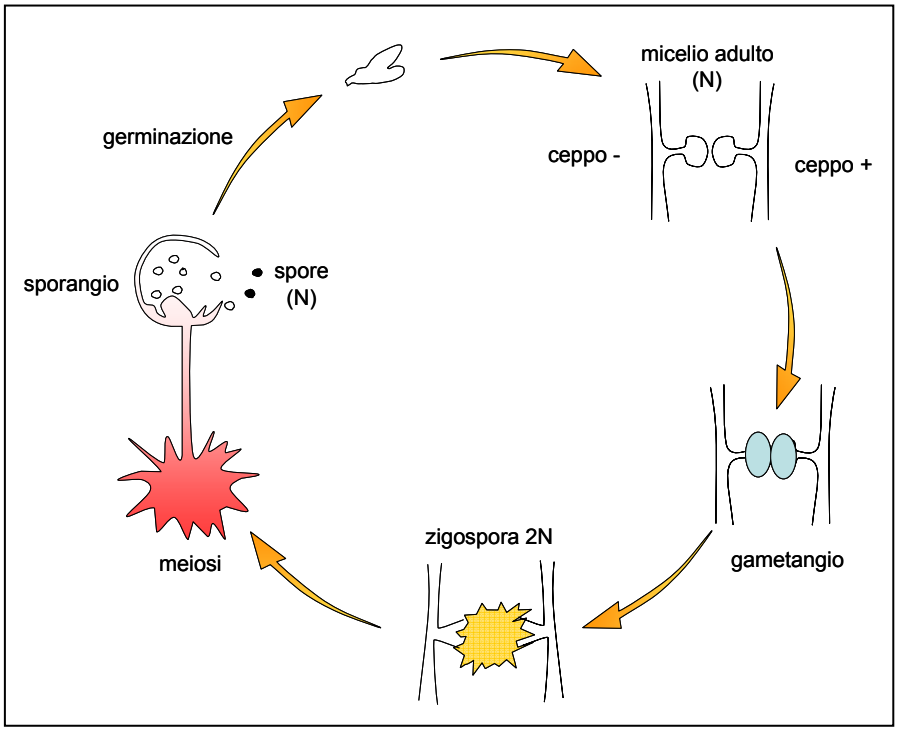


Figura 5. Zygomycetes: ciclo vitale di *Rhizopus*

Figura 6. Cellule lievito e pseudoife di *Candida albicans*; ingrandimento 200 x
(per gentile concessione di Silvia Sandini, Dip. Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, ISS, Roma)

Classificazione delle micosi umane

Le micosi umane possono essere suddivise nei seguenti quattro gruppi in base al livello di penetrazione e diffusione dell'agente infettante nei tessuti e alle caratteristiche specifiche del microrganismo (Figura 7).

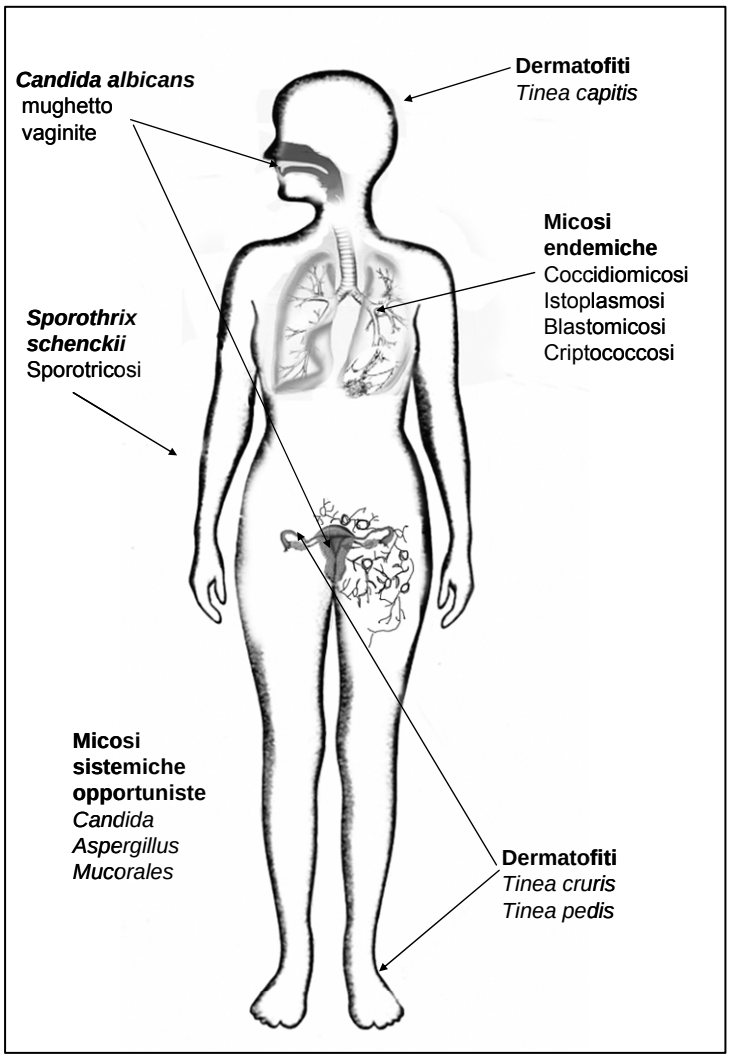


Figura 7. Micosi umane

1. *Micosi superficiali*
   Malattie causate da funghi che crescono solo sulla superficie della pelle e annessi cutanei con scarsa risposta infiammatoria da parte dell'ospite normale. Hanno quasi esclusivamente importanza dal punto di vista estetico, ma nei soggetti immunocompromessi (ad es. il soggetto HIV+) la diffusione del fungo sulla cute può essere patologica, perché molto vasta e distruttiva. Esempi: Pitiriasi versicolor

(Malassezia furfur), Pitiriasi nera (*Hortaea werneckii*), Pietra nera (*Pietraia hortae*), Pietra bianca (*Trichosporon* spp.)

2. *Micosi cutanee*
   La crescita fungina avviene negli strati cheratinizzati e più profondi della pelle, annessi cutanei e mucose con danni tissutali e reazione infiammatoria da parte dell'ospite. Esempi: piede d'atleta, onicomicosi.
3. *Micosi sottocutanee*
   Infezioni fungine in grado di penetrare sotto la pelle e coinvolgere il tessuto connettivo, sottocutaneo e osseo. Significativa reazione immunitaria da parte dell'ospite. Raramente evolvono in micosi sistemiche. Esempi: feoifomicosi, cromoblastomicosi, sporotricosi.
4. *Micosi opportunistiche*
   Sono infezioni causate da funghi, che si trovano normalmente nell'ambiente o nell'uomo come commensali, in pazienti debilitati da altre patologie (diabete, neoplasie) o immunodepressi o portatori di dispositivi protesici impiantati o cateteri vascolari. Virtualmente qualsiasi fungo potrebbe essere un opportunista patogeno e infatti la lista di nuovi patogeni aumenta di anno in anno. I più comuni opportunisti nei paesi occidentali sono i lieviti *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans,* la muffa *Aspergillus* spp. e *Pneumocystis jiroveci.*
5. *Micosi sistemiche e/o profonde*
   Infezioni, solitamente a livello polmonare, che possono disseminare per via ematica con coinvolgimento degli organi interni e della cute (micosi disseminate o sistemiche) con massima reazione immunitaria da parte dell'ospite ed associate con elevata mortalità specialmente nell'ospite immunocompromesso Queste malattie sono tipiche degli agenti di micosi endemiche ([2]). Esempi: istoplasmosi, blastomicosi, coccidioidomicosi. Tuttavia, anche molte micosi da agenti opportunistici possono esser sistemiche (es. candidosi, aspergillosi e criptococcosi).

Patogenesi

I funghi hanno sviluppato e diversificato molti meccanismi patogenetici per colonizzare ed infettare l'uomo: la capacità di crescere a 37 °C è uno dei fattori più importanti. La produzione di cheratinasi permette ai dermatofiti di digerire la cheratina nella pelle e annessi cutanei, mentre la produzione di aspartyl-proteasi da parte di *Candida* consente di digerire, oltre la cheratina, importanti proteine difensive, quali il complemento e le immunoglobuline. Il dimorfismo permette a molti funghi che esistono in natura come muffe, di cambiare in forma lievito e quindi di diventare patogeni sfuggendo alle difese dell'ospite. In contrasto, *Candida albicans* esiste in forma lievito nella flora normale umana, ma diviene invasiva nella forma ifale. Le proprietà antifagocitarie della capsula di *Cryptococcus neoformans* e le capacità adesive di *Candida albicans* costituiscono fattori di virulenza potenziali per questi funghi. L'infezione può essere localizzata alla pelle (dermatofiti, eumicetoma) o diffondere per via linfatica (*Sporothrix schenckii*) o per via polmonare e ematica, dopo fagocitosi a livello degli alveoli (micosi sistemiche). *Cryptococcus neoformans* rappresenta un'eccezione perché si dissemina senza essere fagocitato a causa della sua grossa capsula antifagocitaria. Inoltre la patogenesi di alcuni funghi è anche parzialmente dovuta alla reazione allergica dell'ospite sollecitata dal microrganismo. Infine, molti funghi esercitano un potere patogeno attraverso la

([2]) Si tratta spesso di agenti con distribuzione geografica limitata. Sono in pratica assenti in Italia ed in Europa.

capacità di sfuggire alle difese immunitarie (variazioni antigeniche, dimorfismo, blocco della maturazione della cellula dendritica, ed altri fenomeni). I fattori responsabili della virulenza fungina sono molteplici e ancora in parte da definire anche se ci sono stati recentemente molti progressi nelle conoscenze per merito delle ricerche in ambito molecolare. Vengono schematizzati appresso i principali fattori di virulenza fungini (Tabella 5).

Tabella 5. Fattori di virulenza fungini e meccanismi di azione patogena

Fattori	Descrizione del meccanismo
Adesine (glucano, mannoproteine, proteine)	Mediano l'adesione e la formazione del biofilm sulla cute, sulla superficie mucosale e sui cateteri. Esempio classico: *Candida albicans.* Agiscono o tramite forze aspecifiche da legami idrofobici e cariche elettrostatiche, o attraverso specifico riconoscimento di recettori cellulari, quali ad esempio, i "toll-like receptors", gli "Fc-receptors", le integrine, ecc.
Tossine (glicoproteine, gliotossina, micotossine)	Agiscono come specifici veleni, in sostanziale comparazione con le tossine di altri microrganismi. Talvolta esplicano la loro azione nel micetismo (avvelenamento per ingestione di funghi velenosi). Alcune tossine possono interferire con la risposta immunitaria, come alcuni enzimi di virulenza (vedi sotto).
Enzimi (proteasi, fosfolipasi, fenolossidasi)	Agiscono degradando o comunque modificando molecole importanti dell'ospite, comprese molecole immunologiche (ad es. l'aspartil-proteasi di *C.albicans,* in grado di idrolizzare anticorpi e citochine). Possono contribuire all'adesività e all'invasività.
Altre sostanze e strutture cellulari (capsula, melanina ed altre)	Meccanismo principale è la capacità di inibire la fagocitosi e deviare la risposta immunitaria. Esempi tipici sono la capsula di glucurono-xilo-mannano di *Cryptococcus neoformans* ed alcuni polisaccaridi di altri funghi.
Forme di crescita (dimorfismo, pleomorfismo, sporulazione, ecc.)	Sia i lieviti (es. *Histoplasma*) che le ife (es. *Candida*) possono essere le forme meno aggredibili dalla fagocitosi o con tendenza a crescere all'interno dei macrofagi (es. *Histoplasma*) sfuggendo alla risposta immunitaria.

Difese immunitarie dell'ospite

I funghi sono ubiquitari in natura e gli esseri umani sono costantemente esposti ad essi. Molti agenti fungini sono saprofiti del suolo e le malattie fungine in genere non sono trasmissibili da persona a persona (eccezioni occasionali *Candida,* che può trasmettersi per via sessuale, ed alcuni dermatofiti) e spesso rappresentano un evento accidentale nel ciclo naturale del fungo. Poiché la stragrande maggioranza dei funghi è costituita da patogeni opportunisti, che cioè colpiscono un ospite affetto da altre patologie di base, in particolare quello immunocompromesso, è del tutto evidente che le varie difese dell'immunità innata (barriere meccaniche, pH, sostanze antimicrobiche nel sangue e nei tessuti, complemento e fagociti) cui si associano quelle dell'immunità adattativa (immunità umorale e immunità cellulo-mediata) sono normalmente in grado di contenere le infezioni fungine. Fanno eccezione alcuni patogeni fungini, presenti soprattutto in alcune aree geografiche del Nord e Sud America, che sono in grado di aggredire, spesso con gravi patologie mortali, anche soggetti del tutto normali. Esempi sono *Coccidioides, Histoplasma, Blastomyces* e pochi altri. Questi patogeni sono tuttavia rari od assenti in Europa.

Per quanto detto sopra, l'efficienza dello stato immunitario dell'ospite è di vitale importanza nel determinare la manifestazione, gravità ed esito della malattia fungina. Lo stato immunitario può essere compromesso da vari fattori come fattori dietetici (dieta non equilibrata ricca di carboidrati), fattori iatrogeni (terapie immunosoppressive), fattori meccanici, età, altre malattie concomitanti, disfunzioni endocrine, in particolare il diabete mellito. La compromissione immunitaria predispone all'insorgenza di micosi, in quanto i meccanismi di difesa umorali (essenzialmente anticorpali, Ab) e cellulo-mediati (ICM), importanti nel controllo delle malattie fungine, vengono alterati o propriamente perduti (come nel caso dell'AIDS). In genere, si pensa che la ICM sia più importante, in quanto pazienti con alterazioni e deficienze nella ICM presentano malattie fungine più gravi rispetto a pazienti con immunodeficienza a livello Ab. Tuttavia, questo non è assoluto stante l'evidente interconnessione fra difese umorali e cellulari. La Figura 8 schematicamente mostra il percorso ed i meccanismi dell'immunità cellula-mediata contro i funghi patogeni, rappresentati da lievito ed ifa. Per ulteriori approfondimenti si rimanda ai testi specializzati.

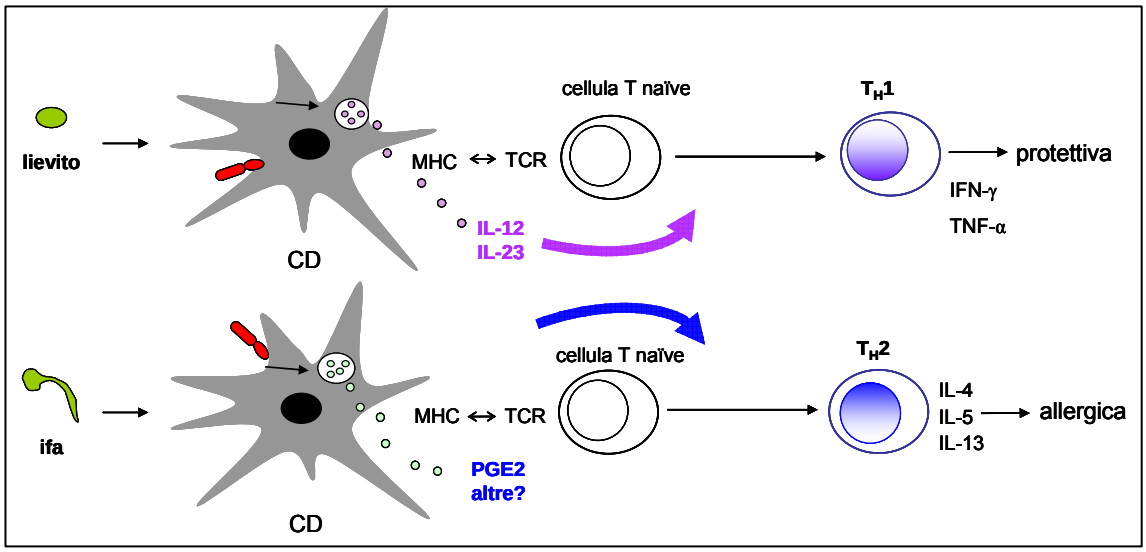


Figura 8. Breve illustrazione della risposta immunitaria contro antigeni microbici (in questo caso fungini, vedi lievito/ifa). CD cellula dendritica che presenta l'antigene; MHC complesso maggiore di istocompatibilità; TCR recettore delle cellule T; Th1 cellule T-helper 1; Th2 cellule T-helper 2; Treg cellule T regolatorie; IL-12, IL-23, IL-10, IL-4, IL-5, IL-13 interleuchine; PGE2 prostaglandina E2

Epidemiologia: note generali

Molti ricercatori e autorità del campo della salute pubblica hanno più volte richiamato l'attenzione circa l'impatto delle infezioni fungine sulla salute umana. Considerando solamente pazienti istituzionalizzati (ospedali, case di ricovero per anziani, ecc.) i dati più vecchi sono stati confermati da quelli più recenti nell'indicare un'incidenza di nuovi casi dell'1% per anno. Inoltre, i dati recenti dimostrano un allargamento dello spettro delle infezioni dei funghi patogeni, in parallelo con l'aumento dell'immunosoppressione dovuta a varie patologie, incluse l'infezione con HIV, a trattamenti che richiedono o inducono alterazione dell'integrità cutanea e mucosale e a invecchiamento della popolazione. In particolare le specie di *Candida* sono diventate la quarta causa più comune di setticemia

nosocomiale negli USA e nella maggior parte delle nazioni europee. Ci sono anche fattori di rischio ben definiti per micosi profonde che sono frequenti persino in pazienti non immunocompromessi: elevata colonizzazione da parte del microrganismo; chirurgia gastrointestinale e chirurgica; lunga permanenza in reparti di terapia intensiva, uso di antibiotici ad ampio spettro, nutrizione parenterale, e anche semplicemente esposizione massiva alle spore fungine, come nel caso delle infezioni primarie endemiche. Le infezioni invasive fungine sono frequenti e gravi nel caso di tumori maligni ematologici e trapianti d'organo e sono associate, in questi soggetti, a mortalità particolarmente elevata. Soggetti sottoposti a trapianti di cellule staminali ematopoietiche sembrano particolarmente vulnerabili ad un'ampia varietà di funghi patogeni.

