
**APPLICAZIONE DI TECNICHE
MOLECOLARI PER LA DIAGNOSI
RAPIDA E LO STUDIO GENOTIPICO
DELLE CANDIDOSI ORALI**

Francesca Gallè

Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XX ciclo
Indirizzo Biotecnologie Mediche
Università di Napoli Federico II



Dottorato in Scienze Biotecnologiche – XX ciclo
Indirizzo Biotecnologie Mediche
Università di Napoli Federico II



**APPLICAZIONE DI TECNICHE
MOLECOLARI PER LA DIAGNOSI
RAPIDA E LO STUDIO GENOTIPICO
DELLE CANDIDOSI ORALI**

Francesca Gallè

Dottoranda: Francesca Gallè
Relatore: Prof. Fabrizio Pane
Correlatore: Prof. Fabio Rossano
Coordinatore: Prof. Giovanni Sannia

Grazie, papà

INDICE

RIASSUNTO	pag. 1
SUMMARY	pag. 3
INTRODUZIONE	pag. 6
• Cenni sulla epidemiologia delle candidosi	
• Candidosi orali	
• Antibioticoresistenza nei lieviti del genere <i>Candida</i>	
• Metodi per la identificazione, la tipizzazione intraspecie e lo studio della suscettibilità agli antimicotici di isolati di <i>Candida</i> spp.	
• Tipizzazione molecolare di <i>Candida albicans</i>	
• Obiettivi della ricerca	
MATERIALI E METODI	pag. 19
• Campioni di studio e metodologia di campionamento	
• Identificazione degli isolati	
• Analisi degli isolati pre- e post-terapia antimicotica:	
- determinazione della suscettibilità agli antifungini	
- analisi del cariotipo	
- Restriction Fragment Length Polymorphism	
- studio dei determinanti di resistenza	
RISULTATI	pag. 25
• Identificazione degli isolati	
• Analisi degli isolati pre- e post-terapia antimicotica:	
- suscettibilità agli antifungini	
- analisi del cariotipo	
- Restriction Fragment Length Polymorphism	
- studio dei determinanti di resistenza	
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag. 31
BIBLIOGRAFIA	pag. 36
PUBBLICAZIONI	pag. 44

RIASSUNTO

Negli ultimi decenni le infezioni micotiche, e principalmente quelle causate da *Candida* spp., hanno fatto registrare un'incidenza crescente, sia in ambito ospedaliero che comunitario. Diversi sono i fattori che hanno contribuito a determinare questo incremento; tra questi vanno sicuramente considerati i progressi raggiunti dalla pratica medica, responsabili non solo dell'aumento della sopravvivenza di pazienti in condizioni critiche, e dunque maggiormente suscettibili a tali infezioni, ma anche della diffusione di procedure invasive e di trattamenti terapeutici che ne possono favorire l'insorgenza.

Le candidosi orofaringee, che rappresentano la forma più comune di infezione superficiale da *Candida*, sono riscontrate frequentemente negli individui immunodepressi, in cui non di rado si verificano episodi di reinfezione dopo i trattamenti antimicotici. A volte tali episodi risultano determinati da nuovi ceppi di *Candida*; spesso invece essi sono causati da varianti del ceppo responsabile della prima infezione, capaci di resistere al trattamento antifungino. La diagnosi precoce delle candidosi e l'identificazione delle specie coinvolte, nonché lo studio delle caratteristiche di suscettibilità ai diversi farmaci antimicotici, risulta fondamentale per la scelta di una terapia tempestiva e adeguata, soprattutto per pazienti in condizioni critiche nei quali le manifestazioni superficiali da *Candida* spp. possono facilmente dare origine a infezioni sistemiche difficili da trattare e a volte fatali. Analogamente, lo studio molecolare degli isolati responsabili di infezione può fornire preziose informazioni sui processi attraverso cui si estrinseca la patogenicità di *Candida* nell'organismo ospite.

Tuttavia, nonostante negli ultimi anni le tecniche molecolari abbiano avuto un enorme sviluppo, e nonostante numerose ricerche abbiano dimostrato l'efficacia e le potenzialità dell'applicazione di tali tecniche allo studio delle candidosi, sia in campo diagnostico che epidemiologico, esse vengono applicate ancora in pochi laboratori. Ciò è determinato sia dai costi elevati dei sistemi attualmente in commercio, sia dalla mancata validazione e standardizzazione delle metodiche finora messe a punto.

L'esperienza qui riportata si inserisce in questo contesto. La mia attività di ricerca nell'ambito del Dottorato in Scienze Biotecnologiche si è fondata infatti sullo studio delle candidosi orali, sia dal punto di vista diagnostico che nella caratterizzazione genotipica dei ceppi infettanti. Come modello di studio sono stati scelti isolati di *Candida* spp. ottenuti da pazienti affetti da candidosi orale.

Nella prima fase del progetto è stata applicata una metodica di amplificazione tramite multiplex PCR all'analisi diretta di campioni di gargarizzato, saggiandola contemporaneamente anche sulle colonie ottenute dopo sviluppo colturale, al fine di sperimentarne l'efficacia e la praticità d'uso nella diagnosi delle candidosi orali e nella identificazione delle più comuni specie di *Candida* responsabili di queste infezioni.

Nella seconda fase invece, sono stati considerati nell'ambito del campione di studio gli isolati provenienti da pazienti affetti da candidosi orale ricorrente. Per ciascuno di questi pazienti sono stati analizzati il ceppo responsabile del primo episodio di infezione e quello isolato durante il secondo episodio, verificatosi dopo l'assunzione della terapia antifungina. Nell'ambito di tali coppie di isolati sono state considerate quelle composte da lieviti appartenenti alla stessa specie e, tra queste, quelle appartenenti alla specie *albicans*. Esse sono state quindi tipizzate mediante elettroforesi del cariotipo ed analisi del polimorfismo di restrizione, per valutare se

nella patogenesi delle reinfezioni esaminate fossero coinvolti lieviti differenti o varianti del ceppo originario insorte nel corso della terapia antifungina. Infine, sulle coppie risultate composte dallo stesso isolato, è stata condotta un'analisi di espressione di alcuni geni coinvolti nella resistenza ai composti azolici, allo scopo di evidenziare eventuali meccanismi di resistenza innescati dalla somministrazione di tali antimicotici.

Per quanto concerne la diagnosi diretta delle candidosi orali, la tecnica di multiplex PCR sperimentata si è dimostrata utile e valida nel dimostrare la presenza dei lieviti nei campioni di gargarizzato e nell'identificarne la specie; la rapidità e i bassi costi connessi all'impiego della metodica consentono di auspicarne l'adozione nella routine diagnostica.

Le due tecniche di tipizzazione non sono risultate completamente concordanti: in un caso lo studio del polimorfismo di restrizione è risultato maggiormente discriminante rispetto all'analisi del cariotipo. È stato comunque possibile riscontrare tre episodi di candidosi recidiva, alle quali è stato applicato il protocollo di analisi dell'espressione genica. I risultati hanno permesso di rilevare overespressione dei geni considerati solo per una coppia di isolati, per la quale sembra dunque chiarito il meccanismo alla base della reinfezione; per gli altri due casi, la persistenza del lievito potrebbe essere imputabile ad altri meccanismi di resistenza. Ulteriori approfondimenti saranno necessari per chiarire quali processi siano intervenuti nella determinazione di questi casi di recidiva e per estendere l'analisi ad un campione più ampio. La tecnica di diagnostica molecolare, già oggetto di ulteriori sperimentazioni, verrà estesa ad altri tipi di campioni e all'identificazione di altre specie di *Candida*.

SUMMARY

In the last decades, the innovations in medical practice have determined remarkable changes in the diffusion of infectious diseases. The increase of survival in critically ill patients, which are more susceptible to infections, the increasing employ of antibiotics and the development of invasive diagnostic procedures have lead to the circulation of “new pathogens” and the spread of microorganisms resistant to the common antimicrobial drugs.

At the same time the incidence of fungal infections, and especially of *Candida* spp. infections, has increased both in nosocomial and community settings. As for bacterial infections, the extensive use of antifungal agents in prophylactic and therapeutic treatments caused a shift toward resistant fungal species or strains in the etiology of mycoses.

Oropharyngeal candidosis is a most common superficial fungal infection. Immunocompromised patients are frequently affected by this type of infection because their low immune response easily allows the development of pathogenicity in colonizing strains. Moreover, recurrent candidosis commonly occurs in these subjects, that is caused by a new strain (reinfection) or by the original strain (relapse), which became resistant during antifungal therapy.

Clinical diagnosis is complicated by a lack of specific clinical signs and symptoms of disease. Laboratory diagnosis is also complex because traditional methods are often inadequate. These may be deficient in sensitivity and/or in specificity, or aren't rapid enough, especially in the detection of systemic infections. Cultural techniques require several days for completion and frequently generate false negative, as in the case of blood cultures, or positivity also for a simple colonization. Serologic methods, which are commonly employed for antigen or antibodies detection in biological fluids, may be not very useful. Circulating antibodies to *Candida* spp. may indeed occur in healthy individuals as the result of commensal colonization of mucosal surfaces, while fungal antigens can be rapidly cleared from the circulation. Furthermore, differences in the virulence and in the susceptibility of the various *Candida* species to antifungal drugs make identification to the species level important for clinical management.

In the last few years, newer molecular biological tests have generated interest but are not yet standardized or readily available in most clinical laboratory settings nor have they been validated in large clinical trials. Similarly, a lot of studies have demonstrated the utility of genotyping in order to establish the source of epidemic outbreaks, or to evidence any modification due to selective pressure occurred in the genotype of a strain, or to distinguish between new infections and rearrangement in the genome of a same strain. Several effective techniques have been employed for genotyping of *Candida* spp., but none of these was chosen for large scale epidemiological trials. Finally, although standard International methods for testing antifungal susceptibility were defined, they aren't ever employed in clinical practice. This lack complicates the management of candidosis, because inadequate therapy may promote induction of resistance or colonization by few susceptible strains, and consequently development of recurrent infections. Where susceptibility tests were not carried out routinely, they should be performed at least in those cases which do not respond to the therapy.

This research was applied to the diagnostics of oral candidosis and to the genotyping of strains responsible for these infection, including a study of the mechanisms of their response to the antifungal treatment.

The study was designed in the course of the first year, and it was composed by three steps: collection of samples, detection and identification of isolates, genotypic analysis. These phases were carried out in the first two years; genotyping was improved in the last year, together with a study of some resistance determinants.

Samples were taken through the oral rinse technique in the laboratory of the Microbiology Division of the Department of Pathology, University Hospital "Federico II", Naples.

In the first phase of the project, in order to test the effectiveness and the handiness of a molecular method for the detection and the identification of the most common *Candida* spp. responsible for oral candidosis, a multiplex PCR protocol proposed by Chang et al. in 2001 was applied to the direct analysis of oral rinses, and at the same time to the colonies from samples cultures. A phenotypical identification test based on sugar assimilation, commonly used in routine diagnosis, was considered as reference.

The results showed a good level of agreement between both genotypic and phenotypical identification, and the two amplification-based methods.

The molecular test allowed diagnosis of candidosis also with a high bacterial contamination and demonstrated good sensitivity. Moreover, in some cases the direct analysis showed occurrence of more than one *Candida* species in the same sample. This situation is often not revealed with common diagnostic methods based on microbiological cultures.

Multiplex PCR is therefore useful and valid for the diagnosis of oral candidosis and for the species identification. Rapidity and low cost of this method allowed to consider its employ for routine diagnostics, especially in laboratories already equipped with basic molecular instruments and with trained personnel.

The direct application to the oral rinse, without previous extraction of DNA, represent a further step in the early diagnostics of candidoses, which is fundamental for the timely administration of antifungal therapy, mainly in critical patients.

In the second phase of the study, isolates from subjects affected by recurrent oral candidosis were analyzed. For each of them the strain isolated in the first episode of infection, before antifungal treatments, and that responsible for the second episode, occurring after the therapy, were considered.

In order to define if new strains or variants of the original strain were involved in the pathogenesis of these recurrent candidoses, and to reveal possible resistance mechanisms related to the administration of antifungal therapy, several techniques were applied to the analysis of the strains.

Among these pair of strains, those composed by the same species of *Candida*, and in particular 12 pair of *C. albicans* isolates, were studied. All the corresponding patients were treated with azole antifungals. The microdilution-based analysis of susceptibility to these compounds didn't show development of resistance among yeasts responsible for the second episode of infection, but allowed to detect in four cases a decrease of susceptibility, expressed as Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Instead, in two cases an increase in susceptibility was observed.

Isolates were therefore examined in several steps. First, a karyotype analysis of each pair was carried out to identify correlation or discordance by evidencing possible chromosomal rearrangements. This analysis was performed through Pulsed Field

Gel Electrophoresis (PFGE) on the whole genome of the strains to visualize their chromosomal patterns (Electrophoretic Karyotyping, EK). The comparison showed differences of chromosomal bands in eight cases.

Besides, in order to obtain other information on the nature of infecting strains, a fingerprinting analysis was performed by using a Southern hybridization with the 27A probe, which is widely used for *C. albicans* typing due to its medium-repeated sequence.

Computer-assisted analysis of hybridization patterns showed modifications in nine pair of isolates. Therefore, a total correspondence between the two typing methods was not registered: in one case the study of restriction polymorphism resulted more discriminating than the karyotype analysis.

Finally, on the three pair of isolates which were composed by the same strain, a Real Time PCR analysis on the expression of *CDR1*, *CDR2* and *MDR1* genes, coding for antifungal azoles efflux pumps, was performed to identify the molecular mechanism responsible for the resistance to the administered therapy and consequently for the genesis of relapse. In all the three pair of isolates were not registered MIC variations between the first and the second isolate.

In the first case both the isolates showed high levels of expression for all genes, with a decrease for *MDR1*. As expected on the basis of MIC values, an overexpression was registered for *CDR1* and *CDR2*, which allowed to identify in the expulsion of the drug the mechanism which caused relapse.

In the other two cases was observed a little, non-significant increase of expression for all the genes. This increase did not correspond with relative MIC values. Persistence of the same yeasts in these patients is probably due to other resistance mechanisms, as for example mutations in the gene encoding for ergosterol. Differences existing between these phenomena *in vitro* and *in vivo* should be considered. If the treatment was well performed, is therefore possible that overexpression which determined survival of the strain in the host was not revealed in the next phases in laboratory.

Further studies will be necessary to clarify what processes determined these episodes of relapse. Collection of new strains responsible for possible new cases of recurrent candidosis will allow the application of these analyses to a statistically significant sample.

The study of expression, which resulted simple and rapid, will be extended to the analysis of other resistance mechanisms in order to obtain information on the pathogenicity of *Candida albicans* in oropharyngeal recurrent candidoses.

The molecular method for the diagnosis of candidosis is now in comparison with other phenotypical identification methods; results of this analysis are not yet published.

In the next future, this technique will be applied to the identification of other *Candida* species and to other types of clinical samples. Finally, a Real Time PCR protocol will be designed for the diagnosis of candidosis.

This research represents therefore a preliminary phase of a study on oral candidoses that in the next future will be expanded to a wider collection of isolates, which will be composed by non-*albicans* species too. Moreover, the study will be applied to the definition of the role of several molecular mechanisms in the pathogenesis of recurrent candidoses, in order to implement a useful and effective method for the rapid identification of their causes.

