



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute

Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali

Corso di Dottorato di Ricerca in Sanità Pubblica
XXVI ciclo

Tesi di Dottorato di Ricerca

Epidemiologia delle infezioni da Candida

Tutor: Prof.ssa **Anna Maria TORTORANO**

Coordinatore del dottorato: Prof. **Alessandro ZANETTI**

Tesi di:
**Cristina Francesca
LAZZARINI**
Matricola: R09112

Anno Accademico 2012/2013

INDICE

	Pagine
ABSTRACT	3
1.INTRODUZIONE	5
1.1 Genere <i>Candida</i>	5
1.2 <i>Candida albicans</i>	6
1.2.1 Parete cellulare	6
1.2.2 Struttura molecolare e fattori di virulenza	7
1.2.3 Morfogenesi	9
1.2.4 Riconoscimento del sistema immunitario	9
1.2.5 <i>Candida albicans</i> appartenenti al cluster “General Purpose Genotype” (GPG)	10
1.3 <i>Candida non-albicans</i>	11
1.4 Epidemiologia	11
1.4.1 Vie di trasmissione	13
1.4.2 Fattori dell’ospite	14
1.5 Malattie associate ad infezione da <i>Candida</i>	15
1.5.1 Diagnosi di infezione profonda o disseminata da <i>Candida</i>	19
1.6 Terapia antifungina	19
1.6.1 Meccanismi d’azione degli antifungini	23
1.6.2 Antifungini per il trattamento delle micosi sistemiche	24
1.6.3 Resistenza agli agenti antifungini	26
1.6.4 Test di sensibilità agli antifungini	27
1.6.5 Trattamento delle vulvovaginiti da <i>Candida</i>	27
1.6.6 Trattamento della candidemia e della candidosi invasiva	28
1.7 Prevenzione della candidemia e delle candidosi invasive	29
1.7.1 Misure di controllo delle infezioni	30
1.7.2 Chemioprolifassi antifungina	30
2.OBIETTIVI	31

3. MATERIALI E METODI	32
3.1 Candidemia	32
3.2 Candidosi vaginali e colonizzazioni da <i>Candida albicans</i>	35
3.3 Identificazione dei ceppi	35
3.3.1 Crescita su CHROMagar	35
3.3.2 Germinazione in siero di cavallo	36
3.3.3 Morfologia su PCB agar	36
3.4 Produzione di biofilm	37
3.5 Sensibilità in vitro agli antifungini	38
3.6 Analisi molecolare dei ceppi di <i>C. albicans</i>	41
3.6.1 Ricerca del cluster genotipico GPG	41
3.6.2 Genotipizzazione dei ceppi colonizzanti	44
4. RISULTATI	47
4.1 Studio epidemiologico sulla candidemia	47
4.1.1 Studio epidemiologico 2009	47
4.1.2 Confronto tra sorveglianza 2009 e sorveglianza 1997-1999	47
4.1.3 Pattern di sensibilità agli antifungini e produzione di biofilm	49
4.2 Studio sulle candidosi vaginali e colonizzazione da <i>C. albicans</i>	51
4.2.1 Analisi dei dati epidemiologici	51
4.2.2 Studio degli isolati	54
4.2.3 Frequenza dell'infezione da ceppi GPG	54
4.2.4 Pattern di sensibilità agli antifungini dei ceppi di <i>C. albicans</i> GPG+ e GPG-	58
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	60
6. BIBLIOGRAFIA	63

ABSTRACT

Candida is reported as an important cause of bloodstream infections (BSI) in critical patients such as cancer patients, surgical patients and premature neonates. Neonates are frequently infected or colonised during the stay in the nursery or during the delivery from *Candida* vaginitis that is a frequent event in pregnant women, particularly during the third trimester. Candidemia is an important challenge for public health as it is associated with severe complications, high mortality, increased length of hospital stay and great economical cost. Most of *Candida* BSIs develop from an endogenous source such as the colonised gut.

One of the aims of this study was to assess the epidemiology of candidemia and antifungal susceptibility profiles of *Candida* isolates in Lombardy hospitals through a prospective survey and to evaluate the changes compared to results of a previous survey performed 10 years before in the same region.

A prospective laboratory-based surveillance of candidemia was performed in 2009. The compared data reveal a threefold increase in incidence (from 0.38 to 1.19 per 1000 admissions), aging of infected patients, an increase in surgical patients (63.8% vs. 56%) and decline in crude mortality (from 35 to 27.1%). *C. albicans* was confirmed as the prevalent species causing candidemia although the rate was a little lower respect the previous survey (52.1% vs. 58.5%). *C. glabrata* was the second species with a statistically significant increase from 12.8% to 20.3%. Susceptibility testing confirmed the broad spectrum activity of amphotericin B and echinocandins. Decreased susceptibility or resistance to fluconazole was found in 24.9% of the tested isolates. The rate of high biofilm producers among *Candida* isolates was relevant (25.7%), however no correlation between this microbiological parameter and outcome could be demonstrated.

In a previous study performed in collaboration with Massey University a particular cluster of *C. albicans* named General Purpose Genotype (GPG) was found more virulent than others in causing candidemia in neonates and was associated with higher mortality rate in this population. The number of cases was low and we wanted to better investigate this association by enlarging the population number. However the introduction of antifungal prophylaxis in the neonatal intensive care units lowered the number of candidemia in this patients population. Therefore we decided to investigate the prevalence of the cluster as cause of vaginitis in pregnant women that is the principal way of infection at birth. GPG strains were detected in 32% of the pregnant women with *C. albicans* vaginitis and in 34.7% of not-pregnant women. The prevalence of GPG among isolates from African and North African women was statistically significant (62.5% versus 18.2%).

In addition it was investigated the presence of GPG in isolates from patients affected by alimentary tract colonization. The overall prevalence of the cluster was 32.7% without difference among men and women. A similar prevalence of the cluster among isolates causing colonization or candidemia was observed in neonates (34.8% vs. 33.3%). On the contrary in adult patients hospitalized in intensive care units the rates were statistically different (42.9% vs. 11.9%).

Patients with alimentary tract colonization in different sites were selected for the molecular identification of the strains by multilocus system typing. This was designed to verify if different body sites were colonized by the same strain as predictive tool of deep infection. This part of the study was performed at Massey University. However, due to problems regarding the growth of the strains, only the extraction and the amplification of the DNA was performed until now and the sequencing is in progress.

GPG+ and GPG- isolates were also analyzed to detect differences in susceptibility to antifungal drugs. A decrease susceptibility to fluconazole (geometrical mean 1.53mg/l vs. 0.67mg/l) and a higher rate of resistance to 5-fluorocytosine (30% vs. 0%), were detected in GPG+ isolates.

A boric acid-5-fluorocytosine based cream was suggested by guidelines for the treatment of vaginal candidosis, especially in pregnant women. Our results suggest to looking for GPG strains among vaginal isolates to avoid clinical failures with possible evolution to a chronic infection, more

difficult to eradicate, and the possible vertical contamination of the newborns by a strains associated with high crude mortality rate.

1.INTRODUZIONE

Nel corso degli ultimi decenni le micosi invasive si sono imposte come un emergente e grave problema di Sanità Pubblica sia in termini di ospedalizzazione che in termini di costi. L'aumento dell'incidenza, riscontrato in particolare nelle unità di Terapia Intensiva, si è verificato per il continuo accrescersi della popolazione a rischio di contrarre questo tipo d'infezione e per l'emergere di nuove specie fungine. Grazie ad un continuo miglioramento nelle terapie e con l'avvento di nuovi farmaci, pazienti per i quali un tempo si riscontrava una prognosi sfavorevole (es. trapiantati, malati di AIDS, pazienti sottoposti a chemioterapia antitumorale) possono ora sopravvivere più a lungo pur essendo maggiormente vulnerabili ad un'ampia gamma di patologie quali le micosi invasive.

Ad oggi sono riconosciute circa 200.000 specie fungine, di cui circa 200 clinicamente rilevanti per l'uomo.^(1,2) Molte di queste specie vengono considerate opportuniste, essendo microrganismi che generalmente in soggetti sani non provocano alcuna patologia ma che, in soggetti debilitati o con sistema immunitario compromesso, possono essere causa di diversi quadri patologici. Un ruolo molto importante è svolto dalle specie di *Candida*.

1.1 Genere *Candida*

Il genere *Candida* appartiene al regno dei Funghi caratterizzato da cellule eucariote con chitina come principale componente della parete cellulare. Morfologicamente si presentano come lieviti che allo stato vegetativo si riproducono per gemmazione o per fissione risultando in una crescita principalmente a singola cellula (blastoconidi) o a pseudo micelio.

Nonostante sia un genere anamorfico, cioè di cui non si conosce riproduzione sessuata, è considerato appartenente alla famiglia delle *Saccharomycetaceae*, ordine *Saccharomycetales*, classe *Ascomycetes*. Macroscopicamente le colonie delle varie specie di *Candida* variano dal color crema al giallo. A seconda della specie la consistenza può essere pastosa, liscia, brillante o secca, rugosa o dura. I tratti microscopici mostrano importanti variazioni da specie a specie. Tutte producono blastoconidi che possono essere tondeggianti o allungati e la maggior parte produce pseudoife lunghe o ramificate. Inoltre alcune specie, in determinate condizioni, possono produrre vere ife e clamidospore.

Recentemente alcune specie di *Candida* sono state definite come parasessuali in quanto sono stati ritrovati meccanismi simili a quelli per la riproduzione sessuale ma privi di meiosi. Attualmente sono state riconosciute più di 200 specie di lieviti appartenenti al genere *Candida*, alcune commensali facenti parte della normale popolazione microbica umana della cute, del tratto gastrointestinale e dell'apparato genito-urinario, e solo circa il 10% responsabile di infezione

nell'uomo.⁽³⁾ Esse possono diventare patogene quando calano le difese immunitarie dell'ospite, locali o sistemiche, nei confronti delle infezioni. In queste condizioni alcune specie di *Candida* possono causare infezione in tutte le sedi anatomiche. Generalmente questo tipo di patologie non causa problemi particolarmente gravi in soggetti il cui sistema immunitario sia competente, porta a manifestazioni superficiali più o meno evidenti che coinvolgono la cute (intertrigine, onicomicosi, perionicomi) e le mucose del cavo orale (mughetto), del faringe, dell'esofago, dell'intestino e dell'apparato genitale femminile (vaginiti). Tutte queste manifestazioni sono curabili mediante trattamenti locali. Se il soggetto colpito è gravemente immuno-compromesso l'infezione è più grave, più difficile da trattare e può avere conseguenze gravi come lo shock settico o l'insufficienza multi-organo che possono anche risultare nella morte del paziente. Negli ultimi anni sono state riscontrate infezioni invasive gravi in pazienti che non presentavano grave compromissione immunitaria⁽³⁾ quali pazienti ricoverati nelle unità di Terapia Intensiva e nei neonati prematuri.

1.2 *Candida albicans*

Tra le specie di *Candida* patogene per l'uomo quella più rappresentata risulta essere *Candida albicans* e, per la sua importanza in ambito clinico, è stata studiata più estesamente rispetto alle altre specie.

C. albicans è un importante patogeno opportunistico, ha una sviluppata capacità di adattamento e può cambiare la morfologia, da blastospore a pseudo micelio, a ife vere e proprie adattandosi ai cambiamenti che avvengono nel microambiente di crescita. *C. albicans* può essere responsabile di infezioni in qualunque sito anatomico. Tali infezioni possono essere classificate come superficiali, localmente invasive o disseminate.

1.2.1 Parete cellulare

Una delle strutture fondamentali di *Candida* è la parete cellulare i cui strati possono variare da 2 a 7 a seconda delle condizioni di crescita in cui si trova il lievito; è composta prevalentemente da polisaccaridi in particolare da mannani fosforilati, glucani e in minor quantità da chitina.⁽⁵⁾

I polipeptidi e le proteine sono strettamente legati ai polisaccaridi di parete comportando numerose differenze inter e intra specie per quanto riguarda la struttura antigenica, le proprietà idrofobiche, l'adesione alle cellule dell'ospite o ad altre superfici.

L'espressione delle macromolecole di parete varia non solo da cellula a cellula ma anche all'interno della stessa cellula in modo da conferirle funzioni diverse in parti diverse. La parete cellulare quindi è una struttura dinamica e fluida che costantemente cambia la sua composizione. L'espressione delle diverse proteine presenti sulla sua superficie è il risultato di un complesso sistema di

regolazione. La parete cellulare contiene 3 tipi differenti di molecole di adesione⁽⁶⁾. Una glicoproteina appartenente alla famiglia delle β 2-integrine che lega specificatamente la sequenza arginina-glicina-aspartato (RGD), comune in molte matrici glicoproteiche degli organismi ospiti, viene espressa specificatamente sulla superficie delle ife di *C. albicans* e funge da recettore mimando le componenti C3d e iC3b del complemento umano. La seconda molecola è la porzione proteica di una glicoproteina che si lega come la lectina ai glicosidi dell'ospite che contengono fucosio o N-acetil glucosammina. La terza molecola coinvolge una porzione polisaccaridica di una mannoproteina che lega un recettore dell'ospite al momento non ancora identificato. I residui di mannano sono legati alla parete cellulare tramite O- e N-glicosilazione e la struttura di questi può variare se cambiano le condizioni di pH e di temperatura. I glucani sono situati nella parete ma più internamente rispetto ai mannani.

I lipidi sono rappresentati soprattutto da fosfolipidi e steroli, in particolare da ergosterolo. Questi lipidi forniscono il sito d'azione per la sintesi di enzimi coinvolti nella morfogenesi della parete e sono il bersaglio di molti antifungini. Un'alterazione lipidica può verificarsi durante la trasformazione da lievito a micelio.⁽⁷⁾

1.2.2 Struttura molecolare e fattori di virulenza

Il genoma di *C. albicans* è stato ampiamente descritto e studiato, è diploide e la replicazione avviene per via asessuata; sono stati identificati codoni specifici: i codoni CUG e CTG, che normalmente codificano per la leucina, in *Candida* spp codificano per la serina, ciò porta ad un cambiamento nel loop della serina tRNA che potrebbe essere collegato all'acquisizione della termo tolleranza.⁽⁸⁾

Sebbene la riproduzione avvenga per via asessuata, in *Candida* sono stati ritrovati geni omologhi a quelli per la replicazione sessuale di *Saccharomyces cerevisiae* ma non è stato ancora chiarito il loro ruolo. In *Candida albicans*, diploide obbligato, è stata rilevata l'attivazione di un ciclo para-sessuale che coinvolge accoppiamento, ricombinazione e riduzione genomica, ma senza prova di meiosi, per aumentare la sua capacità di ricombinazione e adattamento ai vari ambienti di crescita in cui si può ritrovare.^(9,10)

C. albicans possiede 8 cromosomi numerati da 1 a 7 più un cromosoma molto variabile per struttura detto "R".⁽¹¹⁾

Fondamentali per l'ingresso del patogeno nella cellula ospite sono le adesine, proteine di membrana che si legano ad alcune componenti della matrice extracellulare della membrana delle cellule di mammifero come il fibrinogeno o la laminina. Esistono diversi tipi di adesine: ALS1, ALS5, HWP1 e INT1 sono le più importanti. L'adesione alla superficie cellulare, che costituisce il primo passo

verso la colonizzazione, avviene anche grazie ad interazioni non specifiche come la carica elettrostatica e le forze di Van der Waals.⁽¹²⁾ Anche l'idrofobicità della membrana cellulare fungina contribuisce in maniera importante all'adesione ai substrati inerti e questa caratteristica potrebbe essere conferita dalla glicosilazione delle mannoproteine di superficie.⁽¹³⁾ I blastoconidi hanno una superficie idrofila ma la formazione di un tubo di germinazione è associata alle capacità di adesione del lievito. I mannani presenti sulla superficie contribuiscono alla virulenza conferendo idrofobicità, cambiando le capacità di aderenza alla cellula ospite e sopprimendo la risposta immunitaria con meccanismi ancora non del tutto chiariti.⁽¹⁴⁾ Le mannoproteine legano i globuli rossi ed inducono emolisi. Le ife, contrariamente ai blastoconidi, si legano all'emoglobina per usarla come fonte di ferro e per questo motivo possiedono molti più recettori per l'emoglobina stessa.

Importanti fattori di virulenza sono rappresentati da alcuni enzimi quali: SAP (secreted aspartyl proteases), fosfolipasi, lipasi, enzimi idrolitici e d'adesione che inducono il lievito a lisare la membrana cellulare e a penetrare nella cellula ospite.⁽¹⁵⁻¹⁸⁾

Uno dei gruppi di enzimi più studiati è rappresentato dalle SAP che vengono prodotte da *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Diverse isoforme delle SAP prodotte da *C. albicans* rappresentano importanti fattori di virulenza per diversi tipi di candidosi. Questi enzimi inducono una lisi non specifica delle proteine della cellula ospite coinvolte nei meccanismi di difesa. La superfamiglia delle SAP include almeno dieci isoenzimi in *C. albicans* (i geni vengono identificati da SAP1 a SAP10). È stato dimostrato come l'espressione di SAP1-3 sia cruciale per lo sviluppo di infezioni superficiali in modelli sperimentali di candidosi cutanea e mucosale mentre SAP 4-6 sono molto importanti nella candidosi sistemica.

La produzione di fosfolipasi è fondamentale per il rimaneggiamento lipidico della membrana e per l'invasione da parte del patogeno mediante l'idrolisi lipidica della cellula ospite. È stato dimostrato come la fosfolipasi B sia essenziale per la virulenza e sia secreta dal lievito per tutto il processo d'infezione anche se la sua secrezione è limitata da variazioni di pH.

I cambiamenti morfologici rappresentano un altro fattore di virulenza in quanto facilitano la sopravvivenza del lievito nei vari distretti corporei e i genotipi in cui questa caratteristica è più espressa sono stati isolati più frequentemente nel corso di infezioni invasive. I neutrofili e gli antifungini possono fungere da trigger per i cambiamenti morfologici durante l'infezione.⁽¹⁹⁾

Un fattore da non sottovalutare durante un'infezione invasiva è la capacità di alcuni lieviti di produrre biofilm: esiste infatti una relazione positiva tra produzione di questo e grado di virulenza. Il biofilm si sviluppa sulle superfici di corpi estranei, quali cateteri e protesi; la sua formazione è un processo complicato che segue tre stadi fondamentali controllati dal punto di vista genetico. Nella prima fase le cellule aderiscono alla superficie del corpo estraneo e formano uno strato di cellule e

aumenta la sintesi e la produzione di proteine ALS; segue poi un'attiva crescita cellulare, infine viene prodotta matrice extracellulare e si formano delle ife che contribuiscono a stabilizzare il biofilm. Recenti studi hanno dimostrato che le cellule di lievito riescono a riconoscere il substrato adatto e solo allora viene indotto il pathway che porta alla produzione del biofilm.