La maggior parte dei funghi che provocano infezioni hanno una distribuzione cosmopolita, ma altri agenti di infezione sistemica non opportunistica hanno una nicchia ecologica caratteristica in natura. In questo ambiente (suolo ricco di humus vegetale e di varie deiezioni di uccelli) gli organismi fungini normalmente saprofiti proliferano e si sviluppano, producendo particelle infettanti e/o spore in grado di infettare incidentalmente animali e uomini. *B. dermatidis* e *H. capsulatum* sono presenti soprattutto in Nord America (Stati Uniti e Canada) e raramente in Europa. *Paracoccidioides brasiliensis* è stato isolato in Brasile ed è presente nel Sud e Centro America. *Coccidiodies immitis* è presente nelle regioni sud-occidentali degli Stati Uniti e poche altre zone del Centro e Sud-America.

In Europa la patologia da miceti è dovuta a *Cryptoccoccus neoformans*, ai dermatofiti e agli opportunisti *Aspergillus* e *Candida*. Le infezioni fungine originano oltre che per inalazione degli elementi sporali, anche per attivazione endogena della patogenicità di funghi che sono normalmente presenti nella flora microbica del soggetto sano (candidosi). Molte delle infezioni fungine non sono trasmissibili e solo alcune dermatofizie sono contagiose tramite l'uomo o l'animale infetto.

Epidemiologia: distribuzione e fattori di rischio

I dati riguardanti la prevalenza e incidenza delle infezioni fungine sistemiche e mucosali sono difficili da reperire, in quanto queste non sono malattie notificabili. Si hanno solo delle indagini pubblicate su riviste internazionali da cui si può evincere che le infezioni sistemiche fungine soprattutto quelle causate da *Candida* spp. e da *Aspergillus* spp., in minore entità da *Cryptococcus* spp. e pochi altri funghi filamentosi, costituiscono gravi infezioni nei soggetti normali e soprattutto in quelli immunocompromessi. Considerando solo i pazienti ospedalizzati sappiamo da precedenti ricerche (2, 3) che le infezioni ospedaliere hanno un'incidenza superiore al 10% ogni anno e tra queste le infezioni fungine sono la terza o quarta causa con un'incidenza assoluta superiore all'1%. Perciò, per ogni milione di pazienti ospedalizzati più di 10.000 sono affetti ogni anno da infezioni fungine, con una percentuale di mortalità del 40%. Questi dati risultano più elevati di quelli della maggior parte delle malattie batteriche (es. meningite) e virali (es. rosolia) per le quali si utilizzano vaccini e, persino più elevati dei dati riguardanti tubercolosi e AIDS negli USA e nella maggior parte delle nazioni. Inoltre recenti indagini indicano che queste infezioni aumentano proporzionalmente con l'incremento dell'immunosoppressione dovuta a vari trattamenti medici, all'invecchiamento della popolazione, ai trapianti d'organo, sia solidi che ematologici e cellule staminali. Oltre a quanto già accennato sopra circa il fatto che varie specie di *Candida* sono diventate la terza causa più comune di infezione nosocomiale setticemica negli USA (la quarta nella maggior parte delle nazioni europee) (4) sono stati chiaramente identificati i fattori di rischio per le candidosi profonde che sono frequenti persino in soggetti non immunocompromessi:

colonizzazione dovuta al microrganismo, chirurgia cardiaca e gastrointestinale, lunga permanenza nei reparti di terapia intensiva, uso di antibiotici a largo spettro, nutrizione parenterale. Il fattore di rischio più importante per la candidosi e soprattutto per l'aspergillosi è il trapianto di organo, in particolare di midollo osseo, e la chemioterapia associata, con conseguente neutropenia (5, 6). Infatti, i pazienti leucemici sottoposti a trapianto di midollo osseo sono attualmente la principale categoria a rischio per micosi invasiva letale. In Italia la principale ricerca nell'ambito delle infezioni fungine sistemiche è stata fatta dal gruppo SEIFEM che comprende 18 centri ematologici presenti in tutto il Paese (7). Lo studio ha esaminato 11.802 pazienti affetti da leucemia cronica, linfoma o mieloma multiplo. In cinque anni (1999-2003) ci sono stati 538 casi di infezioni fungine invasive, provocate soprattutto da *Aspergillus* (56%) e *Candida* (42%) con una mortalità del 39% direttamente attribuita all'infezione fungina. La più alta incidenza e mortalità è presente in pazienti con leucemia mieloide acuta.

Per quanto riguarda le infezioni mucosali, va detto che esse sono diffuse soprattutto nei neonati e nelle donne, con prevalenza più alta per la vaginite da *Candida*. Approssimativamente due terzi di tutte le donne in età fertile vengono colpite da almeno un episodio di candidosi vaginale nell'arco della loro vita e il 50% dei soggetti ha avuto episodi multipli, soprattutto dopo una terapia antibiotica a largo spettro e uso di contraccettivi steroidei. Inoltre, attorno al 4-5% di queste donne soffre di vaginite ricorrente cronica (>3 episodi all'anno) molto difficile da controllare e mai definitivamente curata prima della menopausa. Perciò si sta parlando di milioni di casi per anno, documentati dall'elevato numero di farmaci venduti annualmente in tutto il mondo e dalla consistente proporzione di donne che denunciano la malattia per tutto il periodo della loro vita sessuale (8). Per quanto attiene alle specie fungine isolate, due studi sono particolarmente degni di nota:

1) In un grosso studio eseguito presso un ospedale regionale tedesco (8) sono stati isolati lieviti da 492 pazienti con sospetta candidosi vulvovaginale da gennaio 1998 a marzo 2001. Ottantaquattro pazienti avevano una vaginite cronica ricorrente trattata con antifungini. Sono stati isolati 593 lieviti: *Candida albicans* (n. 420), *Candida glabrata* (n. 112), *Candida parapsilosis* (n. 8), *Candida lusitaniae* (n. 1), e *Trichosporon* spp. (n. 1). Molte di queste specie erano parzialmente o totalmente resistenti agli antifungini.
2) In un altro studio eseguito in Italia, otto ospedali e cliniche universitarie ginecologiche hanno partecipato (9) ad un monitoraggio prospettico di pazienti con candidosi vulvovaginale sintomatica (VVC) confermata dall'esame colturale (da ottobre 1999 a marzo 2001). Sono stati valutati 931 dei 1138 pazienti reclutati in questo studio. Il 43,5% dei pazienti (358/823) con una media di 2,9±2,7 episodi per paziente (n. 302) hanno avuto candidosi vulvovaginale acuta. Settentasette pazienti (10,0%) hanno avuto un'infezione cronica ricorrente (quattro o più episodi in un anno). La presenza di lieviti è stata documentata dall'esame microscopico diretto nel 78,3% (448/572) e l'esame colturale è stato positivo in 98,3% pazienti (909/925). *Candida albicans* è stata la specie predominante (77,1%), seguita da *Candida glabrata* (14,6%) e *Candida krusei* (4,0%). In conclusione questo studio conferma il ruolo predominante svolto da *C. albicans,* sia nella VVC cronica che in quella sporadica acuta.

Il maggior fattore predisponente e di rischio per le infezioni fungine invasive è il trapianto di organo, in particolare il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (HSCT), insieme alla chemioterapia citostatica immunosoppressiva per la leucemia mieloide acuta. I pazienti HSCT sono particolarmente a rischio per l'aspergillosi e altre infezioni profonde causate da funghi filamentosi, sia durante la neutropenia indotta da una terapia mieloablativa, sia più frequentemente durante i cicli di immunosoppressione post-trapianto (corticosteroidi, ciclosporina e altri immunosoppressori) eseguiti in pazienti non neutropenici per evitare la

sindrome del trapianto contro l'ospite (*graft versus host*). In questi pazienti, le infezioni causate da Zygomycetes e da *Fusarium* spp. sono in aumento e sono difficili da trattare, e la mortalità è maggiore del 60%. Nel già citato studio multicentrico su 11.802 pazienti in Italia (Coorte SEIFEM) nell'arco dei due anni sono stati diagnosticati 346 casi di infezione invasiva dovuti a muffe (incluse infezioni da muffe rare come *Scedosporium, Acremonium, Cladosporium e Penicillium*) mentre 192 infezioni erano causate da lieviti (175 casi di *Candida*, 8 di *Cryptococcus*, 7 di *Trichosporon*). È da notare che le terapie immunosoppressive e HSCT sono in aumento nei pazienti leucemici e anziani. Le Tabelle 6 e 7 dettagliano i tipi di fattori di rischio per le infezioni fungine ed in particolare per la *Candida*.

Tabella 6. Fattori di rischio per le micosi opportunistiche

Fattori	Possibile ruolo nell'infezione	Principali patogeni opportunisti
Sostanze antimicrobiche ed antibiotici in generale	Promuovono la colonizzazione fungina	*Candida* spp. e altri lieviti
Corticosteroidi	Immunosoppressione	*Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp., Zygomycetes, altre muffe, *Pneumocystis*
Chemioterapia	Immunosoppressione	*Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Pneumocystis*
Tumori ematologici o solidi	Immunosoppressione	*Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp., Zygomycetes, altre muffe e lieviti, *Pneumocystis*
Precedente colonizzazione	Immunosoppressione	*Candida* spp.
Catetere in sede	Accesso vascolare diretto	*Candida* spp. e altri lieviti
Nutrizione parenterale totale	Contaminazione dei liquidi di infusione Accesso vascolare diretto	*Candida* spp., *Malassezia* spp. e altri lieviti
Neutropenia	Immunosoppressione	*Aspergillus* spp., *Candida* spp., altre muffe e lieviti
Chirurgia maggiore o ustioni	Via di infezione Accesso vascolare diretto	*Candida* spp., *Fusarium* spp., Zygomycetes
Ventilazione assistita	Inalazione	*Candida* spp., *Aspergillus* spp.
Ospedalizzazione o permanenza in unità di cura intensiva	Esposizione ai patogeni Esposizione ai fattori di rischio addizionali	*Candida* spp. e altri lieviti, *Aspergillus* spp.
Emodialisi o dialisi peritoneale	Immunosoppressione	*Candida* spp., *Rhodotorula* spp., altri lieviti
Malnutrizione	Immunosoppressione	*Pneumocystis*, *Candida* spp. *Cryptococcus neoformans*
Infezione HIV/AIDS	Immunosoppressione	*Cryptococcus neoformans* *Pneumocystis*, *Candida* spp.
Età pediatrica o geriatrica	Immunosoppressione	*Candida* spp.

Tabella 7. Infezioni più frequenti dovute a *Candida* e fattori associati predisponenti

Tipi di infezione	Fattori predisponenti
Infezione oro-faringea	Infezione con HIV Età (bambini e anziani) Portatori di protesi dentarie Diabete mellito Uso di antibiotici Radioterapia per tumore alla testa e al collo Steroidi per via sistemica ed inalatoria Chemioterapia citotossica Emopatie maligne Trapianti di cellule staminali o di organi
Infezione vulvovaginale	Contraccettivi orali Gravidanza Diabete mellito Corticosteroidi per via sistemica Infezione con HIV (*) Uso di antibiotici
Endocardite	Chirurgia maggiore Valvulopatie Protesi valvolari Somministrazione endovenosa di farmaci Catetere venoso centrale
Infezione Sistema Nervoso Centrale (SNC)	Chirurgia del SNC Shunt ventriculoperitoneale Chirurgia oculare
Infezione oculare, endoftalmite	Trauma Chirurgia Uso di farmaci
Infezione addominale	Perforazione viscerale Chirurgia addominale Fistole anastomotiche Pancreatite Dialisi peritoneale continua ambulatoriale
Setticemia	Trapianto di organi Colonizzazione anche transitoria Uso prolungato di antibiotici Chirurgia addominale Terapia intensiva Nutrizione parenterale totale Emodialisi Immunosoppressione Età (bambini e anziani) Trapianto di cellule staminali

(*) È stata ritenuta per molto tempo l'infezione da HIV come fattore predisponente alla vulvovaginite. Recenti studi hanno messo in dubbio questa associazione.

Diagnosi

Quando si deve diagnosticare una sospetta infezione è sempre necessario pensare ad una infezione fungina, dato il crescente numero di individui a rischio per tale tipo di malattia. Non si può quindi ignorare o classificare un fungo come "contaminante o insignificante" quando è isolato da materiale clinico. È chiaro che la prognosi e la risposta alla terapia può variare con il tipo di fungo infettante e con lo stato immunologico del paziente. In base a ciò i medici e biologi dovrebbero "familiarizzare" con le varie caratteristiche epidemiologiche, patogenetiche dei vari tipi di funghi insieme agli ultimi approcci terapeutici e diagnostici. Vengono forniti i principi generali necessari per la diagnosi della maggior parte delle infezioni fungine, per i dettagli si rimanda ai testi elencati nella bibliografia.

In generale la prima diagnosi di infezione fungina è una diagnosi clinica, che nel caso delle micosi invasive, è posta anche attraverso esami strumentali (TAC, NMR, Rx). Tuttavia, gli esami clinici e strumentali mancano di specificità e consentono al massimo di porre una diagnosi presuntiva.

Per una diagnosi definitiva sono necessari tre tipi di indagini di laboratorio: microbiologica, immunologica, istopatologica. L'esame microbiologico oggi può essere utilmente integrato dai saggi molecolari (PCR, RT-PCR) che peraltro sono poi assai utili per tipizzare la specie fungina isolata (vedi appresso). In ogni caso l'esame microscopico diretto in combinazione con l'esame colturale e/o con la biopsia (in alcuni casi), rappresenta la prova diagnostica principale per identificare il microrganismo responsabile. Per alcune malattie fungine è necessaria la sierologia per evidenziare antigeni fungini e/o anticorpi dell'ospite. Si tratta di un ausilio diagnostico che si sta espandendo. La diagnosi di laboratorio di un'infezione fungina, come per tutte le infezioni in genere, è strettamente dipendente da un prelievo ben eseguito di un materiale clinico appropriato e da una pronta consegna del campione al laboratorio attraverso un appropriato mezzo di trasporto. È chiaro che la storia del paziente, l'esame clinico, e le conoscenze micologiche, compresa l'epidemiologia locale, indirizzeranno verso la scelta del tipo di prelievo (pelle, mucose, escreti, sangue, tessuti ecc.). I campioni devono essere prelevati asetticamente o dopo un'appropriata decontaminazione del sito del prelievo e devono essere posti in contenitori sterili sigillati, in quantità adeguata per il repentino esame microscopico e colturale, accompagnato da un'appropriata storia clinica. Il campione clinico deve essere trasportato rapidamente al laboratorio, in quanto può essere conservato a 4 °C, solo per poco tempo senza alterazioni nella vitalità del microrganismo. Si può effettuare l'osservazione microscopica diretta (esame morfologico) se i materiali patologici sono fluidi, invece nel caso di materiale denso (squame cornee, tessuti, unghie) si deve effettuare una solubilizzazione a caldo con soluzioni di idrato sodico o potassico al 10% per visualizzare gli elementi fungini (es. dermatofiti, *Malassezia furfur*). Si possono anche utilizzare colorazioni specifiche (Gram, Giemsa e altre) per visualizzare la tipica morfologia fungina. La colorazione con inchiostro di china mette in evidenza la capsula polisaccaridica del criptococco nel liquido cefalo-rachidiano (LCR) e permette quindi una diagnosi presuntiva. Le sezioni istologiche vengono colorate con vari metodi (colorazione al PAS, metodo Gridley, metodo Gomori-Grocott, colorazione al mucicarminio per i criptococchi).