INTRODUZIONE

Cenni sulla epidemiologia delle candidosi

Nell'ultimo ventennio si è assistito ad un incremento globale delle infezioni fungine mucocutanee ed invasive, incluse quelle orofaringee, delle ferite chirurgiche, quelle urinarie e soprattutto le fungemie (1, 2, 3). Tale aumento di incidenza è stato registrato parallelamente all'introduzione in medicina di nuove tecnologie e terapie più efficaci, che hanno consentito l'allungamento della sopravvivenza nei soggetti immunodepressi, ma anche di pratiche mediche invasive e di antibiotici ad ampio spettro (4, 5, 6, 7, 8).

La maggioranza delle micosi che interessano l'uomo è causata da *Candida* spp.; tali microrganismi occupano il quarto posto tra i principali patogeni responsabili di infezioni del torrente ematico (9, 10), e ad essi sono correlati elevati tassi di mortalità, specie nei pazienti immunocompromessi (11, 12). I lieviti appartenenti al genere *Candida* sono infatti capaci di comportarsi come patogeni opportunisti: normalmente presenti sulla superficie del corpo umano e nell'ambiente, essi possono causare una vasta gamma di infezioni che comprende forme superficiali, come la candidosi orale o vaginale, in genere risolvibili con adeguate terapie, e forme sistemiche spesso difficili da trattare e in molti casi anche letali. Le diverse specie di *Candida* rappresentano i più comuni agenti responsabili di micosi nell'uomo e, in particolare, di infezioni fungine di origine nosocomiale (4, 11, 13). Nelle unità di terapia intensiva, dove le condizioni dei pazienti sono generalmente critiche, esse rappresentano la terza causa più comune di sepsi (14).

Il meccanismo attraverso cui si verifica per *Candida* spp. il passaggio dalla condizione di commensale a quella di patogeno non è ancora stato del tutto definito, ma è chiaro che affinché esso si realizzi occorre una diminuzione delle difese dell'ospite. Fattori di rischio che possono predisporre all'infezione sono rappresentati dalle terapie antibiotiche o chemioterapiche, dalla cateterizzazione, da trattamenti immunosoppressivi o antiretrovirali.

Le candidosi possono essere di natura esogena o endogena. Studi epidemiologici hanno dimostrato che gli episodi infettivi sono spesso causati da ceppi provenienti dal microbiota residente cutaneo o gastrointestinale. Il rinvenimento di lieviti sulla superficie corporea non rappresenta necessariamente un indice di infezione, ma l'adesione e la persistenza di questi costituiscono il primo passo nello sviluppo della candidosi, che si realizza in mancanza di una adeguata risposta immune e può dare luogo, col superamento delle barriere mucose, a conseguenti infezioni disseminate (2, 15, 16, 17).

Per contro, la natura esogena delle candidosi è documentata da diversi episodi epidemici verificatisi in strutture ospedaliere e correlati a fattori quali il trasporto dei pazienti da un ambiente ad un altro, la contaminazione di liquidi per infusione o strumenti, ma soprattutto il comportamento non corretto del personale (1, 2, 16, 18). Non di rado infatti è stata rilevata corrispondenza tra isolati di *C. parapsilosis* e *C. albicans* provenienti dalle mani degli operatori e dai pazienti (2, 7, 19).

La definizione della natura endogena o esogena delle candidosi è dunque importante per l'adozione di idonee misure di controllo delle stesse (1).

Per quanto riguarda l'etiologia, *C. albicans* rappresenta la principale specie responsabile, seguita da *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, con

differenti distribuzioni geografiche (1, 20); recentemente tuttavia è stato registrato in diversi Paesi un incremento delle candidosi causate da specie non-*albicans*, in particolar modo da *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (21, 22, 23, 5). Tale fenomeno è correlato probabilmente alla diffusione nei laboratori diagnostici di metodi di identificazione più accurati rispetto al passato, che hanno permesso una migliore distinzione delle specie “non-*albicans*”, ma anche ad una serie di fattori epidemiologici, fra cui l’adozione di dispositivi e procedure invasivi che aumentano il rischio di sviluppare infezioni da specie normalmente ambientali e soprattutto dall’impiego estensivo del fluconazolo nei trattamenti profilattici e terapeutici, che ha favorito l’emergenza delle specie resistenti ai composti azolici, complicando la gestione dei pazienti critici (5).

Candidosi orali

Le candidosi del tratto orofaringeo, ed in particolare quelle che si sviluppano sulla mucosa del cavo orale, sono comprese tra le più comuni infezioni superficiali da *Candida* spp., soprattutto nei neonati e negli anziani; negli individui infetti da HIV esse costituiscono la principale affezione mucosale (24, 25). Anche in questo caso *C. albicans* rappresenta la principale responsabile, ma altre specie come *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis* sono state isolate dalla saliva di soggetti con candidosi orale (26).

L’isolamento del lievito dalla cavità orale non implica obbligatoriamente un processo patologico, dal momento che la prevalenza di colonizzazione in portatori asintomatici è pari a 20-75% (24). Diversi studi hanno però dimostrato l’associazione tra colonizzazione orale e sviluppo di infezione profonda, nonché tra entità della colonizzazione e data di insorgenza dell’infezione (27, 11). La semplice presenza di *Candida* nella cavità orale non causa problemi nella popolazione generale ma può condurre, in caso di proliferazione eccessiva del lievito, ad un processo infettivo che si manifesta con alterazione del gusto, senso di fastidio o di bruciore, disagia; in soggetti defedati l’infezione può anche diffondere nel circolo ematico e dare forme sistemiche severe, con elevata morbilità e mortalità (24). È possibile distinguere diverse manifestazioni, tra cui forme acute (pseudomembranosa e atrofica), croniche (leucoplachia, forma atrofica e glossite) e stomatiti (24).

Il meccanismo patogenetico col quale si realizza la lesione infettiva non è completamente noto, ma i fattori di rischio per il suo sviluppo sono stati individuati. Tra questi possono essere annoverati sia caratteristiche patogenetiche del lievito, come la capacità di aderire alla mucosa orale, resistendo al normale processo di rimozione esercitato dalla saliva, la formazione di ife, l’idrofobicità e la possibilità di legarsi alla fibronectina, sia fattori legati alle condizioni del sito e dell’organismo ospite, quali l’utilizzo di protesi, il cattivo funzionamento delle ghiandole salivari, l’età avanzata, l’impiego di antibiotici o altre malattie (24, 28). Alla base della maggiore frequenza di colonizzazione/infezione e dell’alta incidenza di candidosi ricorrenti registrate per gli individui con deficit del sistema immunitario stanno le alterazioni nella qualità delle cellule della mucosa buccale, che negli individui immunocompromessi offrono una diversa recettività ed avidità alle cellule fungine, ma anche i cambiamenti genetici e fenotipici cui le popolazioni di *Candida*, soprattutto quelle incluse in un eventuale biofilm, vanno incontro in tali soggetti (29, 30, 31).

Il trattamento delle candidosi orali non complicate viene effettuato generalmente tramite l'adozione di appropriate procedure di igiene orale e l'applicazione topica di antifungini; la terapia sistemica è indicata per i pazienti intolleranti o refrattari ai trattamenti locali e per coloro che sono a rischio di sviluppare infezioni sistemiche. La prognosi è in genere buona, qualora vengano impiegati idonei trattamenti; l'elaborazione di diagnosi non corrette, l'impiego di terapie inadeguate e la mancata rimozione dei fattori di rischio favoriscono invece la ricorrenza dell'infezione (24).

Antibioticoresistenza nei lieviti del genere Candida

Parallelamente all'incremento esponenziale di pazienti immunocompromessi, e dunque a rischio di sviluppare infezioni fungine invasive, che si è registrato negli ultimi decenni, la ricerca sui composti antifungini ha subito una notevole espansione, che ha portato alla produzione di nuove classi di molecole altamente efficaci nei confronti di diverse famiglie di miceti. Inoltre, l'aumento di consapevolezza della pandemia fungina da parte della comunità medica ha condotto ad un notevole miglioramento nella definizione delle strategie terapeutiche da adottare nella pratica clinica. Nonostante ciò, ancora oggi le infezioni fungine risultano spesso difficili da diagnosticare e da gestire, soprattutto in relazione alla possibilità che i ceppi responsabili siano resistenti ai comuni farmaci antimicotici (32).

Dal momento che una scarsa risposta alla terapia antifungina può essere dovuta a diversi fattori, sia propri dell'ospite (terapie citotossiche in corso, neutropenia, patologie concomitanti) che legati al farmaco impiegato (dosaggio inadeguato, interazioni) o alla natura dell'infezione (ascessi drenanti, presenza di catetere nel sito infetto), è opportuno considerare la resistenza nei confronti di un dato composto antimicotico come la capacità del lievito di persistere nell'organismo e causare infezione nonostante la somministrazione di concentrazioni tollerabili del composto stesso.

Il fenomeno della resistenza agli antifungini sembra essere strettamente legato all'impiego estensivo di tali sostanze nel trattamento delle infezioni micotiche. Sebbene tale caratteristica sia stata descritta anche in altri tipi di funghi, come *Aspergillus* spp. o *Cryptococcus neoformans*, quella mostrata dal genere *Candida* costituisce oggi il problema più significativo in campo micologico.

Diversamente da quanto avviene nei batteri, nei lieviti la resistenza agli antibiotici non emerge rapidamente e non si diffonde con facilità, a causa della natura eucariotica delle cellule, del tempo di replicazione più lungo e della mancanza di meccanismi genetici per lo scambio di resistenze. In questi sono pertanto individuabili due forme di resistenza: una innata, presente anche prima della somministrazione di terapie antifungine, come quella mostrata da *C. krusei* verso il fluconazolo, ed una secondaria o acquisita, che insorge durante o in seguito ad un trattamento antimicotico, comune ad esempio nei ceppi di *C. albicans* responsabili di infezioni orofaringee in pazienti HIV-positivi trattati con composti azolici (33). Per questi ultimi, nonostante l'introduzione della terapia HAART abbia determinato una drastica diminuzione degli episodi di infezione, l'isolamento di ceppi resistenti è diventato più frequente rispetto al passato. Tale fenomeno sta assumendo sempre maggiore importanza, soprattutto a causa dell'impiego diffuso del fluconazolo per la profilassi antifungina nei pazienti oncologici: sempre più spesso infatti si osserva in

questi soggetti uno shift verso isolati con diminuita suscettibilità agli antimicotici o verso specie intrinsecamente resistenti come *C. krusei* o *glabrata* (3).

Diversi sono i meccanismi responsabili della ridotta suscettibilità, innata o acquisita, mostrata da *Candida* spp. nei confronti dei composti antimicotici, e spesso due o più meccanismi possono concorrere a determinarla.

L'azione dell'amfotericina B e dei farmaci polienici in generale si esplica tramite legame all'ergosterolo, il principale sterolo della membrana fungina, responsabile della fluidità e della asimmetria della stessa e del buon funzionamento delle proteine ad essa legate. Il principale meccanismo di resistenza nei confronti di questo composto è rappresentato da una diminuzione nella quantità di ergosterolo della membrana cellulare fungina. L'amfotericina B è attiva contro gran parte delle specie eccetto *C. lusitanae*, spesso intrinsecamente resistente, e *C. glabrata*, che mostra a volte una ridotta suscettibilità. Tuttavia, in pazienti neutropenici che hanno ricevuto terapie prolungate a base di amfotericina B, sono rilevabili alti livelli di resistenza da parte di tutte le maggiori specie di *Candida* (33).

Gli antifungini che inibiscono la sintesi dell'ergosterolo a partire dallo squalene si dividono in tre gruppi: le allilammine e i tiocarbamati, che agiscono sull'epossidasi dello squalene, codificata dal gene *ERG1*, e i composti azolici, distinti in imidazoli (come il ketoconazolo) e triazoli (come il fluconazolo), che hanno come bersaglio il citocromo P-450 (lanosterol-14- α -demetilasi), codificato dal gene *ERG11*, responsabile della conversione del lanosterolo in ergosterolo, causando alterazioni delle proprietà della membrana e di conseguenza inibizione della crescita e della replicazione cellulare.

I composti azolici sono attivi contro dermatofiti, *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* e funghi dimorfici. Vengono comunemente impiegati per trattare molte infezioni superficiali ed invasive e possono condurre come già detto sia allo sviluppo di resistenze acquisite (specialmente in *C. albicans*) sia ad una variazione nella composizione della flora commensale fungina, a favore di specie meno suscettibili a tali composti.

Diversi meccanismi sono alla base della ridotta suscettibilità agli agenti azolici. Il citocromo P-450, che rappresenta il target di tali composti, può essere prodotto in eccesso, alterato o sostituito nell'attività di sintesi degli steroli da altri enzimi con la stessa funzione; alternativamente, agli azoli può essere impedito l'ingresso nella cellula fungina, essi possono essere espulsi mediante carriers multipli, essere degradati o modificati (32, 34, 35).

Per quanto riguarda i meccanismi di resistenza che si esplicano nella biosintesi dell'ergosterolo, diverse mutazioni puntiformi sono state individuate a livello del gene *ERG11* in isolati resistenti, e la regolazione dell'espressione dei geni coinvolti in questa via biosintetica è oggetto di numerosi studi; mutazioni in geni correlati si sono rivelate responsabili della sintesi di proteine analoghe a quelle prodotte da *ERG11*.

Il meccanismo attraverso cui viene prevenuto l'ingresso delle molecole del farmaco all'interno della cellula si basa probabilmente su una modificazione nella struttura della membrana citoplasmatica che non è stata ancora completamente chiarita.

La capacità di espellere gli azoli dal citoplasma, tipica della specie *krusei*, è stata studiata a fondo ed è basata sulla presenza di due tipi di proteine trasportatrici, appartenenti alle famiglie delle "ATP-binding cassette" (ABC) e delle "major facilitators" (MF) proteins. Le prime sono proteine a quattro domini, di cui due integrati nella membrana e due coinvolti nell'idrolisi dell'ATP per il trasporto del substrato. Fra i geni che codificano per tali proteine, i *Candida Drug Resistance*

(*CDR*), e in particolare *CDR1* e *CDR2*, il cui m-RNA è presente in quantità maggiori nei ceppi resistenti rispetto a quelli sensibili, si sono rivelati direttamente correlati con la resistenza ai composti azolici. Il secondo tipo di pompe di efflusso invece consiste di proteine che sfruttano la forza protonmotrice per espellere le molecole di antifungino dal citoplasma; anche in questo caso sono stati identificati diversi tipi di geni *MF*, fra cui quello codificante per MDR1 (multidrug resistance 1), responsabile della resistenza di *C. albicans* al fluconazolo (33). Una rappresentazione dei diversi meccanismi alla base della resistenza nei confronti degli azoli è riportata in **Figura 1**.