Il biofilm fornisce protezione alle cellule di lievito nei confronti del sistema immunitario dell'ospite e capacità di resistenza nei confronti dei farmaci antifungini. Quest'ultima funzione è dovuta al fatto che viene impedito il contatto tra il farmaco e il fungo e che nel biofilm *C. albicans* è presente con tutte e tre le sue differenti morfologie e, in particolare, ife e pseudoife che sono particolarmente resistenti agli antifungini.

1.2.3 Morfogenesi

C. albicans è l'unico tra i lieviti di rilevanza clinica ad avere differenti aspetti morfologici come blastoconidi, pseudoife più o meno allungate, vere e proprie ife e, in particolari condizioni, clamidospore. Non è stato ancora chiarito con esattezza quali e quanti geni possano essere coinvolti nell'espressione di questi cambiamenti: i diversi pathway che entrano in gioco nei cambiamenti morfologici sono innescati da differenti stimoli esterni quali pH del microambiente, disponibilità di carbonio e azoto, ossigenazione, presenza di siero, di ormoni. Per questi motivi non si può dire che ci sia una relazione diretta tra genotipo e fenotipo.

1.2.4 Riconoscimento del sistema immunitario

Tutte le componenti del sistema immunitario vengono coinvolte nel riconoscimento e nella protezione nei confronti di *Candida* spp. Nei soggetti sani l'immunità innata reagisce individuando le cellule di lievito, l'immunità cellulo-mediata e le citochine hanno il compito di proteggere le mucose mentre non è del tutto chiaro il ruolo dell'immunità umorale. La *Candida* può trasformarsi in patogeno per l'uomo quando il sistema immunitario risulta in qualche modo compromesso. Monociti, neutrofili e macrofagi sono i componenti dell'immunità innata che hanno il compito di riconoscere il patogeno e si ritrovano comunemente nel sito d'infezione. I monociti esprimono sulla loro membrana dei recettori detti toll-like receptor (TLR), e in misura minore dai neutrofili, che riconoscono specifiche componenti presenti sulla membrana del patogeno. Le cellule dendritiche, che hanno il compito di inglobare, processare e presentare l'antigene, esprimono elevate concentrazioni di pattern recognition receptors (PRR) anch'essi fondamentali per il riconoscimento; i neutrofili oltre ai TLR mostrano una forte espressione di complement receptor 3 (CR3) e di recettori che legano la regione Fc delle immunoglobuline (Fcγ). L'insieme di questi recettori genera risposte diverse a seconda del tipo di patogeno. Vengono riconosciute le proteine di membrana

come i mannani e le mannoproteine che stimolano la produzione di citochine ed è stato dimostrato come inibiscano in modo non specifico l'immunità mediata in risposta all'antigene oltre a sfavorire la maturazione delle cellule dendritiche. Sono riportate evidenze in vitro di come i β -glucani, rilasciati a seguito di un'infezione fungina profonda, stimolino la produzione di leucociti e di fattori pro-infiammatori come citochine e chemochine.

I vari recettori si legano alle regioni PAMP (pathogens associated molecular patterns) che iniziano una serie di processi metabolici e di cascate enzimatiche che portano alla produzione di citochine, alla fagocitosi e quindi alla morte del fungo; in seguito a fagocitosi dopo opsonizzazione il lievito viene eliminato attraverso meccanismi ossidativi e non ossidativi presenti nella cellula ospite⁽³⁶⁾.

1.2.5 Cluster “General Purpose Genotype” di *Candida albicans*

Da precedenti studi di tipizzazione molecolare è emersa l'esistenza di un cluster genotipico largamente rappresentato fra i ceppi d'isolamento clinico di *C. albicans*.

L'analisi di 266 isolati clinici, provenienti da diverse aree geografiche, mediante DNA fingerprinting con sonda C3 ha infatti rivelato che il 41% dei ceppi apparteneva ad un unico cluster denominato clade A.⁽²⁰⁾ In seguito, un più ampio studio, in cui sono stati tipizzati 1391 isolati clinici mediante Multi Locus Sequence Typing (MLST), ha confermato l'esistenza di un cluster principale (clade 1) al quale apparteneva il 33% dei ceppi.⁽²¹⁾ Un'analisi comparativa dei due studi ha fatto supporre che il clade A e il clade 1 fossero sovrapponibili e che rappresentassero il cosiddetto General-Purpose-Genotype (GPG).⁽²²⁾

Nel tentativo di dare una spiegazione alla prevalenza dei ceppi GPG negli isolati clinici è stato condotto uno studio⁽²³⁾ su 66 isolati di *C. albicans* per valutare la correlazione del genotipo GPG con il tipo di sequenza nucleotidica contenuta nel gene ALS7 (agglutinin-like sequence), proteina con un ruolo chiave nell'aderenza del lievito alle cellule endoteliali ed epiteliali e quindi implicata nel processo d'infezione. Il polimorfismo del gene ALS7 è principalmente dovuto a due regioni ipervariabili: la prima regione contiene sequenze dette tandem repeat domain che variano nel numero di ripetizioni mentre la seconda regione contiene sequenze VA/TSES (della sequenza aminoacidica codificata). Sulla base dell'analisi di queste sequenze sono stati identificati 49 genotipi di *C. albicans* ed è stato osservato come il genotipo GPG fosse associato prevalentemente ai ceppi che contenevano un genotipo ALS7 con alto numero di ripetizioni (sia tandem che VA/TSES) e quindi ipervariabile⁽²³⁾.

Questi risultati hanno innescato un successivo studio con lo scopo di ricercare all'interno del genoma di *C. albicans* altri geni che avessero delle sequenze alleliche specifiche per il genotipo GPG. Oltre al gene ALS7 sono quindi stati identificati molti altri geni e open reading frame con un

polimorfismo legato al genotipo GPG. In particolare queste regioni non sono disperse a caso nelle varie categorie di geni funzionali o strutturali ma sembrano essere overesprese in particolari categorie di geni come quelli per la transizione da lievito a pseudoifia, quelli responsabili della risposta agli antifungini e i geni contenenti sequenze ripetute, tutti fattori di virulenza fondamentali per permettere l'evoluzione dell'infezione da localizzata a disseminata.

E' stato osservato come la sostituzione di un singolo nucleotide, una timina al posto di una citosina in posizione 301 nel gene *FUR1* con conseguente sostituzione dell'amminoacido arginina con cisteina in posizione 101, nei ceppi appartenenti al clade 1 di *C. albicans* dia la capacità di resistenza all'antifungino flucitosina.⁽²⁴⁻²⁵⁾

I geni *YHB4* e *YWP1* sono stati selezionati per disegnare un modello di amplificazione tramite PCR che permettesse di discriminare i ceppi appartenenti al cluster GPG da quelli appartenenti ad altri cluster. Nello studio di Schmid et al. pubblicato nel 2011 è stato usato questo protocollo per determinare la prevalenza del cluster GPG in 301 ceppi di *C. albicans* isolati da soggetti affetti da candidemia ricoverati nelle unità di Terapia Intensiva italiane. Da questo studio è emerso come la prevalenza complessiva del cluster fosse del 14% ma, tra i neonati ricoverati nelle unità di Terapia Intensiva neonatale, salisse al 33% con un tasso di mortalità cruda del 45,5% tra i neonati affetti da infezione con ceppo GPG+.

1.3 *Candida non-albicans*

Sebbene *C. albicans* venga riconosciuta come la principale specie causa di infezione disseminata negli ultimi anni si è notato un aumento di frequenza delle infezioni causate da specie *non-albicans*. Diversi studi hanno dimostrato come le più frequenti specie di *Candida non-albicans* causa di infezione disseminata siano rappresentate da *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. Diversi fattori come immunosoppressione, prematurità, patologie gravi o esposizione ad antibiotici ad ampio spettro possono influenzare la prevalenza delle diverse specie: *C. parapsilosis* in particolare viene osservata in relazione alla presenza di cateteri vascolari e, trovandosi normalmente sulla cute di soggetti sani, può essere facilmente trasmessa ai pazienti qualora non vengano rispettate le regole della buona gestione dei cateteri.

1.4 Epidemiologia

Alcune specie di *Candida* sono colonizzanti prevalentemente a livello del tratto gastrointestinale, della mucosa vaginale e della cute.

Candida albicans è la specie più frequentemente responsabile di infezioni sia superficiali che profonde.

La prevalenza di colonizzazione orale è di circa il 6% nei soggetti sani e di circa 47% nei soggetti ospedalizzati e aumenta fino al 70% in soggetti con AIDS, nei pazienti diabetici, oncematologici e nei neonati.⁽²⁶⁾

Il 70% delle donne in età fertile ha sofferto almeno di un episodio di candidosi vaginale nel corso della vita e il 10% soffre di vaginiti ricorrenti. La frequenza è maggiore in presenza di infezione da HIV.

La candidosi invasiva rappresenta la principale infezione fungina nel paziente ospedalizzato, in particolare è la quarta causa, in ordine di frequenza, di sepsi nosocomiale.

Una sorveglianza epidemiologica delle sepsi condotta negli Stati Uniti ha evidenziato come l'incidenza della candidemia sia triplicata nel periodo tra il 1979 e il 2000.⁽²⁷⁾

Studi di sorveglianza in diverse regioni degli Stati Uniti hanno mostrato una drammatica differenza nel tasso d'incidenza della candidemia, andando da 6 casi/10⁵ abitanti in Iowa, a 7 casi/10⁵ abitanti in Connecticut, a 8 casi/10⁵ abitanti ad Atlanta e San Francisco fino a 24 casi/10⁵ abitanti a Baltimora.

Al di fuori degli USA il tasso di candidemia stimato in studi di popolazione, è molto più basso. In Canada il tasso annuale di candidemia è di 2,9 casi/10⁵ abitanti;⁽²⁸⁾ in Europa in uno studio nazionale condotto in Irlanda dal 1980 al 1999, si è riscontrato un aumento del tasso annuale di candidemia da 1,4 casi/10⁵ abitanti nel periodo 1980-1984 a 4,9 casi/10⁵ abitanti nel periodo 1995-1999;⁽²⁹⁾ in Finlandia in uno studio epidemiologico tra il 1995 e il 1999 il tasso annuale di candidemia è aumentato da 1,7 casi/10⁵ abitanti nel 1995 a 2,2 casi/10⁵ abitanti nel 1999;⁽³⁰⁾ in Norvegia il tasso d'incidenza annuale, durante un periodo di studio di 13 anni, è aumentato da 2,4 casi/10⁵ abitanti a 3,0 casi/10⁵ abitanti tra il 2001 e il 2003;⁽³¹⁾ in Scozia un anno di sorveglianza prospettica ha evidenziato un tasso di candidemia di 4,8 casi/10⁵ abitanti;⁽³²⁾ in Spagna una sorveglianza condotta tra il 2002 e il 2003 ha mostrato un tasso annuale di 4,9 casi/10⁵ abitanti.⁽³³⁾ Unica eccezione sembra essere la Danimarca con un tasso di 11 casi/10⁵ abitanti in uno studio condotto tra il 2003 e il 2004.⁽³⁴⁾

Altri dati epidemiologici europei si riferiscono al tasso di candidemia per ricoveri o per giornate di degenza: l'incidenza media riportata varia da 0,17 a 0,38/1000 ricoveri e da 0,26 a 0,50/10000 giornate di degenza. In uno studio condotto in Lombardia dal 1997 al 1999 con una casistica di 645 episodi nel corso di 26 mesi, è riportato un tasso medio di 0,38/1000 ricoveri (range 0,03-1,45) e 4,4/10000 giornate di degenza (range 0,4-16,4).⁽³⁵⁾ I dati più elevati fanno riferimento alle strutture ospedaliere con il maggior numero di posti letto che generalmente ospitano pazienti che richiedono interventi diagnostici e terapeutici più invasivi associati ad un maggiore rischio di sviluppare una candidemia. I pazienti chirurgici e di Terapia Intensiva sono i soggetti a maggior rischio per questa

patologia, infatti chirurgia e ricovero in Terapia Intensiva sono i fattori predisponenti presenti nel 56% e 45% delle candidemie.

La gravità della candidemia è documentata dall'elevata mortalità cruda, circa il 35% in questo studio italiano che è in linea con i dati degli altri paesi europei (35% Finlandia, 44% in Spagna). È molto difficile calcolare la mortalità attribuibile in quanto questa patologia si sviluppa in pazienti già ad elevato rischio di morte per le condizioni cliniche di base.

Inoltre l'insorgenza di una candidemia ha un importante impatto economico: oltre al costo della terapia antifungina, si assiste ad un prolungamento della degenza anche di 15 giorni in reparti ad alto costo di gestione quali le terapie intensive. Sono stati stimati costi aggiuntivi di 16000 euro per una candidosi profonda.

Uno studio epidemiologico più recente condotto nei reparti di Terapia Intensiva italiani è stato promosso dalla Confederazione Europea di Micologia Medica (ECMM) in collaborazione con il gruppo di studio della Federazione Italiana di Micologia Umana e Animale (FIMUA). La mortalità cruda raggiungeva il 50% con netta differenza tra le due differenti tipologie di pazienti ricoverati, 61% nei pazienti medici e 46% in quelli chirurgici.⁽³⁶⁾ Rispetto all'esperienza degli anni '90 è stata evidenziata una diminuzione delle infezioni di *C. albicans* dal 63 al 59% ma un aumento della mortalità cruda dal 37 al 50%.

1.4.1 Vie di trasmissione

La principale fonte d'infezione è rappresentata dal paziente stesso.

Il passaggio dei lieviti colonizzanti il tratto alimentare al torrente circolatorio è favorito dalla presenza di interruzioni dell'integrità della barriera rappresentata dalla mucosa intestinale, anche se si sono verificati casi in cui il passaggio è avvenuto anche in presenza di mucosa integra.⁽³⁷⁾ Quindi la candidemia ha principalmente un'origine endogena.

La contaminazione per via esogena è più rara ma è comunque clinicamente rilevante. Lieviti, in particolare *C. parapsilosis*, presenti sulla cute anche integra del personale di assistenza o del paziente stesso possono raggiungere il torrente ematico a seguito per esempio di interruzioni della continuità della barriera cutanea per la presenza di cateteri vascolari. Sono stati riportati numerosi episodi epidemici soprattutto in reparti ad alto rischio quali geriatria, ematologia, e in particolare centri per la cura degli ustionati gravi, unità di Terapia Intensiva e di trapianto.

I neonati spesso vengono contaminati al momento del parto dalle *Candide* presenti a livello vaginale della madre. La candidosi vaginale è particolarmente frequente durante il terzo trimestre di gravidanza e oltre il 56% delle partorienti ne è affetto.⁽³⁸⁾ Nelle unità di Terapia Intensiva Neonatale sono state riscontrate epidemie di infezioni da *Candida* dovute al personale di assistenza per il quale

si è riscontrata una percentuale di presenza di *Candida* sulle mani attorno al 58%.⁽³⁹⁾

1.4.2 Fattori dell'ospite

I fattori dell'ospite associati alla candidemia e alla candidosi invasiva sono stati ben documentati. Prima del 1990 la maggior attenzione era focalizzata sul rischio di candidemia nei pazienti ematologici, in particolare quelli neutropenici. Tuttavia l'introduzione della profilassi antifungina con fluconazolo per questa tipologia di pazienti ha contribuito a diminuire il rischio di infezione. Recentemente l'attenzione si è rivolta anche verso i pazienti non neutropenici ricoverati nei reparti di Terapia Intensiva, soprattutto pazienti chirurgici. L'uso di antibiotici ad ampio spettro, la chemioterapia, la colonizzazione delle mucose, i cateteri vascolari, la nutrizione parenterale, la chirurgia specialmente gastrointestinale, l'insufficienza renale, l'emodialisi e la prolungata degenza in Terapia Intensiva sono stati dimostrati come importanti fattori di rischio in analisi multivariate. Questi fattori rappresentano condizioni comuni in ambito ospedaliero e in particolare nei reparti di Terapia Intensiva. Alcuni individui hanno, già al momento del ricovero, un rischio maggiore di sviluppare una candidemia a causa delle loro condizioni cliniche di base: pazienti che hanno subito interventi chirurgici in particolare gastrointestinali, trapiantati, diabetici, bambini prematuri e pazienti anziani.⁽⁴⁰⁾

La prevalenza della candidosi invasiva è relativamente bassa nei primi 5-7 giorni di permanenza in Terapia Intensiva ma dal settimo giorno in poi aumenta drammaticamente raggiungendo il massimo intorno al ventunesimo giorno.

La presenza di cateteri vascolari o altri corpi estranei è un ulteriore fattore di rischio per la candidemia, poiché le specie di *Candida* possono aderire ai materiali che li costituiscono formando il biofilm. È stato evidenziato come la mortalità nei pazienti infettati da ceppi produttori di biofilm fosse più alta rispetto ai pazienti infettati da ceppi non produttori di biofilm, rispettivamente 70% e 45,7%. *C. albicans* e *C. parapsilosis* erano correlate ad un aumento della mortalità in pazienti infettati da ceppi produttori di biofilm rispetto a quelli infettati da ceppi non produttori: 84,2% vs 71,4% e 50% vs 28% rispettivamente per le due specie. Questo potrebbe suggerire che la produzione di biofilm può contribuire alla virulenza di *C. albicans* e aumentare la potenziale patogenicità di *C. parapsilosis*. I cateteri venosi centrali rappresentano il più comune fattore di rischio per lo sviluppo della candidemia in pazienti non-neutropenici o particolarmente immunocompromessi: più della metà delle candidemie nei pazienti di Terapia Intensiva è catetere-correlata. Anche la nutrizione parenterale è stata associata ad un aumento di rischio di fungemia: soluzioni contenenti elevate concentrazioni di glucosio promuovono la formazione di biofilm aumentando la capacità del microrganismo di colonizzare la superficie del catetere e di causare

infezione nei pazienti che ricevono la nutrizione endovenosa.⁽⁴¹⁾

Quindi i cateteri vascolari possono essere bersaglio del lievito nel caso in cui la candidemia si sviluppi dal tratto alimentare oppure fonte primaria di infezione nel caso in cui rappresenti la via d'entrata del lievito.

1.5 Malattie associate ad infezione da *Candida*

I lieviti del genere *Candida* possono causare un'ampia gamma di patologie di grado più o meno elevato a seconda del patogeno e della condizione immunitaria dell'ospite. Le forme più frequentemente riscontrate sono le infezioni superficiali che interessano cute (intertrigine) e mucose dell'apparato genitale femminile (vaginite) e del cavo orale (mughetto).

Più raramente si riscontrano infezioni profonde conseguenti a disseminazione con compromissione dei vari organi. Tali forme sono particolarmente gravi e possono portare come estrema conseguenza alla morte del paziente.

La colonizzazione delle mucose è conseguenza di un cambiamento della popolazione microbica con crescita preponderante del lievito e può rappresentare il punto di partenza per lo sviluppo di una forma disseminata.