L'esame colturale è sempre fondamentale in quanto può risultare positivo in caso di negatività dell'esame microscopico diretto ed inoltre permette l'identificazione specifica del micete. Un primo isolamento viene effettuato su due o più tipi di terreni solidi non selettivi e selettivi, con temperature di incubazione a 28 °C e/o 37 °C e con pH neutro (agar Sabouraud, agar Mycosel, *Brain Heart Infusion* agar con 5-10% di sangue di pecora, terreno cromogeno che permette l'isolamento e la simultanea identificazione di specie di lievito in base al colore delle colonie). Tuttavia anche pH acidi permettono la crescita di miceti e nello stesso tempo contrastano la crescita di batteri contaminanti. Terreni arricchiti con antibiotici e cicloeximide (antifungino nei

confronti di muffe contaminanti) permettono la crescita selettiva dell'agente eziologico fungino. La cicloeximide però può inibire la crescita di alcuni lieviti dimorfi. È importante l'osservazione macro e micromorfologica delle colonie delle muffe e dei lieviti per la loro identificazione. Per le muffe in particolare si utilizza la soluzione chiarificante e colorante "lattofenolo-blu-cotone" per analizzare le patine fungine microscopicamente. Oltre a ciò, per evitare manipolazioni distruttive della colonia, si può effettuare una coltura su vetrino dove lo sviluppo miceliale viene seguito microscopicamente nella sua cinetica, permettendo di identificare i vari tipi di sporulazione necessari per l'identificazione di specie. Nella coltura su vetrino la semina viene effettuata su un quadratino di terreno solido, specifico per il micete, prelevato e posto sterilmente con un bisturi su un vetrino portaoggetti e ricoperto dopo la semina con un vetrino coprioggetto. I lieviti vengono identificati oltre che microscopicamente, evidenziando eventuali morfologie tipiche (es. formazione del tubo germinativo o clamidospore in *C. albicans*), anche attraverso prove biochimiche, come prove di assimilazione e di fermentazione degli zuccheri, saggio dell'ureasi, saggio di utilizzazione di altre sostanze quali i nitrati. Per quanto riguarda l'indagine sierologica la ricerca di anticorpi specifici è relativamente poco utile a scopo diagnostico, a causa della frequenza di reazioni crociate dovute alla presenza di miceti commensali colonizzanti il nostro organismo. Considerevoli progressi sono stati fatti ultimamente nell'allestimento di prove sierodiagnostiche più specifiche e sensibili per la rilevazione di anticorpi, antigeni, metaboliti, acidi nucleici fungo-specifici. Per monitorare la progressione della malattia e la risposta del paziente alla terapia è utile la determinazione dei titoli anticorpali e/o antigenici nel siero su campioni seriali. Tuttavia la ricerca di anticorpi non è sensibile e specifica per la diagnosi di infezioni invasive profonde, con l'eccezione della coccidioidomicosi e istoplasmosi. La rilevazione di antigeni citoplasmatici e parietali e metaboliti nel siero rappresentano la prova diagnostica sierologica principale per le infezioni invasive profonde (saggi per la rilevazione degli antigeni polisaccaridici, glucurono-xilo-mannani, di *C. neoformans* e *H. capsulatum*, saggi immunoenzimatici per galattomannano di *Aspergillus* e mannano di *C. albicans,* saggio del lisato di *limulus* per beta 1-3 glucano di *Candida* e *Aspergillus*). La rilevazione di metaboliti consente una diagnosi rapida sia per la candidosi che per l'aspergillosi (D-arabinitolo nel siero sembra un indicatore per candidosi disseminata, D-mannitolo nel lavaggio broncoalveolare risulta utile nell'aspergillosi polmonare). Comunque ancora non esistono test a livello commerciale con sensibilità e specificità elevata.

Le tecniche microbiologiche e sierologiche convenzionali spesso non permettono di diagnosticare precocemente il tipo di infezione fungina e l'identificazione di specie, fattore di fondamentale rilievo prognostico. Attualmente una valida alternativa ai metodi di diagnostica tradizionale sembrano essere garantite da tecniche di biologia molecolare, le quali consentono diagnosi più corrette e rapide, pur comportando ancora necessità di standardizzazione, elevati costi e personale qualificato. Tali metodiche permettono uno studio più approfondito dell'agente eziologico fungino attraverso l'analisi del genoma e delle proteine. Per la diagnosi rapida sono state utilizzate sonde genetiche o *probes* che ibridizzano con specifiche sequenze di DNA o di RNA del fungo che si ricerca (DNA *fingerprinting*). L'amplificazione del materiale genico attraverso l'impiego della reazione polimerasica a catena (PCR) permette di rilevare acidi nucleici specifici fungini direttamente nel materiale clinico, anche possibilmente quantificando il carico fungino (*Real-Time*-PCR).

Le tecniche di biologia molecolare sono poi fondamentali per la tipizzazione intra-specie del fungo, che riveste un importante significato ai fini epidemiologici e medico-legali, consentendo spesso una precisa identificazione della sorgente dell'infezione e delle sue modalità di diffusione, in particolare nell'ambiente ospedaliero. Per queste finalità, le metodiche attualmente più utilizzate sono l'analisi elettroforetica del cariotipo cellulare attraverso la cosiddetta *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), nonché la digestione con enzimi di

restrizione del DNA nucleare o mitocondriale, e la successiva analisi elettroforetica dei frammenti ottenuti, cioè del profilo di digestione (*Restriction Endonuclease Analysis* - REA) seguita, se necessario, dalla rivelazione su filtro con sonde specifiche (*Restriction Fragment Length Polimorphism* - RFLP). Entrambe le tecniche mettono in evidenza polimorfismi genici associati a gruppi di funghi e talvolta addirittura ad "individui" fungini nell'ambito della stessa specie. Anche le tecniche di amplificazione genica (PCR) possono servire allo scopo. Infine, esistono anche metodi fenotipici per la differenziazione intra-specifica, basati sulla suscettibilità alle tossine killer (metodo di Polonelli) o ad altre sostanze chimiche, oppure a particolari forme di crescita in diversi terreni (morfotipo e resistotipo, metodo di Ponton). I metodi diagnostici di più comune uso sono riassunti nelle Tabelle 8-10, mentre i principali metodi di tipizzazione fungina sono riassunti nel seguente schema:

Metodi di tipizzazione fungina	**fenotipici**	Morfotipo Resistotipo Antibiotipo Sensibilità tossina killer
	genotipici	RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism*) PCR (*Polymerase Chain Reaction*) MLST (*Multi Locus Sequence Typing*) Cariotipo elettroforetico (*PFGE Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

Tabella 8. Metodi di laboratorio per la diagnosi di malattie fungine

Metodi	**Descrizione**
Microbiologici	Esame microscopico diretto (a fresco, con alcali, con inchiostro di china; con colorazioni Gram, Giemsa, Calcofluor white) Esame colturale Identificazione Test di sensibilità agli antimicotici
Istopatologici	Colorazioni di routine (Ematossilina e Eosina) Colorazioni speciali (Gomori metenamina silver, PAS, mucicarminio) Immunofluorescenza diretta Ibridazione *in situ*
Immunolog**ici** (per rilevare antigeni e anticorpi)	Doppia immunodiffusione Immunoelettroforesi Immunoelettrosineresi Precipitazione Fissazione del complemento Immunofluorescenza indiretta Agglutinazione su particelle di lattice Agglutinazione diretta Saggio immunoenzimatico (ELISA) Saggio radioimmunologico
Molecolari	Amplificazione acidi nucleici, PCR e RT-PCR Tipizzazione
Biochimici	Dosaggio di alcuni metaboliti (es. arabinitolo) Componenti della parete cellulare Enzimi

PAS=Reazione di Schiff all'acido periodico; PCR=*Polymerase Chain Reaction*; RT-PCR=*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

Tabella 9. Colorazioni comunemente usate nell'esame diretto microscopico per rilevare elementi fungini nel materiale clinico

Colorazioni	Dettagli esplicativi
Calcofluor white	Rapida 1-2 min; rileva la chitina della parete cellulare tramite fluorescenza, è usata anche con KOH. Richiede il microscopio a fluorescenza. Rileva tutti i funghi compreso *Pneumocystis jiroveci (carinii)*
Giemsa	Rileva *Histoplasma capsulatum* intracellulare, le forme intracistiche e trofiche di *P. jiroveci (carinii)*, ma non la parete (*). Esame di campioni delle vie respiratorie, di midollo osseo, strisci di sangue periferico, impronte tissutali
Gram	Comunemente utilizzata per rilevare funghi e batteri. Colora lieviti ed elementi ifali. I funghi appaiono Gram-positivi, ma alcuni come *Cryptococcus* presentano colorazione irregolare puntiforme o appaiono Gram-negativi.
Ematossilina Eosina	Colorazione ottima per dimostrare la reazione dell'ospite nei tessuti infetti, colora molti funghi, ma alcuni non si differenziano. È utile per dimostrare il pigmento naturale dei funghi dematiacei.
Gomori	Ottima colorazione per rilevare tutti i funghi, colora ife e forme lievito in nero su fondo verde. Utilizzata usualmente in istopatologia
Mucicarminio (soluzione idroalcolica di carminio e cloruro di alluminio)	Utile per rilevare il materiale capsulare di *Cryptococcus neoformans.* Colora anche le pareti di *Blastomyces dermatitidis* e *Rhinosporidium sieberi.*
Reazione di Schiff al PAS (Periodic Acid - Schiff)	Colore sia lieviti che ife nei tessuti, però PAS artefatti possono sembrare cellule lievito.

(*) Porre attenzione alla specificità perché colora altri organismi

Tabella 10. Siti di infezione, raccolta di campioni e procedure diagnostiche per alcune infezioni fungine

Sito di infezione e microrganismo infettante	Campione	Metodo di raccolta	Procedura diagnostica
Sangue *Candida* spp. *C. neoformans* *Histoplasma capsulatum* *Fusarium* spp. *Aspergillus terreus* *Penicillium marneffei*	Sangue intero	Prelievo ematico	Brodocoltura, Coltura Centrifugazione lisi
	Siero	Prelievo ematico	Ricerca antigeni *(Candida, Cryptococcus e Histoplasma)* Amplificazione acidi nucleici
	Urine	Sterile	Ricerca antigeni (*Histoplasma)*
Midollo osseo *Histoplasma capsulatum* *Penicillium marneffei*	Aspirato midollare	Sterile	Esame microscopico Coltura
	Siero	Prelievo ematico (sterile)	Sierologia *(Histoplasma*), Ricerca antigeni e anticorpi
	Urine	Sterile	Ricerca antigeni *(Histoplasma)*
Sistema nervoso centrale *Candida* spp. *C. neoformans* *Aspergillus* spp. *Scedosporium* spp. Muffe dematiacee	Liquido cerebrospinale	Sterile	Esame microscopico Coltura
	Biopsia	Sterile, non sterile per istopatologia	Esame microscopico Coltura
	Siero	Sterile	Ricerca antigene GXM (*) criptococcico
Ossa e articolazioni *Candida* spp. *Aspergillus* spp. *Fusarium* spp. *Histoplasma capsulatum* *Blastomyces dermatitidis* *Coccidioides immitis* *Penicillium marneffei* *Sporothrix schenckii*	Aspirato	Sterile	Esame microscopico Coltura
	Biopsia	Sterile, non sterile per istopatologia	Esame microscopico Coltura
	Siero	Prelievo ematico	Sierologia Ricerca antigeni e anticorpi
Occhi *Candida* spp. *C. neoformans* *Aspergillus* spp. Zygomycetes	Cornea	Biopsia, raschiamento	Esame microscopico Coltura
	Liquido corpo vitreo	Aspirato sterile	Esame microscopico Coltura
Apparato urogenitale *Candida* spp. *C. neoformans* *Trichosporon* spp *Rhodotorula* spp raramente*:* *Histoplasma capsulatum* *Blastomyces dermatitidis* *Coccidioides immitis*	Urina	Sterile	Esame microscopico Coltura
	Secrezioni vaginali, uretrali, prostatiche	Tampone	Esame microscopico, Coltura Esame a fresco, Calcofluor/KOH Coltura
	Siero	Prelievo ematico	Sierodiagnosi
	Biopsia	Sterile, non sterile per istopatologia	Esame microscopico Coltura

segue

continua

Sito di infezione e microrganismo infettante	**Campione**	**Metodo di raccolta**	**Procedura diagnostica**
Tratto respiratorio *C. neoformans* *Aspergillus* spp. *Fusarium* spp. Zygomycetes *Scedosporium apiospermum* Muffe dematiacee Funghi dimorfici endemici *Pneumocystis jiroveci (carinii)*	Sputo	Indotto, senza conservanti	Esame microscopico Coltura
	Lavaggio bronchiale (quando indotto)	Nessun conservante	Esame microscopico Coltura
	Aspirato nasofaringeo	Aspirato o biopsia	Esame microscopico Coltura
	Biopsia polmonare a cielo aperto	Sterile, non sterile per istopatologia	Esame microscopico Coltura (**)
	Siero	Prelievo ematico	Sierodiagnosi Amplificazione acidi nucleici
	Urine	Sterile	Ricerca antigene (*Histoplasma* spp.)
Pelle e mucose *Candida* spp. *C. neoformans* *Trichosporon* *Aspergillus* spp. Zygomycetes *Fusarium* spp. Muffe dematiacee Funghi dimorfici endemici *Sporothrix schenckii*	Biopsia	Sterile, non sterile per istopatologia	Esame microscopico Coltura
	Mucosale	Tampone	Esame microscopico, Coltura Esame a fresco, Calcofluor/KOH
	Scarificazione	Non sterile	Calcofluor/KOH
	Siero	Prelievo ematico	Sierodiagnosi Amplificazione acidi nucleici
	Urine	Sterile	Ricerca antigene (*Histoplasma* spp.)
Siti multipli sistemici *Candida* spp. *C. neoformans* *Trichosporon* Muffe dematiacee Funghi dimorfici endemici Muffe ialine	Sangue intero	Prelievo ematico (Sterile)	Brodocoltura Coltura Centrifugazione lisi
	Siero	Prelievo ematico (Sterile)	Sierodiagnosi Amplificazione acidi nucleici
	Urina	Sterile	Ricerca antigene (*Histoplasma* spp.)
	Biopsia	Sterile, non sterile per istopatologia	Esame microscopico Coltura (**)

(*) GXM= glucurono-xilo-mannano
(**) senza frammentare il tessuto.
Tradotto e adattato da: Pfaller MA, McGinnis MR. The laboratory and clinical mycology. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (Ed.). *Clinical Mycology.* New York: Churchill Livings; 2003.

Controllo delle infezioni fungine

Il controllo delle infezioni fungine comprende sia la prevenzione che il trattamento. La prevenzione consiste nell'evitare condizioni ambientali che possano favorire una crescita fungina. Il mantenimento di un ambiente libero da spore fungine (cioè con la minore possibile quantita di esse) negli ospedali infatti può ridurre l'incidenza di infezioni nosocomiali. Nel caso di pazienti immunocompromessi, il controllo della malattia di base può aiutare a contenere l'incidenza di infezioni fungine (es. controllo del diabete tramite dieta, insulina o ipoglicemici orali), in altri casi (malati di AIDS, di cancro sottoposti a chemioterapia, organo-trapiantati) è utile, a volte necessaria la profilassi con antifungini, come ad esempio, la profilassi con fluconazolo in trapiantati di midollo osseo o di cellule staminali con colture di sorveglianza positive a *Candida*.

Non esistono ancora vaccini contro le infezioni fungine, ma la ricerca è molto attiva in quest'area ed alcune formulazioni vaccinali sono risultate molto efficaci in test pre-clinici sia per la candidosi mucosale che per la candidosi e l'aspergillosi invasiva (11).

Trattamento con antifungini

Poichè le cellule dei mammiferi e dei funghi sono entrambi eucariotiche e contengono sostanzialmente gli stessi organelli ed un simile livello di organizzazione della membrana citoplasmatica, con simili steroli (ergosterolo nella membrana cellulare fungina, colesterolo nella membrana cellulare animale, entrambi assenti, ad esempio, nelle cellule batteriche, molto meglio contrastabili con la chemioterapia) diventa difficile anche trovare un'agente antimicotico capace di inibire il microrganismo infettante senza provocare danni nell'ospite. Lo sviluppo dei chemioterapici anti-fungini è quindi stato estremamente più lento rispetto a quello degli agenti antibatterici e, per molti anni, l'armamentario chemioterapico antifungino è stato limitato a due-tre composti davvero efficaci, ma anche notevolmente tossici. L'unica vera differenza fra cellule fungine e dell'ospite è la parete cellulare (ad esempio, il blocco della sintesi della chitina della parete cellulare sarebbe l'obiettivo ideale per impedire l'infezione fungina), ma per parecchio tempo non è stata considerata come un utile bersaglio terapeutico.