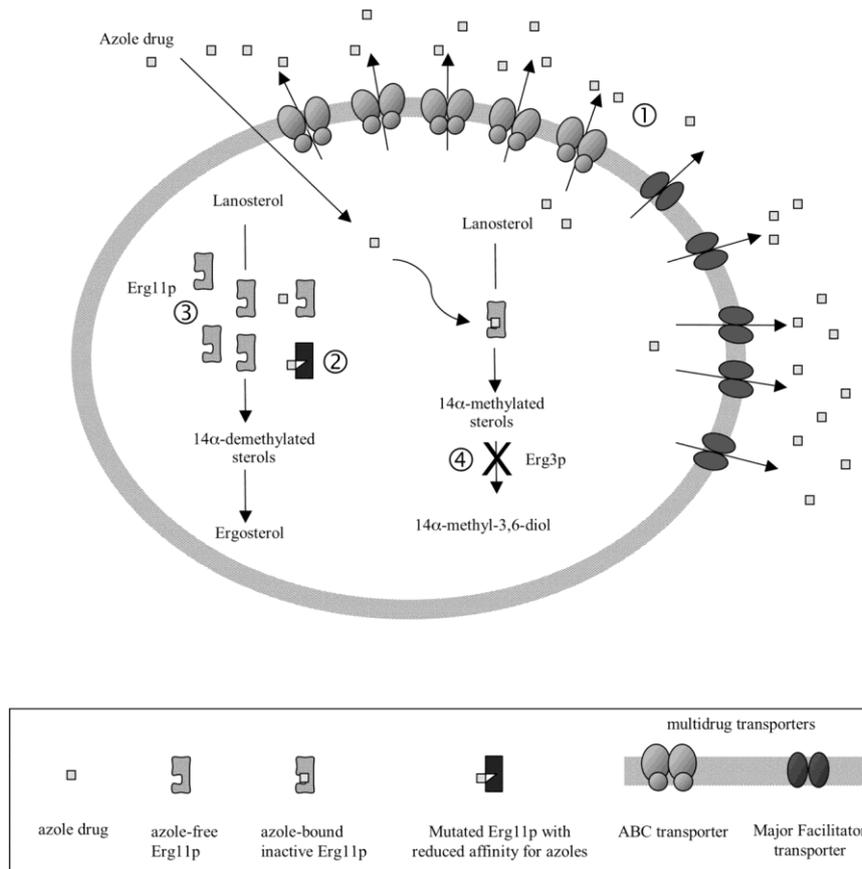


Figura 1 Rappresentazione schematica dei meccanismi di resistenza agli antifungini azolici in *Candida* spp.: 1. Riduzione dell'accumulo di farmaco dovuto alla deregolazione dei geni per ABC (ATP-binding cassette) e major facilitator proteins. 2. Diminuita affinità per gli azoli dell'enzima target Erg11. 3. Aumento del contenuto cellulare di Erg11. 4. Alterazione della via biosintetica dell'ergosterolo per inattivazione di Erg3 (sterol C5,6-desaturasi)

Attualmente, la forma più significativa di resistenza agli azoli è quella mostrata da *Candida* nei confronti del fluconazolo, sia costitutiva che indotta. La forma acquisita è frequente, come già riportato, nei pazienti HIV-positivi, in cui la candidosi orofaringea da ceppi fluconazolo-resistenti si sviluppa facilmente con livelli di CD4+ <100/mm³ e storia clinica caratterizzata da precedenti episodi di infezione (3). In genere infatti le prime manifestazioni rispondono prontamente ad un breve ciclo di terapia orale a base di fluconazolo e la continua o intermittente esposizione a questo antifungino può comportare la diminuzione della suscettibilità nei suoi confronti e

conseguentemente la necessità di aumentarne la dose per raggiungere un'adeguata risposta clinica. Ciò sottolinea l'importanza del ruolo delle scelte profilattiche/terapeutiche a base di composti azolici. La diffusione della forma costitutiva è legata all'impiego diffuso degli azoli in medicina, agricoltura e veterinaria, che favorisce la selezione di specie intrinsecamente resistenti.

La flucitosina (5-fluorocitosina) è un analogo pirimidinico con un'attività diversa da quelli degli altri antimicotici: grazie ad una permeasi essa entra nelle cellule e viene convertita prima in 5-fluorouracile da una deaminasi, quindi in 5-fluoro-2'-deossiridina-5'-monofosfato (5-FdUMP) e in 5-fluoro-2'-deossiridina-5'-trifosfato (5'-FdUTP), che vengono incorporati nel DNA e nel RNA inibendo la sintesi degli acidi nucleici e delle proteine. Essa ha uno spettro di azione antifungina comprendente *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* e alcuni funghi dematiacei. I meccanismi di resistenza in questo caso consistono in difetti delle deaminasi o delle uracil-fosforibosiltrasferasi. *C. krusei* e *C. lusitanae* sono intrinsecamente resistenti a questo composto e la resistenza viene acquisita rapidamente dalle altre specie durante il suo impiego in terapia, soprattutto se somministrata in dosi inferiori a 25 µg/mL (32,33).

Altri meccanismi possono determinare una ridotta suscettibilità ai farmaci antifungini. Un cambiamento nel numero dei cromosomi dovuto a mancata disgiunzione, con aggiunta o perdita di una copia, può essere determinante per la resistenza ad un determinato composto, qualora i geni coinvolti nella risposta al composto in questione siano presenti sul cromosoma soprannumerario o perso (33).

La resistenza crociata è possibile ma non si verifica sempre: mutazioni nei geni *CDR1* e *CDR2* possono indurre resistenza nei confronti di tutti i composti azolici, mentre quelle che determinano una overespressione di *MDR1* sono specifiche per la resistenza al fluconazolo. Alterazioni nella composizione della membrana possono risultare in una ridotta suscettibilità sia nei confronti dei polieni che degli azoli. Per questi motivi, alcune strategie terapeutiche si basano su associazioni di diversi composti (es. fluconazolo con itraconazolo) (33).

Data l'importanza che la resistenza ai farmaci oggi riveste nella pratica clinica, la determinazione della suscettibilità agli antifungini è fondamentale per la scelta della terapia da somministrare. Considerando tuttavia la difficoltà di correlazione tra quanto rilevabile *in vitro* e ciò che si verifica *in vivo*, a causa di variabili connesse alle condizioni del paziente e/o al tipo di infezione, la definizione di una metodica standard affidabile e riproducibile per la valutazione delle resistenze è essenziale per stabilire trattamenti adeguati. La dimostrazione che per alcune forme di candidosi la prognosi sia direttamente correlata alla suscettibilità di *Candida* spp. nei confronti degli azoli, e del fluconazolo in particolare, unitamente alla scoperta, negli ultimi anni, di nuove classi di antifungini, hanno aumentato l'interesse verso tali composti e la necessità di test attendibili per la pratica clinica.

Il Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, precedentemente National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) ha sviluppato un protocollo standard noto come M27, proposto nel 1992 (M27-proposed, M27-P), emanato in prova nel 1995 (M27-tentative, M27-T) ed approvato nel 1997 (M27-approved, M27-A) (36-39). Tale documento descrive la procedura di microdiluzione da impiegare (misura e preparazione dell'inoculo, tipo di terreno, condizioni di incubazione, tempi di lettura) per la determinazione della suscettibilità agli antifungini e fornisce, finora solamente per fluconazolo, itraconazolo e fluorocitosina, i breakpoints per l'interpretazione dei risultati in termini di Minimum Inhibitory Concentration (MIC), la

concentrazione minima del composto alla quale la crescita del micete è inibita (**Tabella 1**).

	S	SDD	I	R
Fluconazolo	< 8	16 - 32	/	> 64
Fluorocitosina	< 4	/	8 - 16	> 32
Itraconazolo	< 0.12	0.25 - 0.5	/	> 1

Tabella 1. Breakpoints ($\mu\text{g/ml}$) definiti dal CLSI per la determinazione della suscettibilità agli antifungini

Per gli azoli, isolati con MIC comprese nel range indicato con SDD (Sensibilità Dose- o Rilascio-Dipendente) rispondono al trattamento solo se una quantità significativa di farmaco viene somministrata nel sito di infezione. La categoria interpretativa indicata come Intermedia (I) invece è usata per descrivere isolati che possono essere trattati con una dose maggiore di farmaco o che offrono una risposta clinica indeterminata o incerta alla terapia.

Nonostante l'esistenza di una metodica standardizzata, e dunque ampiamente validata e riproducibile, la rilevazione della suscettibilità agli antifungini costituisce ancora oggi una pratica meno sviluppata ed utilizzata rispetto all'analisi dell'antibioticoresistenza nei batteri. Tuttavia, la diffusione delle resistenze fungine può essere prevenuta unicamente mediante una corretta gestione dei pazienti a rischio e la somministrazione di idonee terapie. In futuro, lo sviluppo di nuove classi di agenti antifungini, attualmente in studio, fornirà probabilmente nuovi strumenti per il controllo delle infezioni più difficili, ma il primo passo per il controllo di questo fenomeno è rappresentato dalla rapida identificazione degli isolati nei campioni clinici, dalla corretta determinazione dei relativi valori di MIC e da un'adeguata interpretazione del loro significato clinico, insieme alla considerazione di tutti i fattori che possono influire sull'esito del trattamento. Laddove ciò non viene effettuato di routine al momento della prima diagnosi, sarebbe opportuno almeno analizzare gli isolati ottenuti da infezioni che non rispondono alla terapia, per rilevare eventuali meccanismi di resistenza in atto, escludendo eventualmente altre cause di fallimento terapeutico, ed orientare in modo adeguato i successivi trattamenti (40).

Metodi per la identificazione, la tipizzazione intraspecie e lo studio della suscettibilità agli antimicotici di isolati di *Candida* spp.

La risoluzione delle candidosi è strettamente dipendente da una diagnosi precoce e dall'adozione tempestiva di un'appropriata terapia antifungina, in particolar modo nei pazienti critici (41). A tutt'oggi la diagnostica delle micosi risulta ancora difficoltosa, sia per la mancanza di una sintomatologia ascrivibile inequivocabilmente a tale tipo di patologia, sia perché i metodi tradizionali, basati sullo sviluppo in coltura dei lieviti eventualmente presenti nei campioni clinici, non sono sufficientemente precisi e richiedono anche diversi giorni per fornire risultati. La diagnosi colturale di candidosi invasiva, ad esempio, richiede 2-5 giorni per il completamento e può dare false negatività, mentre campioni superficiali possono risultare positivi anche in caso di colonizzazione (42).

Diversi metodi, sia fenotipici che genotipici, sono stati messi a punto negli ultimi decenni per individuare, identificare e tipizzare i lieviti del genere *Candida*.

I sistemi fenotipici si basano sulla caratterizzazione dei prodotti cellulari, ottenibili dopo esame colturale; ciò rappresenta anche il loro principale limite, dal momento che anche minime variazioni nelle condizioni di crescita possono influenzare l'espressione genica degli isolati, portando ad una scarsa riproducibilità fra diversi laboratori (43). Spesso poi i metodi fenotipici, per il cui allestimento possono essere necessari anche più giorni, non offrono sufficienti informazioni per differenziare isolati tra di loro non correlati; in alcuni casi inoltre i risultati sono condizionati dalla instabilità o variabilità fenotipica di alcune specie caratterizzate da switching fenotipico spontaneo (44).

Le tecniche sierologiche, impiegate per la ricerca di antigeni fungini o di anticorpi prodotti nei confronti di *Candida* spp. nei fluidi biologici, sono caratterizzate da maggiore rapidità e semplicità, ma molte tra queste sono poco specifiche e sensibili, e i risultati vanno accuratamente interpretati: un test positivo non indica necessariamente infezione, mentre un risultato negativo non permette di escludere la possibilità che il soggetto sia incapace di produrre un'adeguata risposta anticorpale o che gli antigeni del micete siano stati eliminati dal circolo ematico (45).

Le tecniche di biologia molecolare, consentendo una rapida ed accurata individuazione dei microrganismi nei campioni clinici e potendo offrirne anche la contemporanea identificazione di specie, costituiscono una valida alternativa ai metodi tradizionali nella diagnosi precoce di candidosi. Esse possono inoltre essere impiegate per ottenere una distinzione a livello molecolare dei diversi isolati, utile non solo nelle indagini epidemiologiche, per stabilire l'origine di outbreak epidemici, ma anche per rilevare in stipiti isolati in tempi diversi da una stessa fonte eventuali modificazioni genotipiche conseguenti, ad esempio, alla pressione selettiva esercitata dalla terapia antimicotica. Negli ultimi anni diverse tecniche molecolari sono state applicate all'analisi delle caratteristiche genetiche di isolati di *Candida* spp. Alcune di esse sono basate sull'amplificazione degli acidi nucleici, anche direttamente all'interno dei campioni clinici; altre invece, avendo come scopo il confronto tra specifici ceppi o cloni di una determinata specie, devono essere effettuate su colonia: per queste è dunque necessario lo sviluppo colturale del lievito. A volte, per aumentare il potere discriminante dell'analisi, è opportuno applicare almeno due tecniche di genotipizzazione contemporaneamente (46).

Le tecniche basate sull'amplificazione del DNA vengono impiegate per determinare la presenza del lievito nei campioni clinici all'interno dei quali la quantità di DNA di lievito è generalmente minima. Per quanto riguarda i metodi basati sull'impiego della Polymerase Chain Reaction, come target di amplificazione possono essere scelte sequenze specie-specifiche, per la ricerca di una determinata specie di lievito. In alternativa possono essere scelte sequenze presenti in tutti i tipi di funghi o anche sequenze genere-specifiche: in questi casi è necessario condurre una successiva analisi dei prodotti dell'amplificazione per l'identificazione di specie. Per assicurare sensibilità e specificità alla reazione è opportuno scegliere come target geni presenti in più copie e sequenze presenti solo nel microrganismo di interesse. I geni per il RNA ribosomiale rispondono ad entrambe queste esigenze: 50-100 copie di tali geni, rappresentati dal gene per la subunità piccola (18S) e da quelli per la subunità grande (5.8S e 28S), separati da regioni spaziatriche interne trascritte, ITS1 e ITS2, sono presenti in tandem nel genoma aploide di tutti i miceti; mentre i geni per rRNA sono altamente conservati nei funghi, le regioni ITS hanno sia aree altamente variabili che aree molto conservate, il che permette di tracciare primers specifici per determinate specie, generi o per i miceti in generale (47).

L'impiego della nested PCR, tramite due amplificazioni successive, può aumentare sia la specificità che la sensibilità della reazione; è anche possibile utilizzare per la prima fase dei primers con sequenza universale, per ottenere ampliconi caratteristici di un ampio spettro di specie fungine, e operare una seconda fase con diversi primers specie-specifici, in più reazioni parallele o, più economicamente, in un'unica miscela di reazione contenente più coppie di primers. Il principale svantaggio di questa tecnica risiede proprio nella sua estrema sensibilità, essendo possibile registrare falsi positivi a causa di cross-contaminazione dovuta a prodotti di altre amplificazioni, microrganismi di origine ambientale o reagenti contaminati (48, 49). Ciò può essere evitato con precauzioni quali l'impiego di ambienti separati ed equipaggiamenti differenti per le diverse reazioni (50).

Diverse procedure sono oggi utilizzabili per lo studio degli ampliconi. Il tipo più semplice e tradizionale di analisi dei prodotti di amplificazione è rappresentato dalla stima della loro lunghezza mediante elettroforesi su gel (Amplified Product Length Polymorphism, APLP), che può essere resa più accurata utilizzando gel di poliacrilammide e automatizzata mediante sistemi capillari (51). Gli ampliconi possono anche essere sottoposti a restrizione o analizzati in base al Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP), ma tali procedure richiedono tempo e adeguata preparazione per il corretto svolgimento (52, 53).

Nella real-time PCR, invece, l'amplificazione viene monitorata in tempo reale ed è possibile la quantificazione del DNA target; l'impiego di sonde aumenta la specificità della reazione ed elimina la necessità di un'analisi dei prodotti di reazione. Inoltre, la possibilità di condurre amplificazione e rilevazione all'interno delle medesime provette diminuisce sia il tempo di reazione sia il rischio di contaminazione e di risultati falsi positivi. Nonostante i costi ancora elevati e la mancanza di standardizzazione delle procedure, la real-time PCR sta assumendo sempre maggiore importanza per la diagnostica micologica. Diversi studi hanno dimostrato come sia valido il suo impiego nella identificazione di *Candida* spp., e come sia possibile anche la rilevazione e quantificazione contemporanea di più specie nello stesso campione (multiplex real-time PCR) (54-57).