-Infezioni del tratto gastrointestinale

La candidosi orale generalmente si verifica in pazienti con immunocompromissione locale o sistemica o esposti ad altri fattori che favoriscono lo svilupparsi del lievito a discapito di altre forme microbiche. I soggetti immunocompromessi più a rischio sono neonati prematuri, pazienti malnutriti o diabetici, HIV positivi, pazienti in trattamento con farmaci citotossici o steroidei o sottoposti a radioterapia maxillo-facciale. Prolungate terapie con antibiotici ad ampio spettro o con corticosteroidi per via inalatoria favoriscono la crescita del lievito diminuendone la competizione con forme batteriche. Il mughetto del cavo orale viene riscontrato nel 28-38% di pazienti sottoposti a chemioterapia antitumorale.

Prima dell'introduzione della terapia HAART la quasi totalità dei pazienti malati di AIDS presentava candidosi orale⁽⁴²⁾; con l'avvento della nuova terapia la percentuale si è stabilizzata attorno al 2-4%⁽⁴³⁾. In questa particolare classe di pazienti la candidosi orale si complica con la forma esofagea che rappresenta una delle patologie che definiscono l'AIDS.

La candidosi orale può presentarsi in diverse tipologie: bianca a macchie, di tipo pseudo membranosa, di tipo eritematoso, a placche. La lingua si presenta gonfia e arrossata.

La candidosi può interessare tutto il tratto alimentare, cavo orale, esofago, intestino spesso accompagnato da interessamento perianale.

-Infezioni dei genitali

C. albicans è la specie che gioca un ruolo primario in questo genere d'infezioni in particolare nelle candidosi vulvovaginali. La vaginite da *Candida* è la seconda patologia infettiva genitale più diffusa tra le donne con almeno un episodio nel corso della vita riscontrato nel 75% di esse, nella metà dei casi prima dei 25 anni.⁽⁴⁴⁾ Forme acute di candidosi vulvovaginale sono state associate all'uso di contraccettivi orali, corticosteroidi o antibiotici, al diabete e alla gravidanza. La trasmissione sessuale tra i due partner è frequente specialmente attraverso pratiche di sesso orale. Nella maggior parte dei casi i sintomi sono acuti ma non gravi e variano dal prurito alla secchezza vaginale, dalla dispareunia alla disuria ad anormali secrezioni vaginali. Queste infezioni sono in genere facilmente e rapidamente curabili con farmaci ad uso topico. Tuttavia circa il 5% delle donne sviluppa una candidosi vulvovaginale ricorrente definita da più di 4 episodi/anno nonostante l'assenza di patologie predisponenti.⁽⁴⁵⁾ Queste forme ricorrenti sono di difficile eradicazione e nel 10-20% dei casi risultano causate da specie *non-albicans*. Un cambiamento nelle difese immunitarie a livello locale sembra essere più rilevante di un abbassamento dell'immunità sistemica e ciò potrebbe spiegare il fatto che l'incidenza di questa patologia non aumenta in donne sieropositive con bassa conta di CD4.⁽⁴⁶⁾

Le infezioni genitali maschili sono molto meno frequenti e possono essere causate dal lievito stesso o da una reazione allergica agli antigeni della *Candida* a seguito di rapporti non protetti.

-Infezioni della cute e delle unghie

Alcune specie di *Candida* come *C. parapsilosis* appartengono alla normale popolazione microbica cutanea, manifestandosi con prurito e rash a contorno poco definito, abbondanti lesioni vescicolari eritematose e piaghe interdigitali.⁽⁴⁷⁾

C. albicans può essere responsabile di intertrigine in sedi anatomiche umide.

Le onicomicosi interessano principalmente le unghie delle mani e sono accompagnate da perionissi.

-Infezioni dei tessuti profondi

La maggior parte delle infezioni che riguardano i tessuti profondi sono il risultato di infezioni disseminate per via ematogena e possono coinvolgere tutti gli organi e gli apparati: il tratto urinario può presentare manifestazioni come la candiduria, che nei pazienti ospedalizzati varia dal 2 all'11% soprattutto tra pazienti leucemici o ricoverati nelle unità di Terapia Intensiva⁽⁴⁸⁾ o la candidosi renale, che è secondaria a quella ematica e si presenta con manifestazioni settiche; il sistema polmonare può sviluppare infezioni secondarie comuni in seguito a candidemia ed infezioni

primarie molto più rare ed in genere dovute ad aspirazione⁽⁴⁹⁾, più frequenti nei neonati a seguito di parti particolarmente traumatici; il sistema cardio-vascolare risulta essere uno dei sistemi maggiormente predisposti allo sviluppo di infezioni in quanto il 2-4% di endocarditi è causato da specie fungine rappresentate per il 65% da *Candida*⁽⁵⁰⁾ e il 25% dei pazienti con valvole protesiche sviluppa endocardite da *Candida*; il sistema nervoso centrale in genere viene interessato secondariamente ad una infezione ematica, e risulta come il 65% dei pazienti neonatali, contro il 15% dei pazienti adulti, sviluppi una candidosi cerebrale con gravi conseguenze nel caso di sopravvivenza; inoltre si sono riscontrate patologie fungine riguardanti il sistema ottico nella forma di cheratiti o endoftalmiti spesso conseguenza di una infezione ematica; le infezioni addominali sono tra le più importanti in quanto *Candida* spp. vengono comunemente ritrovate nei campioni intra-addominali ma danno patologie importanti come ascessi o peritoniti solo quando le condizioni dell'ospite sono compromesse come nel caso di ricorrenti perforazioni, pancreatiti necrotizzanti o infezioni precedentemente presenti a causa di terapie antibiotiche o farmacologiche in genere o per anastomosi a causa di perdite di liquido addominale. Nel 10% di pazienti sottoposti ad intervento chirurgico per acuta pancreatite necrotizzante è stata trovata infezione da *Candida* suggerendone un possibile ruolo nell'evoluzione di questa malattia.⁽⁵¹⁾ Nei malati di cancro con cateteri di drenaggio cutaneo sono stati ritrovati ascessi epatici. I funghi sono responsabili di circa l'8% delle peritoniti che si sviluppano in seguito a dialisi ambulatoriale peritoneale che però non coinvolgono altri organi e il 75% di questi è risultato appartenere al genere *C. albicans*.⁽⁵²⁾ Le peritoniti da *Candida* sono state riscontrate anche in caso di pazienti affetti da cirrosi epatica e tumori intra-addominali. Se non vengono curate possono portare a disseminazione ematica e formazione di ascessi che necessitano drenaggio.

-Candidosi sistemiche e candidemie

Le candidosi e le candidemie possono avere un'origine endogena o esogena.

L'origine endogena è conseguenza dell'aumento della colonizzazione di *Candida* delle mucose in particolare dal tratto alimentare favorito dalla prolungata esposizione ad antibiotici ad ampio spettro che sopprimono la naturale flora batterica e aumentano il tasso di crescita di *Candida* endogena sulle mucose. La traslocazione del fungo, che si verifica anche a mucose integre, è favorita in caso di danni all'integrità della mucosa conseguenti a interventi chirurgici o chemioterapia.

L'origine esogena è favorita da soluzioni della continuità della barriera che si realizzano in presenza di cateteri vascolari o per la prolungata ospedalizzazione che aumenta la possibilità d'infezione dovuta al contatto con il personale sanitario o all'ambiente stesso. La presenza di cateteri vascolari gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo/evoluzione della candidemia: infatti il catetere può

rappresentare sia la via di penetrazione del lievito presente come commensale sulla cute del paziente o del personale di assistenza che il reservoir di infezione da parte di lieviti provenienti per via ematica da altre sedi di infezione/colonizzazione.

L'incidenza di questa patologia varia a seconda della popolazione di pazienti presa in esame: 22-38% tra coloro che sono in nutrizione parenterale totale,⁽⁵³⁾ 1,8-7,6% tra gli ustionati con incremento al 12-21% tra gli ustionati colonizzati da *Candida*, fino al 34% quando i siti di colonizzazione risultano più di due.⁽⁵⁴⁾

Il range di mortalità attribuibile alla candidemia è molto ampio, varia dal 5 al 71% e dipende probabilmente dalla diversità e dal numero di soggetti delle popolazioni prese in esame.⁽⁵⁵⁾ Fattori che favoriscono un esito negativo sono l'età avanzata, la gravità della patologia precedentemente in atto, la disseminazione viscerale, la persistente neutropenia, la permanenza nelle unità di Terapia Intensiva, la nutrizione parenterale e l'emodialisi. Studi recenti hanno mostrato una mortalità del 44%. Le morti precoci (tra il terzo e il settimo giorno dopo la comparsa di candidemia) sono state associate a emopatie maligne mentre l'intubazione è stata associata alle morti tardive.⁽⁵⁶⁾

Tuttavia è possibile parlare solo di mortalità cruda dovuta alla candidemia in quanto i pazienti che sviluppano questo tipo di infezione sono in genere già ampiamente immunocompromessi e la candidemia può essere presa in considerazione come una concausa aggravando il quadro generale di salute del paziente.

Le manifestazioni cliniche possono essere varie a seconda della tipologia di paziente. Nei neonati la candidosi disseminata è causata per lo più da *C. albicans*.⁽⁵⁷⁾ Più frequenti sono le localizzazioni meningei (64%), cutanee (66%) e retiniche (50%); nel 70% dei casi si sviluppa insufficienza respiratoria e frequente è lo shock settico. Anche nei soggetti adulti la candidemia può evolvere in candidosi disseminata con coinvolgimento di tutti gli organi. La localizzazione oculare ad esempio, colpisce dal 3 al 78% dei soggetti con candidemia, ed è in genere una complicanza tardiva che, se non diagnosticata in tempo può portare alla perdita della vista. Nei pazienti neutropenici frequenti sono le lesioni cutanee che si sviluppano nel 10-25% dei casi. Tali lesioni possono comparire improvvisamente, senza dolore e si presentano come pustole disseminate su tutta la superficie corporea che possono evolvere in larghi noduli con aree necrotiche al centro; in questo tipo di pazienti, a causa dell'assenza di reazioni infiammatorie, possono anche comparire come un rash cutaneo simile alle reazioni cutanee non specifiche in risposta ai farmaci. In pazienti affetti da candidemia è possibile riscontrare un'insufficienza multi-organo e shock settico. La candidosi disseminata cronica è meno comune rispetto alla forma acuta, è quasi sempre associata a pazienti neutropenici e può presentarsi come complicazione di quella acuta. E' caratterizzata da una febbre persistente resistente agli antibiotici con emocolture negative, dolore addominale soprattutto del

quadrante superiore, nausea, vomito, aumentato livello serico degli enzimi epatici in particolar modo della fosfatasi alcalina e dalla presenza di ascessi a livello del fegato e talvolta della milza, dei polmoni e dei reni.⁽⁵⁸⁾

1.5.1 Diagnosi di infezione profonda o disseminata da *Candida*

La diagnosi di candidosi invasiva e candidemia si basa sulla combinazione di dati clinici e di laboratorio. Segni e sintomi utili in un paziente a rischio possono essere la comparsa di febbre senza altra causa, sepsi o lesioni cutanee metastatiche che vengono però riscontrate solo in pazienti neutropenici.

Le indagini di laboratorio includono tre tipi di ricerca: microbiologica, istopatologica ed immunologica.

Un esame microscopico del campione clinico può portare ad una rapida diagnosi. Questa analisi può essere fatta sia su sangue, se si sospetta candidemia di alto grado, sia su preparati istologici.⁽⁵⁹⁾

L'emocoltura è caratterizzata da una bassa sensibilità anche se il rendimento è migliorato negli ultimi anni, con l'avvento di tecnologie nuove quali sistemi di lisi e centrifugazione (Isolator) e sistemi con monitoraggio automatizzato continuo della crescita microbica (BactAlert e Bactec).⁽⁶⁰⁾

Sono risultati promettenti la ricerca mediante ELISA del mannano e degli anticorpi anti-mannani (Platelia Candida) e la ricerca del β 1-3 glucano (Fungitel).

1.6 Terapia antifungina

Gli antifungini approvati per il trattamento delle micosi profonde appartengono alla classe dei polieni (amfotericina B), delle pirimidine (5-fluorocitosina), degli azoli (fluconazolo, itraconazolo, posaconazolo, voriconazolo) e alla classe delle echinocandine (casprofungina, micafungina, anidulafungina). (Tabella 1)

I possibili target per i farmaci antifungini sono limitati rispetto a quelli degli antibatterici a causa dell'elevata somiglianza della cellula fungina con quella dei mammiferi. Ad oggi sono stati studiati tre target: gli steroli della membrana plasmatica, la sintesi degli acidi nucleici e i costituenti della parete cellulare. La maggior parte degli antifungini usati in terapia interagiscono con l'ergosterolo presente nella membrana plasmatica in modo diretto, come i polieni, o indiretto, come gli azoli. Le echinocandine, invece, interagiscono sulla sintesi del β 1,3 glucano, uno dei costituenti della parete cellulare. (figura 1)

Tabella 1: Antifungini

CLASSE	MECCANISMO D'AZIONE	NOME GENERICO	NOME COMMERCIALE	FORMULAZIONE DISPONIBILE
Polieni	Destabilizzano la membrana della cellula fungina. Si legano all'ergosterolo incorporato nella membrana cellulare fungina creando pori sulla superficie e portando alla depolarizzazione della membrana stessa con conseguente morte cellulare.	Amfotericina B deossicolato	Fungizone	Intravenosa, soluzione orale
		Amfotericina B complesso lipidico	Abelcet (ABLCL)	Intravenosa
		Amfotericina B dispersione colloidale	Amphotec (ABCD)	Intravenosa
		Amfotericina B liposomiale	AmBisome (LAmB)	Intravenosa
Pyrimidine	Trasportate nella cellula attraverso la citosina permeasi, convertite in fluoro uracile dalla citosina deaminasi e successivamente convertite in 5-fluorouridina trifosfato che viene incorporata nell'RNA fungino e interferisce con la sintesi proteica. L'intermedio inibisce anche la timidilatosintetasi e interferisce con la sintesi del DNA	Flucitosina (5FC)	Ancotil	Compresa
Azoli	Interferiscono con la sintesi degli steroli attraverso l'inibizione della C-14 α demetilasi enzima CYP dipendente importante per	Chetoconazolo	Nizoral	Compresa
		Fluconazolo	Diflucan	Intravenosa, sospensione orale, compressa
		Itraconazolo	Sporanox	Capsula orale, soluzione orale

	convertire il lanosterolo in ergosterolo	Voriconazolo	Vfend	Intravenosa, compressa
		Posaconazolo	Noxafil	Sospensione orale
Echinocandine	Inibiscono la sintesi del β 1,3 glucano attraverso l'inibizione della β 1,3 glucano sintasi. La parete cellulare fungina è composta per la maggior parte da polisaccaridi di cui i più abbondanti sono i glucani. La glucano sintasi catalizza la polimerizzazione di questi polisaccaridi. L'inibizione di quest'unico enzima porta all'aumento della permeabilità della parete cellulare e alla lisi cellulare	Caspofungina	Cancidas	Intravenosa
		Micafungina	Mycamine	Intravenosa
		Anidulafungina	Eraxis	Intravenosa

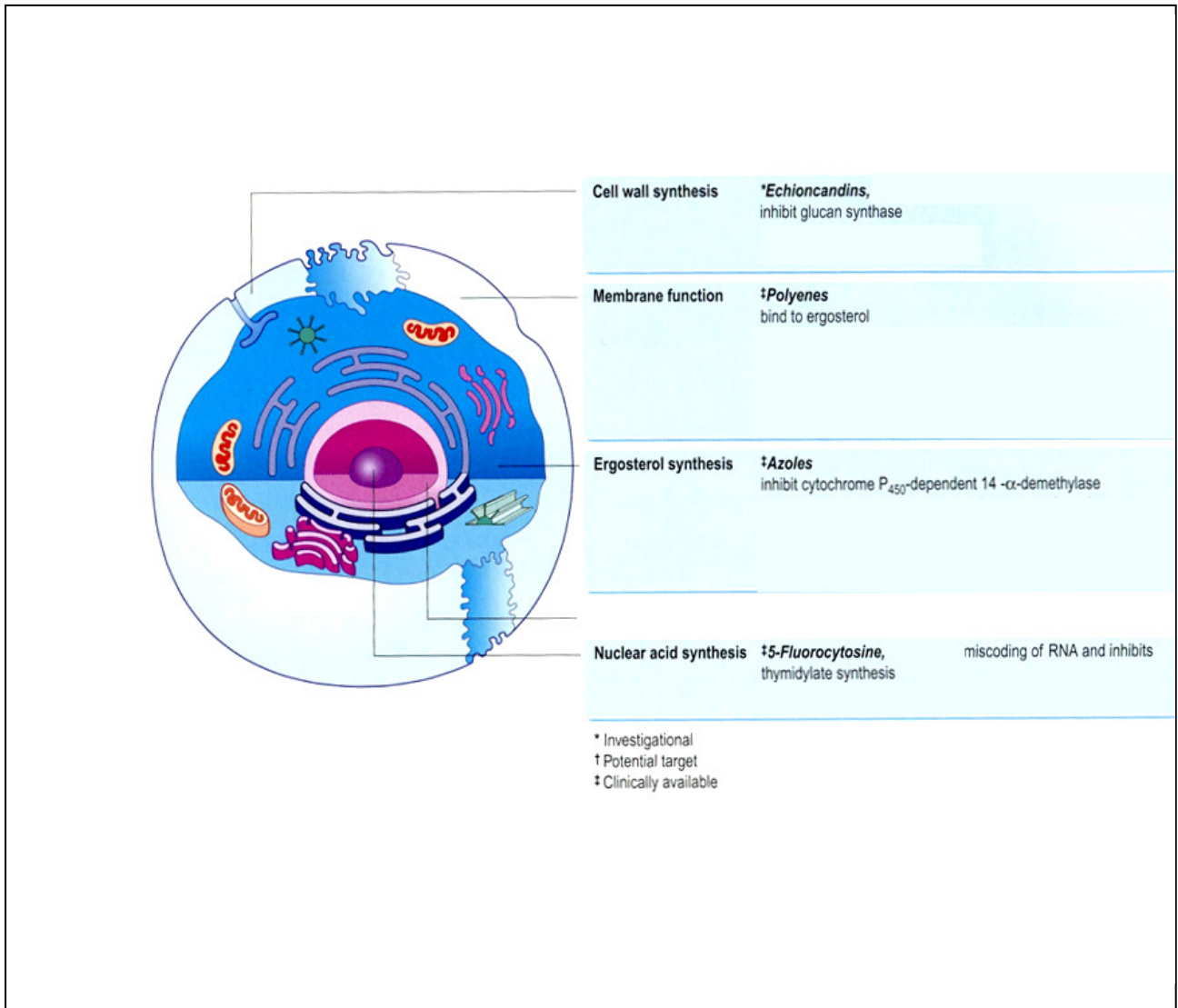


Figura 1: siti d'azione degli antifungini

1.6.1 Meccanismi d'azione degli antifungini

-Azione sull'ergosterolo e sulla sua sintesi

Un importante componente della membrana cellulare dei funghi è l'ergosterolo fondamentale per mantenere l'integrità cellulare e per regolare la fluidità di membrana. Poiché non è presente nella membrana delle cellule di mammifero è uno dei target ideali per gli antifungini.