Negli ultimi anni, tuttavia, stante la crescente importanza delle malattie fungine nell'uomo, in particolare all'interno delle infezioni ospedaliere (vedi sopra epidemiologia), ci sono stati significativi progressi nel settore, soprattutto attraverso la produzione di nuovi derivati azolici e dell'intero gruppo delle echinocandine (vedi appresso). I principali agenti antifungini oggi disponibili possono essere distinti in base al meccanismo d'azione:

I derivati polienici **c**omprendono amfotericina B, nistatina e pimaricina e sono prodotti da varie specie di streptomiceti. Hanno una maggiore affinità per l'ergosterolo nelle membrane cellulari fungine rispetto al colesterolo nelle membrane delle cellule dell'ospite. Ciò provoca rottura delle membrane cellulari e morte della cellula fungina per lisi osmotica, ma purtroppo anche tossicità per le cellule umane. L'amfotericina B è il farmaco elettivo per la maggior parte delle infezioni sistemiche fungine (aspergillosi, micosi da miceti dimorfi, candidosi sistemiche, criptococcosi). È necessario somministrare la sostanza per via endovenosa spesso per 2-3 mesi e il paziente richiede l'ospedalizzazione. Il farmaco ha notevole tossicità, in particolare può provocare nefrotossicità, tromboflebiti, febbre, brividi, convulsioni e anemia. Sebbene ci siano al giorno di oggi nuovi antimicotici efficaci e meno tossici, l'amfotericina B rimane sempre il *golden standard* per la terapia di infezioni gravi. L'amfotericina in

formulazione lipidica (liposomiale) è meno tossica ma molto costosa. La nistatina è tossica per via parenterale, e quindi l'uso è molto limitato (solo per via orale o mucosale*)* soprattutto per infezioni del tratto gastrointestinale da *Candida*. Esiste ora una formulazione lipidica per somministrazione endovena.

La griseofulvina è prodotta da *Penicillium griseofulvum* ed è un farmaco della classe dei benzofurani, ad azione lenta, usato per gravi infezioni della pelle e delle unghie (micosi superficiali e cutanee). Viene somministrato per via orale e il suo effetto dipende dall'accumulo elettivo a livello dello strato corneo dell'epidermide, costituendo in tal modo una barriera all'ulteriore penetrazione e crescita del fungo. Sembra possedere azione multipla a livello cellulare, con interferenza sulla sintesi della parete cellulare e sulla polimerizzazione dei microtubuli del fuso mitotico fungino, impedendo quindi la duplicazione cellulare ([3]).

Gli azoli sono chemioterapici antifungini di sintesi. Il generale meccanismo di azione degli azoli è l'inibizione della sintesi dell'ergosterolo che danneggia la struttura della membrana fungina (inibizione della lanosterolo C-14-demetilasi, dipendente dal citocromo P450). Gli azoli (imidazoli e triazoli, inclusi chetoconazolo, fluconazolo, itraconazolo, voriconazolo, terconazolo) sono usati per candidosi mucocutanea, dermatofitosi e alcune infezioni fungine sistemiche. Il fluconazolo è usato nei pazienti AIDS con criptococcosi in quanto è in grado di penetrare nel liquido cefalorachidiano. La somministrazione orale e la tossicità ridotta costituiscono dei vantaggi. Il miconazolo e il clotrimazolo sono in genere utilizzati per via topica. L'itraconazolo e il voriconazolo sono farmaci particolarmente attivi contro *Aspergillus.*

Il chetoconazolo può interferire con la sintesi degli steroli umani.

La 5-fluorocitosina (5-FC) inibisce la sintesi di RNA e trova il suo maggior impiego nella cura della criptococcosi. Viene somministrato per via orale, passa la barriera emato-encefalica ed è relativamente ben tollerato dall'ospite. Lo spettro di azione risulta limitato ai lieviti (*Candida e Cryptococcus)* e facilmente viene indotta resistenza ad essa. Deve di norma essere usata in associazione con altri antifungini (amfotericina B) per evitare la possibilità di indurre resistenze.

Le allilamine sono molecole con attività fungistatica con azione sulla sintesi dell'ergosterolo, tramite l'inibizione dell'enzima squalene-epossidasi. LA terbinafina, *per os,* si accumula a livello epidermico ed è usata per infezioni da dermatofiti.

Le echinocandine (caspofungina, micafungina) sono i chemioterapici antifungini più innovativi e dotati, in teoria, della maggiore tossicità selettiva perché inibiscono un componente unico nei funghi ed assente nell'ospite. Sono agenti antifungini esa-peptidi ciclici, che interagiscono con la beta 1-3-glucano sintetasi, enzima localizzato nella membrana cellulare, inibendo la sintesi del beta 1-3 D-glucano della parete cellulare con conseguente alterazione dell'osmosi e lisi cellulare. Sono farmaci abbastanza recenti di cui non è stato ancora sperimentata la piena utilità. Peraltro il loro spettro d'azione, a differenza dei derivati polienici, ed in parte azolici, è assai ristretto.

Recentemente sono state riscoperte le possibilità terapeutiche delle sostanze naturali, quale possibile alternativa o integrazione alla risoluzione di patologie infettive, soprattutto in seguito all'aumento dell'insorgenza della resistenza, della tossicità e delle allergie ai chemioterapici. In particolare sono state attestate da molti lavori scientifici le proprietà antimicrobiche degli oli essenziali, frazioni ottenute dalle piante mediante distillazione in corrente di vapore, con ricerche *in vitro* ed in alcuni casi *in vivo.* Una delle sostanze più studiate, potenzialmente utile farmacologicamente è "l'olio dell'albero del tè" (*tea tree oil*), olio essenziale estratto dalla pianta australiana *Melaleuca alternifolia.* Per quanto riguarda le

([3]) La griseofulvina ha una certa azione antimitotica anche su cellule umane in particolare sui leucociti polimorfonucleati.

infezioni fungine è stata dimostrata scientificamente l'efficacia *in vitro* del *tea tree oil* per lieviti, dermatofiti e altri funghi filamentosi e l'efficacia clinica per il trattamento di onicomicosi, *tinea pedis*, forfora e candidosi orale. Non esistono dati clinici pubblicati per il trattamento della candidosi vaginale, anche se sono stati riportati dati di efficacia sull'uso del *tea tree oil* nel trattamento di candidosi vaginale sperimentale nella ratta (12).

La Figura 9 mostra schematicamente i siti di attacco dei vari antimicotici sulla cellula fungina, mentre le Tabelle 11 e 12 schematizzano tipo e combinazione di antimicotici.

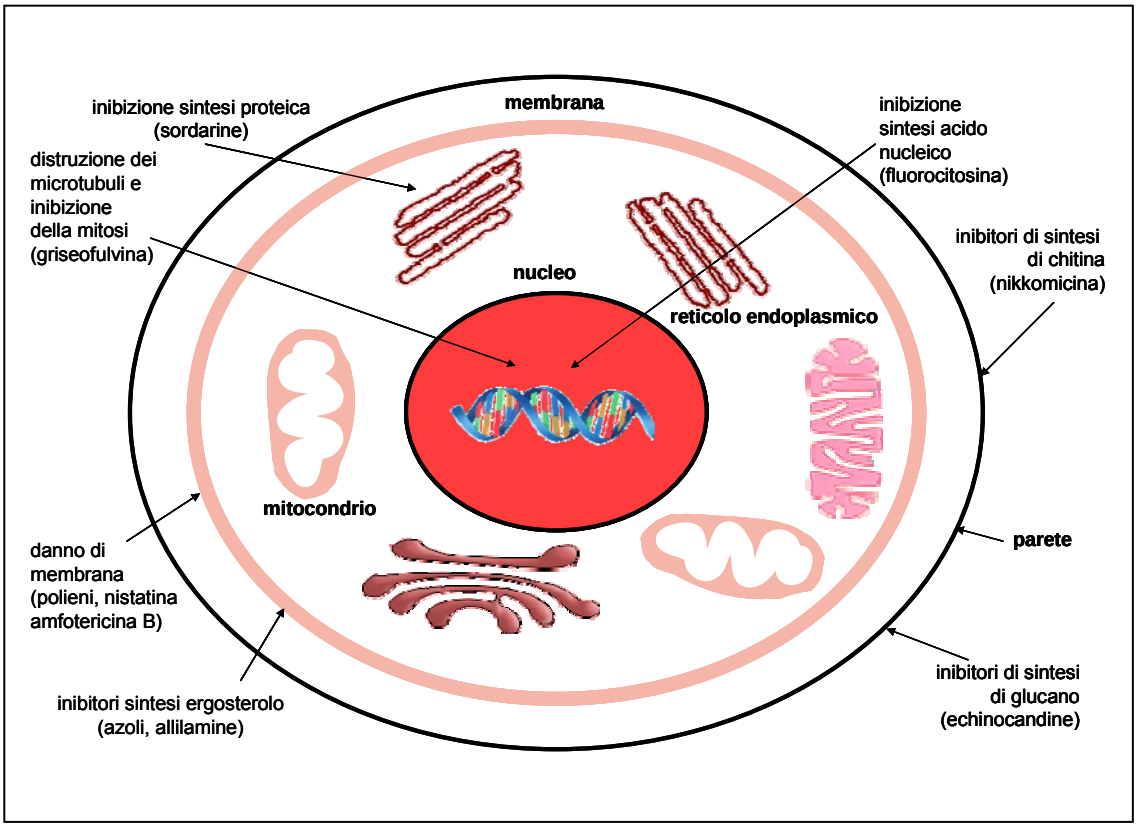


Figura 9. Siti di attacco di vari antimicotici sulla cellula fungina

Tabella 11. Agenti antimicotici più frequentemente adoperati in clinica

Antimicotici	Somministrazione	Meccanismo di azione	Commenti
Allilamine			
Naftifina Terbinafina	Topica, orale, Topica	Inibizione di squalene-epossidasi	Terbinafina ha un ampio spettro di azione e agisce sinergicamente con altri antifungini.
Antimetaboliti			
Fluorocitosina	Orale	Inibizione della sintesi di DNA e RNA	Usato in combinazione con amfotericina B e fluconazolo; tossicità e resistenza secondaria rappresentano problemi
Imidazolici e triazolici			
Imidazolici (Ketoconazolo, Miconazolo, Tioconazolo)	Orale, topica	Inibizione dell'enzima lanosterolo 14-α-demetilasi citocromo P-450 dipendente	Chetoconazolo ha uno spettro di attività non molto ampio e presenta problemi di tossicità.
Fluconazolo	Orale, endovena	Come per gli imidazoli, ma si lega più specificamente all'enzima bersaglio	Spettro limitato (lieviti); buona penetrazione a livello del sistema nervoso; buona attività *in vivo*; resistenza primaria e secondaria con *Candida krusei* e *Candida glabrata,* rispettivamente
Itraconazolo	Orale, endovena	Come per gli imidazoli, ma si lega più specificamente all'enzima bersaglio	Ampio spettro di attività; assorbimento imprevedibile; tossicità e interazione con altri farmaci rappresentano problemi
Voriconazolo	Orale, endovena	Come per gli imidazoli, ma si lega più specificamente all'enzima bersaglio	Ampio spettro di attività (lieviti e muffe); attivo *vs Candida krusei;* molte interazioni con altri farmaci
Posaconazolo	Orale	Come per gli imidazoli, ma si lega più specificamente all'enzima bersaglio	In via di sviluppo; ampio spettro di attività anche *vs* Zygomycetes
Ravuconazolo	Orale, endovena	Come per gli imidazoli, ma si lega più specificamente all'enzima bersaglio	In via di sviluppo; ampio spettro di attività verso lieviti e muffe
Echinocandine			
Caspofungina Anidulafungina Micafungina	Endovena	Inibizione della sintesi β-1,3-D-glucano a livello della parete cellulare	Caspofungina è consigliata per il trattamento della candidosi invasiva e aspergillosi. Le altre sostanze sono in via di sviluppo; attività fungicida contro *Candida*
Polieni			
Amfotericina B	Endovena, topica	Si lega all'ergosterolo causando un danno diretto ossidativo alla membrana	Agente classico molto usato con ampio spettro di attività ma tossico
Formulazione lipidica (amfotericina B in complesso lipidico o dispersione colloidale, amfotericina B liposomale)	Endovena	Come per amfotericina B	Ampio spettro di attività; meno tossico ma costoso
Nistatina	Orale, topica	Come per amfotericina B	Uno dei pochi antimicotici polienici usati per via mucosale

Tabella 12. Combinazioni antifungine potenzialmente utili nella terapia delle micosi più comuni

Infezione	Combinazioni antifungine	Commenti
Candidosi	AmB + FCZ	Buon successo clinico nella candidemia
	AmB + FC	Successo clinico nella peritonite
Criptococcosi	AmB + FC	Buon successo clinico nella meningite criptococcica
	AmB + FCZ	Successo clinico nella meningite criptococcica
	FC + FCZ	Successo clinico nella meningite criptococcica
Aspergillosi	AmB + FC	Efficacia *in vivo* (modello animale); non ci sono dati nell'uomo
	AmB + echinocandine	Efficacia *in vivo* (modello animale); non ci sono dati nell'uomo
	Triazoli + echinocandine	Efficacia *in vivo* (modello animale); non ci sono dati nell'uomo

AmB=Amphotericina B; FC=fluorocitosina; FCZ=fluconazolo

Resistenza agli antimicotici

L'uso massiccio e a volte l'abuso di farmaci antifungini (specialmente quelli da banco) in relazione all'incremento di infezioni fungine, ha portato alla selezione di mutanti resistenti con conseguenti problemi terapeutici ed epidemiologici. La resistenza antifungina di solito si sviluppa lentamente e dipende dalla comparsa di specie intrinsecamente resistenti che non sono mai venute in contatto con il farmaco (resistenza primaria) o da alterazioni graduali di strutture o funzioni cellulari che portano alla resistenza acquisita (resistenza secondaria) dopo esposizione ripetuta del microrganismo all'agente antifungino. In contrasto con i meccanismi di resistenza agli agenti antibatterici, i funghi non hanno la capacità di distruggere o modificare l'agente antifungino e se possiedono geni responsabili della resistenza antifungina, questi non sono trasmissibili da cellula a cellula in quanto i funghi non possiedono elementi plasmidici o trasposoni. Bisogna considerare anche che una terapia può essere fallimentare anche se il farmaco usato è attivo nei confronti del fungo infettante. Infatti ci sono molti fattori che possono contribuire alla resistenza: lo stato immune dell'ospite, il sito e la gravità dell'infezione, la presenza di corpi estranei come cateteri o trapianti vascolari, la reazione del trapianto verso l'ospite (*graft versus host)*, l'età, lo stato nutrizionale e la scarsa *compliance*, cioè l'aderenza al trattamento, da parte del paziente. Altri fattori sono inerenti a caratteristiche del farmaco stesso come l'attività fungistatica o fungicida del farmaco nel sito dell'infezione, la dose e la durata della terapia, il tipo di molecola e l'interazione con altri farmaci. Finora, la resistenza con maggiori implicazioni cliniche è risultata quella verso il fluconazolo, un farmaco poco tossico e ben tollerato. Altre resistenze stanno tuttavia emergendo, e richiedono da parte del terapeuta una maggiore attenzione e selezione nell'uso di questi farmaci che peraltro non sono così numerosi come nel caso degli antibiotici.

MICOSI SUPERFICIALI E CUTANEE

Micosi superficiali

Gli agenti eziologici delle micosi superficiali colonizzano gli strati più esterni della pelle e gli annessi cutanei, inducono poca o nessuna reazione immunitaria, non sono lesivi e perciò le patologie da essi determinate sono asintomatiche. In generale costituiscono più un problema di ordine estetico che patologico e sono facili da diagnosticare e curare.

Pitiriasi Versicolor

L'agente eziologico di questa comune infezione fungina superficiale diffusa in tutto il mondo è il lievito lipofilo *Malassezia furfur*.