Anche la Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA), permettendo una sensibile amplificazione del rRNA 18S mediante l'azione consecutiva di trascrittasi inversa, RNasi H e T7 RNA polimerasi, può essere adoperata per rilevare diverse specie di *Candida*: la reazione si svolge in poche ore e ha una elevata sensibilità. Essa consente di rilevare le cellule fungine vitali nei campioni biologici, ma dato il costo dei tre enzimi impiegati risulta ancora poco diffusa (58).

Tra i metodi di identificazione/tipizzazione che non si basano sull'amplificazione genica invece, l'impiego di sonde marcate con fluoresceina nella Fluorescence in situ Hybridisation (FISH) consente l'identificazione dei lieviti senza bisogno di colture pure, direttamente sul campione biologico posto su vetrino. La sensibilità di tale metodica, che risulta rapida e semplice da effettuare, sembra essere simile a quella dei metodi basati sull'amplificazione degli acidi nucleici (59).

In molte specie fungine, riarrangiamenti cromosomici ineguali o rotture e conseguenti ricongiunzioni dei cromosomi possono tradursi in un polimorfismo della loro lunghezza, che può essere analizzato tramite cariotipizzazione elettroforetica (Electrophoretic Karyotyping, EK). Nelle tecniche elettroforetiche convenzionali i frammenti di DNA più lunghi di 50 kb mostrano la stessa mobilità e non si separano tra di loro. La Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), utilizzando un campo elettrico alternato, permette invece la separazione di molecole molto grandi o anche

di interi cromosomi. Per evitare rotture meccaniche delle molecole di DNA durante le comuni procedure di estrazione, le cellule intatte vengono fissate in blocchetti di agarosio, all'interno dei quali avvengono le reazioni di lisi: la matrice di agarosio è in grado infatti di mantenere ferme e integre le molecole di DNA, e consente ai reagenti di diffondere liberamente. L'incubazione con detergenti ed enzimi permette quindi di rimuovere i componenti cellulari dal DNA, e successivamente i blocchetti vengono posti nel gel di corsa, nel quale i cromosomi, sottoposti all'azione del campo elettrico, migrano in funzione della loro lunghezza. Ad ogni cambiamento di polarità durante la PFGE le molecole si riorientano e cambiano direzione, il che ne facilita il passaggio attraverso le maglie del gel.

La grandezza dei cromosomi può variare molto fra differenti ceppi di *Candida*, dando luogo a vari cariotipi elettroforetici. La valutazione delle differenze fra i pattern può essere effettuata visivamente o tramite analisi computer-assistita. Se il polimorfismo che si ottiene non è sufficientemente discriminante, il DNA può essere digerito con enzimi di restrizione a taglio raro prima dell'elettroforesi, in modo da analizzare un numero maggiore di frammenti a lunghezza variabile (Restriction Endonuclease Analysis of Genomic DNA, REAG). Nonostante l'equipaggiamento necessario per la PFGE sia costoso e la preparazione e l'elettroforesi dei campioni siano procedure lunghe, impegnative e non consentano l'analisi simultanea di un ampio numero di ceppi, questa tecnica rappresenta un buon metodo per la tipizzazione di *Candida* spp. (60,61). L'elettroforesi in campo pulsato è stata impiegata, sia come strumento di confronto diretto del cariotipo di diversi isolati di *Candida* spp., sia per valutare eventuali differenze clonali dopo digestione del DNA con enzimi di restrizione specifici, per la distinzione fra i pattern cromosomici di *C. albicans*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, nonché per distinguere *C. albicans* da *C. dubliniensis*, ad essa fenotipicamente correlata (62-73).

Il DNA genomico può anche essere sottoposto a digestione da parte di enzimi a taglio frequente per analizzare il polimorfismo di lunghezza dei frammenti (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), determinato dalla variabilità delle sequenze dei siti di taglio o da inserzioni/delezioni che si realizzano tra di essi. Ciò può essere visualizzato separando i frammenti ottenuti con una comune elettroforesi su gel. L'analisi di restrizione è rapida, semplice e poco costosa, ma i pattern che si ottengono sono alquanto difficili da interpretare e comparare. La maggior parte delle bande più evidenti in tali pattern è rappresentata da frammenti di DNA ribosomiale o mitocondriale, che non forniscono sufficienti informazioni sulla corrispondenza fra isolati moderatamente correlati. Per una comparazione più semplice è possibile trasferire il DNA digerito su una membrana e permetterne l'ibridazione con sonde marcate specifiche per alcune sequenze ripetute, come la Ca3 o 27A, o sequenze sintetiche derivate da DNA microsatellite capaci di ibridarsi a loci ipervariabili di DNA fungino (74-76). Per la tipizzazione di *Candida* spp. è anche possibile impiegare la cosiddetta Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) o Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), tecnica di fingerprinting associata ad amplificazione a partire da un solo primer di circa 10 basi, la cui sequenza è scelta arbitrariamente e non in base alla conoscenza di regioni genomiche bersaglio. Essendo di piccole dimensioni, il primer è capace di ibridarsi a molti loci presenti nel genoma e l'annealing avviene a condizioni di bassa stringenza (35-40°C, 2.5 mM MgCl₂). Gli ampliconi generati possono essere visualizzati come un profilo elettroforetico. Data la competizione che si verifica per l'ibridazione dei primer, eventuali polimorfismi esistenti tra i diversi ceppi nei siti di annealing risultano in variazioni specifiche nei pattern. La

maggioranza dei frammenti amplificati origina da sequenze uniche piuttosto che da elementi ripetitivi. Quando viene condotta sull'intero genoma, la RAPD risulta generalmente in pattern più complessi rispetto alla PCR standard o alla RFLP e può aumentare la probabilità di rintracciare differenze tra i ceppi (77). Questa tecnica risulta semplice nella progettazione e nell'applicazione, economica e più veloce rispetto ad altri metodi di tipizzazione. Tuttavia, piccole differenze nelle condizioni sperimentali possono fornire profili differenti, compromettendone la riproducibilità intra- ed inter-laboratorio; diversi fattori possono influire sulla visibilità di determinate bande, come la concentrazione di ioni Mg^{2+} , la proporzione di primer e DNA target, la concentrazione e la provenienza della *Taq* polimerasi, il modello di termociclatore (78). Per superare tali ostacoli la PCR può anche essere mirata a specifiche sequenze, come le microsatelliti, e condotta ad elevata stringenza (79). La RAPD può essere dunque utilizzata sia per l'identificazione di specie che per la tipizzazione degli stipiti quando non è richiesto il confronto fra diversi laboratori (80-82).

Analogamente alla precedente, anche la Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) consiste in una tecnica di fingerprinting basata sull'amplificazione mediante PCR. In questo caso il DNA genomico viene digerito con due enzimi di restrizione e sui frammenti ottenuti si fa avvenire una reazione di amplificazione a partire da primers ad essi complementari, che possono anche essere marcati con dei tag fluorescenti per analisi automatizzate. Avvenuta l'amplificazione, i frammenti sono separati su gel per essere visualizzati. In genere un profilo AFLP consta di 50-100 bande, e l'elevata capacità discriminante ne favorisce l'impiego negli studi epidemiologici. I costi e la necessità di esperienza non ne permettono l'impiego routinario. Come per la RAPD e la RFLP, anche in questo caso non c'è bisogno di conoscere a priori le sequenze target, ma l'utilizzo di primers specifici e di temperature di annealing stringenti ne assicura la riproducibilità. Tale metodica viene impiegata sia per l'identificazione che per la tipizzazione di *Candida* spp. (83-85).

Il metodo più accurato per comparare due ceppi diversi è rappresentato ovviamente dal sequenziamento del loro genoma, anche se tale metodica non risulta ancora facilmente applicabile nella routine (86). Porzioni di geni fungini, come ad esempio la regione variabile V3 del gene per la subunità ribosomale grande in *C. dubliniensis*, o regioni microsatelliti polimorfiche in *C. albicans*, possono essere amplificate e le sequenze risultanti possono essere comparate tra di loro e fornire sufficienti informazioni sia per la tipizzazione che per l'identificazione di specie (87-89). Ad oggi, la tecnica più promettente per la tipizzazione risulta essere la Multi Locus Sequence Typing (MLST), basata appunto sul sequenziamento di segmenti interni di geni "housekeeping", in cui il polimorfismo di alcuni nucleotidi determina variazioni alleliche che si traducono in determinati fenotipi. Questo approccio fornisce risultati univoci e facili da standardizzare, il che consente una riproducibilità che può essere impiegata per studi epidemiologici. La tecnica è stata utilizzata per caratterizzare isolati clinici di *C. albicans* e per differenziare le specie *tropicalis*, *glabrata* ed *albicans* (90, 91). Essa è ancora applicata in pochi laboratori, ma lo sviluppo dell'automazione e l'abbattimento dei costi collegato alla diffusione di nuove tecnologie ne fa prevedere una maggiore disponibilità per il futuro.

I sistemi basati sui microarrays, infine, offrono un alto livello di sensibilità, specificità e ampia capacità di analisi, anche senza bisogno di conoscere a priori sequenze specifiche. Il legame degli acidi nucleici a sonde complementari immobilizzate su supporti solidi viene rivelato da un segnale fluorescente che viene captato da uno scanner ad alta risoluzione e analizzato tramite software, il che ne permette la

standardizzazione. I microarrays possono essere utilizzati per individuare i miceti nei campioni biologici, ma anche per tipizzarli definendo la presenza e la quantità di differenti varianti di regioni di specifici geni, come quelli ribosomiali (92). In futuro tale metodica verrà sicuramente estesa dalla ricerca alla pratica clinica.

Le suddette tecniche possono essere utilizzate anche nello studio delle modifiche genetiche alla base dello sviluppo di resistenze agli antimicotici (58, 93, 94).

Nonostante l'efficacia di tali metodi nella diagnosi di candidosi e nella tipizzazione degli isolati sia stata dimostrata da numerosi Autori, essi non sono stati ancora standardizzati o validati in ampi studi e molti risultano difficilmente applicabili, per costi e gestione, in gran parte dei laboratori. Essendo la diagnostica rapida e la caratterizzazione degli isolati fondamentali per l'adozione precoce di adeguate terapie antifungine, soprattutto nella sorveglianza dei pazienti a rischio, tale carenza risulta problematica in ambito microbiologico. Infine, per quanto concerne la resistenza agli antifungini, nonostante il problema sia sempre più sentito, e nonostante la caratterizzazione dei meccanismi che lo determinano sia in continuo sviluppo, non esistono ancora sistemi di sorveglianza che ne permettano l'analisi epidemiologica, e l'analisi di suscettibilità risulta ancora poco diffusa nella pratica clinica.

Tipizzazione molecolare di *Candida albicans*

Come già esposto, l'approccio fenotipico nella identificazione di determinati ceppi come cause di infezione, nella verifica dell'adattamento di alcuni stipiti a particolari distretti corporei, nonché nella distinzione tra episodi di recidive e nuove infezioni, è limitato dal fatto che le stesse caratteristiche fenotipiche, come la crescita su un certo substrato o la reazione ad un particolare antibiotico, possono essere determinate anche da diversi genotipi.

Nonostante la sequenza del genoma diploide di *C. albicans* sia stata pubblicata nel 2004 (95), la correlazione tra genotipo e caratteristiche patogenetiche del lievito non è ancora stata del tutto chiarita. Ciò è in parte complicato dalla mancanza di standardizzazione delle tecniche di biotipizzazione finora sperimentate, seppure esse si siano dimostrate efficaci. Fra queste, l'elettroforesi del cariotipo e lo studio del polimorfismo di restrizione sono considerate sufficientemente discriminanti e vengono comunemente impiegate per scopi epidemiologici (96, 97). I cambiamenti genetici che tali tecniche permettono di rilevare si verificano con una frequenza relativamente bassa ad ogni divisione cellulare e rimangono stabili nel tempo, il che rende riproducibili le metodiche; tali cambiamenti hanno inoltre un'entità tale da consentire un adeguato potere di risoluzione nella distinzione di ceppi differenti.

Il genoma di *C. albicans* è costituito da 7 cromosomi, numerati in ordine di grandezza decrescente, e da un cromosoma recante le sequenze ribosomiali, denominato cromosoma R, caratterizzato da una più lenta migrazione su gel elettroforetico. Uno degli aspetti più variabili del cariotipo è rappresentato appunto dalla diversa migrazione dei due omologhi di questo cromosoma, originati da crossing-over ineguali (98). Tale caratteristica può condurre erroneamente a considerare come differenti due stipiti omologhi. Appare dunque necessario, soprattutto quando si consideri un gran numero di isolati, accompagnare le analisi del cariotipo con altri metodi di tipizzazione (97). Le tecniche di analisi del polimorfismo di restrizione si

sono dimostrate valide nel coadiuvare la cariotipizzazione in diversi studi epidemiologici, potendo fornire utili indicazioni sulla correlazione tra ceppi (99).

Obiettivi della ricerca

La presente esperienza è stata indirizzata alla sperimentazione di alcune tecniche molecolari applicate allo studio delle candidosi orali, al fine di identificare una strategia pratica ed efficace per la diagnosi e l'analisi epidemiologica di questo tipo di infezione.

In una prima fase si è dunque provveduto ad implementare una metodica di multiplex-PCR per l'identificazione rapida ed accurata degli isolati, in riferimento a una tecnica fenotipica comunemente impiegata nei laboratori diagnostici.

Successivamente, diverse tecniche molecolari sono state applicate allo studio delle candidosi ricorrenti, per distinguere i casi di nuove infezioni da eventuali recidive causate da varianti del ceppo originario. Infine, è stato messo a punto un protocollo di analisi basato sulla valutazione dell'espressione di alcuni geni coinvolti nella determinazione della resistenza agli azoli in *C. albicans.*, al fine di identificare quale meccanismo fosse intervenuto nel causare episodi di recidiva.

MATERIALI E METODI

Campioni di studio e metodologia di campionamento

Il modello scelto è rappresentato da campioni provenienti da pazienti affetti da candidosi orale sospetta all'esame clinico, afferenti al laboratorio della Sezione di Microbiologia del Dipartimento Assistenziale di Patologia, Azienda Universitaria Policlinico "Federico II" di Napoli.

I prelievi sono stati eseguiti mediante tecnica dello sciacquo orale: ad ogni paziente è stato chiesto di effettuare un gargarismo con 9 ml di soluzione fisiologica sterile (NaCl 0.9%) per 60 secondi e di raccogliere poi in una capsula Petri il campione ottenuto, corrispondente ad una diluizione di saliva pari a circa 1:10. Tale campione è stato poi diluito ed insemato per inclusione in agar Sabouraud con Gentamicina e Cloramfenicolo e parallelamente in Plate Count Agar, per la determinazione della carica micotica (CM) e della carica microbica totale (CMT). Le piastre sono state quindi incubate a 37°C per 24-48 ore.

Identificazione degli isolati

Le colonie sviluppatesi dopo incubazione sono state identificate, secondo le indicazioni fornite dal produttore, con il metodo fenotipico API 20 C AUX (bioMérieux), basato sull'assimilazione degli zuccheri da parte dei lieviti.

Contemporaneamente, sugli stessi isolati è stata effettuata una identificazione genotipica mediante multiplex-PCR, secondo il protocollo proposto da Chang et al. nel 2001 (100).

Per l'estrazione del DNA, le colonie sono state inoculate in 5 mL di Yeast extract – Peptone - Dextrose (YPD) medium (1% estratto di lievito, 2% bacto-peptone, 2% glucosio) e lasciate crescere per una notte; 1.5 mL della sospensione ottenuta sono stati quindi sottoposti a trattamento con 2 µl di zymoliase (5 u/µL, ZymoResearch) a 37°C per 2 ore per ottenere la formazione degli sferoplasti, e posti nel BioRobot EZ1 (Qiagen) per l'estrazione del DNA mediante EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen).