I polieni hanno un'attività fungicida concentrazione dipendente in quanto legano direttamente gli steroli di membrana formando dei canali transmembrana che aumentano la permeabilità della membrana stessa con conseguente fuoriuscita di sostanze presenti all'interno della cellula e flusso in entrata di ioni extracellulari con conseguente depolarizzazione della membrana, aumento di permeabilità ai protoni ed ai cationi monovalenti e infine morte cellulare.⁽⁶¹⁾ Inoltre l'amfotericina B interagisce con le funzioni degli enzimi ossidativi associati alla membrana.

L'ergosterolo è anche il target indiretto di altri antifungini quali i composti azolici, che agiscono su uno o più passaggi della sua biosintesi.⁽⁶¹⁾ L'enzima 14 α - demetilasi citocromo P450 dipendente catalizza la demetilazione dei precursori dell'ergosterolo, convertendo il lanosterolo in ergosterolo. L'inibizione di questo enzima porta alla mancanza di ergosterolo e ad un accumulo di precursori tossici con conseguente formazione di una membrana plasmatica con una diminuita integrità strutturale e perdita di funzioni.⁽⁶²⁾ I differenti azoli differiscono per la loro azione inibitoria della 14 α -demetilasi e ciò spiega le differenze nella loro azione antifungina. Hanno anche target secondari sempre coinvolti nella biosintesi dell'ergosterolo che variano a seconda dell'antifungino e del microrganismo. Così per esempio in *C. albicans* fluconazolo inibisce solo parzialmente la sintesi dell'ergosterolo, completamente quella dell'obtusifoliolo, mentre voriconazolo inibisce completamente la sintesi di entrambi.

-Azione sulla sintesi degli acidi nucleici:

la 5-fluorocitosina (o flucitosina, 5FC) è trasportata attraverso la membrana plasmatica dall'enzima citosina permeasi e, una volta all'interno della cellula, viene convertita dalla citosina deaminasi in 5-fluorouracile. Può agire attraverso due meccanismi. Nel primo caso, grazie ad una serie di fosforilazioni successive, il 5-fluorouracile viene convertito in 5-fluoriuridina trifosfato che viene incorporata nell'RNA fungino al posto dell'uracile alterando così l'azione del tRNA e inibendo quindi la sintesi proteica. Con il secondo meccanismo viene inibita la sintesi del DNA in quanto viene trasformata dalla uridinmonofosfato pirofosforilasi in 5-fluorodeossiuridina monofosfato che è un inibitore della sintetasi timidilata fondamentale per la sintesi del DNA.⁽⁶³⁾

-Azione sui glucani:

la parete cellulare dei funghi è composta da mannoproteine, chitina e glucani e svolge molte funzioni come il mantenimento della rigidità cellulare, la forma, il metabolismo, lo scambio ionico e l'interazione con i meccanismi di difesa della cellula ospite. La composizione varia da specie a specie ma il maggiore componente della parete cellulare di molti funghi è il β 1,3 glucano. Le echinocandine svolgono un'attività antifungina tempo-dipendente in quanto sono inibitori non competitivi della β 1,3 D-glucano sintetasi, bloccando la sintesi del β 1,3 glucano. La mancanza di questo componente porta ad un'inefficiente integrità strutturale della parete e alla perdita delle funzioni che si risolvono nella lisi osmotica della cellula fungina.⁽⁶⁴⁾

1.6.2 Antifungini per il trattamento delle micosi sistemiche

-Polieni:

in questa classe di antifungini l'unico composto utilizzato per via sistemica è l'amfotericina B. Oltre all'azione fungicida diretta stimola la risposta immunitaria della cellula di mammifero agendo sul rilascio di interleuchina1 (IL1) e tumor necrosis factor (TNF), sulla produzione da parte dei macrofagi di anione superossido contribuendo alla risposta antifungina generale.

Lo spettro d'azione dell'amfotericina B è molto ampio, è attiva praticamente nei confronti di quasi tutti i patogeni fungini.⁽⁶⁵⁾

L'amfotericina B non è assimilata dal tratto gastrointestinale e viene quindi somministrata solo per via endovenosa.

Nella specie umana l'amfotericina B si distribuisce prima nel fegato e poi in minore quantità nei reni, nella milza e nel cuore. Per circa il 95% si lega all'albumina che la veicola nel torrente circolatorio in quanto ha una bassissima solubilità nel plasma umano.⁽⁶⁶⁾

La sua tossicità dipende dalla dose e dalla modalità di somministrazione; essa, immediatamente dopo la somministrazione, si lega all'ergosterolo fungino ma ha anche affinità, seppure molto inferiore, per il colesterolo presente nelle membrane delle cellule di mammifero. Un'alta concentrazione può danneggiare gli eritrociti e le altre cellule causando lisi e perdita di ioni ed emoglobina e quindi anemia. Un importante effetto collaterale è la nefrotossicità, la cui incidenza varia tra 15 e 80% a seconda della popolazione di pazienti.

Per ovviare alla tossicità della prima formulazione sono state messe a punto tre formulazioni:

su base lipidica amfotericina B complesso lipidico (ABLCL), amfotericina B dispersione colloidale (ABCD) e amfotericina B liposomiale (AmBisome). Quest'ultima è la formulazione maggiormente utilizzata per la bassa tossicità.

-5-Fluorocitosina:

lo spettro d'azione di questo antifungino è molto limitato, risulta infatti attivo solo nei confronti dei lieviti del genere *Candida* e *Cryptococcus*. Per la facilità di insorgenza di resistenza questo farmaco viene usato solo in combinazione con altri antifungini, quali l'amfotericina B.⁽⁶⁷⁾

Viene somministrata per via orale e viene assorbita rapidamente dall'intestino, si distribuisce a tutti i tessuti corporei e viene eliminata per via renale attraverso la filtrazione glomerulare. La posologia deve essere modulata sulla base della funzionalità renale per evitare gli effetti collaterali da accumulo. Il più importante effetto tossico riguarda la mielosoppressione probabilmente per conversione della 5FC in 5-fluorouracile.

-Azoli:

lo spettro d'azione varia da molecola a molecola appartenente a questa classe di antifungini. Il fluconazolo è fungistatico e possiede uno spettro d'azione limitato ai lieviti. È molto attivo nei confronti di *C. albicans*, meno nei confronti delle altre specie di *Candida*. In particolare *C. krusei* è intrinsecamente resistente, e *C. glabrata* sviluppa facilmente una resistenza secondaria.⁽⁶⁸⁾

Itraconazolo, voriconazolo e posaconazolo hanno uno spettro d'azione molto più ampio, esercitando un'azione fungicida nei confronti sia dei lieviti che dei funghi filamentosi. La formulazione orale di fluconazolo viene rapidamente e quasi completamente assorbita e le concentrazioni sieriche dopo somministrazione orale sono pressoché identiche a quelle raggiunte con la somministrazione endovenosa. Il fluconazolo si lega poco alle proteine plasmatiche e più del 90% del farmaco viene escreto nelle urine. L'itraconazolo è disponibile sia come capsule che come soluzione orale. L'assorbimento dalla formulazione in capsule è lento, molto variabile e favorito dall'acidità gastrica. La soluzione orale in ciclodestrina ne migliora l'assimilazione rendendola più rapida e non influenzata dall'acidità gastrica, e diminuisce notevolmente la variabilità inter e intra paziente del profilo farmacocinetico. L'itraconazolo è altamente lipofilo, si lega per oltre il 99% all'albumina, ha una notevole affinità per i tessuti e viene eliminato per via epatica. Il voriconazolo è disponibile sia come formulazione orale che come soluzione endovenosa in ciclodestrina. La biodisponibilità dopo somministrazione orale raggiunge il 90%, il farmaco è moderatamente legato alle proteine plasmatiche e ampiamente distribuito in tutti i distretti corporei. Il posaconazolo è chimicamente simile all'itraconazolo; è altamente lipofilo e disponibile solo come sospensione orale.

Per quel che riguarda la tossicità sono una classe di farmaci ben tollerati. I sintomi gastrointestinali sono i più frequenti effetti collaterali, così come un transitorio aumento delle transaminasi. È stata dimostrata la loro azione teratogena.

-Echinocandine:

le echinocandine possiedono uno spettro d'azione piuttosto ristretto, limitato alla *Candida*, su cui esercitano un'azione fungicida, e agli *Aspergilli* nei confronti dei quali inducono solamente un'anormale sviluppo ifale.

Le echinocandine attualmente in commercio –caspofungina, anidulafungina e micafungina- sono somministrabili solo per via endovenosa e possiedono proprietà farmacocinetiche molto simili, sono altamente legate alle proteine plasmatiche (84-99%). Le tre molecole differiscono per la modalità di metabolizzazione da parte degli enzimi epatici.

Sono farmaci ben tollerati e il loro impiego è associato a scarsi effetti collaterali, principalmente irritazione nel punto di somministrazione, flebite e transitorio aumento delle transaminasi.

1.6.3 Resistenza agli agenti antifungini

L'ampliarsi dell'impiego della terapia antifungina in questi ultimi anni ha portato all'insorgenza di alcuni ceppi resistenti. Esistono due tipi di resistenza, quella innata e quella acquisita: alcune specie di funghi sono primariamente resistenti ad alcuni antifungini mentre altri sviluppano una resistenza secondaria all'esposizione a questi farmaci.

-Resistenza ai polieni:

la resistenza all'amfotericina B è un evento eccezionale. La resistenza sembra essere data da alterazione del contenuto o della composizione degli steroli della membrana cellulare.⁽⁶⁹⁾ Un altro meccanismo di resistenza sembra coinvolgere cambiamenti ossidativi nella cellula fungina con diminuzione della respirazione aerobica.⁽⁷⁰⁾

-Resistenza alla flucitosina:

l'impiego della 5FC in monoterapia porta rapidamente all'insorgenza di resistenza. I meccanismi includono l'assenza della citosina permeasi e le alterazioni dei target enzimatici come la pirofosfatasi. La frequenza di resistenza primaria varia dal 5 al 43% a seconda della specie e dell'origine geografica. Nei ceppi di *C. albicans* appartenenti al clade 1 la resistenza è primaria, dovuta ad una sostituzione amminoacidica nel gene FUR1⁽²⁴⁾.

-Resistenza agli azoli:

a causa del loro largo utilizzo nelle terapie antifungine sono segnalati con una crescente frequenza casi di resistenza in particolare al fluconazolo. I meccanismi di resistenza includono eccesso nella produzione del target, alterazione del target, impossibilità di penetrazione del farmaco e attivazione

di pompe di efflusso.⁽⁷¹⁾

-Resistenza alle echinocandine:

rare sono le segnalazioni di resistenza alle echinocandine, anche per la recente immissione sul mercato di questi farmaci. La resistenza intrinseca o primaria è dovuta ad uno scarso quantitativo di β 1,3 D glucano, mentre la resistenza acquisita coinvolge la mutazione del gene FKS1 che codifica per una subunità della β 1,3 glucano sintasi.⁽⁷²⁾ Tuttavia, soprattutto per la grande variabilità inter e intra laboratorio di sensibilità alla caspofungina non è disponibile avere una reale fotografia delle resistenze.

1.6.4 Test di sensibilità agli antifungini

Il sempre più largo impiego di farmaci antifungini, specie per la profilassi in soggetti immunocompromessi, ha portato all'incremento dell'insorgenza di ceppi resistenti in particolare al fluconazolo.

Inizialmente la metodica utilizzata per saggiare l'efficacia in vitro dei farmaci antifungini è stata la microdiluizione in brodo messa a punto dal gruppo di ricerca americano del Clinical and Laboratory Standards Institute denominata CLSI M27-A3.⁽⁷³⁾

Più recentemente la European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ha redatto un protocollo di micro diluizione in brodo, che si differenziava dal protocollo americano per la composizione del terreno di crescita, più ricco in glucosio (RPMI -1640 al 2% di glucosio), per la lettura spettrofotometrica al posto di quella ottica e per il minor tempo di incubazione (24 ore invece di 48). Inoltre l'inoculo finale deve essere di $0.5-2.5 \times 10^5$ CFU/ml invece che 1×10^3 CFU/ml.⁽⁷⁴⁾

Per entrambe le metodiche è in corso l'individuazione di break-point specie-specifici.

1.6.5 Trattamento delle vulvovaginiti da *Candida*

Nelle linee guida pubblicate nel 2009⁽⁷⁵⁾ il trattamento primario consigliato per le vulvovaginiti da *Candida* è la somministrazione di agenti topici a base di azoli o un trattamento con 150mg di fluconazolo per via orale una volta alla settimana per sei settimane consecutive. Per il trattamento viene consigliata anche una crema a base di flucitosina al 17% per 14 giorni o, in alternativa ovuli a base di acido borico.

Poiché è nota la capacità teratogena degli azoli, nel caso di infezione durante la gravidanza, viene indicato l'uso solo di somministrazioni topiche in quanto la maggior parte degli antifungini hanno mostrato un'azione teratogena in esperimenti in vivo. In uno studio condotto nel 2011 in

Australia⁽⁷⁶⁾ viene messo in luce come, a seguito di una survey a cui parteciparono diversi clinici, non esista un trattamento univoco per le vulvovaginiti e quasi la totalità dei clinici intervistati non seguiva le linee guida pubblicate ma si basava unicamente sulla sua esperienza clinica.

I farmaci più usati risultavano essere gli azoli ma, a seconda del medico interpellato variavano le dosi e le modalità di somministrazione. Attualmente la terapia più seguita consiste in alte dosi di antifungini per 2 settimane, seguite da una somministrazione a lungo termine a dosi meno elevate che può prolungarsi per settimane o mesi a seconda della risposta al trattamento. Questo tipo di terapia è molto costoso e nella maggior parte dei casi il trattamento viene interrotto dalla paziente stessa per mancanza di costanza o per dimenticanza.

Attualmente si sta studiando l'efficacia della creazione di vaccini contro la *Candida* da somministrare nelle donne con ricorrenti episodi di vulvovaginite e in persone affette da vaginite cronica che ricorre nel 4-8% dei casi.⁽⁷⁷⁾

In Italia non viene seguita una particolare linea guida per quel che riguarda il trattamento delle vulvovaginiti da *Candida*, spesso i clinici si affidano alla loro esperienza ma ultimamente sono stati effettuati diversi studi in cui al posto dei farmaci tradizionali venivano usati probiotici o derivati naturali specie in pazienti che mostravano resistenza alla terapia classica con fluconazolo.⁽⁷⁸⁻⁷⁹⁾

1.6.6 Trattamento della candidemia e della candidosi invasiva

Recentemente sono state pubblicate le linee guida americane e europee per il trattamento della candidemia e della candidosi invasiva che prevedono un diverso approccio in presenza o assenza di neutropenia.

Secondo le linee guida dell'Infectious Diseases Society of America (IDSA) per la maggior parte dei pazienti adulti non neutropenici è raccomandato fluconazolo o un'echinocandina. Il trattamento con echinocandina è ritenuto più idoneo per i pazienti con malattia grave o moderatamente grave e per i pazienti precedentemente esposti ad azoli. Fluconazolo è raccomandato per i pazienti meno critici e che non hanno avuto una precedente esposizione ad azoli. Lo stesso approccio terapeutico è indicato per i bambini tenendo conto delle differenze nelle posologie. Il voriconazolo è efficace per la candidemia, ma non offre particolari vantaggi rispetto al fluconazolo. La transizione da una echinocandina a fluconazolo è raccomandata per quei pazienti con infezione da *Candida* sensibili a fluconazolo (es. *C. albicans*) e che sono clinicamente stabili. Per le infezioni da *C. glabrata* si dà la preferenza ad una echinocandina. Il passaggio a fluconazolo o voriconazolo non è raccomandato in assenza di conferma di elevata sensibilità agli azoli del ceppo responsabile di infezione. Per le infezioni da *C. parapsilosis* è raccomandato il trattamento con fluconazolo. Si può comunque continuare con il trattamento con echinocandine in caso di miglioramento clinico e colture negative

al follow-up. In caso di intolleranza a questi antifungini (azoli e echinocandine) si consiglia una formulazione lipidica di amfotericina B. La durata della terapia della candidemia in assenza di localizzazioni metastatiche è di circa due settimane dopo la documentazione dell'eliminazione della *Candida* dal sangue e la risoluzione dei sintomi. La rimozione dei cateteri intravenosi è fortemente raccomandata. Per i pazienti neutropenici è raccomandato il trattamento con una echinocandina (caspofungina, micafungina, anidulafungina) o con amfotericina B lipidica. Per i pazienti meno critici e che non hanno avuto una precedente esposizione agli azoli il fluconazolo rappresenta una valida alternativa. Per le infezioni da *C. glabrata* si dà la preferenza ad una echinocandina o amfotericina B lipidica, mentre per le infezioni da *C. parapsilosis* si preferisce fluconazolo o amfotericina B lipidica e per le infezioni da *C. krusei* viene raccomandata una echinocandina o amfotericina B lipidica o voriconazolo.

Secondo le linee guida europee dell'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) per i pazienti ricoverati nelle ICU viene raccomandata la profilassi con fluconazolo. Nei pazienti adulti con diagnosi di candidemia sono altamente raccomandate le tre echinocandine. Il trattamento con amfotericina B e voriconazolo viene considerato come seconda scelta e il fluconazolo viene marginalmente raccomandato solo se l'infezione è dovuta a *C. parapsilosis*. Viene inoltre fortemente incoraggiata la rimozione di cateteri vascolari.

1.7 Prevenzione della candidemia e delle candidosi invasive

La prevenzione di gravi infezioni da *Candida* è importante a causa della mortalità elevata riscontrata anche in presenza di adeguata terapia antifungina. La miglior strategia è quella di individuare la popolazione a rischio di candidosi invasiva identificando e trattando tempestivamente le colonizzazioni. Specialmente nella popolazione neonatale il rischio di gravi conseguenze a seguito di candidemia non è da sottovalutare. Infatti in questa popolazione sono frequenti le complicanze metastatiche in particolare quelle concernenti lo sviluppo neurologico. I neonati si infettano frequentemente durante il parto se la madre è portatrice di infezione vaginale; al momento del parto possono infatti ingoiare facilmente liquido contaminato da *Candida* e sviluppare una colonizzazione che può sfociare in una candidemia nei neonati più a rischio. E' perciò importante effettuare uno screening durante la gravidanza per diagnosticare vulvovaginite da trattare prima del parto.

1.7.1 Misure di controllo delle infezioni

La trasmissione di *Candida* tra staff medico e paziente e tra paziente e paziente è stata documentata in diversi studi.⁽⁸⁰⁾ L'accurato lavaggio delle mani e l'uso di guanti prima di entrare in contatto con il paziente è un buon metodo di prevenzione. Da precedenti studi è emerso come solo il 40% del personale sanitario si lavi le mani prima di accudire un paziente e che sarebbe sufficiente una più accurata igiene personale per evitare questo tipo di infezioni. Deve essere scoraggiato l'uso di unghie finte o ricostruite da parte del personale d'assistenza in quanto rappresentano un importante reservoir di infezione.⁽⁸¹⁾ Particolare attenzione deve essere posta alla diagnosi e successiva cura di onicomicosi, perioniciti e intertrigine delle mani del personale di assistenza.