- *Morfologia*
  Le cellule sono lievito-simile sferiche o ovali (3-8 micron), in genere a grappolo nelle squame cutanee infette. Possono essere presenti ife corte poco ramificate disposte a catena. Le cellule sono fialoconidi e mostrano una formazione gemmante con un collaretto intorno al punto di inizio della gemma dalla cellula madre. In coltura, su terreni standard contenenti olio di oliva, si hanno colonie con colore variante dal crema al bruno, di consistenza secca, costituite da cellule lievito gemmanti.
- *Epidemiologia*
  È una malattia presente in tutto il mondo in molte persone sane, ma è più diffusa nelle regioni tropicali e subtropicali. *M. furfur* non si trova come saprofita in natura e non è stato isolato negli animali. Si può trasmettere per contatto diretto o indiretto del materiale cutaneo infetto da una persona all'altra.
- *Aspetti clinici*
  Le lesioni sono piccole macchie irregolari ipo- o iper- pigmentate e possono essere presenti in tutte le zone del corpo, preferibilmente su collo e schiena. In generale non si hanno sintomi, con l'eccezione a volte di un leggero prurito. Follicolite associata ad eczema seborroico con invasione dell'ostio follicolare sono rare complicazioni di questa malattia.
- *Diagnosi di laboratorio*
  Esame diretto microscopico di squame epidermiche in KOH 10% con o senza *Calcofluor white*. Si possono evidenziare le cellule lievito con colorazione ematossilina-eosina (EE) o all'acido periodico di Schiff (PAS). Le lesioni possono essere evidenziate alla fluorescenza con la lampada di Wood. Non è necessario l'esame colturale per la diagnosi, ma è possibile la crescita con terreni micologici arricchiti con olio di oliva, come fonte di lipidi. Si ottiene crescita dopo 5-7 giorni di incubazione a 30 °C.
- *Trattamento*
  La malattia è generalmente cronica e persistente. Vengono prescritti l'uso topico di azoli o di shampoo al solfuro di selenio o della pomata solfo-salicilica (unguento d Withfield). Si possono anche usare ketoconazolo o itraconazolo per via orale, ma solo per infezioni molto estese, come spesso succede nel soggetto HIV+. Per evitare ricadute è anche necessario mantenere un'elevata igiene degli indumenti intimi, tramite lavaggio ad alta temperatura.

Pitiriasi Nera (*Tinea Nigra*)

È una feoifomicosi superficiale provocata dal fungo pigmentato *Hortea werneckii* (precedentemente, *Exophiala werneckii*).

- *Morfologia*
  Microscopicamente appare come fungo dematiaceo con ife settate, frequentemente ramificate con ampiezza da 1,5 a 3 micron. Sono presenti artroconidi e cellule allungate gemmanti. Cresce su terreni micologici standard a 25 °C come muffa pigmentata nera-grigiastra, umida con produzione di anelloconidi.
- *Epidemiologia*
  Si contrae in seguito ad inoculazione traumatica del fungo negli strati superficiali della pelle. È diffusa nelle zone tropicali e subtropicali soprattutto in Africa, Asia, America Centrale e Sud America. Si riscontra soprattutto nei bambini e nei giovani adulti con un'alta incidenza nelle femmine.
- *Aspetti clinici*
  Tinea Nigra appare come una macchia irregolare pigmentata (marrone, nera) di solito sulle palme delle mani e sulle piante dei piedi. Non c'è invasione dei follicoli piliferi e l'infezione non è contagiosa. La lesione può essere confusa con un melanoma, ma un semplice esame microscopico delle squame cutanee della zona lesa può evitare procedure invasive bioptiche.
- *Diagnosi di laboratorio*
  Si diagnostica facilmente con l'esame microscopico diretto delle scaglie epidermiche poste in KOH al 10% o al 20%. Le ife pigmentate sono confinate agli strati più esterni dello strato corneo e sono facilmente evidenziati con colorazione EE. Le scaglie epidermiche devono essere poste poi in terreni micologici con antibiotici per l'esame colturale. Le colonie lievitiformi crescono entro tre settimane e assumono aspetto vellutato con l'invecchiamento. L'esame microscopico mostra cellule lievitiformi cilindriche, spesso divise da un setto fra due cellule e con l'invecchiamento ife toruloidi.
- *Trattamento*
  Terapia topica con creme a base di azoli, di unguento di Whitfield (pomata solfo-salicilica) e di terbinafina.

Pietra Bianca

Infezione superficiale dei capelli e dei peli causata funghi lievitiformi del genere *Trichosporon* (*T. inkin, T. asahii,T. beigelii, T. mucoides*).

- *Morfologia*
  L'esame microscopico rivela elementi ifali, artroconidi (cellule rettangolari risultanti dalla frammentazione delle ife) e blastoconidi (cellule lievito gemmanti).
- *Epidemiologia*
  Diffusa nelle aree tropicali e subtropicali ed è dovuta alla scarsa igiene.
- *Aspetti clinici*
  I capelli, i peli dei genitali, delle ascelle, della barba sono infettati e presentano noduli soffici, morbidi al tatto, lungo la sezione pilifera e possono essere facilmente rimossi.
- *Diagnosi di laboratorio*
  Quando l'esame microscopico rivela elementi ifali, artroconidi o cellule gemmanti, i peli infetti devono essere seminati su terreni micologici senza cicloeximide (quest'ultima inibisce *Trichosporon* spp.). Si sviluppano colonie color crema, rugose, secche in 48-72 ore di incubazione a 30 ° C. Le varie specie possono essere identificate tramite saggi di assimilazione degli zuccheri, di assimilazione negativa del nitrato di potassio, produzione positiva di ureasi e esame morfologico su *corn meal agar* per la presenza di artroconidi e blastoconidi.

– *Trattamento*
  Uso topico di creme a base di azoli, ma sono efficaci anche la rasatura della zona e una maggiore igiene.

Pietra Nera

Infezione dei capelli causata dal fungo ascomicete *Pedraia hortae*.

– *Morfologia*
  Il microrganismo si sviluppa come muffa pigmentata da marrone a nero rossastro. Con l'invecchiamento le colonie producono aschi e ascospore allungate e fusiformi all'interno di strutture specializzate.
– *Epidemiologia*
  È un'infezione non comune ed è stata riportata in aree tropicali dell'America Latina e dell'Africa centrale. Si pensa che sia dovuta a scarsa igiene.
– *Aspetti clinici*
  I capelli e i peli presentano piccoli noduli scuri e duri. La massa ifale è sostenuta da una sostanza cementante e contiene aschi e ascospore, la fase sessuale del fungo.
– *Diagnosi di laboratorio*
  L'esame del nodulo rivela ife ramificate e pigmentate immerse in una sostanza cementante, con artroconidi e aschi con otto ascospore asettate. *P. hortae* può essere coltivata sui terreni micologici di routine, cresce molto lentamente a 25 °C prima in forma lievito, poi come muffa.
– *Trattamento*
  Rasatura delle zone infette ed accurata igiene.

Micosi cutanee

Includono infezioni della cute e dei suoi annessi cutanei causate da funghi dermatofiti (dermatofitosi) e da funghi non dermatofiti (dermatomicosi).

Micosi causate da funghi dermatofiti (dermatofitosi)

Complesso di malattie provocate da diverse specie di funghi filamentosi tassonomicamente correlati nei generi *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*. Sono noti come dermatofiti e hanno la capacità di invadere la pelle e annessi cutanei, sia negli uomini, che negli animali. Sono cheratinofili e cheratolitici, in grado quindi di rompere la superficie cheratinizzata delle strutture cutanee, invadendo però solo lo *stratum corneum* più esterno. Le varie forme di dermatofitosi sono riferite come "tigna". Clinicamente sono classificate in base al sito anatomico o alla struttura infettata:

– *tinea capitis* dei capelli, sopracciglia, ciglia
– *tinea barbae* della barba
– *tinea corporis* delle zone glabre della pelle
– *tinea cruris* dell'inguine
– *tinea pedis* del piede
– *tinea unguium* delle unghie (onicomicosi)

I segni clinici e sintomi delle dermatofitosi variano in base all'agente eziologico, alla reazione immunitaria dell'ospite e al sito dell'infezione.

– *Morfologia*
Ogni genere di dermatofita è caratterizzato da una specifica modalità di crescita in coltura e dalla produzione di macroconidi (grandi, pluricellulari, settati) e microconidi (piccoli, unicellulari). Un'ulteriore identificazione di specie richiede la valutazione *in vitro* della morfologia della colonia, della produzione di spore e della richiesta nutrizionale.
Microscopicamente il genere *Microsporum* è identificato dall'osservazione dei macroconidi, mentre i microconidi sono strutture caratteristiche del genere *Trichophyton*. *Epidermophyton floccosum* non produce microconidi, ma la sua produzione di macroconidi a parete liscia, a grappolo di 2-3 è abbastanza caratteristica. *Microsporum canis* produce macroconidi a pareti spesse e rugose multicellulari (da 5 a 8 cellule per conidio). *Tricophyton rubrum* produce microconidi a forma di goccia, lungo la superficie laterale dell'ifa, mentre *T. mentagrophytes* produce sia macroconidi singoli a forma di sigaro, sia grappoli di microconidi sferici. *T. tonsurans* produce microconidi variabili nella forma e nella grandezza, ma in genere sufficientemente grandi, e di forma sferica.
Nelle biopsie della pelle tutti i dermatofiti sono morfologicamente simili e mostrano ife ialine settate, catene di artroconidi e artroconidi dissociati che invadono lo strato corneo, i follicoli piliferi e i capelli. Quando i capelli sono infettati si distinguono tre tipi di invasione parassitaria: *ectothrix, endothrix e favosa* a seconda della specie dermatofita. In tutti i tipi di invasione si riscontrano ife settate. Nel parassitismo di *tipo ectothrix* gli artroconidi formano una guaina all'esterno dei capelli, in quello di *tipo endothrix* sono formati all'interno del capello, mentre in quello di *tipo favoso* ife, artroconidi e spazi vuoti simili a bolle di aria sono formati all'interno e alla radice del capello. I dermatofiti sono evidenziati con le colorazioni EE, Gomori metenamina silver (GMS), PAS. La Tabella 13 riassume alcuni aspetti morfologici e patologici dei dermatofiti.

– *Epidemiologia*
Sono classificati in tre differenti categorie a seconda del loro habitat:
1. Geofili
2. Zoofili
3. Antropofili

I dermatofiti geofili vivono nel suolo e sono patogeni occasionali sia degli uomini che degli animali. Quelli zoofili parassitano i peli degli animali e si possono trasmettere agli uomini. I dermatofiti antropofili generalmente infettano gli uomini e possono essere trasmessi direttamente o indirettamente da persona a persona. Questa classificazione è abbastanza utile dal punto di vista clinico, in quanto specie antropofile tendono a provocare infezioni croniche, non infiammatorie, difficili da curare; mentre specie zoofile e geofile tendono a stimolare una profonda reazione infiammatoria dell'ospite con lesioni, ma con infezioni che rispondono bene alla terapia e talvolta guariscono spontaneamente.
I dermatofiti sono ubiquitari, molto comuni anche in Italia e l'infezione è acquisita tramite contatto con ife, artroconidi o materiale cheratinizzato infetto da un ospite infetto ad uno sensibile. Queste muffe possono sopravvivere per lungo tempo nelle squame cornee e nei capelli per cui l'infezione può avvenire sia per contatto diretto, che indiretto tramite materiale infetto (fomiti). Sono sensibili all'infezione persone di tutte l'età e di entrambe i sessi, anche se *tinea capitis* è più comune in età prepuberale e *tinea cruris* e *tinea pedis* è più diffusa nei maschi adulti. Le infezioni causate da dermatofiti sono generalmente endemiche, ma possono accadere episodi epidemici in situazioni particolari (*tinea capitis* negli scolari). Su scala mondiale *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* sono i più diffusi rispetto alle altre specie (80-90%). Una condizione igienica insufficiente od il contatto con animali tignosi sono i fattori più comuni nell'epidemiologia delle tigne.

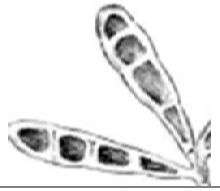
- *Aspetti clinici*
  Le infezioni da dermatofiti mostrano un'ampia gamma di segni clinici che possono essere influenzati dalla specie, dall'entità dell'inoculo, dal sito dell'infezione e dallo stato immunitario dell'ospite. La classica dermatofitosi è costituita da un'alterazione eritema-desquamativa tipicamente circolare (*tinea; ringworm*) con diminuizione dello stato infiammatorio man mano che si va verso il centro della lesione stessa. Le aree affette da tigne spesso presentano un bordo circolare sollevato di alopecia con eritema e desquamazione oppure diffuse zone con papule, pustule, vescicole e kerion, cioè una severa infiammazione del follicolo pilifero. Infezioni della pelle glabra si presentano solitamente con eritema e chiazze di desquamazione che si espandono dal centro, ma con un area centrale non lesionata. La dermatofitosi dei piedi e delle mani spesso spesso si complicano con onicomicosi e distruzione dell'unghia. In genere *T. rubrum* è l'agente eziologico più comune.
- *Diagnosi di laboratorio*
  La diagnosi di laboratorio della dermatofitosi richiede la dimostrazione delle ife fungine all'esame diretto microscopico nel materiale clinico (pelle e annessi cutanei) e l'isolamento del microrganismo all'esame colturale. L'esame diretto viene condotto applicando una goccia di KOH al 10-20% sul campione posto su vetrino oppure viene usato *Calcofluor white* con eccellenti risultati. Per l'esame colturale si adoperano i terreni standard micologici come Sabouraud agar con e senza antibiotici o il terreno "dermatophyte test" con indicatore di pH (rosso fenolo). Le colonie crescono in un periodo che va da 7 a 28 giorni, alcalinizzando il terreno per deaminazione ossidativa degli aminoacidi con viraggio del colore da giallo a rosso. La loro morfologia macroscopica e microscopica (macro- e microconidi) e la richiesta nutrizionale consente un'appropriata identificazione (vedasi testi specializzati).
- *Trattamento*
  Le infezioni che non coinvolgono capelli e unghie possono essere trattate con agenti antifungini topici (azoli, terbinafina, aloprogina)**,** in tutti gli altri casi è richiesta una terapia orale (griseofulvina, itraconazolo, fluconazolo, terbinafina) spesso con rimozione dell'annesso infetto (unghia-peli). Gli azoli e la terbinafina sono più rapidi ed efficaci della griseofulvina specialmente per il trattamento delle onicomicosi.

Onicomicosi causata da funghi non dermatofiti (dermatomicosi)

Le infezioni delle unghie possono essere provocate anche da altre muffe non dermatofitiche come *Scopulariopsis brevicaulis, Scytalidium dimitiatum, Scytalidium hyalinum, Aspergillus, Fusarium* e da lieviti della specie *Candida.*

Tra questi organismi *Scopulariopsis brevicaulis* e *Scytalidium* spp. sono agenti eziologici accertati dell'onicomicosi, invece per gli altri funghi non è accertata l'eziologia in quanto essi potrebbero rappresentare semplicemente una colonizzazione saprofitica del materiale ungueale anormale. I criteri utilizzati per determinare il ruolo eziologico di questi funghi include l'isolamento ripetuto e la presenza di ife o conidi all'esame microscopico del campione ungueale. Le infezioni dovute a *Scopulariopsis brevicaulis, Scytalidium dimitiatum, Scytalidium hyalinum* sono notoriamente difficili da trattare. Di solito è necessaria una parziale asportazione dell'unghia infetta associata a terapia con itraconazolo per via orale o terbinafina. Il trattamento intensivo con 5% di amorolfina sotto forma di smalto ungueale o unguento di Withfield (pomata solfo-salicilica) può essere utile per la remissione delle lesioni.