Per l'amplificazione sono stati impiegati primers universali, specifici per le sequenze conservate della regione 18S del rDNA fungino, la regione adiacente ITS1 ed una piccola porzione della regione 28S (ITS1 e ITS2), e primers specifici per la specie *albicans*, che riconoscono la regione ITS2 (CA3 e CA4) (**Figura 2**):

ITS1 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'

ITS2 5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3'

CA3 5'-GGT TTG CTT GAA AGA CGG TAG-3'

CA4 5'-AGT TTG AAG ATA TAC GTG GTA G-3'

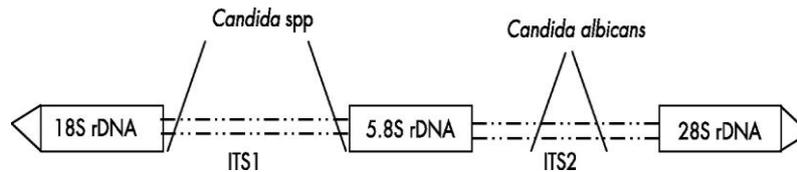


Figura 2: Siti di ibridazione per i primers genere-specifici ITS1 e ITS2 e specie-specifici CA3 e CA4

Sono state utilizzate le seguenti condizioni:

- 2 ng di DNA stampo, Tris-HCl 10 mM (ph 8.3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 0.8 mM, primers 3.2 μM (ITS1 e ITS2 0.4 μM ognuno, CA3 e CA4 1.2 μM ognuno), 1.25 U di Taq DNA polimerasi (V_f 50μl);
- pre-denaturazione a 94°C per 3 minuti, seguita da 35 cicli di 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C, 1 minuto a 72°C e da un'estensione finale a 72°C per 5 minuti;
- analisi degli ampliconi mediante elettroforesi in gel di agarosio al 2% con ladder 50bp e colorazione con bromuro di etidio (0,5 μg/ml).

Per ogni reazione sono stati processati anche un controllo negativo, contenente acqua sterile, e un controllo positivo contenente una sospensione di cellule di *C. albicans* in brodo di coltura.

La multiplex PCR è stata effettuata contemporaneamente anche sui campioni di saliva originari: 5 ml di ogni gargarizzato sono stati centrifugati a 14.000 rpm per 5 minuti; eliminato il sovrantante, il pellet è stato risospeso in 100 μl di acqua distillata sterile. La reazione di amplificazione è stata implementata su 20 μl di questo campione, seguendo lo stesso protocollo impiegato per le colonie.

L'identificazione è stata operata in base a quanto riportato in **Tabella 2**.

SPECIE	ITS1	ITS2	CA3	CA4	DIMENSIONE AMPLICONI (bp)	
<i>C. glabrata</i>	+	+	-	-	482-483	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	-	-	248	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	-	-	229	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	-	-	218	-
<i>C. neoformans</i>	+	+	-	-	201	-
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	218-219	110
<i>C. krusei</i>	+	+	-	-	182	-
<i>C. lusitaniae</i>	+	+	-	-	148	-
<i>C. kefyr</i>	-	+	-	-	249	-
<i>C. famata</i>	-	+	-	-	234	-

Tabella 2. Lunghezza dei prodotti di amplificazione ottenibili per le diverse specie coi primers ITS1, ITS2, CA3 e CA4.

La determinazione della carica micotica e della carica microbica totale è stata effettuata per ogni campione contando il numero di Unità Formanti Colonia (UFC) sviluppatasi su piastra e moltiplicandolo per il fattore di diluizione corrispondente.

Analisi degli isolati pre- e post-terapia antimicotica

Nella seconda fase dello studio si è proceduto a caratterizzare gli isolati responsabili di infezioni ricorrenti. Per ogni paziente affetto da almeno un episodio di recidiva sono stati considerati l'isolato ottenuto nel corso della prima infezione, prima di ogni trattamento antifungino, e quello responsabile della seconda infezione, comparsa in seguito alla terapia antimicotica. L'analisi si è basata sul confronto dei pattern di suscettibilità presentati dalle coppie di isolati di *C. albicans* nei confronti degli antifungini usati più comunemente, e successivamente sullo studio dei loro cariotipi e dell'eventuale polimorfismo di restrizione. Infine, è stata implementata una tecnica di Real Time PCR applicata allo studio dell'espressione dei geni delle pompe di efflusso caratteristiche della specie *albicans*.

Determinazione della suscettibilità agli antifungini

L'analisi dell'antibioticoresistenza è stata effettuata mediante il metodo colorimetrico YeastOne (YO3, Trek Diagnostic Systems, Westlake, Ohio), basato sul principio della microdiluizione. Esso consiste in un pannello contenente un ampio range di diluizioni di 6 diversi antifungini, riportati in **Tabella 3**:

ANTIFUNGINO	RANGE DI DILUIZIONE ($\mu\text{g/mL}$)
Amfotericina B	0.008-16
Fluconazolo	0.125-256
Itraconazolo	0.008-16
Ketoconazolo	0.008-16
5-Fluorocitosina	0.03-64
Voriconazolo	0.008-16

Tabella 3. Concentrazioni dei composti antifungini impiegati per la determinazione delle MIC, presenti nel pannello YO3

La metodica prevede che una sospensione di colonie con torbidità pari a 0.5 McFarland venga aggiunta ($V=20 \mu\text{L}$) a 10 mL di RPMI broth; 100 μL di questo vengono quindi distribuiti in ognuno dei pozzetti della piastra e si lascia in incubazione per 24 ore a 37°C. Il metodo consente di determinare la MIC di un dato antimicotico in base alla crescita del lievito nel pozzetto contenente il composto in esame, evidenziata dalla colorazione sviluppata dal marker redox Alamar Blue. Questa tecnica offre in genere una concordanza $\geq 85\%$ col metodo di riferimento definito dal NCCLS (101).

Analisi del cariotipo

L'elettroforesi in campo pulsato (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) è stata impiegata per evidenziare eventuali differenze genomiche nelle coppie di isolati attraverso il confronto diretto dei cariotipi (Electrophoretic Karyotyping, EK).

Le colonie di *Candida* ottenute dopo 48 ore di incubazione a 30°C sono state inoculate in 50 mL di Yeast extract - Peptone - Dextrose (YPD) medium (1% estratto di lievito, 2% bacto-peptone, 2% glucosio) e messe a 30°C in agitazione fino ad ottenere una torbidità della sospensione $\geq 1 \text{ OD}_{600}$. Le colture sono state dunque centrifugate per 10 minuti a 5000 rcf; il pellet cellulare così ottenuto è stato risospeso

in EDTA 50 mM, pH 8. Dopo avere misurato la concentrazione cellulare della sospensione mediante emocitometro, ne è stata prelevata una quantità contenente $6 \cdot 10^8$ cellule, in base alle formule seguenti:

n. medio di cellule/quadrato x n. di quadrati (25) x fattore di diluizione (100) x 10^4 = n. di cellule/mL di sospensione

volume di plug desiderato (1 mL) x numero di cellule necessario ($6 \cdot 10^8$) ÷ n. di cellule/mL di sospensione = volume (mL) di sospensione richiesto

Tale volume è stato centrifugato per 3 minuti e le cellule risospese in 500 μ L di una soluzione di Tris 10 mM, pH 7.2, NaCl 20 mM, EDTA 50 mM; a tale sospensione è stato aggiunto 1 mg di lyticase e 500 μ L di agarosio al 2%, mantenuto a 50°C. La miscela ottenuta è stata quindi trasferita nei pozzetti di plastica per ottenere la solidificazione dei "plugs", i blocchetti contenenti le cellule fungine incluse in agarosio. Questi sono stati quindi immersi in 2.5 mL di lyticase buffer (Tris 10 mM, pH 7.2, EDTA 50 mM, lyticase 1 mg/mL) e lasciati in incubazione per 1 ora a 37°C; il buffer è stato quindi rimosso e i plugs lavati con la soluzione di lavaggio (Tris 20 mM, pH 8.0, EDTA 50 mM) prima di essere reincubati, per 24 ore a 50°C, con 2.5 mL di buffer di reazione della Proteinasi K (EDTA 100 mM, pH 8.0, sodium deoxycholate 0.2%, sodium lauryl sarcosine 1%, Proteinasi K 1 mg/mL). I plugs sono stati quindi lavati per quattro volte da 30 minuti in 25 mL di buffer di lavaggio.

Al momento dell'elettroforesi, i plugs sono stati caricati e bloccati all'interno dei pozzetti di un gel di agarosio 0.8%, posizionato all'interno della camera elettroforetica CHEF DR II (BIO RAD) ed immerso in TAE 1X (Tris 40 mM, acido acetico 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0). Come marcatore di peso molecolare è stato utilizzato il *S. cerevisiae* marker, range 225-2200 kb (BIO RAD). Le migliori condizioni di corsa tra quelle sperimentate si sono rivelate le seguenti:

- Switch Time 120 sec / 24 h
240 sec / 36 h
- Voltaggio 3.5 V/cm
- Angolo di rotazione 106°.

La discriminazione tra gli isolati di ogni coppia è stata effettuata mediante confronto visivo tra i pattern di bande cromosomiche ottenuti. Sono stati considerati uguali quegli isolati che non esibivano differenze né nel numero né nella grandezza dei cromosomi (73, 69,70).

Restriction Fragment Length Polymorphisms

L'analisi di restrizione è stata condotta con la metodica sviluppata da Scherer et al., basata sull'ibridazione della sonda 27A, una sequenza mediamente ripetuta di *C. albicans*, al DNA digerito (99); l'ibridazione è stata poi rivelata tramite chemiluminescenza.

Le colonie sono state inoculate in 5 mL di YPD medium e lasciate crescere per una notte; 1.5 mL della sospensione ottenuta sono stati quindi sottoposti a trattamento con 2 μ L di zymoliase (5 U/ μ L, ZymoResearch) a 37°C per 2 ore per ottenere la formazione degli sferoplasti, e posti nel BioRobot EZ1 (Qiagen) per l'estrazione del DNA mediante EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen). I campioni ottenuti sono stati quindi sottoposti a restrizione con EcoRI (10 U/ μ L, Roche Applied Science), a 37°C per 4

ore, e successivamente caricati su gel di agarosio 0.6% (bromuro di etidio 0.5µg/mL) per la separazione elettroforetica, condotta per 18 ore a 40 V. Si è quindi proceduto, dopo aver trattato il gel in successione con HCl 0.5M, acqua distillata e NaOH 0.5M, al trasferimento su membrana di nylon sotto pressione; la membrana è stata dunque lavata ed essiccata a 80°C per 40 minuti, e messa in incubazione a 42°C per l'ibridazione con 1 µg di sonda 27A marcata precedentemente con dUTP-digossigenina (Roche). Dopo 24 ore sono stati effettuati passaggi in una soluzione di acido maleico 1X (0.1M, pH7.5, NaCl 0.15M) e blocking buffer 1X, poi in blocking buffer 1X contenente 35 U di anticorpi anti-digossigenina marcati con fosfatasi alcalina (Fab anti-Dig-AP, Roche), quindi lavaggi con wash buffer 1X (acido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5, 0.3% Tween 20) ed infine con detection buffer 1X (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, pH 9.5) (Roche DIG High Prime Labeling and Detection Starter kit). Si è proceduto dunque al trattamento della membrana con diossietano, substrato della fosfatasi alcalina, che in seguito a defosforilazione libera un anione fenolato che decomponendosi emette luce a 466 nm e può essere quindi rivelato mediante esposizione al luminometro.

La discriminazione tra gli isolati di ogni coppia è stata effettuata mediante analisi computerizzata dei pattern ottenuti: la membrana è stata visualizzata tramite VersaDoc MP 4000 (BIO RAD) ed elaborata mediante il software QuantityOne 4.6.5 (BIO RAD), assumendo come identici gli isolati con coefficiente di similarità pari a 100%, distinti quelli con coefficiente pari o inferiore a 90% e sottotipi quelli con coefficiente tra 90 e 99%.

Studio dei determinanti di resistenza

Per le coppie di isolati i cui cariotipi e i cui pattern di resistenza e di restrizione mostravano similitudine, è stato implementato un protocollo di real-time PCR basato sulla quantificazione dell'espressione dei geni *CDR1*, *CDR2* e *MDR1* in rapporto a quella del gene housekeeping *TEF3* (translation elongation factor 3). Le sequenze di primers e probes impiegati allo scopo sono riportate di seguito:

GENE (Accession N.)	PRIMER/ PROBE	SEQUENCE^a	GENE LOCATION (5'-3')
<i>CDR1</i> (X77589)	CDR1a	AACCGTTTACGTTGAACACGATAT	2504-2527
	CDR1b	ACCAACTTCACCATCTTCAATGAC	2565-2588
	CDR1pr	6FAM- ACTCACGCCGACACCACCGTTGTT-TAMRA	2535-2558
<i>CDR2</i> (U63812)	CDR2a	TGGCTAGTGTTTATATGGCAACCT	1725-1748
	CDR2b	AAGCTTCAGCAATTGACACTCTTT	1821-1844
	CDR2pr	6FAM- TCACCACGGAAACACCACGCACA-TAMRA	1792-1815
<i>MDR1</i> (Y14703)	MDR1a	TCTCGGGTGGATTCTTTGCTAAT	2659-2681
	MDR1b	AATGGACCAAACTAGGACCACA	2775-2797
	MDR1pr	6FAM- ACGGCACCCAACTCCAAGCGGC-TAMRA	2751-2773
<i>TEF3</i> (Z12822)	TEF3a	AACCGTTTACGTTGAACACGATAT	2480-2504
	TEF3b	ACCAACTTCACCATCTTCAATGAC	2565-2588
	TEF3pr	Texas Red- ACTCACGCCGACACCACCGTTGTT-BHQ2	2535-2558

^aAbbreviazioni: 6FAM, 6-carboxyfluorescein; TAMRA, 6-carboxy-*N,N,N',N'*-tetramethylrhodamine; Texas Red, trademark product from Molecular Probes; BHQ2, Black Hole Quencer 2

Tabella 4. Primers e probes fluorescenti impiegati nella Real Time-PCR

L'estrazione del RNA a partire da 5 mL di sub-coltura in YPD è stata effettuata tramite RNeasy mini kit (Qiagen). Ogni reazione di amplificazione è stata condotta in triplicato per ciascun isolato, in un volume pari a 25 μ L contenente 14 μ L di mix Qiagen OneStep Real Time-PCR (con 7.5 μ L buffer di reazione 5X, 1 μ L dNTP mix 10 mM ciascuno, 1 μ L di Enzime Mix: Omniscript e Sensiscript Reverse Transcriptase, HotStar Taq DNA Polymerase), 1 μ L di ogni primer (10 μ M), 1 μ L di probe (2 μ M), 2 μ L di RNA e 6 μ L di acqua RN-ase free. Il protocollo termico ha previsto una retrotrascrizione di 45 minuti a 52°C, seguita da 5 minuti a 95°C per l'inattivazione della retrotrascrittasi e l'attivazione della polimerasi, da 40 cicli di amplificazione con 15 secondi a 95°C e 1 minuto a 54°C e da una estensione finale a 54°C per 10 minuti. L'emissione di fluorescenza è stata misurata mediante il software iCycler iQ (BIO RAD). I risultati sono stati calcolati come media delle tre misurazioni ottenute per ogni campione. Per ciascun gene, un incremento pari a due volte il livello di espressione assunto come riferimento è stato considerato significativo.

RISULTATI

Identificazione degli isolati

I risultati delle identificazioni di specie effettuate sono riportati in **Tabella 5**.