1.7.2 Chemiopprofilassi antifungina

La chemiopprofilassi con antifungini sistemici dovrebbe essere riservata ai pazienti a più elevato rischio e durante il periodo di maggior rischio.

La profilassi con fluconazolo nei pazienti con leucemia acuta ha abbassato notevolmente l'incidenza di candidosi invasiva.⁽⁸²⁾ Il fluconazolo è stato somministrato con successo nella prevenzione di candidemia in pazienti con una degenza in Terapia Intensiva superiore a 5 giorni, anche se questo trattamento non è risultato associato ad un aumento di sopravvivenza in questa popolazione.⁽⁸³⁾

La profilassi con fluconazolo è risultata particolarmente utile nei trapiantati di fegato e pancreas e nei neonati prematuri riducendo in modo significativo l'incidenza d'infezioni disseminate e sistemiche.⁽⁸⁴⁾

2.OBIETTIVI

Gli obiettivi da perseguire nei tre anni di Dottorato sono stati i seguenti:

- 1) valutare l'evoluzione dell'epidemiologia della candidemia in termini di incidenza, fattori di rischio, specie coinvolte a dieci anni di distanza da un precedente studio sulla candidemia, condotto in Lombardia nel biennio 1997-1999;
- 2) saggiare la sensibilità agli antifungini in vitro e la capacità di produrre biofilm dei ceppi responsabili di candidemia nello studio del 2009;
- 3) ricercare la prevalenza del cluster genotipico GPG di *C. albicans*, particolarmente frequente come causa di sepsi e di mortalità nei pazienti di Terapia Intensiva Neonatale, come causa di vaginite, che rappresenta la principale fonte d'infezione verticale al momento del parto;
- 4) ricercare la prevalenza del cluster genotipico GPG come causa di colonizzazione del tratto alimentare e verificare, tramite metodica MLST, l'identità dei ceppi di *C. albicans*, isolati da più siti anatomici dello stesso paziente, come possibile rischio per lo sviluppo di un'infezione disseminata;
- 5) comparare il pattern di sensibilità agli antifungini dei ceppi di *C. albicans* GPG+ e GPG-.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Candidemia

Uno studio epidemiologico prospettico sulla candidemia è stato condotto in Lombardia dal gennaio al dicembre 2009 con la partecipazione di 30 laboratori di microbiologia.

Per ciascun caso è stato compilato un questionario contenente dati demografici fattori predisponenti la candidemia, profilassi e trattamento antifungino ed evoluzione a 30 giorni dalla diagnosi (figura 2). Un “memento” è stato inviato ogni mese per email ai microbiologi per essere sicuri che venissero riportati tutti i casi di candidemia che si verificavano.

I ceppi isolati da sangue sono stati inviati al Laboratorio di Micologia Medica del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute dell'Università degli studi di Milano per le indagini microbiologiche quali identificazione, sensibilità in vitro agli antifungini e produzione di biofilm.

I dati epidemiologici raccolti nell'indagine del 2009 sono stati confrontati con le informazioni provenienti da un analogo studio condotto nella stessa regione nel biennio 1997-99⁽³⁵⁾. I tassi specifici per gli ospedali erano basati sul numero di ammissioni e sono stati gentilmente forniti dalla Direzione Generale Sanità-Regione Lombardia. Il test del χ^2 è stato usato per l'analisi statistica delle due popolazioni e un valore di $p < 0,05$ è stato considerato come statisticamente significativo.

PATIENT			
Patient code	Sex: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F	Date of birth (mm/yyyy) __/__/----	
Hospital	Ward		
DIAGNOSIS OF CANDIDEMIA			
Date of first positive blood sample dd/mm/yyyy __/__/----		<input type="checkbox"/> 1st episode	<input type="checkbox"/> relapse
Blood puncture from <input type="checkbox"/> catheter <input type="checkbox"/> vein			
Blood culture system on which yeast infection was diagnosed			
<input type="checkbox"/> BactAlert system: <input type="checkbox"/> aerobe; <input type="checkbox"/> anaerobe <input type="checkbox"/> Bactec system: <input type="checkbox"/> aerobe; <input type="checkbox"/> anaerobe; <input type="checkbox"/> mycosis; <input type="checkbox"/> pediatric <input type="checkbox"/> Lysis centrifugation <input type="checkbox"/> other, specify			
Candida species identified			
Other fungi/bacteria isolated in the same vial, specify			
Date of the last positive blood sample dd/mm/yyyy __/__/----			
Total number of positive blood cultures/total number of blood cultures (total aerobe+anaerobe+mycosis vials) __/__/--			
IV LINE			
<input type="checkbox"/> IV line in situ at time of the first positive blood culture: <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> yes, specify			
<input type="checkbox"/> IV line removed after the diagnosis of candidemia: <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> yes, date of removal dd/mm/yyyy __/__/----			
Catheter cultured: <input type="checkbox"/> no; <input type="checkbox"/> yes negative; <input type="checkbox"/> yes positive: <input type="checkbox"/> same yeast species/ <input type="checkbox"/> other fungi/bacteria, specify			
ISOLATION OF CANDIDA FROM NORMALLY STERILE BODY SITES other than blood			
<input type="checkbox"/> Positive cultures from normally sterile body sites (other than blood)			
Body site	date dd/mm/yyyy __/__/----	Candida species	
Body site	date dd/mm/yyyy __/__/----	Candida species	
Body site	date dd/mm/yyyy __/__/----	Candida species	
Body site	date dd/mm/yyyy __/__/----	Candida species	
<input type="checkbox"/> No positive culture from a normally sterile body site (other than blood)			
<input type="checkbox"/> Not done			
OTHER POSITIVE TEST			
Test	date dd/mm/yyyy __/__/----	body site	result
Test	date dd/mm/yyyy __/__/----	body site	result
<input type="checkbox"/> no other positive test			
<input type="checkbox"/> not done			
CANDIDA COLONISATION, within 2 weeks prior to diagnosis of invasive Candida infection			
Cultures: <input type="checkbox"/> not done <input type="checkbox"/> negative <input type="checkbox"/> positive, specify number of body sites: <input type="checkbox"/> one; <input type="checkbox"/> two; <input type="checkbox"/> three; <input type="checkbox"/> > three			
Body site	date dd/mm/yyyy __/__/----	Candida species	
Body site	date dd/mm/yyyy __/__/----	Candida species	
Body site	date dd/mm/yyyy __/__/----	Candida species	
Body site	date dd/mm/yyyy __/__/----	Candida species	
Number of positive sites / total number of cultured sites __/__(colonisation index)			
CANDIDA ISOLATES SENT TO THE NATIONAL COORDINATOR			
Ref.number:	Identification	Cultured from:	date __/__/--
/----			
Ref.number:	Identification	Cultured from:	date __/__/----
CORRESPONDING MICROBIOLOGIST			
Name	Hospital		
Phone	E-mail address		

Figura 2: questionario sorveglianza della candidemia

PATIENT		
Patient code	Sex: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F	Date of birth (mm/yyyy) __/__/____
Country of origin	Hospitalization date dd/mm/yyyy __/__/____	
Date of first positive blood culture dd/mm/yyyy __/__/____		

RISK FACTORS/UNDERLYING DISEASE	
<input type="checkbox"/> General Surgery, <i>specify</i>	date __/__/____
<input type="checkbox"/> Solid organ transplant, <i>specify</i>	date __/__/____
<input type="checkbox"/> Solid cancer, <i>specify</i>	date of diagnosis __/__/____
<input type="checkbox"/> Hematological malignancies: <input type="checkbox"/> Leukemia / <input type="checkbox"/> Lymphoma, <i>specify</i>	date of diagnosis __/__/____
Disease stage at time of candidemia: <input type="checkbox"/> onset <input type="checkbox"/> complete/ <input type="checkbox"/> partial remission <input type="checkbox"/> resistant <input type="checkbox"/> relapse <input type="checkbox"/> other, <i>specify</i>	
Last therapy for underlying disease: <input type="checkbox"/> 1 st / <input type="checkbox"/> 2 nd line chemotherapy <input type="checkbox"/> maintenance <input type="checkbox"/> other, <i>specify</i>	
<input type="checkbox"/> Hemopoietic stem cell transplant	date __/__/____
<input type="checkbox"/> autologous <input type="checkbox"/> allogeneic (<input type="checkbox"/> matched related; <input type="checkbox"/> matched unrelated; <input type="checkbox"/> mismatched; <input type="checkbox"/> aplotype; <input type="checkbox"/> umbelical cord)	
<input type="checkbox"/> myeloablative (<input type="checkbox"/> related; <input type="checkbox"/> unrelated) <input type="checkbox"/> non myeloablative (<input type="checkbox"/> related; <input type="checkbox"/> unrelated)	
<input type="checkbox"/> Bone marrow transplant	date __/__/____
<input type="checkbox"/> Graft versus host disease (<input type="checkbox"/> acute; <input type="checkbox"/> chronic)	date of diagnosis __/__/____
<input type="checkbox"/> Severe neutropenia (<500/mm ³), <i>specify time and duration of neutropenia</i>	
<input type="checkbox"/> Diabetes (<input type="checkbox"/> type I; <input type="checkbox"/> type II)	
<input type="checkbox"/> HIV infection (CD4 number/mm ³	date of diagnosis __/__/____
<input type="checkbox"/> Fetal immaturity birth weight	weeks of gestation.....
<input type="checkbox"/> Intensive care date of admission in ICU __/__/____ <input type="checkbox"/> single/ <input type="checkbox"/> multiple bedroom	
APACHE II score..... SAPS III score	SOFA score at onset of invasive Candida infection:.....
<input type="checkbox"/> Burn, <i>specify % of burned body surface</i>	date __/__/____
<input type="checkbox"/> Broad-spectrum antibiotics given within 2 weeks prior to blood <i>Candida</i> detection	<input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> PO
<input type="checkbox"/> Corticosteroids, <i>specify drugs, dosage, period of treatment</i>	
<input type="checkbox"/> Immunosuppressive drugs, <i>specify drugs, dosage, period of treatment</i>	
<input type="checkbox"/> Total parenteral nutrition, <i>specify period</i>	
<input type="checkbox"/> Intravascular lines: <input type="checkbox"/> peripheral; <input type="checkbox"/> central catheter; <input type="checkbox"/> implanted port (Port-a-cath); <input type="checkbox"/> other, <i>specify</i>	
date of insertion dd/mm/yyyy __/__/____	
<input type="checkbox"/> Dialysis: <input type="checkbox"/> peritoneal; <input type="checkbox"/> hemodialysis; <input type="checkbox"/> hemofiltration (due to acute renal failure); <input type="checkbox"/> other, <i>specify</i>	
<input type="checkbox"/> Prosthetic device, <i>specify type and date of insertion</i>	
<input type="checkbox"/> Other, <i>specify</i>	

CLINICAL & BIOLOGICAL SIGNS AT TIME OF CANDIDEMIA	
White blood count/ mm ³	<input type="checkbox"/> Shock related to candidemia
Organ involvement: <input type="checkbox"/> central nervous system, <i>specify</i>	<input type="checkbox"/> eye, <i>specify</i>
<input type="checkbox"/> heart, <i>specify</i>	<input type="checkbox"/> other, <i>specify</i>
Documented: <input type="checkbox"/> clinically; <input type="checkbox"/> histologically; <input type="checkbox"/> by X-ray, CTscan, NMR, <i>specify</i>	

MANAGEMENT	
Systemic antifungal prophylaxis (or treatment) given within 2 weeks prior to diagnosis of invasive <i>Candida</i> infection	
<input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> yes, <i>specify drug(s) and period</i>	
Treatment of invasive <i>Candida</i> infection	
<input type="checkbox"/> no	drug dosage from dd/mm __/__ to
<input type="checkbox"/> yes, <i>specify</i> →	drug dosage from dd/mm __/__ to dd/mm
	drug dosage from dd/mm __/__ to dd/mm
Line(s) removed after detection of invasive <i>Candida</i> infection: <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> yes	
Ophthalmoscopic examination: <input type="checkbox"/> done <input type="checkbox"/> not done	

OUTCOME (at day 30 after diagnosis of invasive <i>Candida</i> infection)	
<input type="checkbox"/> Survived	<input type="checkbox"/> Candidemia related complications, <i>specify</i>
<input type="checkbox"/> Dead, date dd/mm/yyyy __/__/____	autopsy performed <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> yes, <i>specify</i>
<input type="checkbox"/> Lost at follow up, date dd/mm/yyyy __/__/____	

3.2 Candidosi vaginali e colonizzazioni da *Candida albicans*

Nel periodo 2011-13 sono stati raccolti 461 ceppi di *C. albicans* isolati da essudato vaginale e 159 ceppi provenienti da pazienti con colonizzazione del tratto alimentare. I ceppi sono stati inviati al Laboratorio di Micologia Medica del Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute dell'Università degli Studi di Milano da quattro centri partecipanti allo studio: Ospedale Maggiore Policlinico Fondazione IRCCS Cà Granda di Milano, Azienda Ospedaliera S. Anna di Como, Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti di Bergamo e IRCCS Policlinico San Donato di Milano.

Le informazioni riguardanti i pazienti sono state raccolte attraverso questionari, compilati dal microbiologo dei vari centri partecipanti, uno relativo alle donne con infezione vaginale e uno relativo ai pazienti colonizzati. Per ogni paziente veniva richiesta la data di isolamento del ceppo, l'età e il gruppo etnico. Nel questionario relativo alle vaginiti venivano riportate informazioni relative allo stato di gravidanza e in quello relativo alle colonizzazioni dati sul reparto di degenza e sesso del paziente.

I ceppi giunti al laboratorio già identificati come *C. albicans* sono stati ricontrrollati per confermarne l'identificazione e sono stati sottoposti ad analisi molecolare per identificarne l'appartenenza al cluster GPG mediante duplex colony PCR con due set di primer. Per 204 ceppi risultati GPG+ e 164 ceppi GPG- è stata saggiata la sensibilità in vitro agli antifungini. La parte del sequenziamento tramite metodica MLST di 50 ceppi provenienti da più siti di colonizzazione è stata effettuata presso la Massey University di Palmerston North in Nuova Zelanda sotto la supervisione del Dr Jan Schmid.

3.3 Identificazione dei ceppi

I ceppi giunti al laboratorio sono stati sottoposti ad identificazione mediante metodi morfologici e biochimici.

I ceppi sono stati seminati su terreno differenziale cromogeno CHROMagar (CHROMagarTMCandida Parigi) per verificarne la vitalità e la purezza. L'identificazione della specie è stata verificata mediante produzione di tubi di germinazione in siero di cavallo, morfologia microscopica della coltura fatta crescere su terreno patata-carota-bile a 28°C e profili di assimilazione degli zuccheri con il sistema ID 32 C (bioMerieux, Bagno a Ripoli, Firenze).

3.3.1 Crescita su CHROMagar

La semina sul terreno cromogeno CHROMagar consente di evidenziare eventuali colture miste in quanto le colonie assumono colore differente a seconda della specie: *C. albicans* assume una colorazione verde, *C. tropicalis* blu, *C. krusei* rosa e *C. glabrata* viola (figura 3)



Figura 3: crescita su CHROMagar di varie specie di *Candida*

3.3.2 Germinazione in siero di cavallo

Tramite un'ansa sterile si preleva una piccola quantità di patina dalla piastra di SDA e si inocula in una provetta eppendorf contenente 800 µl di siero di cavallo. Dopo 3-4 ore d'incubazione a 37°C si preleva una goccia della sospensione, si mette su un vetrino portaoggetto, la si copre con un vetrino coprioggetto e si osserva al microscopio (40x) per evidenziare la presenza di tubi germinativi che emergono dalle blastospore in assenza di restringimento (figura 4). La formazione di questo tipo di tubi germinativi è tipica della *C. albicans*.



Figura 4: tubi di germinazione di *Candida albicans*

3.3.3 Morfologia su PCB agar

La patina di lievito viene seminata, mediante lancetta sterile, incidendo il PCB agar e successivamente i bordi dell'incisione vengono riaccostati creando così una condizione di anaerobiosi. Dopo 24 ore d'incubazione a 28°C si preleva un frammento di agar scegliendo la zona in cui si è sviluppato il micelio, si depone il frammento tra vetrino portaoggetti e copri oggetti, si scioglie delicatamente alla fiamma e si osserva al microscopio. *C. albicans* in queste condizioni di

crescita sviluppa pseudomicelio, micelio vero e le tipiche clamidospore apicali, cellule globose, a parete spessa e rifrangente (figura 5).



Figura 5: clamidospore di *Candida albicans*

3.4 Produzione di biofilm

La produzione di biofilm viene evidenziata con la metodica messa a punto da Ramage et al. che utilizza la reazione di riduzione del 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT; Sigma-Chemical, ST.Louis, Mo).⁽⁸⁵⁾ In questa reazione l'XTT è ridotto dalla deidrogenasi mitocondriale in un prodotto formazan idrosolubile che determina un cambiamento di colore. Gli isolati vengono sospesi in terreno RPMI ad una concentrazione finale di 1×10^6 CFU/ml; 100 μ l di sospensione vengono poi inoculati in un pozzetto di una piastra a 96 pozzetti a fondo piatto e incubati per 24 ore a 35°C; ad ogni pozzetto, precedentemente lavato, e al pozzetto di controllo vengono aggiunti 100 μ l di XTT (1 mg/ml in PBS; 0.15M phosphate buffer saline) e 1 μ l di Menadione (Sigma-Chemical, St.Louis, Mo; preparato in acetone). Le piastre vengono poi incubate per 2 ore al buio a temperatura ambiente, e la reazione di riduzione dell'XTT viene letta allo spettrofotometro a 490 nm. La percentuale di trasmittanza ($\%T = 10^{-\text{assorbanza}} \times 100$), calcolata dall'assorbanza, è inversamente proporzionale alla densità cellulare del biofilm. Il saggio viene eseguito in triplo.

Alla produzione di biofilm viene assegnata una valutazione numerica: 6+ ($\%T \leq 5$), 5+ ($\%T 6-10$), 4+ ($\%T 11-20$), 3+ ($\%T 21-40$), 2+ ($\%T 41-60$), o 1+ ($\%T > 60$). Quando si ottiene un punteggio di 6+ o 5+ si considera il ceppo un buon produttore di biofilm.

3.5 Sensibilità in vitro agli antifungini

Per saggiare la sensibilità dei ceppi agli antifungini è stata utilizzata la metodica della microdiluizione in brodo secondo il protocollo redatto dalla commissione EUCAST.