Tabella13. Dermatofiti: caratteristiche *in vitro* e *in vivo*

Genere	*In vitro*		*In vivo* (capigliatura)	
	Macroconidi	Microconidi	Invasione	Fluorescenza
Epidermophyton	Numerosi, in grappoli di due o tre, a parete liscia con spessore intermedio (20-40 x 6-8µ) 	Assenti	Non applicabile	Non applicabile
Microsporum	Numerosi, grandi, a parete spessa e rugosa (5-100 x 3-8µ)	Rari	*Ectothrix*	+/-
Tricophyton	Rari, lisci a parete sottile (20-50 x 4-6µ)	Numerosi, sferici o a goccia	*Endothrix*	+/-

MICOSI SOTTOCUTANEE

Infezioni che coinvolgono la cute e i tessuti sottocutanei dopo inoculazione traumatica dell'agente eziologico. Possono rimanere localizzate o diffondere per contiguità, o per via linfatica, con rilevante reazione immunitaria da parte dell'ospite. Si tratta di malattie poco diffuse nei paesi a clima temperato e di fatto praticamente assenti in Italia. Le principali micosi sottocutanee sono:

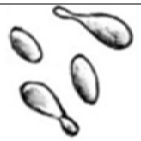
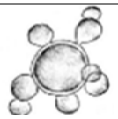
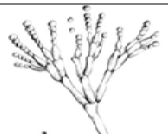
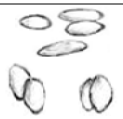
1. *Cromoblastomicosi*
   Infezione fungina cronica della pelle e dei tessuti sottocutanei caratterizzata dallo sviluppo di noduli o placche verrucoidi a lenta crescita. È più diffusa ai tropici, dove a causa del clima caldo umido è più facile l'inoculazione diretta accidentale con materiale infetto. Gli agenti eziologici della cromoblastomicosi (funghi dematiacei del genere *Fonsecaea, Cladosporium, Exophiala, Cladophialophora, Phialophora*) sono presenti nel suolo e nelle piante come saprofiti e infettano in genere persone nelle aree rurali ai tropici, in particolare gambe e braccia facilmente più esposte ai traumi. Non ci sono dati di trasmissione da uomo a uomo.
2. *Micetoma eumicotico*
   Processo infettivo localizzato, cronico, granulomatoso che coinvolge tessuti cutanei e sottocutanei. È caratterizzato dalla formazione di granulomi multipli e ascessi che contengono grandi ammassi di ife noti come "grani". Il processo può essere fortemente destruente del muscolo, del connettivo e dell'osso. I micetomi si riscontrano soprattutto nelle aree tropicali e l'infezione avviene per inoculazione traumatica dell'agente eziologico (*Acremonium, Fusarium, Madurella, Exophiala e Scedosporium* spp.) presente nell'ambiente naturale. Gli uomini risultano più colpiti rispetto alle donne. L'infezione non risulta contagiosa.
3. *Zigomicosi sottocutanea*
   È una micosi cronica provocata dagli Zygomycetes dell'ordine Entomophthorales (*Conidiobolus coronatus, Basidiobolus ranarum*) dovuta ad un'introduzione traumatica accidentale del fungo presente nei detriti organici vegetali in luoghi tropicali. Entrambe i funghi sono saprofiti ambientali di detriti organici vegetali che infettano, per inoculazione traumatica, il tessuto sottocutaneo (*B. ranarum*) oppure, per inalazione delle spore, i tessuti delle cavità nasali (*C. coronatus*), i seni paranasali e i tessuti molli facciali. Questi tipi di infezioni sono diffuse soprattutto in Africa e India. La zigomicosi da *B. ranarum* è diffusa soprattutto nei bambini e nei giovani di età inferiore ai 20 anni. La zigomicosi da *C. coronatus* è invece diffusa nei giovani adulti prevalentemente maschi.
4. *Feoifomicosi sottocutanea*
   Costituisce un gruppo di infezioni fungine eterogenee causate da funghi pigmentati o dematiacei saprofiti (*Exophiala jeanselmei, Wangiella dermatitidis, Bipolaris* spp.) che si presentano con ife irregolari nei tessuti infettati. Si possono presentare come micosi superficiali, sottocutanee o disseminate. La via di infezione è probabilmente dovuta all'inoculazione traumatica di tali funghi, vista la loro natura saprofitica. Schegge di legno presenti nel materiale istopatologico determinano la formazione di una cisti reattiva feoifomicotica.
5. *Sporotricosi linfocutanea*
   Infezione causata da un fungo dimorfico (*S. schenckii*) ubiquitario nel terreno e nel materiale organico in decomposizione. L'infezione è cronica ed è caratterizzata da lesioni nodulari e ulcerose. La disseminazione in altri siti corporei è rara. Le aree di maggiore endemicità sono Giappone, Nord e Sud America. L'infezione classica è dovuta ad una inoculazione traumatica di materiale contaminato. La trasmissione zoonotica è stata associata a gatti infetti.

MICOSI SISTEMICHE CAUSATE DA FUNGHI ENDEMICI DIMORFICI

I funghi dimorfi patogeni sono organismi che esistono sia in forma miceliale in natura ed in laboratorio a 25-30 °C, sia in forma lievito o di sferula (come nel caso di *Coccidioides*) nei tessuti o nei terreni micologici arricchiti a 37 °C. Vengono considerati funghi patogeni primari sistemici, in quanto sono in grado di determinare infezione sia negli individui normali che in quelli compromessi e per la loro capacità di disseminazione profonda viscerale nell'ospite. I funghi patogeni dimorfi comprendono *Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis, Coccidioides posadasii, Histoplasma capsulatum* var *capsulatum, Histoplasma capsulatum var duboisii, Paracoccidioides brasiliensis, Penicillium marneffei.* Sono anche considerati endemici perché il loro habitat naturale è delimitato a specifiche aree geografiche e l'infezione è dovuta all'inalazione di spore da uno specifico ambiente e area geografica. La diagnosi di tali infezioni endemiche può essere indaginosa, perché l'infezione può rendersi manifesta dopo che il paziente ha lasciato l'area endemica oppure l'infezione, dopo un periodo di quiescenza si può riattivare, quando il paziente diventa immunocompromesso in un'area non endemica.

La Tabella 14 evidenzia alcuni aspetti morfologici, istopatologici e di diagnostica sierologica delle principali micosi endemiche.

Tabella 14. Diagnosi di micosi endemiche dimorfiche

Micosi	Coltura	Morfologia in coltura				Istopatologia	Sierologia
		25 °C		37 °C			
Blastomicosi	Sputo, BAL, tessuto polmonare, biopsia della cute	Muffa con conidi rotondi, ovali o a forma di pera (2-10 µ di diametro)		Gemmazione conidiale unica a larga base con conidi a parete spessa (8-15 µ)		Gemmazione conidiale unica a larga base con conidi	Anticorpo: CF, ID, EIA (poca sensibilità e specificità) Antigene: urine (rendimento non definito)
Coccidioido micosi	Sputo, BAL, tessuto	Muffa con artroconidi a forma di barilotti (3-6 µ)		Non applicabile		Sferule (20-60 µ) contenenti endospore	Anticorpi: P, CF, ID, LP (valore diagnostico e prognostico)
Istoplasmosi	Sputo, BAL, sangue, midollo osseo, tessuto	Muffa con macroconidi tubercolati (8-15 µ) e microconidi piccoli, ovali (2-4 µ)		Piccoli lieviti gemmanti (2-4 µ)		Lieviti gemmanti Intracellulari	Anticorpi: CF, ID Antigeni: siero e urine (92% di sensibilità nella istoplasmosi disseminata)
Paracoccidio idomicosi	Sputo, BAL, tessuto	Muffa con microconidi rotondi (2-3 µ) e clamidospore intercalari		Grandi lieviti con gemmazione multipla (15-30 µ)		Grandi lieviti con gemmazione multipla	Anticorpi: ID, CF (specificità variabile, CF utile per monitorare la risposta ai farmaci)
Penicilliosi *Penicillium marneffei*	Sangue, midollo osseo, tessuto	Muffa con pigmento rosso diffusibile; conidiofori che portano all'estremità conidi ellissoidali lisci		Lieviti pleomorfici allungati con setti traversi (1- 8 µ)		Lieviti intracellulari pleomorfici, allungati con setti trasversi	In via di sviluppo

BAL, lavaggio broncoalveolare; CF, fissazione del complemento; EIA, saggio immunoenzimatico; ID, immunodiffusione; LP, agglutinazione con particelle latex; P, precipitazione.
Adattato da: Perea S, Patterson TF. Endemic mycoses. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (Ed.). *Clinical Mycology*. New York: Churchill Livings; 2003

MICOSI OPPORTUNISTICHE

I principali agenti di micosi opportunistiche sono elencati in Tabella 15 mentre le caratteristiche di detti agenti e della loro identificazione in campioni clinici sono schematizzati nelle Tabelle 16 e 17. Sono causate da agenti fungini molto studiati e di grande interesse sanitario, come dimostrato dal fatto che il genoma di *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus* è stato integralmente sequenziato.

Tabella 15. Principali agenti eziologici di micosi opportunistiche

Agente fungino	Specie
***Candida* spp.**	*C. albicans* *C. glabrata* *C. parapsilosis* *C. tropicalis* *C. krusei* *C. lusitaniae* *C. guilliermondii* *C. dubliniensis* *C. rugosa*
***Cryptococcus* spp. e altri lieviti opportunisti**	*Cryptococcus neoformans* *Malassezia* spp. *Trichosporon* spp. *Rhodotorula* spp. *Geotrichum capitatum*
***Aspergillus* spp.**	*A. fumigatus* *A. flavus* *A. niger* *A. versicolor* *A. terreus*
Zygomycetes	*Rhizopus* spp. *Mucor* spp. *Rhizomucor* spp. *Absidia* spp. *Cunninghamella* spp.
Altre muffe ialine	*Fusarium* spp. *Acremonium* spp. *Scedosporium* spp. *Paecilomyces* spp. *Trichoderma* spp. *Scopulariopsis* spp.
Muffe dematiacee	*Alternaria* spp. *Bipolaris* spp. *Cladophialophora* spp. *Curvularia* spp. *Exophiala* spp. *Exserohilum* spp. *Wangiella* spp.
***Pneumocystis* spp.**	*Pneumocystis jiroveci*

Tabella 16. Caratteristiche dei principali funghi patogeni opportunisti rilevanti in Italia, presenti in campioni clinici e colture

Fungo	Morfologia microscopica in campioni clinici	Morfologia in coltura		Test aggiuntivi per identificazione
		Macroscopica	Microscopica	
Candida spp.	Lieviti gemmanti ovali, 2-6 µ in diametro, ife e pseudoife possono essere presenti	Morfologia variabile. Colonie pastose da bianche a color bronzo, opache, lisce o rugose	Blastoconidi pseudoife e clamidospore terminali in alcune specie	Formazione del tubo germinativo in *Candida albicans, C. stellatoidea, C. dubliniensis.* Assimilazione dei carboidrati, morfologia su *corn meal agar*
Cryptococcus neoformans	Lieviti sferici gemmanti di dimensioni variabili (2-15 µ). La capsula può essere presente, assenza di ife e pseudoife	Le colonie sono lucide, mucose, a cupola, color crema e color bronzo	Cellule sferiche di varie dimensioni con capsula presente; assenza di pseudoife; le cellule possono avere gemme multiple con base stretta.	Test per ureasi(+), fenolossidasi(+), nitrato riduttasi(–). Agglutinazione latex o EIA test per l'antigene polisaccaridico. Coloranti al mucicarminio e melanina per tessuti
Aspergillus spp.	Ife settate ramificate dicotomicamente di grandezza uniforme (3-6 µ)	Varia con la specie: *A.fumigatus*: blu-verde grigio, *A.flavus:* giallo-verde, *A.niger:* nero	Varia con la specie; conidiofori con vescicole con metule a fiasco o fialidi; le ife sono ialine e settate	Identificazione basata sulle caratteristiche morfologiche microscopiche e colturali
Zygomycetes	Ife con pochi setti, pareti sottili (6-25 µ), lati non paralleli con ramificazioni random; le ife si colorano poco con GMS, meglio con EE	Colonie con crescita rapida, lanuginose, grigio-marroni, grigio nere	Ife larghe nastriformi con pochi setti; sporangio o *sporangiola* prodotto da sporangioforo; rizoidi presenti in alcune specie	Identificazione basata sulle caratteristiche morfologiche microscopiche
Pneumocystis jiroveci (*carinii)*	Le cisti sono rotonde, collassate oblunghe. Le forme trofiche sono evidenziate con colorazioni speciali	Non applicabile	Non applicabile	Le cisti sono rotonde, collassate o a forma oblunga. Le forme trofiche sono evidenziate con colorazioni speciali

EIA = saggio immunoenzimatico, GMS= *Gomori metenamina silver*, EE= ematossilina eosina

Tabella 17. Caratteristiche degli agenti di micosi esotiche, assenti in Italia, in campioni clinici e colture

Fungo	Morfologia microscopica in campioni clinici	Morfologia in coltura		Test aggiuntivi per identificazione
		Macroscopica	Microscopica	
Histoplasma capsulatum	Lieviti piccoli (2-4µ) gemmanti all'interno di macrofagi	Le colonie hanno crescita lenta e sono bianco-marroncine (25 °C). Le colonie in fase lievito (37 °C) sono lisce, bianche e pastose	Ife sottili settate che producono macroconidi tubercolati e microconidi a parete liscia (25 °C). Piccoli lieviti gemmanti ovali: si formano a 37 °C	Dimostrazione del dimorfismo in base alla temperatura con conversione da muffa a lievito a 37 °C. Identificazione dell'antigene secreto e test di biologia molecolare permettono l'identificazione senza la conversione di fase
Blastomyces dermatitidis	Lieviti grandi (8-15 µ), gemmanti con base larga con parete spessa	Le colonie variano da membranose, lievito simile, a cotonose bianche, muffa simile, a 25 °C. Quando crescono a 37 °C le colonie in fase lievito sono rugose con pieghe e lisce	Le ife sono ialine settate con conidi lisci unicellulari (25 °C). Grandi lieviti gemmanti con parete spessa a 37 °C	Dimostrazione del dimorfismo in base alla temperatura. Identificazione dell'antigene secreto e test di biologia molecolare
Coccidioides immitis	Sferule sferiche a parete spessa (20-200µ). Le sferule mature contengono piccole endospore (2-5µ)	Le colonie inizialmente appaiono umide e glabre e rapidamente diventano sul grigio biancastro o color bronzo	Ife ialine con artroconidi rettangolari	Identificazione dell'antigene secreto e test di biologia molecolare
Sporothrix schenckii	Cellule lievito di varie dimensioni. Molte possono apparire allungate o a forma di sigaro. La reazione tissutale forma corpi asteroidi	Le colonie sono inizialmente lievito simile lisce e umide, poi diventano vellutate con la formazione di ife a 25 °C. Le colonie diventano pastose da color bronzo a marrone a 37 °C	Ife sottili, ramificate settate. I conidi originano sotto forma di grappoli a rosetta alla fine del conidioforo (25 °C). Lieviti gemmanti di grandezza variabile vengono prodotti a 37 °C	Dimostrazione del dimorfismo in base alla temperatura. Identificazione dell'antigene secreto e test di biologia molecolare
Penicillium marneffei	Cellule lievito intracellulari settate	Le colonie producono un pigmento rosso diffusibile a 25 °C	Le ife sono settate con metule, fialidi con catene di conidi distribuiti a forma di pennello (25 °C). Lieviti gemmanti di varie dimensioni vengono prodotti a 37 °C	Dimostrazione del dimorfismo in base alla variazione di temperatura (25-37 °C).

EIA = saggio immunoenzimatico, GMS= *Gomori metenamina silver*, EE= ematossilina eosina

Candidosi

Il gruppo più importante dei patogeni fungini opportunisti è costituito da specie del genere *Candida*. Quest'ultime costituiscono la quarta causa di infezioni setticemiche nosocomiali dopo i patogeni Gram negativi e *Staphylococcus* spp. Sebbene più di 100 specie di *Candida* siano state descritte, solo poche specie sono implicate in infezioni cliniche. *C. albicans* è la specie più comune isolata da materiali clinici (90-100% dalle mucose; 50-70% dal sangue). Approssimativamente il 95% di tutte le sepsi nosocomiali da *Candida* sono dovute principalmente a quattro specie: *C. albicans*, *C. glabrata, C. parapsilosis e C. tropicalis*. Tra queste specie solo *C. glabrata* si può chiamare un reale patogeno emergente come responsabile di setticemie, questo a causa della sua resistenza intrinseca ed acquisita agli azoli ed altri antifungini. Il rimanente 5% comprende 12-14 differenti specie tra cui *C. krusei, C. lusitaniae, C. dubliniensis* e *C. rugosa* con resistenza innata o acquisita a una o più sostanze antifungine.

- *Morfologia*
  Tutte le specie *Candida* esistono in forma lievito (3-5 micron) con produzione di blastoconidi o gemme. Tutte le specie ad eccezione di *C. glabrata* producono pseudoife e vere ife; *C. albicans* forma tubi germinativi e clamidoconidi, spore terminali con parete spessa (Figura 10). Nelle sezioni istologiche tutte le *Candida* spp. si colorano poco con EE e bene con PAS, GMS e Gridley.
  In coltura la maggior parte delle *Candida* spp. formano colonie lisce, bianche, cremose, con piccola cupola. *C. albicans* e altre specie possono subire un cambiamento fenotipico reversibile in differenti morfotipi dalla colonia liscia, cremosa costituita da cellule lievito gemmanti, alla colonia lanuginosa, cotonosa costituita principalmente da pseudoife e ife, probabilmente in risposta a segnali dell'ambiente. È stato postulato che il cambiamento fenotipico possa essere una capacità della *C. albicans* per sopravvivere alle varie modificazioni dei vari habitat all'interno dell'ospite. È importante sapere che è necessario identificare la specie di *Candida* nella pratica clinica, in quanto il trattamento antimicotico e la farmaco resistenza varia con la specie.