SPECIE IDENTIFICATA	MULTIPLEX PCR		API20 C AUX
	COLONIA	SCIACQUO ORALE	
<i>C. albicans</i>	68 (71.5%)	62 (65.3%)	64 (67.3%)
<i>C. glabrata</i>	8 (8.4%)	7 (8.6%)	6 (6.2%)
<i>C. tropicalis</i>	2 (2.1%)	1 (1.1%)	5 (5.3%)
<i>C. krusei</i>		2 (2.1%)	1 (1.1%)
<i>S. cerevisiae</i>			2 (2.1%)
<i>C. parapsilosis</i>	1 (1.1%)	1 (1.1%)	1 (1.1%)
<i>C. guilliermondii</i>		1 (1.1%)	
<i>C. kefir</i>	1 (1.1%)	2 (2.1%)	1 (1.1%)
<i>C. famata</i>	1 (1.1%)		1 (1.1%)
Flora mista		5 (5.3%)	

Tabella 5. Identificazioni ottenute mediante multiplex PCR e API 20 C AUX

Su un totale di 81 isolati di *Candida spp.* ottenuti da sciacquo orale, l'applicazione della multiplex PCR ha permesso di discriminare 6 specie nel caso della reazione su colonia e 7 nell'applicazione diretta sul campione.

La concordanza con le identificazioni fornite dal sistema API è stata rilevata in 73 (90%) casi per la multiplex PCR eseguita su colonia e in 64 (79%) per quella praticata su sciacquo orale.

Per 63 (77.7%) campioni le due applicazioni della PCR hanno fornito la stessa identificazione; la metodica diretta ha rilevato in cinque campioni la presenza di una flora mista, composta in tre casi dalle specie *albicans* e *glabrata*, in un caso da *C. glabrata* e *C. guilliermondii* e in un altro da *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*.

Un esempio di quanto ottenuto dopo amplificazione mediante multiplex PCR è rappresentato in **Figura 3**.

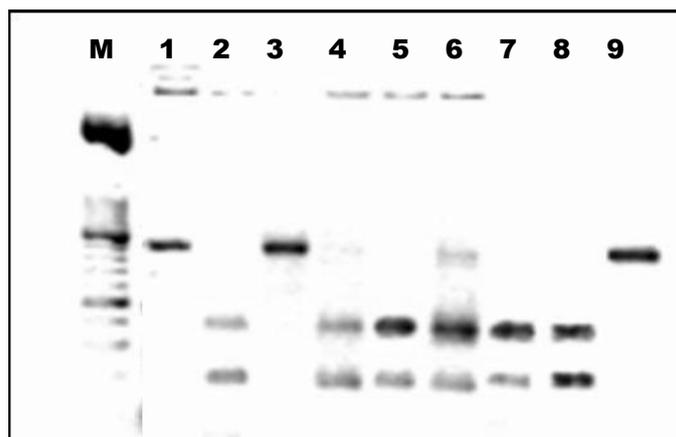


Figura 3. Esempio di ampliconi ottenuti mediante multiplex PCR da sciacquo orale: M 50bp; 1, 3 e 9, *C. glabrata*; 2, 4, 5, 6, 7, 8, *C. albicans*

La presenza dei lieviti nei campioni è stata evidenziata anche con valori di carica micotica intorno a 10 ufc/ml, o in presenza di forti contaminazioni batteriche (CT>3 x 10⁶).

Analisi degli isolati pre- e post-terapia antimicotica

Nell'ambito del campione di studio sono stati registrati 23 casi di candidosi orale ricorrente. In 7 (30.4%) casi il secondo isolato era diverso da quello responsabile della prima infezione, mentre nei restanti 16 (69.5%) è stata rilevata concordanza di specie tra il primo e il secondo episodio di infezione. Tra le coppie di questo gruppo, 12 appartenevano alla specie *albicans* e 2 alla specie *glabrata*, 1 era costituita da *C. tropicalis* e 1 da *C. parapsilosis*. Le coppie costituite da isolati di *C. albicans* (denominate A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K e L) sono state sottoposte ad analisi genomiche. Ciò al fine di verificare se si trattasse di reinfezioni da varianti del primo ceppo infettante, sopravvissute al trattamento antifungino somministrato e dunque resistenti, o alternativamente da nuovi ceppi, appartenenti alla stessa specie, da cui i pazienti fossero stati infettati dopo aver effettuato la terapia e dunque dopo la risoluzione del primo episodio di candidosi. Sulle coppie di isolati risultati corrispondenti è stato effettuato uno studio di espressione genica per valutare eventuali meccanismi alla base delle resistenza alla terapia.

Suscettibilità agli antifungini

I valori di MIC fatti registrare dagli isolati di *C. albicans* prima e dopo il trattamento antimicotico, unitamente all'indicazione della terapia praticata da ogni paziente, sono riportati in **Tabella 6**.

ISOLATO	TERAPIA	AB	FZ	IZ	KZ	FC	VOR
A1	2	0.03	0.125	0.008	0.008	0.03	0.008
A2		0.03	8	0.5	0.25	0.03	0.125
B1	3	0.008	32	0.008	0.008	0.03	0.008
B2		0.06	0.125	0.008	0.008	0.03	0.008
C1	1	0.06	0.125	0.008	0.008	0.125	0.008
C2		0.03	0.125	0.008	0.008	0.125	0.008
D1	2	0.06	0.125	0.008	0.008	0.03	0.008
D2		0.06	0.125	0.008	0.008	0.03	0.008
E1	2	0.03	0.125	0.008	0.008	0.03	0.008
E2		0.06	0.125	0.008	0.008	0.03	0.008
F1	1	0.06	0.125	0.008	0.008	0.03	0.008
F2		0.06	2	0.008	0.008	0.03	0.008
G1	2	0.008	0.125	0.008	0.008	0.03	0.008
G2		0.03	0.125	0.008	0.008	0.03	0.008
H1	1	0.06	0.125	0.008	0.008	0.03	0.008
H2		0.03	2	0.008	0.008	0.03	0.008
I1	3	0.03	32	0.25	0.25	0.03	0.25
I2		0.06	32	0.25	0.25	0.03	0.25
J1	2	0.008	0.125	0.008	0.008	0.03	0.008
J2		0.06	0.125	0.008	0.008	0.03	0.008
K1	3	0.008	32	0.008	0.008	0.03	0.008
K2		0.06	0.125	0.008	0.008	0.03	0.008
L1	2	0.03	0.125	0.008	0.008	0.03	0.008
L2		0.06	8	0.008	0.008	0.03	0.008

Tabella 6: valori di MIC ($\mu\text{g/ml}$) registrati per le coppie di isolati di *C. albicans*

La terapia somministrata è indicata come segue:

- 1: Fluconazolo, cp \times 10 gg
- 2: Itraconazolo, sol \times 7 gg
- 3: Itraconazolo, sol \times 14 gg

Nel complesso, sono stati rilevati 20 (83.3%) ceppi sensibili e 4 (16.6%) sensibili-dose dipendenti nei confronti del fluconazolo, 21 (87.5%) ceppi sensibili e 3 (12.5%) sensibili-dose dipendenti nei confronti dell'itraconazolo, 24 (100%) ceppi sensibili nei confronti della 5-fluorocitosina.

Nessuna coppia di isolati ha mostrato sviluppo di resistenze dopo il trattamento antifungino, ma è stata rilevata una diminuzione di sensibilità al fluconazolo in 4 casi. In due casi è stato possibile invece osservarne un aumento tra prima e seconda infezione.

Analisi del cariotipo

La PFGE ha evidenziato differenze di pattern cromosomici tra isolati appartenenti alla stessa coppia in 8 casi (coppie A, B, C, F, H, J, K, L). Un esempio di quanto ottenuto è riportato in **Figura 4**.

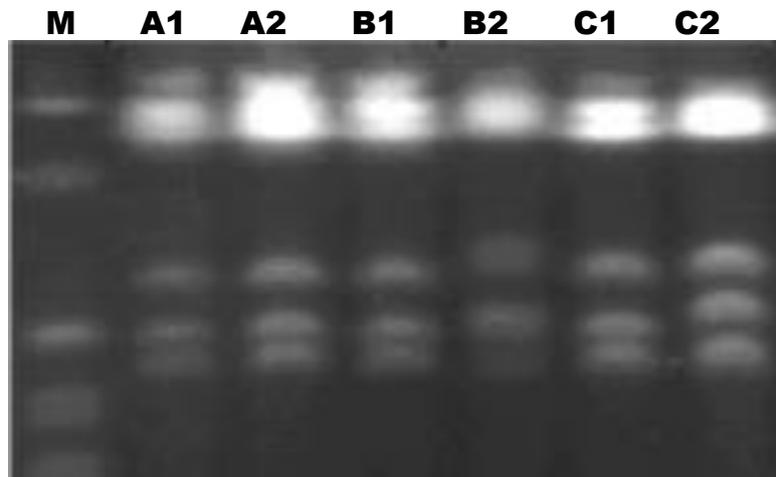


Figura 4. Esempio di elettroforesi del cariotipo

Restriction Fragment Length Polymorphism

Il fingerprinting effettuato sui ceppi esaminati ha permesso di rilevare l'esistenza di variazioni in 9 casi: le coppie A, B, C, F, G, H, J, K, L hanno mostrato un coefficiente di variazione <90%. La **Figura 5** riporta alcuni pattern ottenuti dopo digestione con EcoRI ed evidenziati dalla sonda 27A.

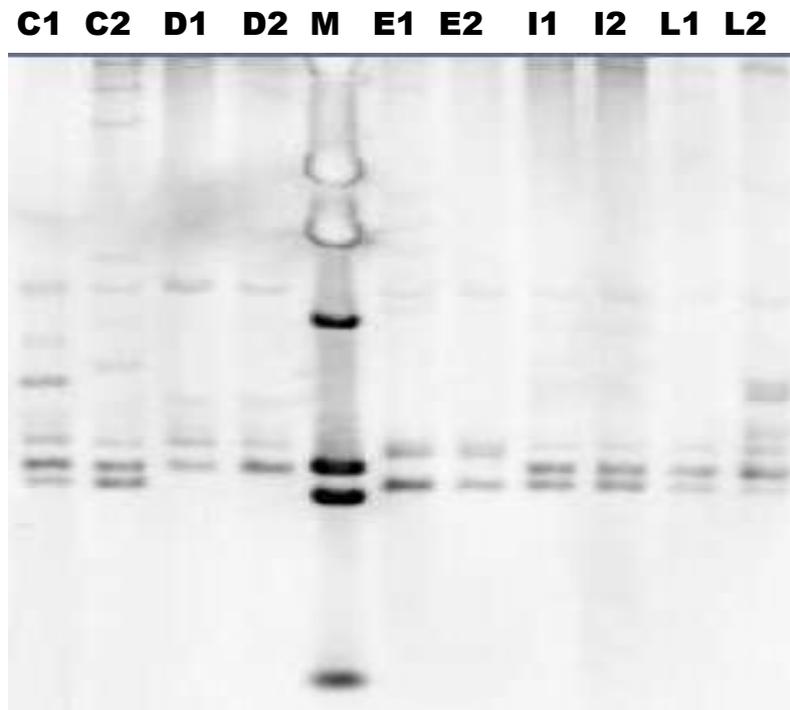


Figura 5. Esempio di RFLP rilevato mediante sonda 27A

Uno schema esemplificativo di quanto ottenuto con le due tecniche di tipizzazione, in rapporto alle suscettibilità rilevate nei confronti del fluconazolo prima e dopo la terapia antifungina, è riportato in **Tabella 7**.

coppia	suscettibilità FZ	EK	RFLP
A	<	≠	≠
B	>	≠	≠
C	≅	≠	≠
D	≅	≅	≅
E	≅	≅	≅
F	<	≠	≠
G	≅	≅	≠
H	<	≠	≠
I	≅	≅	≅
J	≅	≠	≠
K	>	≠	≠
L	<	≠	≠

Tabella 7. Schema delle correlazioni ottenute mediante EK e RFLP nelle coppie di isolati pre- e post-terapia e relative variazioni di suscettibilità al fluconazolo

Studio dei determinanti di resistenza

Le 3 coppie di isolati (denominate D, E e I) di *C. albicans* che nelle analisi suddette sono risultate composte da ceppi aventi lo stesso pattern cromosomico e di restrizione, nonché un simile profilo di suscettibilità antimicotica, sono state quindi sottoposte al confronto dell'espressione genica mediante Real-Time PCR quantitativa.

I risultati sono riportati nella **Figura 6**, che evidenzia per le coppie D ed E un lieve aumento di espressione, non significativo, per tutti i geni considerati. Al contrario, nella coppia I entrambi gli isolati hanno mostrato alti livelli di espressione dei geni in esame, con una riduzione tra primo e secondo ceppo per *MDR1*. Per *CDR1* e *CDR2*, come atteso in base ai valori di suscettibilità riscontrati, è stata osservata overespressione sia nel primo che nel secondo isolato, permettendo in tal modo di individuare il meccanismo determinante la recidiva.

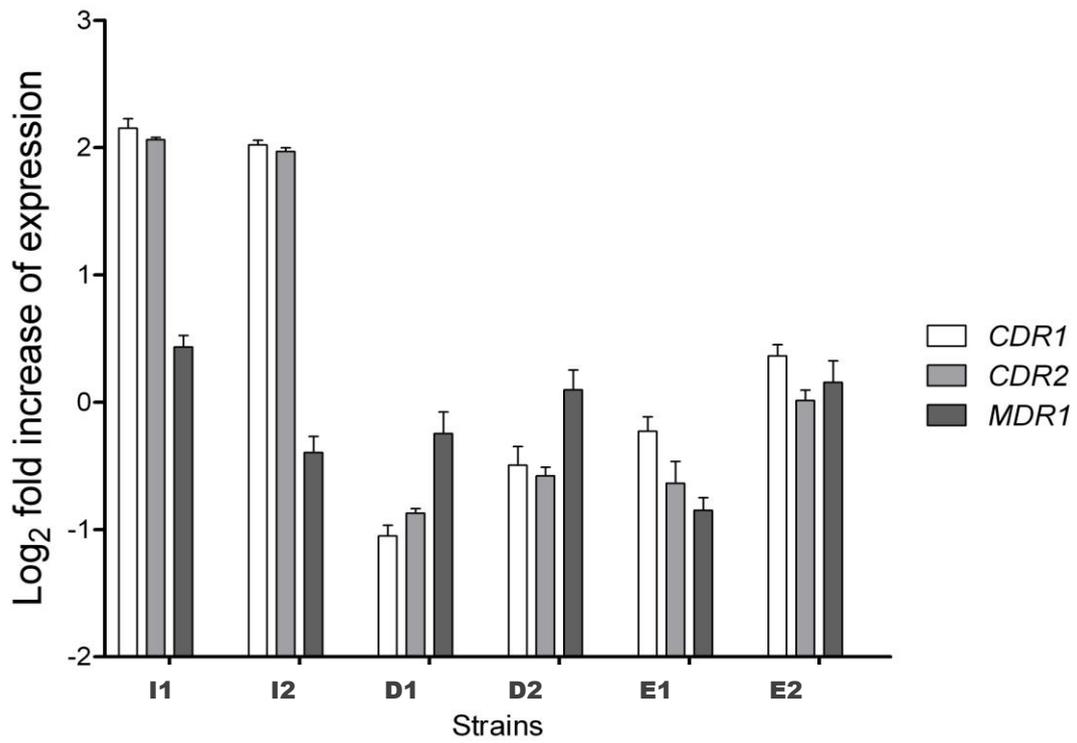


Figura 6. Livelli di espressione dei geni CDR1, CDR2 e MDR1 per le coppie di isolati I, D, E

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La corretta e rapida diagnosi delle candidosi rappresenta un importante strumento per il controllo di questo tipo di infezioni, sia a livello individuale, per evitarne un'eventuale progressione, sia a livello collettivo per evitare la diffusione di ceppi resistenti. Oltre alla semplice dimostrazione della presenza/assenza dei lieviti nei campioni clinici, l'identificazione di questi a livello di specie può essere necessaria in determinate situazioni, dal momento che la suscettibilità agli antimicotici e la capacità di sviluppare resistenze e di causare infezione variano tra le diverse specie. L'aumento dei pazienti maggiormente suscettibili nei confronti di determinate specie e la pressione selettiva esercitata da alcune molecole antifungine di ampia diffusione nella pratica medica hanno favorito l'incremento dell'incidenza delle candidosi da specie non-*albicans*, come *C. glabrata* e *C. krusei*, che mostrano una minore sensibilità nei confronti dei composti azolici rispetto ad altre specie, o *C. parapsilosis*, che predilige l'ambiente nosocomiale ed è dunque spesso causa di infezioni ospedaliere, soprattutto catetere-mediate, cui è spesso associata una elevata mortalità (5, 21, 22, 117).