Lo scopo di questo metodo è saggiare la sensibilità dei lieviti agli antifungini determinando la minima concentrazione inibente (MIC). La MIC permette di caratterizzare i ceppi come suscettibili (S), intermedi (I) o resistenti (R) nei confronti dell'antifungino in base ai breakpoints indicati nel protocollo (tabella 2). I breakpoints EUCAST sono stati usati per identificare i ceppi di *Candida* resistenti all'anidulafungina, alla micafungina, al fluconazolo, al posaconazolo e al voriconazolo. Per la caspofungina e la 5-fluorocitosina sono stati utilizzati i breakpoints CLSI in quanto non sono stati ancora resi disponibili per questi antifungini. Per suscettibile si intende un ceppo fungino inibito in vitro da una concentrazione di antifungino che viene associata ad un alto successo terapeutico; per intermedio si intende un ceppo inibito in vitro da una concentrazione di antifungino associata in terapia ad un dubbio successo terapeutico e per resistente si intende un ceppo inibito in vitro da una concentrazione di antifungino che viene considerata fallimentare in ambito terapeutico. Il test viene effettuato in piastre sterili a 96 pozzetti a fondo piatto in cui vengono dispensati 100µl per ogni pozzetto di una soluzione antifungina in ordine crescente di concentrazione sulla stessa riga a cui viene aggiunto un inoculo in un volume di 100µl. Nel primo e nell'ultimo pozzetto di ogni riga viene dispensato terreno di coltura senza antifungino, uno viene usato come controllo positivo di crescita, inoculando 100µl di soluzione contenente il ceppo, e uno usato come controllo di sterilità aggiungendo 100µl di acqua sterile.

Sono stati saggiati: fluconazolo (Pfizer Central Research, Sandwich, UK), voriconazolo (Molekula Ltd, Wimborne Dorset, UK), posaconazolo (Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, NJ), caspofungina (Merck & Co., Whitehouse Station, NJ), micafungina (Astellas Pharma, Tokyo, Japan), anidulafungina (Pfizer) e 5-fluorocitosina (Sigma-Chemical, Milan, Italy).

Tabella 2: breakpoints di MIC per identificare ceppi resistenti

Specie	MIC (mg/L) breakpoints					
	Fluco	Caspo	Anidula	Mica	5FC	Amfo B
<i>C. albicans</i>	>4	≥1	>0.015	≥1	>16	>1
<i>C. parapsilosis</i>	>4	≥8	NA	≥8	>16	>1
<i>C. tropicalis</i>	>4	≥1	>0.06	≥1	>16	>1
<i>C. krusei</i>	*	≥1	>0.12	≥1	>16	>1
<i>C. glabrata</i>	>8	≥0.5	>0.06	≥0.25	>16	>1

*intrinsecamente resistente

Preparazione delle soluzioni di antifungino

Le soluzioni di antifungino sono state preparate partendo dalla formulazione in polvere fornita dalle ditte produttrici e non utilizzando le soluzioni già preparate per l'uso clinico in quanto possono contenere eccipienti che interferiscono con la suscettibilità. Le soluzioni sono state preparate tenendo conto della potenza del farmaco riportata dalla casa produttrice e, per calcolare la giusta quantità di polvere e di solvente è stata usata la seguente formula:

$$\text{Peso (g)} = \frac{\text{Volume (L)} \times \text{Concentrazione (mg/L)}}{\text{Potenza (mg/g)}}$$

$$\text{Volume (L)} = \frac{\text{Peso (g)} \times \text{Potenza (mg/g)}}{\text{Concentrazione (mg/L)}}$$

Il range delle concentrazioni saggate è stato scelto per comprendere i breakpoints indicati per le differenti specie sulla base di risultati ottenuti con ceppi di controllo internazionalmente riconosciuti.

Gli antifungini sono stati sciolti in acqua o dimetilsolfossido (DMSO) a seconda delle caratteristiche dell'antifungino stesso come mostrato in tabella 3.

Tabella 3: caratteristiche degli antifungini e solvente usato

Antifungino	Caratteristica	Solvente	Range concentrazioni (mg/L)
Fluconazolo	Idrofilo	Acqua	0.25-128
Voriconazolo	Idrofobo	DMSO	0.016-8
Posaconazolo	Idrofobo	DMSO	0.016-8
5-Fluorocitosina	Idrofilo	Acqua	0.25-128
Caspofungina	Idrofobo	DMSO	0.007-4
Anidulafungina	Idrofobo	DMSO	0.007-4
Micafungina	Idrofobo	DMSO	0.015-8

DMSO= Dimetilsolfossido

Preparazione dell'inoculo

I ceppi sono stati seminati su terreno SDA e incubati per la crescita a 35°C. Una volta cresciuto il ceppo è stato sospeso in 2.5 ml di acqua sterile. La densità cellulare è stata paragonata alla densità standard di 0.5 McFarland misurando l'assorbanza a 530nm per ottenere all'incirca una sospensione fungina di $1-5 \times 10^6$ CFU/ml. E' stata infine calcolata la quantità di soluzione da aggiungere al terreno di crescita RPMI con l'aggiunta di glucosio al 2% per raggiungere una concentrazione finale compresa tra 0.5×10^5 e 2.5×10^5 CFU/ml. In ogni pozzetto della piastra da 96 sono stati inoculati 100µl di sospensione, è stata aggiunta inoltre una sospensione contenente un controllo di crescita senza antifungino e una soluzione contenente solo terreno di crescita come controllo di sterilità. Le piastre sono state incubate a 35°C per 24 ore. Per ogni sessione oltre ai ceppi da saggiare sono stati inseriti 2 ceppi di controllo, *C. parapsilosis* ATCC22019 e *C. krusei* ATCC 6258.

Dopo 24 ore le piastre sono state lette tramite spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 450nm.

3.6 Analisi molecolare dei ceppi di *C. albicans*

3.6.1 Ricerca del cluster genotipico GPG

Amplificazione del DNA e elettroforesi su gel d'agarosio

I ceppi sono stati amplificati mediante PCR usando un protocollo di duplex colony PCR (tabella 6) con due set di primer MG1pf e MG1pr, YWP1pf e YWP1pr (tabella 4) rispettivamente specifici per le regioni YHB4 (simile alla flavoemoglobina), e per una proteina coinvolta nel mantenimento dell'integrità della parete cellulare.⁽⁸⁶⁾

Per la reazione di amplificazione sono stati usati reagenti presenti nel kit di amplificazione (Qiagen, Milano, Italia) alle seguenti concentrazioni in 20 µl di volume: 10X PCR buffer II (10mM Tris-HCl, pH 8.3 [a 25°C]; 500 mM KCl); Q solution; 25 mM di MgCl₂; 200 µM di ogni deossinucleotide trifosfato (dNTP.); 20 pmol del primer forward e del primer reverse; 5 U di Qiagen Taq polimerasi e 400 ng di DNA. (tabella 5)

Per ogni campione sono stati aggiunti in una provetta per PCR 20 µl di miscela di reazione e una piccolissima quantità di cellule prelevata tramite puntale sterile direttamente dalla piastra di crescita. In seguito ciascuna provetta è stata inserita nel termociclatore per effettuare la reazione di PCR.

La separazione dei prodotti di amplificazione è stata effettuata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio (Sigma) in TBE 1X (0,089 M Trizma base, 0,089 M acido borico, 0,002 M EDTA, pH 8,0, Sigma) al 2,5% di concentrazione.

Una volta solidificato il gel viene trasferito in una cella elettroforetica (BioRad) e immerso nel tampone di corsa (TBE). In ogni pozzetto sono stati trasferiti i 20 µl di campione amplificato. Oltre ai campioni è stato caricato un marker di riferimento (100bp Molecular Ladder, Applied Biosystems), un controllo positivo ed un controllo negativo. Infine il gel è stato fatto correre per circa 2 ore a 70 V/cm, colorato con etidio bromuro e visualizzato mediante un transilluminatore (BioRad) per poi essere fotografato.

Le fotografie sono state quindi analizzate per confrontare i pattern di corsa dei diversi campioni con quello dei ceppi di controllo, 3 ceppi GPG positivi (OD8911, AU90 e RIHO13) e 3 ceppi negativi (GAYMC, CLB44 e W142) forniti dall'equipe della Massey University di Palmerston North, Nuova Zelanda che ha messo a punto il protocollo di identificazione molecolare.

Per essere considerato GPG il ceppo deve avere la banda corrispondente a MG1 (767 bp) e la banda corrispondente a YWP1 (275 bp) (figura 6).

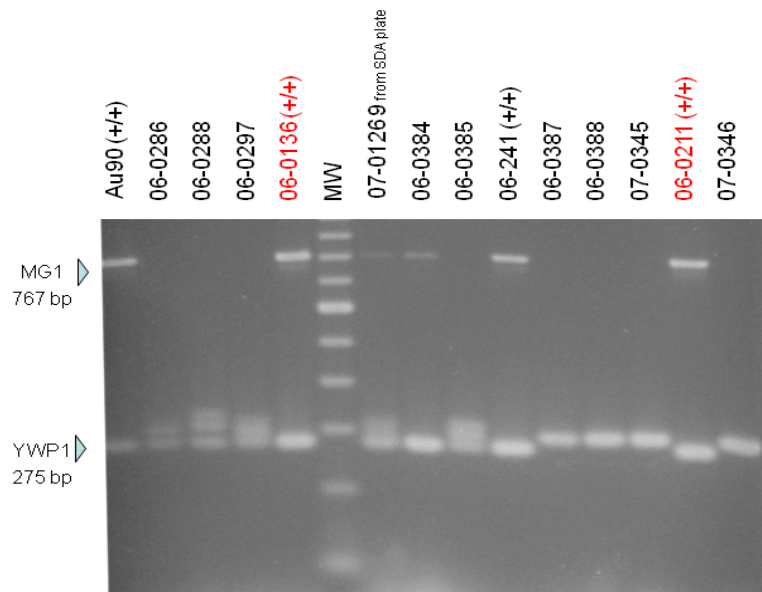


Figura 6: pattern di amplificazione su gel d'agarosio

Tabella 4: primer utilizzati nella reazione d'amplificazione

Primer	Sequenze
MG1pf:	CCTCCCTTCTCTTAAGAG
MG1pr:	AACAGGAGAGGTTAAGAG
YWP1pf:	TCAAGTTCTGCTTCCCCATCG
YWP1pr:	CGTGGACCGTAGTGACACCAATAC

Tabella 5: composizione della miscela di reazione

H ₂ O	7,0 µl
Q solution	4,0 µl
dNTP(2mM)	2,5 µl
10x buffer	2,0 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,0 µl
MG1pf (10 pmol/µl)	1,5 µl
MG1pr (10pmol/µl)	1,5 µl
YWP1pf(10pmol/µl)	0,3 µl
YWP1pr(10pmol/µl)	0,3 µl
Taq (5U/µl)	0,2 µl

Tabella 6: condizioni di duplex colony PCR

N° CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	96°C x 5'		
30	94°C x 45''	50°C x 1'	72°C x 1'
1			72°C x 7'

3.6.2 Genotipizzazione dei ceppi colonizzanti

Multi Locus Sequence Typing

Cinquanta ceppi provenienti da pazienti che presentavano più di un sito di colonizzazione sono stati inviati presso la Massey University per essere sequenziati tramite metodica Multi Locus Sequence Typing o MLST per determinare se fossero presenti variazioni nella sequenza del DNA amplificando e sequenziando 7 geni housekeeping che caratterizzano il genoma di *Candida albicans* e per determinare se il ceppo responsabile della colonizzazione di un sito d'infezione fosse responsabile anche della colonizzazione di un altro sito nello stesso paziente, segno che il paziente potrebbe essere un buon candidato per lo sviluppo di candidemia.

La metodica comprende l'estrazione e la quantificazione del DNA, l'amplificazione, la purificazione dell'amplificato e il sequenziamento. Per effettuare questa metodica occorre che il DNA estratto venga amplificato tramite reazione di PCR (Tabella 9) per ciascuna delle 7 coppie di primer (Tabella 7). Una volta avvenuta la reazione di amplificazione viene effettuata la corsa elettroforetica su gel per 1 ora a 80v/cm e, avuta conferma dell'amplificazione, l'amplificato viene purificato tramite kit ed inviato al laboratorio di riferimento per essere sequenziato. Le sequenze così ottenute vengono comparate alle sequenze di riferimento universalmente riconosciute di *C. albicans* per identificarne il genotipo di appartenenza.

Estrazione e quantificazione del DNA

Il DNA è stato estratto mediante il Kit commerciale DNeasy Mini Kit (QIAGEN) a partire da colonie cresciute per 24 ore su terreno SDA. La patina fungina, prelevata dalla piastra tramite ansa sterile, è stata trasferita in un mortaio e ridotta ad una soluzione omogenea di colore latteo tramite aggiunta di azoto liquido. La soluzione ottenuta è stata trasferita in una eppendorf da 150ml a cui vengono aggiunti 400 µl di buffer AP1 4 µl di RNasi, vortexata e incubata per 10 minuti a 65°C invertendola 2-3 volte. Sono stati aggiunti 130 µl di Buffer AP2 e incubato per 5 minuti in ghiaccio. In seguito si è centrifugato per 5 minuti a 14.000 rpm. Il lisato ottenuto è stato trasferito in una colonna QIAshredder e centrifugato per 2 minuti a 14.000 rpm. Il liquido ottenuto è stato trasferito in un nuovo tubo a cui viene aggiunto il Buffer AP3/E portando la soluzione a 1.5 di volume. 650 µl della soluzione sono stati trasferiti in una colonna DNeasy Mini e centrifugati per 1 minuto a 8000 rpm. Il liquido di scarto viene buttato e si ricentrifuga per 1 minuto a 8000 rpm. La colonna è stata messa in un nuovo tubo per centrifuga e, aggiunti 500µl di Buffer AW, centrifugato per 1 minuto a 8000 rpm, scartando in seguito il filtrato. Sono stati aggiunti altri 500 µl di Buffer AW e centrifugato il tutto per 2 minuti a 14.000 rpm. A questo punto la colonna è stata trasferita in un nuovo tubo da 1,5 ml, sono stati aggiunti 100 µl di Buffer AE e incubati per circa 20 minuti a

temperatura ambiente. Alla fine si è centrifugato per 1 minuto a 8000 rpm, eliminata la colonna e il liquido filtrato contenente il DNA cellulare viene conservato a 4°C fino all'utilizzo.

La concentrazione del DNA estratto è stata misurata mediante spettrofotometro (Pharmacia Biotech) ad una lunghezza d'onda di 260 nm. La purezza del DNA viene determinata calcolando il rapporto fra l'assorbanza del DNA (260 nm) e delle proteine (280 nm) e considerando ottimali valori tra 1,8 e 2,0.

Il DNA viene successivamente stoccato a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

Tabella 7: primer MLST

Primer	Sequenze
AAT1a pf:	ACTCAAGCTAGATTTTTGGC
AAT1a pr:	CAGCAACATGATTAGCCC
ACC1 pf:	GCAAGAGAAATTTTAATTCAATG
ACC1 pr:	TTCATCAACATCATCCAAGTG
ADP1 pf:	GAGCCAAGTATGAATGATTTG
ADP1 pr:	TTGATCAACAAACCCGATAAT
MPIb pf:	ACCAGAAATGGCCATTGC
MPIb pr:	GCAGCCATGCATTCAATTAT
SYA1 pf:	AGAAGAATTGTTGCTGTTACTG
SYA1 pr:	GTTACCTTTACCACCAGCTTT
VPS13 pf:	TCGTTGAGAGATATTCGACTT
VPS13 pr:	ACGGATGGATCTCCAGTCC
ZWF1b pf:	GTTTCATTTGATCCTGAAGC
ZWF1b pr:	GCCATTGATAAGTACCTGGAT

Tabella 8: composizione della miscela di reazione

H ₂ O	11,3 µl
Q solution	5,0 µl
dNTP(2mM)	2,5 µl
10x buffer (+MgCl ₂)	2,0 µl
pf (10 pmol/µl)	1 µl
pr (10pmol/µl)	1 µl
Taq (5U/µl)	0,2 µl

Tabella 9: condizioni di PCR per MLST

N° CICLI	DENATURAZIONE	ANNEALING	ESTENSIONE
1	94°C x 2'		
30	94°C x 45''	54°C x 45''	72°C x 30''
1			72°C x 7'

4. RISULTATI

4.1 Studio epidemiologico sulla candidemia

4.1.1 Studio epidemiologico 2009

Durante lo studio epidemiologico del 2009 a cui hanno partecipato 30 centri ospedalieri lombardi è stato riscontrato un tasso medio di candidemia di 1,19 per 1000 ricoveri (range 0,19-2,3) e 1,20 per 10000 giornate di degenza. L'infezione si è sviluppata prevalentemente in pazienti chirurgici (63,8%) e di Terapia Intensiva (45,1%).

Per quel che riguarda l'eziologia *C. albicans* è risultata la specie dominante (52,1%) seguita da *C. glabrata* (20,3%) e da *C. parapsilosis* (14,8%).

L'antifungino più usato è risultato essere il fluconazolo (73%).

La mortalità cruda a 30 giorni è stata del 27,1%, maggiore nelle infezioni da *C. tropicalis* (34,6%) e da *Candida* relativamente più rare, in modo particolare 5 pazienti su 7 infettati da *C. krusei* sono morti.

4.1.2 Confronto tra sorveglianza 2009 e sorveglianza 1997-1999

I dati raccolti durante il 2009 sono stati confrontati coi dati provenienti dalla precedente sorveglianza condotta nella stessa regione nel 1997-1999 (tabella10).

Il tasso medio di candidemia nel 2009 è risultato maggiore rispetto alla sorveglianza 1997-99, 1,19 vs. 0,38 per 1000 ricoveri (range 0,19-2,3) e 1,20 vs. 0,44 per 10000 giornate di degenza (range 0,2-2,2). La prevalenza maggiore nella popolazione maschile è stata confermata. L'età dei pazienti è stata significativamente maggiore in questo studio rispetto al precedente con il 66,8% di casi di candidemia in soggetti con più di 60 anni contro il 56,2% della precedente sorveglianza. Comparando i 2 studi è emerso come ci sia stato un significativo aumento dei casi di candidemia nei pazienti chirurgici.

Candida albicans è risultata essere la specie predominante in entrambe le statistiche (58,5% e 52,1%). Si è verificato un aumento significativo nel numero di candidemie dovute a *C. glabrata* (12,8% vs. 20,3% $p=0.003$) e un raddoppio, sebbene non statisticamente significativo, delle infezioni da *C. krusei* (0,9% vs. 1,7%).

Il fluconazolo è stato l'antifungino più usato in entrambe le coorti di pazienti e il suo uso è aumentato nonostante l'introduzione delle echinocandine. Inoltre l'impiego di amfotericina B ha subito un netto calo (29,7% vs. 16,7% $p=0,0005$)

La mortalità cruda a 30 giorni è risultata significativamente più bassa rispetto al biennio 1997-99 (27,1% vs. 35%, $P=0,039$).