- *Epidemiologia*
  Candida spp. colonizza gli uomini e altri mammiferi ed è ampiamente diffusa in tutto il mondo. Il sito primario di colonizzazione è il tratto gastrointestinale, dalla bocca al retto. Si trova come commensale in vagina (in circa il 50% di tutte le donne in età fertile), nell'uretra, sulla pelle, sotto le unghie. *C. albicans* è il più comune agente eziologico di micosi nell'uomo ed è stato trovato anche nell'aria, nell'acqua, nel suolo, oltre che in quasi tutti gli animali indagati, compresi i pesci. Si stima che il 25-50% dei soggetti sani siano portatori di *Candida* come flora normale della bocca, con 80-90% di isolamento di *C. albicans*. Le percentuali di colonizzazione salgono nei bambini, pazienti ospedalizzati, quelli con infezione HIV, con protesi dentarie, sottoposti a chemioterapia, ed antibioticoterapia. Virtualmente, tutti siamo portatori di *Candida* e possiamo contrarre malattia, qualora il nostro sistema immunitario risulti compromesso, come chiaramente dimostrato dalla elevatissima frequenza delle candidosi orali nel soggetto HIV+ con meno di 100 linfociti CD4+. La fonte di infezione predominante è il paziente stesso (candidosi endogena), quando la normale flora commensale dell'ospite approfitta della opportunità di provocare infezione; la trasmissione esogena (candidosi esogena) può anche avvenire con l'uso di soluzioni irriganti contaminate, liquidi parenterali nutritivi, valvole e cateteri a permanenza, valvole cardiache, cornee. La trasmissione di *Candida* dagli operatori sanitari ai pazienti e, da paziente a paziente, è ben documentata specialmente nelle unità di terapia intensiva. Le mani degli operatori costituiscono un potenziale veicolo di infezione per la trasmissione nosocomiale di *Candida* spp. *C. albicans* predomina nei vari

tipi di infezione (genitale, cutanea, orale). La frequenza di isolamento di *C. albicans* e di altre specie di *Candida* dal sangue varia in base all'età del paziente e alla zona geografica. Premesso che *C.albicans* è sempre la specie più frequentemente isolata da campioni clinici, altre specie sono frequenti nei bambini e neonati (es. *C. parapsilosis)* e *C. glabrata* è frequente negli adulti. In America Latina predominano anche *C. parapsilosis e C. tropicalis.* La maggiore diffusione di terapie a base di antibiotici a largo spettro ed immunosoppressori, il mantenimento in vita di malati molto debilitati, le particolari condizioni di lavoro (prolungato contatto con acqua o detergenti) e gli interventi chirurgici particolarmente invasivi con uso di cateteri a permanenza, la terapia intensiva possono indurre la maggiore diffusione dell'opportunismo delle varie specie di *Candida*. Le conseguenze della candidemia in pazienti ospedalizzati sono gravi, infatti sono due volte più a rischio di morte rispetto ai pazienti setticemici con altra eziologia. Pazienti leucemici o neutropenici, quelli sottoposti a chirurgia gastrointestinale, bambini prematuri, anziani con età maggiore di 70 anni sono 2 volte a rischio di candidemia, 7 volte se hanno un catetere centrale venoso, 10 volte se sono colonizzati da *Candida* in altri siti anatomici, 18 volte se sono in emodialisi acuta.

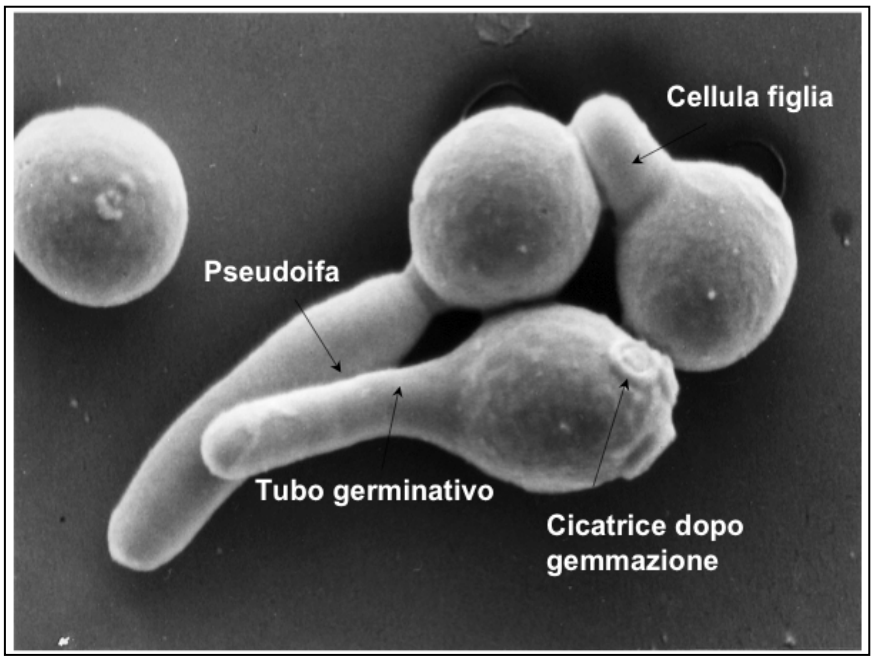


Figura 10. Cellule di *Candida albicans* osservate al microscopio elettronico a scansione; ingrandimento 15.000 x (per gentile concessione di Annarita Stringaro, Dip. Tecnologie e Salute, ISS)

– *Aspetti clinici*

Candida spp. possono provocare l'infezione di ogni organo e sistema, determinando candidosi cutanea e superficiale fino a candidosi profonde disseminate coinvolgendo organi come fegato, reni, milza, cuore, cervello (in tali casi con mortalità fino al 50%). Le infezioni mucosali possono essere limitate all'orofaringe o estendersi all'esofago e all'intero tratto gastrointestinale (soprattutto nel soggetto AIDS). Nelle donne la mucosa vaginale è un sito comune di infezione. In genere queste infezioni sono presenti

in persone con immunodepressione generalizzata o locale o in situazioni in cui la crescita di *Candida* spp. è favorita. Almeno il 75% di tutte le donne è colpita almeno una volta nella vita da candidosi vaginale, e di queste, dal 5 al 7% acquisterà una forma di candidosi cronica che durerà per tutta la fase di fertilità. Il ruolo degli estrogeni in questa patologia è ben documentato nella letteratura (13)

- *Diagnosi di laboratorio*
  La diagnosi di laboratorio comprende una raccolta appropriata del materiale clinico seguita da un esame microscopico diretto e colturale (vedi paragrafo diagnosi). Le squame delle lesioni cutanee e mucosali sono esaminate direttamente con 10%- 20% di idrossido di potassio con *Calcofluor white*. Le forme lievito gemmanti e le pseudoife sono facilmente visibili con il microscopio a fluorescenza. L'esame colturale permetterà l'isolamento e l'identificazione della specie. Inoltre i campioni possono essere coltivati direttamente su terreni cromogeni selettivi, come CHROMagar che permettono la distinzione delle varie specie di *Candida* in un singolo materiale clinico e quindi la rapida identificazione in base al colore presentato dalle colonie (verdi per *C. albicans*, blu per *C. tropicalis,* ecc.). L'esame colturale è indispensabile per la diagnosi ed è necessario anche per materiali clinici come sangue, tessuti e altri liquidi organici normalmente sterili. Quando è possibile, è importante avere biopsie tissutali e eseguire colorazioni specifiche per evidenziare cellule gemmanti e pseudoife per confermare la diagnosi. L'identificazione delle specie è anche importante a causa delle differenze riscontrate nella sensibilità agli antifungini. Per la diagnosi di candidosi sono necessari esami morfologici (test per la formazione del tubo germinativo e la produzione di clamidospore, fondamentali per identificare *C. albicans*), biochimici, immunologici, molecolari.

- *Trattamento*
  Le infezioni mucosali e cutanee possono essere trattate con creme, lozioni, unguenti contenenti vari agenti azolici da usare a livello topico e/o terapia sistemica orale con fluconazolo o itraconazolo. La colonizzazione della vescica o la cistite viene trattata con instillazione di amfotericina B o terapia orale a base di fluconazolo, ma è sempre necessario rimuovere un eventuale catetere per evitare insuccessi terapeutici. Le infezioni profonde sistemiche richiedono terapie sistemiche in base al tipo di infezione, alla specie infettante, allo stato dell'ospite. Il fluconazolo è abbastanza efficace quando è somministrato per via endovenosa in pazienti non neutropenici con candidemia. I pazienti con *C. krusei* o con *C. glabrata* resistenti al fluconazolo richiedono trattamento con amfotericina B o caspofungina. Tutti i cateteri e altre protesi potenzialmente infetti dovrebbero essere rimossi, gli ascessi dovrebbero essere drenati e il sistema immunitario dell'ospite dovrebbe essere potenziato. Come in molte malattie infettive la prevenzione è chiaramente preferibile alla terapia. Bisognerebbe evitare l'uso prolungato ed inappropriato di antibiotici a largo spettro, avere opportune accortezze e precauzioni per il controllo delle infezioni e nell'uso di cateteri. La profilassi con fluconazolo in pazienti ad alto rischio di infezione, come i trapiantati, può portare alla selezione di ceppi o di specie resistenti all'antifungino somministrato. Si sta molto espandendo l'uso dei derivati delle echinocandine nei pazienti con candidosi invasiva. Purtroppo non sono ancora disponibili vaccini, ma la ricerca è molto attiva in quest'area. Per le infezioni da *Candida* e fattori predisponenti vedi Tabella 7.

Criptococcosi

Infezione sistemica causata un lievito basidiomicete capsulato *C. neoformans*, fungo ubiquitario saprofita del suolo contaminato con escrementi aviari. Esistono cinque sierotipi A, B, C, D e AD e due varietà, *C. neoformans* var *neoformans* (sierotipi A, B e AD) e *C. neoformans* var *gatti* (sierotipi B e C). Il suo anamorfo sessuato è stato identificato come *Filobasidiella neoformans.*

- *Morfologia*
  Lievito capsulato (2-20 µ come diametro), si riproduce per gemmazione e a volte sono presenti catene di cellule gemmanti. Sono assenti tubi germinativi, ife e pseudoife nel materiale clinico. La capsula polisaccaridica è un carattere distintivo che può essere evidenziato con inchiostro di china o con il colorante mucicarminio di Mayer. Le cellule sono messe in evidenza con PAS e GMS. La parete cellulare contiene melanina che può essere dimostrata con colorazione Fontana Masson.
- *Epidemiologia*
  La malattia si contrae nell'ambiente attraverso aerosol di cellule di *C. neoformans*. In seguito si ha disseminazione dai polmoni nel sistema nervoso centrale, con malattia conclamata negli individui sensibili. La criptococcosi cutanea primaria è possibile attraverso inoculazione transcutanea, ma è rara. In genere è un patogeno opportunista in pazienti con immunità compromessa (meningite).
  C. neoformans var *neoformans* si trova ovunque nel suolo soprattutto in presenza di contaminazioni fecali aviarie, in particolare nelle feci di piccioni, *C. neoformans* var *gattii* si riscontra nei climi tropicali e subtropicali in associazione con gli alberi di eucaliptus. Entrambe provocano lo stesso tipo do malattia, ma le infezioni *C.* var *gattii* hanno una mortalità meno elevata e più sequele neurologiche, a causa della formazione di granulomi nel sistema nervoso centrale. *C. neoformans* var *neoformans* è il patogeno opportunista più diffuso nei pazienti con AIDS. L'incidenza della criptococcosi negli Stati Uniti sembra decrescere dagli anni 1990 per l'uso diffuso del fluconazolo e di nuovi farmaci antiretrovirali nell'infezione HIV.
- *Aspetti clinici*
  La criptococcosi si presenta come polmonite ed in seguito a diffusione ematica e linfatica, determina un'infezione secondaria del SNC (meningo-encefalite criptococcica). Si possono avere altre manifestazioni a livello cutaneo, mucocutaneo, viscerale, osseo. La polmonite criptococcica può assumere varie manifestazioni da asintomatica a fulminante. In genere esiste un forte neurotropismo con coinvolgimento del tessuto nervoso e delle meningi. Il corso della malattia è variabile, ma se non è trattata risulta fatale. In ogni caso il quadro clinico dipende dallo stato immunitario del paziente e diventa particolarmente grave in pazienti con AIDS o trattati con steroidi o altri agenti immunosoppressori. Le lesioni parenchimali (criptococcomi) non sono comuni in infezioni causate da *C. neoformans* var *neoformans*, sono più comuni in infezioni provocate da *C. neoformans* var *gattii* in pazienti immunocompetenti. Le altre manifestazioni cliniche di criptococcosi disseminata riguardano lesioni della pelle, infezioni oculari (corioretinite, vitreite, nevrite oculare con invasione del nervo ottico), lesioni ossee, coinvolgimento prostatico, che può costituire una riserva asintomatica di reinfezione.
- *Diagnosi di laboratorio*
  La diagnosi si effettua tramite coltura di sangue, fluido cerebro spinale (FCS) e altro materiale clinico. L'esame microscopico diretto del FCS permette la rilevazione delle cellule capsulate tramite colorazione di Gram o inchiostro di china. L'esame colturale del

materiale clinico in terreni micologici di routine mette in evidenza entro 3-5 giorni, colonie mucose costituite da cellule lievito gemmanti, capsulate, ureasi positive. L'identificazione delle specie richiede l'assimilazione dei carboidrati e la crescita su *niger seed agar* (colonie marroni-nere di *C. neoformans*) o il test diretto dell'attività fenolo-ossidasi (positivo). La diagnosi di meningite criptococcica è effettuata tramite rilevazione dell'antigene capsulare polisaccaridico (glucurono-xilo-mannano) nel siero o nel liquor con saggi rapidi, sensibili e specifici (saggi ELISA immunoenzimatici, agglutinazione con lattice).

– *Trattamento*
  La criptococcosi ha esito fatale, senza terapia. Si dovrebbe somministrare amfotericina B con fluorocitosina per due settimane (induzione) seguita da otto settimane di fluconazolo o itraconazolo per via orale (consolidamento). I pazienti possono continuare la terapia anche per un anno e devono essere sempre seguiti a livello clinico e micologico tramite punture lombari, prelievo di FCS e coltura. Il fallimento della terapia di sterilizzazione del FCS al 14° giorno è indicativo di una probabile terapia di consolidamento inefficace.

Micosi causata da altri lieviti

Sono rare infezioni nosocomiali causate da lieviti opportunisti come *Malassezia* spp., *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp., *Geotrichum capitatum* che talvolta possono creare problemi a causa di resistenza a farmaci antifungini.

Aspergillosi

Comprende un ampio spettro di malattie, di carattere tipicamente opportunistico, causate da microrganismi fungini filamentosi del genere *Aspergillus*. L'esposizione a tale microrganismo nell'ambiente può determinare reazioni allergiche in individui ipersensibili, polmonite invasiva distruttiva, malattia diffusa in individui immunosoppressi. Esistono 19 specie di *Aspergillus* causa di micosi umana, ma la maggior parte delle infezioni è provocata da *A. fumigatus, A. flavus, A. niger, A. terreus.* L'aspergillosi è particolarmente frequente e letale nei trapiantati di midollo osseo per la cure di leucemie e linfomi.

– *Morfologia*
  Il genere *Aspergillus* cresce come muffa ialina e comprende oltre un centinaio di specie, raccolte in 15 gruppi. Tali specie rappresentano i più comuni contaminanti delle colture microbiologiche. Le caratteristiche colturali macroscopiche, come modalità di sviluppo delle colonie, il colore, la morfologia, possono dare delle indicazioni per la diagnosi, ma l'identificazione definitiva richiede l'esame microscopico delle ife e della testa conidiale. Gli aspergilli crescono con ife settate, ramificate, con teste conidiali costituite da un conidioforo con una vescicola terminale su cui si ergono uno o due strati di fialidi che a loro volta producono colonne di conidi sferici, da cui poi si svilupperà la fase miceliale del fungo. L'identificazione delle specie dipende in parte dalla morfologia delle teste conidiali e dalla disposizione e forma dei conidi. Nei tessuti le ife si colorano bene con PAS, GMS e colorazione di Gridley. Le ife delle specie patogene di *Aspergillus* sono morfologicamente indistinguibili l'uno dall'altro.

– *Epidemiologia*
  Aspergillus spp. sono ubiquitari nell'aria, nel terreno, nel materiale vegetale organico in disfacimento. Quindi possono essere facilmente inalati e dare vari tipi di patologie

opportuniste, soprattutto in base alla reazione dell'ospite, più che ai loro fattori di virulenza.