Nella presente esperienza, l'applicazione di una metodica di multiplex PCR per la diagnosi rapida delle candidosi ha fornito esiti promettenti. I risultati ottenuti hanno mostrato un buon livello di concordanza tra le tecniche genotipiche e quella fenotipica, nonché tra le due tecniche di amplificazione a confronto. È da sottolineare inoltre che la metodica ha permesso di formulare diagnosi di candidosi anche in presenza di una notevole componente batterica e ha mostrato una notevole sensibilità. Nell'analisi diretta poi, è stato possibile rilevare in alcuni casi la presenza di più specie di *Candida* nello stesso campione, situazione spesso non rilevabile coi comuni metodi diagnostici basati sullo sviluppo colturale. Tali sistemi infatti consistono in procedimenti che vengono condotti a carico di una sola tra le colonie sviluppatesi dalla semina del campione, nel quale appunto possono coesistere diverse specie dello stesso microrganismo, con diverse caratteristiche di patogenicità e antibiotico-sensibilità. La metodica si è dunque dimostrata un utile e valido strumento per la diagnosi di candidosi orale e l'identificazione di specie. La rapidità e i bassi costi connessi all'impiego della tecnica, specialmente all'interno di laboratori già dotati delle attrezzature normalmente adoperate per le procedure di biologia molecolare e di personale già formato, consentono di auspicarne l'adozione nella routine diagnostica. L'applicazione diretta allo sciacquo orale, svolta senza previa estrazione del DNA e dunque in tempi estremamente ridotti, costituisce un ulteriore passo avanti nella diagnostica precoce di questo tipo di infezioni, fondamentale per l'adozione tempestiva di terapie antifungine, soprattutto nei pazienti critici.

L'analisi epidemiologica dei ceppi responsabili di infezione, per identificarne la sorgente e la via di trasmissione, può risultare indispensabile in determinati casi. Tali indagini richiedono accurate tipizzazioni degli isolati per definire con esattezza l'origine delle candidosi: a volte questa va ricercata in fonti esogene, come le mani degli operatori, ma più spesso le candidosi insorgono a partire da una precedente colonizzazione cutanea, del tratto gastrointestinale o della vagina, e sono dunque di natura endogena (18). Diversi studi condotti su casi di candidosi ricorrenti hanno dimostrato che non sempre tali episodi si verificano a causa dell'emergenza di nuovi ceppi, ma che gli stessi lieviti responsabili della prima infezione possono andare incontro a modificazioni genetiche in relazione a variazioni nelle condizioni ambientali del sito colonizzato, inclusa naturalmente l'assunzione di antimicotici (102-104). Ciò

è stato provato per la specie *albicans*, ma anche per *C. glabrata* e *C. krusei*, sia per infezioni sistemiche che localizzate (69, 93, 105). Alla determinazione di questo fenomeno concorrono diversi fattori, la cui caratterizzazione può aiutare nella scelta di adeguate norme igieniche e/o terapeutiche da adottare in ogni diversa situazione. Nella seconda parte dello studio qui riportato, allo scopo di offrire un contributo alla definizione di tali fattori, sono stati analizzati ceppi provenienti da pazienti affetti da candidosi ricorrente, considerando per ognuno di essi l'isolato ottenuto nel corso della prima infezione, prima del trattamento con farmaci antimicotici, e quello responsabile del secondo episodio, verificatosi dopo la somministrazione della terapia. Diverse tecniche sono state applicate all'analisi di tali coppie di isolati, sia per valutare se nella patogenesi delle reinfezioni esaminate fossero coinvolti lieviti differenti o varianti del ceppo originario insorte nel corso della terapia antifungina, sia per evidenziare eventuali meccanismi di resistenza innescati dalla somministrazione di antimicotici.

Tutti i 12 pazienti da cui sono stati isolati lieviti appartenenti alla specie *albicans* sia nel primo che nel secondo episodio di candidosi sono risultati trattati con antimicotici azolici. L'analisi della suscettibilità nei confronti di tali composti, effettuata col metodo della microdiluzione e applicando i limiti proposti dal CLSI per la suscettibilità agli antifungini, non ha mostrato insorgenza di resistenze tra i lieviti responsabili del secondo episodio infettivo, ma ha permesso di rilevare una diminuzione di sensibilità, espressa in termini di Minima Concentrazione Inibente (MIC), in 4 casi. In due casi è stato possibile invece osservarne un aumento tra prima e seconda infezione. Inoltre, solo una piccola parte del campione in studio ha mostrato un ridotta suscettibilità nei confronti di fluconazolo e itraconazolo, come già riportato in studi analoghi (67, 70, 106). È necessario comunque considerare a questo proposito che *Candida albicans* non è intrinsecamente resistente agli azoli ma può diventarlo per induzione e che tra i pazienti inclusi nello studio, benché tutti interessati da patologie preesistenti e favorenti, nessuno era sottoposto, al momento del prelievo, a terapie immunosoppressive o antimicotiche. Ciò potrebbe far supporre che in assenza di pressioni esercitate da trattamenti terapeutici, non si siano innescati meccanismi di resistenza inducibile o selezione di varianti resistenti.

Gli isolati sono stati quindi tipizzati sia mediante analisi del cariotipo che tramite studio del polimorfismo di restrizione. L'impiego della cariotipizzazione per studiare la correlazione tra gli isolati o per rilevare eventuali modifiche nel numero o nella lunghezza dei loro cromosomi in relazione a determinate condizioni ambientali costituisce un valido strumento di analisi. Essa è stata confrontata in diversi studi con altre metodiche di tipizzazione, quali la interrepeat PCR, la REAG o, come nella presente esperienza, col Southern blot, al fine di determinare se cambiamenti nel cariotipo fossero dovuti a riarrangiamenti cromosomici negli stessi isolati o a colonizzazione da parte di nuovi ceppi. I risultati riportati mostrano situazioni differenti: alcune indagini hanno dimostrato una corrispondenza tra diversità registrate a livello cromosomico e diversità di isolati stabilita con altre tecniche, mentre in alcuni casi ricombinazioni che abbiano dato origine a variazioni visibili nei pattern cromosomici non hanno interessato le regioni bersaglio di altre metodiche e non hanno quindi fornito risultati corrispondenti (67, 69, 72, 103). Piccole differenze evidenziate da altre tecniche possono essere infatti presentate anche da ceppi con cariotipo uguale (107).

L'analisi di ibridazione del DNA genomico sottoposto a restrizione con la sonda 27A rappresenta una metodica di tipizzazione per *C. albicans* altamente discriminante e

sensibile e pertanto viene impiegata in un'ampia varietà di studi epidemiologici (107-109). La sequenza della sonda, essendo presente in circa 10 regioni disperse sui cromosomi di *Candida albicans*, produce polimorfismi che possono essere facilmente rilevati e che possono fornire utili indicazioni sulla correlazione tra ceppi. Tuttavia, pur avendo tale sequenza diverse caratteristiche tipiche degli elementi trasponibili eucariotici, quali appunto una moderata ripetizione e dispersione nel genoma e la specie-specificità, il polimorfismo da essa rivelato è generalmente dovuto a modifiche nella sequenza interna delle copie dell'elemento (99).

La selezione di isolati è stata dunque inizialmente esaminata mediante analisi del cariotipo, al fine di rilevarne la corrispondenza/discordanza all'interno di ogni coppia o di evidenziare eventuali modifiche dovute a riarrangiamenti intervenuti a carico dello stesso corredo cromosomico. Tale analisi è stata compiuta applicando l'elettroforesi in campo pulsato (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) al DNA genomico integro degli isolati, per visualizzarne i pattern cromosomici (Electrophoretic Karyotyping, EK) (67, 73). I confronti hanno evidenziato differenze di bande cromosomiche in 8 casi; le coppie con cariotipo coincidente presentavano tutte valori di MIC senza variazioni notevoli dopo la terapia.

Parallelamente allo studio dei cromosomi, per ottenere ulteriori informazioni sulla natura dei ceppi infettanti, è stata condotta anche un'analisi di fingerprinting sugli isolati, utilizzando la sonda 27A (107, 109). Il confronto, effettuato mediante analisi computerizzata dei pattern di restrizione, ha rilevato modifiche in 9 coppie di isolati. Non è stata dunque registrata una completa sovrapposibilità tra i risultati delle due tecniche di tipizzazione: in un caso, corrispondente ad una coppia di isolati con valori di suscettibilità simili, lo studio del polimorfismo di restrizione è risultato maggiormente discriminante rispetto all'analisi del cariotipo. Tale risultato corrisponde a quanto riportato in letteratura per simili comparazioni (72). Vasquez et al. suggerivano nel 1991 che la cariotipizzazione fosse preferibile per semplicità, sensibilità e riproducibilità allo studio del RFLP per la biotipizzazione di *C. albicans* (96). Tuttavia, l'analisi del cariotipo richiede più tempo per l'esecuzione, ed il numero di isolati che possono essere analizzati contemporaneamente è nettamente maggiore in un normale gel elettroforetico che in quello adoperato nella PFGE; l'impiego di una sonda a sequenza mediamente ripetuta come 27A inoltre conferisce al RFLP una maggiore sensibilità, come verificato in questa esperienza. È comunque da considerare che, data la loro complessità, l'interpretazione dei pattern di RFLP necessita di analisi computer-assistite. Tali limitazioni pratiche e i costi ad essa connessi ne limitano l'uso routinario (110).

Infine, sulle tre coppie di isolati risultate costituite da varianti dello stesso ceppo è stata compiuta un'analisi di espressione dei geni responsabili della espulsione dei farmaci azolici dalla cellula fungina: *CDR1* e *CDR2*, coinvolti nella resistenza a tutti i composti azolici, e *MDR1*, codificante per una pompa di efflusso specifica per il fluconazolo. Tale indagine è stata condotta al fine di verificare quale fosse, nelle tre coppie considerate, il meccanismo molecolare responsabile della resistenza alla terapia somministrata e dunque della infezione recidivante. La Real Time PCR è stata scelta per questo tipo di analisi in quanto già applicata allo studio quantitativo dei meccanismi di resistenza in *C. albicans*, e rivelatasi un ottimo strumento di indagine, più sensibile e rapido rispetto al Northern blotting (111).

Nel primo caso entrambi gli isolati hanno mostrato alti livelli di espressione dei geni considerati, con una riduzione registrata tra primo e secondo ceppo per il gene *MDR1*. Per *CDR1* e *CDR2* è stata osservata overespressione sia nel primo che nel

secondo isolato, il che consente di identificare nella espulsione dell'antimicotico somministrato, nel caso specifico itraconazolo, il meccanismo determinante la recidiva. È da osservare a questo proposito che la riduzione della espressione di *MDR1*, coinvolto nella risposta specifica al fluconazolo, emersa nell'isolato ottenuto dopo la terapia, corrisponde probabilmente ad una mancata induzione da fluconazolo.

Negli altri due casi studiati è stato possibile invece osservare un lieve aumento di espressione, per tutti i geni considerati, tra prima e seconda infezione. Tale incremento, anche se sovrapponibile a quanto interpretato in base ai valori di MIC ottenuti con l'antimicogramma, non è risultato significativo. La persistenza del lievito potrebbe quindi essere imputabile per questi pazienti ad altri meccanismi di resistenza, quali ad esempio mutazioni nei geni per la sintesi dell'ergosterolo, o ad altre cause legate alla capacità di colonizzazione dell'isolato. L'acquisizione di resistenza nei confronti dei composti azolici in *C. albicans* è infatti un processo graduale cui contribuiscono più meccanismi; diversi geni, coinvolti nella risposta allo stress ossidativo, hanno una regolazione strettamente connessa a quella dei geni per le proteine trasportatrici già caratterizzate (112).

È necessario inoltre considerare, nell'interpretazione di questo risultato, l'esistenza di differenze tra quanto è possibile rilevare *in vitro* e ciò che realmente si verifica *in vivo*. Assumendo che il ciclo di terapia sia stato effettuato correttamente, è dunque possibile che nell'organismo ospite, in presenza di determinate concentrazioni di antimicotico, si siano innescati meccanismi di overespressione che hanno permesso la sopravvivenza del microrganismo ma che non si sono perpetuati nei successivi passaggi in laboratorio. La capacità di *C. albicans* di sviluppare resistenza in presenza di fluconazolo e di riacquisire suscettibilità agli azoli in assenza di induzione è stata infatti dimostrata, con variazioni di espressione differenti per i diversi geni coinvolti (113-115). Ulteriori approfondimenti saranno necessari per chiarire quali altri processi intervengano nella genesi degli episodi di recidiva.

La ricerca condotta costituisce dunque un contributo alla caratterizzazione delle candidosi orali ricorrenti. L'impiego diretto della metodica molecolare per la diagnosi precoce di candidosi orale è risultato promettente, ma quanto ottenuto dovrà essere validato ulteriormente. Un successivo studio di correlazione tra questa tecnica e altri sistemi fenotipici per l'identificazione di specie correntemente impiegati nei laboratori di diagnostica è stato già effettuato su un campione di oltre 400 isolati, ed è attualmente in corso di elaborazione. Un ulteriore obiettivo è rappresentato dalla messa a punto di un protocollo di Real Time PCR per la diagnostica rapida delle candidosi, che possa permettere fra l'altro la rilevazione di eventuali diverse specie di *Candida* nel campione clinico e la definizione del contributo relativo di ognuna di esse nella patogenesi dell'infezione.

Per quanto riguarda la tipizzazione, le tecniche impiegate hanno mostrato una sufficiente affidabilità, pur con gli svantaggi connessi al tempo necessario per lo svolgimento e all'interpretazione dei risultati di ognuna di esse. Essendo stata dimostrata per la maggioranza degli isolati di *C. albicans* qui analizzati la discordanza tra gli agenti responsabili del primo e del secondo episodio di infezione, la grandezza del campione non era sufficiente a compiere analisi statistiche, e analogamente non è stato possibile approfondire lo studio dei determinanti di resistenza. L'analisi condotta mediante Real Time PCR ha comunque permesso in un caso di individuare nella deregolazione dei geni per le pompe di efflusso il meccanismo alla base della candidosi recidivante. In ricerche analoghe, condotte

mediante Northern blotting su isolati seriali di *C. albicans* e *C. glabrata* da soggetti immunocompromessi trattati con fluconazolo, lo stesso meccanismo era stato identificato come responsabile dell'aumento nei valori di MIC registrato dopo la terapia; in un caso tuttavia, questo non risultava coinvolto (113, 114, 116).