Tabella 10: confronto dei risultati delle sorveglianze sulla candidemia condotte nel 2009 e nel 1997-99

Variabile	1997-99	2009	P
Numero di casi	569	353	
Tasso			
per 1 000 ricoveri	0,38	1,19	
per 10 000 giornate di degenza	0,44	1,20	
Maschi	60,1	59,3%	
Età			
<1 anno	37 (6,5%)	19 (5,6%)	n.s.
>60 anni	320 (56,2%)	225 (66,8%)	0,0018
Fattori predisponenti/patologie concomitanti			
Terapia Intensiva	45%	45,1%	n.s.
Chirurgia	56%	63,8%	0,03
Tumore solido	28%	26,1%	n.s.
Patologie ematologiche	7%	9,3%	n.s.
Immaturità fetale	4%	3,4%	n.s.
Specie di <i>Candida</i>			
<i>albicans</i>	58,5%	52,1%	n.s.
<i>glabrata</i>	12,8%	20,3%	0,003
<i>parapsilosis</i>	14,6%	14,8%	n.s.
<i>tropicalis</i>	6,1%	7,8%	n.s.
<i>guilliermondii</i>	2,1%	0,83%	n.s.
<i>krusei</i>	0,9%	1,7%	n.s.
Terapia antifungina			
Fluconazolo	62,5%	73%	0,009
Amfotericina B	29,7%	16,7%	0,0005
Echinocandine	---	18,8%	
Mortalità cruda a 30 giorni	35%	27,1%	0,039

n.s. non statisticamente significativo

4.1.3 Pattern di sensibilità agli antifungini e produzione di biofilm

I ceppi provenienti dalla sorveglianza sulla candidemia 2009 sono stati saggiati per la sensibilità in vitro agli antifungini. I valori di MIC sono riportati nella tabella 11. Più del 95% degli isolati è risultato sensibile alla flucitosina e alle echinocandine (99,1% per micafungina, 98,5% per anidulafungina, 98,4% per caspofungina). La resistenza alle tre echinocandine è stata riscontrata in 2 ceppi di *C. glabrata* e in 1 ceppo di *C. krusei*. Il 4,2% degli isolati è risultato essere resistente alla flucitosina e specificatamente 11 isolati di *C. tropicalis* (28,2%), 4 di *C. krusei* (50%), 2 di *C. albicans* (0,88%), 1 di *C. glabrata* e 1 di *C. norvegensis*. Si è riscontrata una resistenza o diminuita sensibilità al fluconazolo (MIC > 4 mg/L) nel 24,9% degli isolati, particolarmente in *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Tutti i ceppi erano risultati sensibili all'amfotericina B (<1 mg/L).

E' stata riscontrata una elevata capacità di produrre biofilm in 116 ceppi su 451 saggiati (25,7%) e precisamente è risultato forte produttore di biofilm il 37,5% di *C. parapsilosis*, il 32,9% di *C. albicans*, il 20,5% di *C. tropicalis* e il 2,6% di *C. glabrata*.

Per 160 pazienti è stato possibile analizzare l'evoluzione dell'infezione a 30 giorni dalla diagnosi in funzione della capacità del ceppo infettante di produrre biofilm. Non è stata riscontrata alcuna differenza nella mortalità cruda (32% vs. 23%) di pazienti infettati da ceppo forte produttore di biofilm (77 pazienti) o da ceppo scarso produttore di biofilm (83 pazienti).

Tabella 11: sensibilità in vitro dei ceppi di *Candida* isolati da sangue nel 2009

Specie (n° isolati saggiati)	Anti-fungino	N° isolati con MIC (mg/L) di:														
		0.007	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
<i>C. albicans</i> (226)	ANID	221	3		2							-	-	-	-	-
	CASPO	23	30	20	19	92	30	9	3			-	-	-	-	-
	MICA	226										-	-	-	-	-
	FLUCO	-	-	-	-	-	95	100	11	16	3	1				
	5FC	-	-	-	-	-	160	45	15	4				1		1
<i>C. parapsilosis</i> (81)	ANID	11		2	1		1	3	5	30	28	-	-	-	-	-
	CASPO	5		5	4	7	1	6	27	23	3	-	-	-	-	-
	MICA		5	1	2	3	7	22	34	6	1	-	-	-	-	-
	FLUCO	-	-	-	-	-	41	26	13	1						
	5FC	-	-	-	-	-	28	12	19	18	3	1				
<i>C. glabrata</i> (79)	ANID	4	50	4	19					2		-	-	-	-	-
	CASPO				1	51	24		3			-	-	-	-	-
	MICA		76		1				2			-	-	-	-	-
	FLUCO	-	-	-	-	-	1	1	1	1	7	8	13	24	8	15
	5FC	-	-	-	-	-	26	27	9	4	10	1	1	1		
<i>C. tropicalis</i> (39)	ANID	18	20		1							-	-	-	-	-
	CASPO					18	20	1				-	-	-	-	-
	MICA		36	2	1							-	-	-	-	-
	FLUCO	-	-	-	-	-	2	1	1	3	6	4	2			20
	5FC	-	-	-	-	-	6	10	3	1		5	3	1	1	9
<i>C. krusei</i> (8)	ANID	3		1	1	2	1					-	-	-	-	-
	CASPO							7			1	-	-	-	-	-
	MICA		4	2	1						1	-	-	-	-	-
	FLUCO	-	-	-	-	-					1	1	5	1		
	5FC	-	-	-	-	-	2						1	1	3	1
Altre specie (16)	ANID	5		3	1			1	2	3	1	-	-	-	-	-
	CASPO	1				3	1	4	3	1	3	-	-	-	-	-
	MICA		7			4	2	2			1	-	-	-	-	-
	FLUCO	-	-	-	-	-	7					3	1	3	1	1
	5FC	-	-	-	-	-	3	2		4	4	1	1	1		

ANID: anidulafungina, CASPO: caspofungina, MICA: micafungina, FLUCO: fluconazolo, 5FC: 5-fluorocitosina

4.2 Studio sulle candidosi vaginali e colonizzazione da *C. albicans*

4.2.1 Analisi dei dati epidemiologici

Nei 3 anni dello studio (2011-2013) sono stati segnalati al Laboratorio di Micologia 159 casi di colonizzazione del tratto alimentare e 461 casi di infezione vaginale da *C. albicans*. Alcuni dati epidemiologici relativi alle vaginiti sono riportati nella tabella 12. 259 (56,2%) infezioni si riferivano a donne in stato di gravidanza e 202 (43,8%) a donne non gravide. Per quel che riguarda il gruppo etnico 371 (80,5%) sono risultate appartenere all'etnia euro/nord americana, 34 (7,4%) al gruppo latino americano, 22 (4,8%) al gruppo nord africano, 26 (5,6%) al gruppo asiatico e 8 (1,7%) al gruppo africano. Per quel che riguarda l'età (dato disponibile per 364 soggetti) la mediana totale è risultata essere 44 anni, range 0-88.

Le caratteristiche della popolazione con colonizzazione del tratto alimentare da *C. albicans* sono riportate nella tabella 13. Di questi 88 erano di sesso maschile (55,3%). Per 155 è stato possibile avere il dato dell'età la cui mediana è risultata essere 44 anni (range 0-96). Il 91,2% dei pazienti è risultato appartenere all'etnia euro/nord americana, mentre il 3,1% e il 5,7% rispettivamente appartenevano a quella asiatica e a quella nord/africana. Le informazioni sui reparti di degenza sono pervenute per 138 pazienti risultati per lo più ricoverati nei reparti di Terapia Intensiva (36,2%) di Medicina (25,4%) e di Gastroenterologia (14,5%).

Tabella 12: caratteristiche dei pazienti con vaginite da *C. albicans*

Caratteristiche pazienti	N° soggetti	%
Gravide	259	56,2
Non-gravide	202	43,8
TOTALE	461	
Età		
<1 anno	2	0,5
2-10	2	0,5
11-20	13	3,5
21-30	117	32,1
31-40	177	48,6
41-50	31	8,5
51-60	8	2,2
61-70	8	2,2
71-80	1	0,3
>80	5	1,4
Totale	364	
Gruppo etnico		
euro/nord am.	371	80,5
asiatico	26	5,6
nord africano	22	4,8
africano	8	1,7
latino americano	34	7,4
Totale	461	

Tabella 13: caratteristiche dei pazienti con colonizzazione del tratto alimentare da *C. albicans*

Caratteristiche pazienti	N° soggetti	%
Sesso		
M	88	55,3
F	71	44,7
TOTALE	159	
Età		
<1 anno	23	14,8
2-10	3	1,9
11-20	2	1,3
21-30	4	2,6
31-40	8	5,2
41-50	9	5,8
51-60	27	17,4
61-70	20	12,9
71-80	27	17,4
>80	32	20,6
Totale	155	
Gruppo etnico		
euro/nord am.	145	91,2
asiatico	5	3,1
nord africano	9	5,7
Totale	159	

4.2.2 Studio degli isolati

Tutti i 620 ceppi di *C. albicans* sono stati identificati mediante germinazione in siero e formazione di clamidospore e dalla colorazione verde della crescita su CHROMagar.

Sono risultati appartenenti al cluster genotipico GPG 205 ceppi (33%).

Sono stati selezionati 50 ceppi isolati da 22 pazienti con colonizzazione in diversi siti anatomici per essere sottoposti a sequenziamento presso il laboratorio del Dottor Jan Schmidt alla Massey University di Palmerston North in Nuova Zelanda.

Per problemi di natura tecnica dovuti alla lenta o mancata crescita dei ceppi inviati, nei tre mesi di permanenza in Nuova Zelanda è stato possibile solo estrarre il DNA di 40 ceppi ed effettuare il protocollo di PCR ma non è stato possibile effettuare il sequenziamento delle sequenze amplificate.

4.2.3 Frequenza dell'infezione da ceppi GPG

Vaginiti

I dati relativi alla frequenza del GPG nelle infezioni vaginali vengono riportati nella Tabella 14. La frequenza totale del genotipo GPG è risultata essere del 33,2% (153/461). Nella sottopopolazione costituita da donne gravide la percentuale è stata del 32% (83/259) mentre tra le non-gravide del 34,7% (70/202), dato non statisticamente significativo. Non si evidenzia alcuna differenza nella distribuzione del cluster GPG nelle diverse fasce d'età (dato non mostrato in tabella). Per quel che riguarda la distribuzione del gruppo etnico è risultata una differenza statisticamente significativa tra il gruppo africano e il gruppo nord africano anche se la popolazione presa in esame era costituita da un numero esiguo di individui (62,5% vs 18,2% $p=0,01$).

Tabella 14: frequenza del cluster GPG nelle infezioni vaginali da *C. albicans*

	Vaginiti da <i>C. albicans</i>	
Parametro	GPG+	GPG-
Totale	153/461 33,2%	308/461 66,8%
Gravidanza		
Sì	83/259 32%	176/259 68%
No	70/202 34,7%	132/202 65,3%
Gruppo etnico		
euro/nord americano	121/371 32,6%	250/371 67,4%
latino americano	15/34 44,1%	19/34 55,9%
asiatico	8/26 30,8%	18/26 69,2%
africano	5/8 62,5%	3/8 37,5%
nord africano	4/22 18,2%	18/22 81,8%

Colonizzati

I dati relativi alla frequenza del genotipo GPG nelle colonizzazioni del tratto alimentare sono riportati nella tabella 15. La frequenza totale del genotipo GPG è risultata essere del 32,7% (52/159 pazienti), simile nella popolazione maschile (33%) e femminile (32,4%). Per quel che riguarda la colonizzazione dei pazienti in età neonatale la frequenza è stata del 34,8% (8/23 pazienti) mentre nei pazienti con più di 80 anni è stata del 18,8% (6/32) ma il dato non è risultato statisticamente significativo.

Il cluster GPG è risultato di isolamento statisticamente più frequente ($p < 0,001$) nei pazienti ricoverati in Gastroenterologia (55%) e Terapia Intensiva (42,9%) rispetto all'isolamento nei pazienti di Medicina (8,6%).

Tabella 15: frequenza GPG nei colonizzati

Parametro	Colonizzazione da <i>C. albicans</i>	
	GPG positivo	GPG negativo
Totale (159)	52 (32,7%)	107 (67,3%)
Sesso		
M (88)	29 (33%)	59 (67%)
F (71)	23 (32,4%)	48 (67,6%)
Età (anni)		
0-1 (23)	8 (34,8%)	15 (65,2%)
2-18 (5)	1 (20%)	4 (80%)
19-60 (48)	15 (31,2%)	33 (68,8%)
61-80 (47)	20 (42,6%)	27 (57,4%)
>80 (32)	6 (18,8%)	26 (81,2%)
Reparto		
Terapia Intensiva (49)	21 (42,9%)	28 (57,1%)
Medicina (35)	3 (8,6%)	32 (91,4%)
Gastroenterologia (20)	11 (55%)	9 (45%)

4.2.4 Pattern di sensibilità agli antifungini dei ceppi di *C. albicans* GPG+ e GPG-

La sensibilità in vitro agli antifungini è stata saggiata per 204 ceppi GPG+ e 164 ceppi GPG-. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 16.

Il 100% dei ceppi è risultato essere sensibile a anidulafungina e micafungina.

Per quel che riguarda la caspofungina non è stato possibile ottenere risultati per tutti i ceppi per problemi legati all'antifungino stesso.

Un ceppo di *C. albicans* GPG+, oltre a essere altamente resistente al fluconazolo (MIC>128 mg/l) è risultato resistente anche al posaconazolo e voriconazolo (MIC>16 mg/l).

Per la flucitosina sono stati usati i breakpoints forniti dal CLSI che considera resistenti i ceppi con MIC>16 mg/l. Nessun ceppo GPG- è risultato essere resistente a questo antifungino mentre 25 ceppi GPG+ hanno mostrato MIC >16 mg/l e 36 ceppi valori di MIC tra 16 mg/l e 8 mg/l.

Tre ceppi GPG+ e 2 ceppi GPG- hanno mostrato resistenza al fluconazolo con MIC>4 mg/l .

Tabella 16: risultati sensibilità in vitro dei ceppi di *C. albicans* GPG+ e GPG-

<i>C. albicans</i> (n° isolati saggiati)	Antifungino	N° isolati con MIC (mg/L) di:														m.g		
		0.007	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64		128	
GPG+ (204)	ANID	204											-	-	-	-	-	0,007
	CASPO*	29	30	33	4	15	8						-	-	-	-	-	0,05
	MICA	204											-	-	-	-	-	0,007
	FLUCO	-	-	-	-	-	197	3	1		1						2	1,53
	5FC	-	-	-	-	-	17	12	35	52	29	36	10	2	2	9		9,54
	VORI	-	-	156	30	15			2				1	-	-	-		0,13
	POSA	-	-	202					1				1	-	-	-		0,11
GPG- (164)	ANID	164										-	-	-	-	-		0,007
	CASPO*	37	20	63	9	8	20	1		1		-	-	-	-	-		0,07
	MICA	164										-	-	-	-	-		0,007
	FLUCO	-	-	-	-	-	160	1	1		1					1		0,67
	5FC	-	-	-	-	-	113	16	30	5								0,46
	VORI	-	-	144	10	8			1		1			-	-	-		0,07
	POSA	-	-	160		3	1							-	-	-		0,03

ANID: anidulafungina, CASPO: caspofungina, MICA: micafungina, FLUCO: fluconazolo, 5FC: 5-fluorocitosina

VORI: voriconazolo, POSA: posaconazolo

*119 GPG+ e 159 GPG- saggiati

5. Discussione e conclusioni

Uno dei principali obiettivi di questo Dottorato di Ricerca in Sanità Pubblica è stato quello di verificare l'evoluzione dell'epidemiologia delle infezioni profonde da *Candida* a 10 anni di distanza da una precedente sorveglianza svoltasi in Lombardia negli anni 1997-99.⁽³⁵⁾ Lo studio prospettico sulla candidemia condotto nel 2009 ha confermato il cambiamento nell'epidemiologia di questa patologia che era già stato osservato in altri Paesi.⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾ Cambiamenti nella tipologia dei pazienti e nelle pratiche assistenziali possono aver dato un contributo all'evoluzione della candidemia avvenuta negli ultimi dieci anni negli ospedali lombardi. Comparando le due sorveglianze è emerso come l'incidenza globale di candidemia sia aumentata di tre volte (da 0,38 a 1,19 per 1000 ricoveri e da 0,44 a 1,20 per 10000 giornate di degenza) e la mortalità cruda sia diminuita da 35% a 27,1%. L'incremento del tasso di candidemia, potrebbe essere dovuto al perfezionamento delle tecniche mediche, chirurgiche e di terapia intensiva che di fatto ha prolungato la sopravvivenza di pazienti critici altamente suscettibili alle infezioni fungine e al complessivo invecchiamento della popolazione dei pazienti. Questo incremento potrebbe anche essere associato ai cambiamenti delle politiche sanitarie che tendono ad aumentare le pratiche assistenziali domiciliari e riservano le ospedalizzazioni solo a pazienti severamente compromessi e con un più alto rischio di sviluppare candidemia. Infatti dal 2000 al 2009 è stata riportata una diminuzione del 13,35% del tasso di ricovero ospedaliero in Lombardia (Ministero della Salute 2012).

L'analisi delle specie di *Candida* causa di candidemia ha mostrato un aumento dal 12,8% al 20,3% delle infezioni causate da *C. glabrata* che è divenuta la seconda causa di sepsi nella sorveglianza 2009. Questo incremento, riscontrato anche in altri Paesi⁽⁹⁰⁾, potrebbe essere dovuto ad un maggiore impiego della profilassi con fluconazolo, per il quale questa specie acquisisce resistenza con elevata frequenza. L'aumento dell'età dei pazienti ricoverati potrebbe essere un'altra causa di questo cambiamento, in quanto nei soggetti anziani *C. glabrata* è frequentemente ritrovata come causa di colonizzazione del tratto alimentare. *C. krusei*, specie intrinsecamente resistente al fluconazolo, è stata riscontrata raramente.

La candidemia è stata rilevata prevalentemente nelle unità di terapia intensiva ed è stato osservato un trend in crescita delle infezioni nei pazienti chirurgici.

Come riportato in altri studi è stata osservata una diminuzione della mortalità cruda rispetto alla precedente sorveglianza. Questo potrebbe essere dovuto ad una maggiore attenzione a queste infezioni da parte dei clinici e quindi ad una diagnosi più precoce e ad un più tempestivo inizio della terapia antifungina.

Il saggio di sensibilità in vitro agli antifungini ha confermato l'attività ad ampio spettro dell'amfotericina B. Una resistenza o diminuita sensibilità al fluconazolo è stata riscontrata nel

24,9% degli isolati. I nostri risultati sono in linea con i risultati ottenuti in altre sorveglianze. Non è stato possibile un confronto dei pattern di sensibilità agli antifungini ottenuti nei due periodi di sorveglianza in quanto sono state utilizzate due differenti metodiche, la metodica CLSI per i ceppi raccolti nella sorveglianza 1997-99 e la metodica EUCAST per i ceppi collezionati nel 2009. La metodica EUCAST prevede breakpoints differenziati a seconda della specie di *Candida*, ma non per tutte le combinazioni specie-antifungino sono stati stabiliti, perciò dove non erano disponibili sono stati utilizzati i breakpoints CLSI. Le problematiche relative alle scelte dei breakpoints sono particolarmente sentite in ambito di microbiologia clinica. Infatti la sensibilità in vitro può non essere associata al successo del trattamento. Particolarmente problematici sono gli studi di sensibilità in vitro alla caspofungina. Infatti, come evidenziato in centri europei ed americani, lo stesso ceppo saggiato in tempi diversi mostrava MIC molto diverse. E' stato perciò deciso a livello internazionale di sospendere gli studi in vitro con questo antifungino⁽⁹¹⁾.