- *Aspetti clinici*
  L'aspergillosi si presenta in due principali forme cliniche: l'aspergilloma, una malattia cronica, granulomatosa localizzata principalmente a livello polmonare, e l'aspergillosi invasiva, una malattia in cui vari organi corporei, in particolare fegato, rene e cervello, sono colpiti contemporaneamente. Questa è la forma più grave e maggiormente letale (fino all'80% dei casi). Esiste anche una diffusa forma di aspergillosi allergica.
- *Diagnosi di laboratorio*
  È necessaria molta cautela nella valutazione diagnostica di infezione da *Aspergillus* in un campione clinico, a causa dell'ubiquitarietà della specie fungina. La presenza fungina in biopsie o siti sterili accompagnati da istopatologia positiva dovrebbe essere considerata significativa. L'isolamento da siti normalmente contaminati, come la mucosa respiratoria, dovrebbe essere considerato con cautela. Le specie fungine di *Aspergillus* crescono bene sui terreni micologici di routine senza cicloeximide (*potato dextrose agar*). Per una identificazione di specie sarebbe meglio allestire una coltura su vetrino per l'osservazione microscopica a livello morfologico. *A. terreus* può causare vera aspergillemia, mentre in altri casi si tratta di pseudofungemia o di contaminazione in seguito ad autopsia. Una diagnosi rapida per l'aspergillosi invasiva si è ottenuta con lo sviluppo di saggi immunoenzimatici per la ricerca di antigene galattomannano nel siero.
- *Trattamento*
  La prevenzione di aspergillosi in pazienti ad alto rischio è prioritaria. Tali pazienti infatti devono soggiornare in locali con aria preventivamente filtrata per limitare la contaminazione ambientale con conidi di *Aspergillus* spp. Il controllo ambientale dei conidi di *Aspergillus* si è rivelato comunque molto difficile. Il trattamento elettivo è l'amfotericina B o la formulazione lipidica, ma *A. terreus* è resistente a quest'ultimo farmaco per cui dovrebbe essere trattato con voriconazolo che presenta anche meno tossicità. È importante ricostituire le difese immunitarie dell'ospite e quando è possibile rimuovere chirurgicamente la zona infetta (nel caso dell'aspergilloma).

Zigomicosi

È causata da funghi che appartengono alla classe degli Zygomycetes che si dividono in due ordini *Mucorales* e *Entomophthorales*. L'ordine *Entomophthorales* contiene due generi patogeni *Conidiobolus e Basidiobolus.* Questi in genere determinano un'infezione cronica, granulomatosa dei tessuti sottocutanei. L'ordine *Mucorales* contiene generi patogeni come *Rhizopus, Mucor, Absidia, Rhizomucor, Saksenaea, Cunninghamella, Syncephalastrum* e *Apophysomyces.* Le infezioni sono rare, ma purtroppo, quando presenti, sono generalmente acute e rapidamente progressive con una mortalità dal 70% al 100%.

- *Morfologia*
  I funghi *Mucorales* patogeni crescono rapidamente producendo colonie grigie, marroni, lanuginose entro 12-18 ore, ma l'identificazione del genere e della specie si basa sulla morfologia microscopica. Microscopicamente gli Zygomycetes sono muffe con ife ialine, grandi, cenocitiche, settate sporadicamente. Le spore asessuali dell'ordine *Mucorales* sono contenute all'interno di uno sporangio e sono chiamate sporangiospore. Gli sporangi si formano in cima a sporangiofori che terminano con un rigonfiamento chiamato columella. La presenza di strutture simili a radici chiamate rizoidi è utile

nell'identificazione di generi all'interno dell'ordine *Mucorales*. Nei tessuti gli Zygomycetes, ordine *Mucorales,* sono visualizzati come ife asettate o raramente settate (spesso>10μ) non pigmentate, nastriformi, pleomorfiche. Le pareti delle ife sono sottili e si colorano debolmente con GMS e altri coloranti, sono evidenziate meglio con EE. Gli Zygomycetes sono tipicamente angioinvasivi.

- *Epidemiologia*
  La zigomicosi è una malattia sporadica ma ubiquitaria. *Rhizopus arrhizus* è l'agente eziologico più comune della zigomicosi umana. Tuttavia altre specie di *Rhizopus, Rhizomucor, Absidia* e *Cunninghamella* sono responsabili di micosi in pazienti ospedalieri, in particolare in soggetti sottoposti a trapianto di cellule staminali. Gli organismi sono ubiquitari nel suolo e nel materiale organico in disfacimento. L'infezione avviene per inalazione, ingestione o contaminazione delle ferite con sporangiospore presenti nell'ambiente. Si può avere contaminazione nosocomiale tramite i sistemi di condizionamento. Episodi di zigomicosi primaria cutanea si possono avere con l'uso di bendaggi contaminati per le ferite chirurgiche. La zigomicosi invasiva può essere diagnosticata in pazienti immunocompromessi ed è simile clinicamente all'aspergillosi. Può causare infezione dall'1% al 9% dei trapiantati specialmente in pazienti con diabete mellito. Fattori predisponenti includono corticosteroidi, terapia con desferamina, chetoacidosi diabetica, danno renale, emopatie maligne, mielosoppressione ed esposizione alle polveri durante i lavori di ristrutturazioni ospedaliere.
- *Aspetti clinici*
  Ci sono diverse forme cliniche di zigomicosi causate da *Mucorales.* La zigomicosi rinocerebrale è un'infezione acuta invasiva della cavità nasale, dei seni paranasali, delle orbite oculari e altre strutture facciali, coinvolgente anche il SNC, le meningi e il cervello. Molte di queste infezioni riguardano pazienti con chetoacidosi diabetica e con leucemie. La zigomicosi polmonare, infezione primaria in pazienti neutropenici, può essere confusa con l'aspergillosi invasiva. Le lesioni polmonari sono infarcite di ife, con trombosi dei grandi vasi polmonari. L'esame radiografico del torace rivela una progressiva broncopolmonite o cavitazione e consolidamento dei lobi polmonari. Possono essere presenti forme sferiche simili all'aspergilloma. Si può avere emorragia polmonare con emottisi fatale, in seguito alla invasione vascolare del fungo. Questa tendenza angioinvasiva determina infezioni disseminate in tutti gli organi. La zigomicosi cutanea può essere un segno di disseminazione ematogena, con lesioni che tendono ad essere nodulari con ecchimosi. La zigomicosi primaria cutanea può esserci in seguito a traumi, ferite chirurgiche, ustioni e l'infezione può essere superficiale o estendersi rapidamente ai tessuti sottocutanei.
- *Diagnosi di laboratorio*
  È importante la dimostrazione degli elementi fungini caratteristici nei tessuti oltre che nell'esame colturale, vista l'ubiquitarietà di tale gruppo fungino.Vengono prelevati appropriati campioni dalla mucosa nasale (raschiamento), seni nasali (aspirato), alveoli bronchiali (liquido di lavaggio) e biopsie di tutti i tessuti necrotici ed infetti. L'esame diretto in KOH con *Calcofluor white* può mettere in evidenza le larghe ife asettate. Le colorazioni più utili risultano EE e PAS. I tessuti vanno triturati, omogenati e coltivati su terreni micologici standard, senza cicloeximide. Le colture risultano spesso negative anche se l'esame istologico risulta positivo, per cui la diagnosi viene stabilita in base a diversi parametri clinici e microbiologici. Non esistono test specifici molecolari o sierologici per gli Zygomycetes.

– *Trattamento*
L'amfotericina B rappresenta il primo intervento terapeutico necessario, spesso supportato da rimozione chirurgica del tessuto infetto, quando possibile e da riattivazione del sistema immune. Il posaconazolo ha mostrato documentata efficacia in un modello murino di zigomicosi. Il voriconazolo, altri azoli ed echinocandine risultano inefficaci.

Pneumocistosi

Pneumocystis jiroveci è un patogeno opportunista che si riscontra più frequentemente nei pazienti con infezione AIDS, anche se recentemente l'incidenza è diminuita con l'uso della terapia antiretrovirale altamente attiva (HAART). Veniva prima chiamato *Pneumocystis carinii,* ma questa è la specie del ratto, non dell'uomo. Il ciclo vitale comprende sia una fase sessuale che una fase asessuale. Durante l'infezione umana *Pneumocystis jiroveci* può esistere in forme trofiche o come sporocisti uninucleate o come cisti contenente otto corpi intracistici ovoidi o fusiformi. Dopo la rottura delle cisti si possono osservare le pareti cistiche collassate e vuote. (Figura 11)

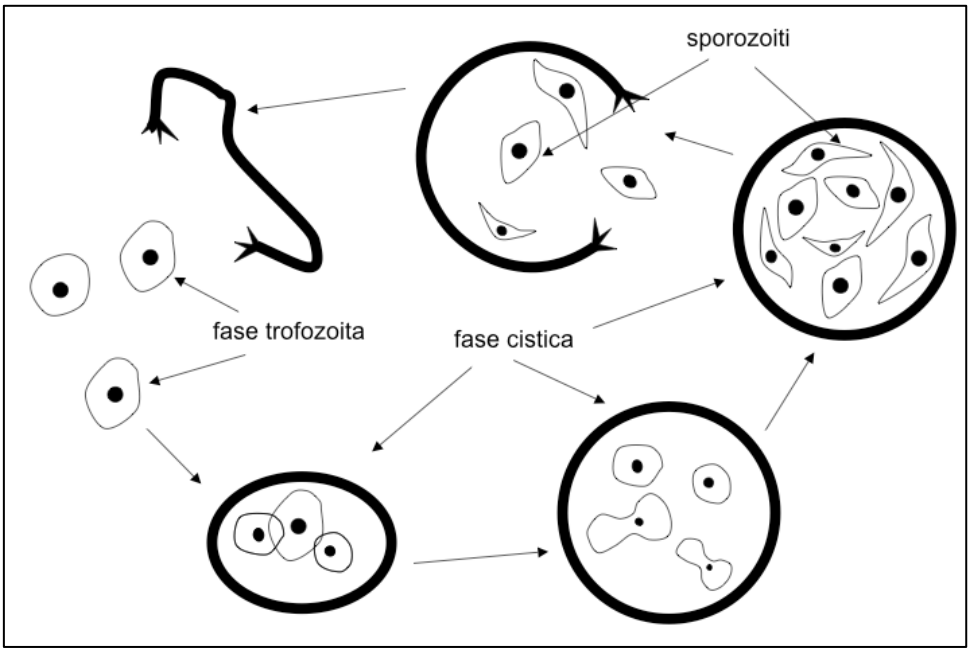


Figura 11. Archiascomycetes: ciclo vitale di *Pneumocystis carinii*

Non si conosce la sua nicchia ecologica in natura, sebbene sia stato dimostrato sperimentalmente la trasmissione via aerosol tra i roditori che geneticamente non possono costituire una riserva zoonotica per l'uomo. La pneumocistosi è una forma di polmonite, anche se esistono forme extrapolmonari tra i pazienti di AIDS. Sono possibili anche delle riattivazioni di vecchie infezioni quiescenti. I pazienti debilitati, malnutriti, immunodepressi e specialmente i pazienti AIDS, con basso numero di linfociti CD4, sono ad alto rischio di infezione. Il decorso della polmonite interstiziale è insidioso con dispnea, cianosi, tachipnea, tosse non produttiva e febbre. La percentuale di mortalità è alta nei pazienti non trattati e la morte è dovuta ad

insufficienza respiratoria. La diagnosi è quasi interamente basata sull'esame microscopico dei campioni clinici che comprendono il liquido di lavaggio bronchiale alveolare, escreato, biopsia polmonare a cielo aperto o transbronchiale. L'esame del liquido di lavaggio bronchiale ha mostrato una sensibilità dal 90 al 100%. L'esame microscopico dell'escreato può essere utile in pazienti AIDS con un numero elevato di microrganismi (percentuale 20-25% di falsi negativi). GMS, Giemsa, PAS, blu toluidina, calcofluor, immunofluorescenza sono usati nell'esame istologico e citologico. Per la profilassi e per il trattamento si usa il trimetoprim-sulfametossazolo come standard. La pentamidina solfato è un'alternativa nelle forme resistenti al trimetoprim-sulfametossazolo.

Micosi opportunistiche causate da muffe ialine non pigmentate (ialoifomicosi) e da funghi pigmentati o dematiacei (feifomicosi): brevi cenni

Le muffe ialine non pigmentate (ialoifomicosi) sono costituite da agenti fungini filamentosi diversi tassonomicamente, che possono essere indistinguibili dall'*Aspergillus.* Muffe ialine importanti, anche se rare, sono *Fusarium* spp.*, Scedosporium* spp., *Acremonium* spp., *Paecilomyces* spp.*, Trichoderma* spp., *Scopulariopsis* spp., in quanto possono provocare infezioni disseminate, quasi sempre fatali in pazienti neutropenici. *Fusarium* spp. provoca infezione disseminata con maggiore frequenza in pazienti immunocompromessi. La specie più comune isolata dai campioni clinici è *Fusarium moniliforme, Fusarium solani e Fusarium oxysporum*. La caratteristica della fusariosi disseminata è la comparsa di noduli cutanei purpurei con necrosi centrale. Le colture del materiale bioptico e del sangue sono utili per diagnosticare la fusariosi, in quanto approssimativamente il 75% dei pazienti con tale infezione presenta emocolture positive, a differenza dell'aspergillosi. Microscopicamente il *Fusarium* è caratterizzato dalla produzione di macroconidi e microconidi. I microconidi sono costituiti da una o due cellule ovoidali o cilindriche, i macroconidi sono fusiformi con molte cellule. Questo microrganismo è spesso resistente all'amfotericina B *in vitro* e spesso si hanno sovrainfezioni in pazienti trattati con questo antimicotico. Il voriconazolo è stato impiegato con successo in pazienti con fusariosi refrattaria all'amfotericina B. Per quanto riguarda la discussione sugli altri ialoifomiceti e i funghi dematiacei (feoifomicosi), responsabili di ben documentate infezioni opportunistiche disseminate, si rimanda alla consultazione di testi specializzati.

BIBLIOGRAFIA

1. International Code of Botanical Nomenclature ICBN (VIENNA CODE) adopted by the Seventeenth International Botanical Congress Vienna, Austria, July 2005. Disponibile all'indirizzo: http://ibot.sav.sk/icbn/main.htm; ultima consultazione 4/4/2008.
2. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 1991;91:72S-75S.
3. Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and axcess length of stay. *Arch Intern Med* 1988;148:2642-5.
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;39:309-17.
5. Ibrahim AS, Spellberg BJ, Avenissian V, Fu Y, Filler SG, Edwards JE Jr. Vaccination with recombinant N-terminal domain of Als1p improves survival during murine disseminated candidiasis by enhancing cell-mediated, not humoral, immunity. *Infect Immun* 2005;73:999-1005.
6. Nucci M, Spector N, Bueno AP, Solza C, Perecmanis T, Bacha PC, Pulcheri W. Risk factors and attributable mortality associated with superinfections in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 1997;24:575-9.
7. Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, *et al*. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Hemathologica* 2006;91:1068-75.
8. Eckert LO. Clinical practice. Acute vulvovaginitis. *N Engl J Med* 2006;355:1244-52.
9. Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hillis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. Antifungal susceptibilities of *Candida* specieis causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *J Clin Microbiol* 2005;43:2155-62.
10. Corsello S, Spinillo A, Osnengo G, Penna C, Guaschino S, Beltrame A, Blasi N, Festa A. An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110:66-72.
11. Cassone A, Torosantucci A. Opportunistic fungi and fungal infections: the challenge of a single, general antifungal vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2006;5:859-67.
12. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassone A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1223-9.
13. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007;369:1961-71.

Testi specialistici

Black JG. *Microbiology: Principles and Explorations*. 7th Edition. New York: John Wiley & Sons; 2008

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology* 5th edition. Mosby: Elsevier; 2005.

Annassie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA (Ed.). *Clinical Mycology* New York: Churchill, Livingstone; 2003.

Bendinelli M, Chezzi C, Dettori G, Manca N, Morace G, Polonelli L, Tufano MA. *Microbiologia Medica. Gli agenti infettivi dell'uomo: biologia, azione patogena, laboratorio. Micologia.* Bologna: Monduzzi Editore; 2005.

La Placa M. *Principi di Microbiologia Medica*. X ed. Bologna: Esculapio Editore; 2005.

Larone HD. *Medically important fungi. A guide to identification.* 4th edition. Washington, DC: ASM Press; 2002.

Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isemberg KL, Shadomy HJ. *Manual of Clinical Microbiology* 5th edition. Washington, DC: ASM Press; 2005.

La riproduzione parziale o totale dei Rapporti *e* Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.

Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma

Roma, aprile-giugno 2008 (n. 2) 2° Suppl.