La capacità di produrre biofilm è un importante fattore di virulenza in quanto la sua formazione impedisce sia la penetrazione dell'antifungino che l'azione dei macrofagi. I ceppi di *Candida* isolati da emocolture nel corso dello studio sono risultati per il 25,7% forti produttori di biofilm e, in particolare il 37,5% dei ceppi di *C. parapsilosis* e il 32,9% dei ceppi di *C. albicans*. A differenza di uno studio che ha dimostrato correlazione tra questa caratteristica e l'evoluzione negativa dell'infezione, nel nostro studio la differenza di mortalità nei pazienti infettati da ceppi forti produttori e scarsi produttori di biofilm non è risultata statisticamente significativa.

In uno studio precedente, sviluppato in collaborazione con la Massey University di Palmerston North in Nuova Zelanda, è stata evidenziata la prevalenza di un particolare cluster genotipico di *C. albicans* denominato GPG nella popolazione neonatale affetta da candidemia. Inoltre i neonati infettati da questo cluster GPG avevano una mortalità maggiore rispetto a quelli infettati da ceppi GPG- (45,5% vs. 9%). Tuttavia la casistica era poco numerosa, solo 33 neonati. Lo scopo iniziale del Dottorato era stato quello di confermare la prevalenza maggiore del cluster GPG ampliando la casistica. Tuttavia l'introduzione della profilassi con fluconazolo nei neonati ad alto rischio ha ridotto notevolmente i casi di sepsi in questa popolazione. Per questo motivo si è deciso di ricercare la prevalenza del cluster GPG in donne in stato di gravidanza affette da vaginite che rappresenta la principale via di infezione del neonato al momento del parto. Sono stati analizzati perciò ceppi di *C. albicans* isolati da essudato vaginale di donne in stato di gravidanza e donne non gravide come popolazione di controllo. Nelle donne affette da vaginite la prevalenza globale del cluster GPG è risultata del 33,2%, 32% tra le donne in stato di gravidanza e 34,7% nelle non gravide. E' risultata invece statisticamente significativa la prevalenza del cluster tra donne di etnia africana e nord/africana, con una prevalenza del 62,5% rispetto al 12,8%.

Lo studio si è ampliato anche con l'analisi dei ceppi di *C. albicans* colonizzanti il tratto alimentare per verificare la prevalenza del cluster GPG nei soggetti colonizzati e per verificare la presenza dello stesso ceppo in più di un sito di colonizzazione dello stesso paziente, possibile segno predittivo dello sviluppo di candidemia. Il cluster GPG era presente nel 32,7% nella popolazione dei colonizzati, senza differenze tra maschi e femmine. Nei neonati il cluster GPG rappresentava il 34,8% dei ceppi colonizzanti, dato paragonabile al 33,3% dei ceppi responsabili di candidemia osservato nel precedente studio. Invece nei pazienti adulti di terapia intensiva la frequenza del cluster GPG tra i ceppi di *C. albicans* responsabili di colonizzazione è stata del 42,9% nettamente inferiore alla frequenza rilevata nel precedente studio come causa di candidemia (11,9%).

La parte dello studio relativa al riconoscimento molecolare dei ceppi causa di colonizzazione in più di un sito anatomico dello stesso paziente doveva essere svolta presso la Massey University in Nuova Zelanda. Tuttavia sono stati riscontrati problemi di crescita dei ceppi inviati che hanno impedito di portare a termine l'obiettivo prefissato. La mancata crescita nei tempi previsti potrebbe essere attribuita a danneggiamenti verificatisi durante la spedizione dall'Italia alla Nuova Zelanda. Nei tre mesi di permanenza quindi è stato possibile effettuare solo l'estrazione del DNA mentre l'identificazione molecolare è attualmente in corso.

Si è voluto inoltre verificare se ci fosse una differenza nella sensibilità in vitro agli antifungini dei ceppi GPG+ rispetto ai ceppi GPG-. In questo confronto è emersa una minore sensibilità al fluconazolo dei ceppi GPG+ (media geometrica 1,53 vs. 0,67); inoltre si è rilevata una maggior frequenza di resistenza alla 5-fluorocitosina tra i ceppi del cluster GPG (30%) rispetto ai ceppi non GPG (0%) in accordo con il dato molecolare che riporta come la mutazione del gene *FUR1* in questo cluster sia responsabile della resistenza o diminuita sensibilità a questo antifungino. Per il trattamento delle candidosi vaginali, soprattutto in gravidanza, nelle principali linee guida viene indicato l'uso di farmaci topici a base di acido borico e 5-fluorocitosina. Per questo motivo bisognerebbe indagare se l'infezione è causata da ceppi GPG per evitare il fallimento terapeutico con conseguente possibile evoluzione da vaginite a vulvovaginite cronica, di più difficile eradicazione, o con possibile prolungarsi dell'infezione in corso di gravidanza aumentando il rischio di infezione verticale al momento del parto con un ceppo associato ad un'alta mortalità cruda nei neonati, in particolare prematuri.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1 Gray LD, Roberts GD. Laboratory diagnosis of systemic fungal diseases. *Infect Dis Clin North Am* 1988; 2: 779-803.
- 2 Armstrong D. Overview of invasive fungal infections and clinical presentation. *Baillière's Clin Infect Dis* 1995; 2: 17-24.
- 3 Eggimann P., Garbino J., and Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet Infectious Diseases* 2003; 3: 685-702.
- 4 Mèan M., Marchetti O. and Calandra T. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Critical Care* 2008; 12: 204-12.
- 5 Shibata N, Okawa Y. Structure of fungal cell wall polysaccharides. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2006; 47 (3):179
- 6 Hostetter MK. Linkage of adhesion, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *J Lab Clin Med* 1998; 132(4):258.
- 7 Mishra P., Bolard J., Prasad R. Emerging role of lipids of *Candida albicans*, a pathogenic dimorphic yeast. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1127 (1):1.
- 8 Santos MA, Perreau VM, Tuite MF. Transfer RNA structural change is a key element in the reassignment of the CUG codon in *Candida albicans*. *EMBO* 1996; 15:5060.
- 9 Forche A., Alby K, Schaefer D. The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biol* 2008; 6(5)e110
- 10 Reedy JL, Floyd AM, Heiyman J. Mechanistic plasticity of sexual reproduction and meiosis in the *Candida* pathogenic species complex. *Curr Biol* 2009 jun9; 19(11):891-9
- 11 Doi M, Homma M, Chindamporn A, Tanaka K. Estimation of Chromosome number and size by the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. *J Gen Microbiol* 1992; 138:2243.
- 12 Cotter G, Kavanagh K. Adherence mechanism of *Candida albicans*. *Br J Biomed Sci* 2000; 57(3):241.
- 13 Fukazawa Y, Kagaya K. Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 1997; 35(2):87.
- 14 Nelson RD, Shibata N, Podzorski RP, Herron MJ. *Candida* mannan: chemistry, suppression of cell-mediated immunity, and possible mechanisms of action. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4(1):1.

- 15 Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Bio Rev* 2003; 67(3):400.
- 16 Hube B, Naglik J. Extracellular hydrolases. In: Calderone R (ed) *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington DC, 2002, p.107.
- 17 Taylor BM, Hannemann H, Sehnal M, et al. Induction of SAP7 correlates with virulence in an intravenous infection model of candidiasis but not in a vaginal infection model in mice. *Infect Immun* 2005; 73(10):7061.
- 18 Schaller M, Korting HC, Borelli C, et al. *Candida albicans* secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an in vitro model of vaginal candidiasis. *Infect Immun* 2005; 73(5):2758.
- 19 Kolotila MP, Diamond RD. Effects of neutrophils and in vitro oxidants on survival and phenotypic switching of *Candida albicans* WO-1. *Infect Immun* 1990; 58(5):1174.
- 20 Schmid J, Herd S, Hunter PR, Cannon RD et al. Evidence for a general-purpose-genotype in *Candida albicans*, highly prevalent in multiple geographic regions, patient types and types of infection. *Microbiology* 1999; 145:2405-2414.
- 21 Odds FC, Bougnoux ME, Shaw DJ, et al. Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 2007; 6:1041-1052.
- 22 Zhang N, Upritchard JE, Holland BR, et al. Distribution of mutations distinguishing the most prevalent disease-causing *Candida albicans* genotype from other genotypes. *Infection, Genetics and Evolution* 2009; 9:493-500.
- 23 Zhang N, Harrex AL, Holland BR et al. Sixty alleles of the ALS7 open reading frame in *Candida albicans*: ALS7 is a hypermutable contingency locus. *Genome Res* 2003; 13:2005-2017.
- 24 Odds FC. In *Candida albicans* resistance to flucytosine and terbinafine is linked to MAT locus homozygosity and multilocus sequence typing clade 1. *FEMS Yeast Res* 2009; 9(7):1091-101
- 25 Dogdson A, Dogdson J. Clade-specific flucytosin resistance is due to a single nucleotide change in the FUR1 gene of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemoter* 2004; 48(6):2223
- 26 Odds FC. *Candida* infections: an overview . *Crit Rev Microbiol* 1987; 15(1):1.
- 27 Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine* 2007; 348:1546-54

- 28 Laupland KB, Gregson DB, Church DL, Ross t, Elsayed S. Invasive *Candida* species infections: a 5 year population-based assessment. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 532-37.
- 29 Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Gottfredsson M. Increasing incidence of candidemia: results from a 20-year nationwide study in Iceland. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3489-92.
- 30 Poikonen E, Lyytikainen O, Anttila VJ, Ruutu P. Candidemia in Finland, 1995-1999. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:985-90.
- 31 Sandven P, Bevanger L, Digranes A, et al. Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1977-81.
- 32 Odds FC, Hanson MF, Davidson AD, et al. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. *J Med Microbiol* 2007; 56: 1066-75.
- 33 Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1829-35.
- 34 Arendrup MC, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, et al. Semination surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4434-40.
- 35 Tortorano AM, Biraghi E, Astolfi A, Ossi C, FIMUA Candidemia Study Group, et al. European Confederation of Medical Mycology (ECMM) prospective survey of candidemia: report from one Italian region. *J Hosp Infect* 2002; 51 (4):297-304.
- 36 Tortorano AM, Peman j, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, et al. ECMM Working Group on Candidemia. Epidemiology of candidemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol & Infect Dis* 2004; 23(4): 317-22.
- 37 Stone HH, Kolb LD, Currie CA, et al. *Candida* sepsis: pathogenesis and principles of treatments. *Ann Surg* 1974; 179(5):697.
- 38 Frerich W, Gad A. The frequency of *Candida* infections in pregnancy and their treatment with clotrimazole. *Curr Med Rs Opin* 1977; 4(9):640.
- 39 Strausbaugh LJ, Sewell DL, Ward TT, et al. High frequency of yeast carriage un hands of hospital personnel. *J Clin Microbiol* 1994; 32(9):1146.
- 40 Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(1):133-66.

- 41 Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol* 2007; 45(6): 1843-50.
- 42 Chattopadhyay A, Caplan DJ, Slade JD, et al. Risk indicators for oral candidiasis and oral hairy leukoplakia in HIV-infected adults. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005; 33(1):35.
- 43 Martins MD, Lozano-Chiu M, Rex JH. Declining rates of oropharyngeal candidiasis and carriage of *Candida albicans* associated with trends toward reduced rates of carriage of fluconazole-resistant *C. albicans* in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 1998; 27(5):291.
- 44 Sobel JD, Faro S, Force RW, et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178(2):203.
- 45 Hurley R. Recurrent *Candida* infection. *Clin Obstet Gynaecol* 1981; 8(1):209.
- 46 Schuman P, Sobel JD, Ohmit SE, et al. Mucosal candidal colonization and candidiasis in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. HIV Epidemiology Research Study (HERS) Group. *Clin Infect Dis* 1998; 27(5):1161.
- 47 Zuber TJ, Baddam K. Superficial fungal infection of the skin. Where and How it appears help determine therapy. *Postgrad Med* 2001; 109(1):117.
- 48 Rivett AG, Perry JA, Cohen J. Urinary candidiasis: a prospective study in hospital patients. *Urol Res* 1986; 14(4):183.
- 49 Haron E, Vartivarian S, Anaissie e, et al. Primary *Candida* pneumonia. Experience at a large cancer center and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1993; 72(3):137.
- 50 Bayer AS, Scheld WM. Endocarditis and intravascular infections. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R (eds) *Principles and Practice of Infectious Diseases*, vol.1, 5th edn. Churchill Livingstone, New York, 2000.
- 51 Calandra T, billie J, Schneider R, et al. Clinical significance of *Candida* isolated from peritoneum in surgical patients. *Lancet* 1989; 2(8677).1437.
- 52 Michel C, Courdavault L, al Khayat R et al. Fungal peritonitis in patients on peritoneal dialysis. *Am J Nephrol* 1994; 14(2):113.
- 53 Montgomerie JZ, Edwards JE Jr. Association of infection due to *Candida albicans* with intravenous hyperalimentation. *J Infect Dis* 1978; 137(2):197.
- 54 Spebar MJ, Pruitt BA Jr. Candidiasis in the burned patient. *J Trauma* 1981; 21(3):237.
- 55 Haijeh RA, Sofair AN, Harrison LH, et al. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* 2004; 42(4)1519.

- 56 Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4):1829.
- 57 Benjamin DK Jr, Stoole BJ, Fanaroff AA, et al. Neonatal candidiasis among extremely low birth weight infants: risk factors, mortality rates, and neurodevelopmental outcomes at 18 to 22 months. *Pediatrics* 2006; 117(1):84.
- 58 Anaissie E, Bodey GP, Kantarjian H et al. Fluconazole therapy for chronic disseminated candidiasis in patients with leukemia and prior amphotericin B therapy. *Am J Med* 1991; 91(2):142.
- 59 Girmenia C, Jaalouk G. Detection of *Candida* in blood smears of patients with hematologic malignancies. *Eur J Haematol* 1994; 52(2):124.
- 60 Magadia RR, Weinstein MP. Laboratory diagnosis of bacteremia and fungemia. *Infect Dis Clin North Am* 2001; 15(4):1009.
- 61 Georgopapadakou NH, Walsh TJ. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science* 1994; 264:371.
- 62 Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: model of action, mechanism of resistance, and correlation of these mechanism with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:501.
- 63 Atkinson GW, Israel HL. 5-fluorocytosine treatment of meningeal and pulmonary aspergillosis. *Am J Med* 1973; 55:496.
- 64 Hector RF. Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6:1.
- 65 Spellberg BJ, Filler SG, Edwards JE. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis* 2006; 42:244.
- 66 Bekersky I, Fielding RH, Dressler DE, et al. Plasma protein binding of amphotericin B and pharmacokinetics of bound versus unbound amphotericin B administration of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycolate. *Antimicrob Agent Chemother* 2002; 46:834.
- 67 Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, et al. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Disease Society of America. *Clin Infect Dis* 2000; 30:662.
- 68 Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Global Antifungal Surveillance Study. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2007: an 8.5 year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1735.

- 69 Graybill JR. Antifungal drugs and resistance. *Adv Exp Med Biol* 1995; 390:217.
- 70 Geraghty P, Kavanagh K. Erythromycin, an inhibitor of mitoribosomal protein biosynthesis, alters the amphotericin B susceptibility of *Candida albicans*. *J Pharm Pharmacol* 2003; 51:982.
- 71 Spanakis EK, Aperis G, Mylonakis E. New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage. *Clin Infect Dis* 2006; 43:1060.
- 72 Rogers TR, Johnson EM, Munro C. Echinocandin antifungal drug resistance. *J Invasive Infect* 2007; 1:99.
- 73 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard - third edition. CLSI document M27-A3[28]. 2008. Clinical and laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA
- 74 Arendrup M, Cuenca-Estrella M, Lass-Florl C, Hope W, and EUCAST-AFST. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:E246-E247.
- 75 Pappas P, Kauffman CA, Sobel J et al. Clical Practice Guidelines fort he managment of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48:503-35.
- 76 Watson C, Pirota M. Recurrent vulvovaginal candidiasis, current management. *Austr Fam Phisician* 2011; 40:149-151.
- 77 Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007; 369(9577):1961-71.
- 78 Vicariotto J,Del Piano M, Mogna L, MognaG. Effectiveness of the association of 2 probiotic strains formulated in a slow release vaginal product, in women affected by vulvovaginal candidiasis: a pilot study. *J Clin Gastroenterol* 2012; 46 suppl S73-80.
- 79 Pietrella D, Angiolella L, et al. Beneficial effect of *Mentha suaveolens* essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by real-time monitoring of infection. *BMC Complement Altern Med* 2011;11:18.
- 80 Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs and modes of transmission. *Clin Infect Dis* 1996; 22(suppl2):S89.
- 81 Hedderwick SA, McNeil SA, Lyons MJ, Kauffman CA. Pathogenic organisms associated with artificial fingernail worn by healthcare workers. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21(8):505.
- 82 Rotstein C, Bow EJ, Laverdiere M, et al. Randomized placebo-controlled trial of fluconazole prophylaxis for neutropenia cancer patients: benefit based on purpose and

- intensity of cytotoxic therapy. The Canadian Fluconazole Prophylaxis Study Group. *Clin Infect Dis* 1999;28(2):331.
- 83 Shorr AF, Chung K, Jackson WL, et al. Fluconazole prophylaxis in critically ill surgical patients: a meta-analysis. *Crit Care Med* 2005; 33(9):1928.
- 84 Kaufman DA, Manzoni P. Strategies to prevent invasive candidal infection in extremely preterm infants. *Clinics in Perinatology* 2010 37: 611-628.
- 85 Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, et al. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Ag and Chemother* 2001; 45:2475-9.
- 86 Arnaud MB, Costanzo MC, Skrzypek MS et al. The *Candida* Genome Database (CGD), a community resource for *Candida albicans* gene and protein information. *Nucl Ac Res* 2005; 33:358-63.
- 87 Ahlquist Cleveland A, Farley MM, Harrison LH, et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011. *Clin Infect Dis*. 2012;55:1352–61.
- 88 Presterl E, Daxböck F, Graninger W, Willinger B. Changing pattern of candidaemia 2001–2006 and use of antifungal therapy at the University Hospital of Vienna, Austria. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:1072–6.
- 89 Arendrup MC, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, et al. Semi-national surveillance of fungaemia in Denmark 2004–2006: increasing incidence of fungaemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *Clin Microb Infect*. 2008;14:487–94.
- 90 Lortholary O, Desnos-Ollivier M, and French Mycosis Study Group. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:532–8.
- 91 A. Espinel-Ingroff I, M.C. Arendrup, M.A. Pfaller ,et al. Interlaboratory variability of Caspofungin MIC for *Candida* spp. Using CLSI and EUCAST methods: should the clinical laboratory be testing this agent? *Antimicrob Agents Chemoter*. 2013; 57(12):5836-42.