L'approfondimento dello studio di espressione sembra dunque necessario per individuare i processi responsabili delle recidive, e la tecnica di Real Time PCR, rapida e semplice da implementare, si è dimostrata idonea per questo tipo di analisi.

Nel prossimo futuro, con il reclutamento di nuovi pazienti e la raccolta dei ceppi responsabili di eventuali nuove recidive, lo studio verrà dunque esteso ad un campione significativo, sia per verificare le potenzialità della tecnica diagnostica molecolare, eventualmente applicandola ad altri campioni e ad ulteriori specie di *Candida*, sia per ottimizzare lo studio genotipico dei ceppi responsabili di candidosi recidivante. L'estensione dell'analisi di espressione ad altri geni di resistenza e l'individuazione di altri meccanismi capaci di determinare la persistenza nell'organismo ospite potranno probabilmente aiutare a chiarire i processi attraverso cui questa si realizza.

BIBLIOGRAFIA

1. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections. Clin Microbiol Rev 1996;9:499-511
2. Verduyn Lunel FM, Meis JFGM, Voss A. Nosocomial Fungal Infections: Candidaemia. Diagn Microbiol Infect Dis 1999;34:213-20
3. Richardson MD. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. J Antimicrob Chemother 2005;56(1):5-11
4. Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. Clin Infect Dis 1995;20:1526-30
5. Hobson RP. The global epidemiology of invasive *Candida* infections – is the tide turning? J Hosp Infect 2003;55:159-68
6. Banerjee SN, Emori TG, Culver DH. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. Am J Med 1991;91:86S-89S
7. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Messer SA, Houston A, et al. National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species. Diagn Microbiol Infect Dis 1998;31:289-96
8. Ellepola ANB, Morrison CJ. Laboratory Diagnosis of Invasive Candidiasis. J Microbiol 2005;43:65-84
9. Hospital Infections Program, National Center for Infectious Diseases, Center for Disease Control and Prevention. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) report, data summary from October 1986 - April 1996, issued May 1996. Am J Infect Control 1996;24:380-8
10. Center for Disease Control and Prevention: National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) report, data summary from January 1992 – June 2001. Am J Infect Control 2001; 29: 404-421
11. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. Lancet Infect Dis 2003;3:685-702
12. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K. Attributable mortality of nosocomial candidaemia, revisited. Clin Infect Dis 2003;37:1172-7
13. Ruhnke M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. Curr Drug Targets 2006; 7(4):495-504
14. Lipsett PA. Surgical critical care: fungal infections in surgical patients. Crit Care Med 2006; 34(9): S215-24
15. Vincent JL, Anaissie E, Bruining H, Demajo W, el-Ebiary M, Haber J, et al. Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *Candida* infection in surgical patients under intensive care. Intensive Care Med 1998;24:206-16
16. Voss A, le Noble JL, Verduyn Lunel FM, Foudraine NA, Meis JF. Candidaemia in intensive care unit patients: risk factors for mortality. Infection 1997;25:8-11
17. Taylor BN, Harrer T, Pscheidl E, Schweizer A, Röllinghoff M, Schröppel K. Surveillance of nosocomial transmission of *Candida albicans* in an intensive care unit by DNA fingerprinting. J Hosp Infection 2003; 55: 283-289
18. Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. Clin Infect Dis 1996;22:S89-94
19. Strausbaugh LJ, Sewell DL, Ward TT, Pfaller MA, Heitzman T, Tjoelker R. High frequency of yeast carriage on hands of hospital personnel. J Clin Microbiol 1994;32:2299-300

20. Beck-Sague C, Jarvis WR. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. *J Infect Dis* 1993;167:1247-51
21. Nguyen MH, Peacock JE Jr, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, et al. The changing face of candidaemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 1996; 100:617-23
22. Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans Candida spp.* causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 2002;50:243-60
23. Garbino J, Kolarova L, Rohner P, Lew D, Pincha P, Pittet D. Secular trends of candidaemia over 12 years in adult patients at a tertiary care hospital. *Medicine* 2002;81:425-33
24. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J* 2002;78:455-59
25. Coogan MM, Fidel PL, Komesu MC, Maeda N, Samaranayake LP. (B1) *Candida* and Mycotic Infections. *Adv Dent Res* 2006;19:130-138
26. Challacombe SJ. Immunologic aspects of oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78(2):202-10
27. Fanello S, Bouchara JP, Sauteron M, Delbos V, Parot E, Marot-Leblond A, Moalic E, Le Flohic AM, Brangerd B. Predictive value of oral colonization by *Candida* yeasts for the onset of a nosocomial infection in elderly hospitalized patients. *J Med Microbiol* 2006;55: 223-228
28. Holmes AR, Bandara BMK, Cannon RD. Saliva promotes *Candida albicans* adherence to human epithelial cells. *J Dent Res* 2002;81:28-32
29. Tsang CS, Samaranayake LP. Factors affecting the adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells in human immunodeficiency virus infection. *Br J Dermatol.* 1999;141(5):852-8
30. Samaranayake YH, Samaranayake LP, Tsang PC, Wong KH, Yeung KW. Heterogeneity in antifungal susceptibility of clones of *Candida albicans* isolated on single and sequential visits from a HIV-infected southern Chinese cohort. *J Oral Pathol Med* (2001). 30:336-346
31. Samaranayake YH, Samaranayake LP, Dassanayake RS, Yau JY, Tsang WK, Cheung BP, et al. Genotypic shuffling of sequential clones of *Candida albicans* in HIV-infected individuals with and without symptomatic oral candidiasis. *J Med Microbiol* 2003;52:349-359
32. Groll AH, Kolve H. Antifungal Agents: In Vitro Susceptibility Testing, Pharmacodynamics, and Prospects for Combination Therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2004) 23: 256–270
33. Yang YL, Lo HJ. Mechanisms of antifungal agent resistance. *J Microbiol Immunol Infect* 2001; 34(2): 79-86
34. Morschhauser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1587:240–248
35. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:73–85
36. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Proposed standard M27-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
37. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; tentative standard. NCCLS document M27-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

38. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard NCCLS document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
39. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Lancaster M, Odds FC, Rinaldi MG, Walsh TJ, Barry AL, and Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Clin Infect Dis 1997; 24:235–247
40. Rex JH, Pfaller MA. Has antifungal susceptibility testing come of age? Clin Infect Dis 2002; 35:982–989
41. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49, 3640-5
42. de Marie S. New developments in the diagnosis and management of invasive fungal infections. Haematologica 2000; 85: 88-93
43. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Infect Control Hosp Epidemiol 1997; 18: 426-39
44. Soll DR. High-frequency switching in *Candida albicans*. Clin Microbiol Rev 1992; 5: 183-203
45. Serpico R. e Liguori G. La candidosi orale: clinica, diagnosi e terapia. (2000) Piccin Nuova Libreria: Padova
46. Bart-Delabesse E, van Deventer H, Goessens W, Poirot JL, Lioret N, Van Belkum A, Dromer F. Contribution of Molecular Typing Methods and Antifungal Susceptibility Testing to the Study of a Candidemia Cluster in a Burn Care Unit. J Clin Microbiol 1995; 33(12): 3278-83
47. Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeauvais JP, et al. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. Med Mycol 1998; 36: 249-57
48. Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. CMAJ 2000; 163: 301-9
49. Loeffler J, Hebart H, Bialek R, Hagemeyer L, Schmidt D, Serey FP, et al. Contaminations occurring in fungal PCR assays. J Clin Microbiol 1999; 37: 1200-2
50. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature 1989; 339: 237-8
51. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, Limaye AP, Cookson BT. (2000) Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. J Clin Microbiol 38, 2302–10
52. Morace G, Sanguinetti M, Posteraro B, Lo Cascio G, Fadda G. (1997) Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR-restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol 35, 667–72
53. Hui M, Ip M, Chan PK, Chin ML, Cheng AF. (2000) Rapid identification of medically important *Candida* to species level by polymerase chain reaction and single-strand conformational polymorphism. Diagn Microbiol Infect Dis 38, 95–9
54. Pryce TM, Kay ID, Palladino S, Heath CH. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. Mycology 2003; 47: 487-96

- 55.Hsu MC, Chen KW, Lo HJ, Chen YC, Liao MH, Lin YH, et al. Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *J Med Microbiol* 2003; 52: 1071-6
- 56.White PL, Shetty A, Barnes RA. Detection of seven *Candida* species using the LightCycler system. *J Med Microbiol* 2003; 52: 229-38
- 57.Guiver M, Levi K, Oppenheim BA. Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. *J Clin Pathol* 2001; 54: 362-6
- 58.Loeffler J, Dorn C, Hebart H, Cox P, Magga S, Einsele H. Development and evaluation of the Nuclisens Basic Kit NASBA for the detection of RNA from *Candida* species frequently resistant to antifungal drugs. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;45: 217–20
- 59.Wilson DA, Joyce MJ, Hall LS, Reller LB, Roberts GD, Hall GS, Alexander BD, Procop GW. Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. *J Clin Microbiol* 2005; 43, 2909–12.
- 60.Zolan ME. (1995) Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiol Rev* 59, 686-8
- 61.Monod M, Porchet S, Baudraz-Rosselet F, Frenk E. (1990) The identification of pathogenic yeast strains by electrophoretic analysis of their chromosomes. *J Med Microbiol* 29, 123–9
- 62.Asakura K, Iwaguchi SI, Homma M, Sukai T, Higashide K, Tanaka K. (1991) Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *C. glabrata*. *J Gen Microbiol* 137, 2531–8
- 63.Carruba G, Pontieri E, De Bernardis F, Martino P, Cassone A. (1991) DNA fingerprinting and electrophoretic karyotypes of environmental and clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 29, 916–22.
- 64.Espinel-Ingroff A, Vazquez JA, Boikov D, Pfaller MA. (1999) Evaluation of DNA-based typing procedures for strain categorization of *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 33, 231–9
- 65.Sullivan D, Coleman D. (1998) *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 36, 329–34
- 66.Riederer K, Fozo P, Khatib R. Typing of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*: species-related limitations of electrophoretic karyotyping and restriction endonuclease analysis of genomic DNA. *Mycoses* 1998; 41(9-10): 397-402
- 67.Shin JH, Shin DH, Song JW, Kee SJ, Suh SP, Ryang DW. Electrophoretic karyotype analysis of sequential *Candida parapsilosis* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. *J Clin Microbiol* 2001;39(4):1258-63
- 68.Shin JH, Park MR, Song JW, Shin DH, Jung SI, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Microevolution of *Candida albicans* strains during catheter-related candidemia. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(9): 4025-31
- 69.Shin JH, Kim MN, Shin DH, Jung SI, Kim KJ, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Genetic relatedness among *Candida tropicalis* isolates from sporadic cases of fungemia in two university hospitals in Korea. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25(8):634-40
- 70.Shin JH, Og YG, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Molecular epidemiological analysis of bloodstream isolates of *Candida albicans* from a university hospital over a five-year period. *J Microbiol* 2005;43(6):546-554

- 71.Chen YC, Chang SC, Tai HM, Hsueh PR, Luh KT. Molecular epidemiology of *Candida* colonizing critically ill patients in intensive care units. J Formos Med Assoc 2001; 100(12): 791-7
- 72.Huang YC, Su LH, Wu TL, Lin TY. Genotyping analysis of colonizing candidal isolates from very-low-birthweight infants in a neonatal intensive care unit. J Hosp Infect 2004; 58: 200–203
- 73.Rho J, Shin JH, Song JW, Park MR, Kee SJ, Jang SJ, Park YK, Suh SP, Ryang DW. Molecular investigation of two consecutive nosocomial clusters of *Candida tropicalis* candiduria using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. J Microbiol 2004; 42(2): 80-86
- 74.Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting of infectious fungi. Clin Microbiol Rev 2000; 13, 332–70
- 75.Anderson J, Srikantha T, Morrow B, Miyasaki SH, White TC, Agabian N, Schmid J, Soll DR. Characterization and partial nucleotide sequence of the DNA fingerprinting probe Ca3 of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1993: 31, 1472–80
- 76.Sullivan DJ, Bennett D, Henman M, Harwood P, Flint S, Mulkahey F, Shanley D, Coleman D. Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *C. albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. J Clin Microbiol 1993; 31, 2124–33
- 77.Swaminathan B, Barrett TJ. Amplification methods for epidemiologic investigations of infectious diseases. J Microbiol Methods 1995; 23, 129–39
- 78.Tyler KD, Wang G, Tyler SD, Johnson WM. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprint of representative bacterial pathogens. J Clin Microbiol 1997; 35, 339–46
- 79.Shemer R, Weissman Z, Hashman N, Kornitzer D. A highly polymorphic degenerate microsatellite for molecular strain typing of *Candida krusei*. Microbiology 2001; 147, 2021–8
- 80.Liu D, Coloe S, Jones SL, Baird R, Pedersen J. Genetic speciation of *Candida* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett 1996; 145, 23–6
- 81.Steffan P, Vazquez JA, Boikov D, Xu C, Sobel JD, Atkins RA. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. J Clin Microbiol 1997; 35, 2031–9.
- 82.Bautista-Munoz C, Boldo XM, Villa-Tanaca L, Hernandez-Rodriguez C. Identification of *Candida* spp. by randomly amplified polymorphic DNA analysis and differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR methods. J Clin Microbiol 2003; 41, 414–20
- 83.Voss P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van der Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 1995; 23, 4407–14
- 84.Borst A, Theelen B, Reinders E, Boekhout T, Fluit AC, Savelkoul PHM. Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp., including *C. dubliniensis*. J Clin Microbiol 2003; 41, 1357–62.
- 85.Ball LM, Bes MA, Theelen B, Boekhout T, Egeler RM, Kuijper EJ. Significance of amplified fragment length polymorphism in identification and epidemiological examination of *Candida* species colonization in children undergoing allogeneic stem cell transplantation. J Clin Microbiol 2004; 42, 1673–9

- 86.Hall L, Wohlfiel S, Roberts GD. (2003) Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of commonly encountered, clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 41, 5099–102
- 87.Chen SCA, Halliday CL, Meyer W. A review of nucleic acidbased diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Med Mycol* 2002; 40, 333–57
- 88.Coleman D, Sullivan D, Harrington B, Haynes K, Henman M, Shanley D, Bennet D, Moran G, McCreary C, O'Neill L. Molecular and phenotypic analysis of *Candida dubliniensis*: a recently identified species linked with oral candidosis in HIV-infected patients. *Oral Dis* 1997; 3, 96–101.
- 89.Botterel F, Desterke C, Costa C, Bretagne S. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. *J Clin Microbiol* 2001;39, 4076–81
- 90.Bougnoux ME, Morand S, d'Enfert C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2002;40, 1290–7
- 91.Tavanti A, Davidson AD, Johnson EM, Maiden MC, Shaw DJ, Gow NA, Odds FC. Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. *J Clin Microbiol* 2005;43:5593–600
- 92.Spiess B, Seifarth W, Hummel M, Frank O, Fabarius A, Zheng C, Morz H, Hehlmann R, Buchheidt D. DNA Microarray-based detection and identification of fungal pathogens in clinical samples from neutropenic patients. *J Clin Microbiol* 2007
- 93.López-Ribot JL, McAtee RK, Kirkpatrick WR, Perea S, Frost Patterson T. Comparison of DNA-based typing methods to assess genetic diversity and relatedness among *Candida albicans* clinical isolates. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: 49-54 49
- 94.Baixench MT, Aoun N, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, Ramires S, Piketty C, Dannaoui E. Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. *J Antimicrob Chemother* 2007;59(6):1076-83
- 95.Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G, Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, et al.: The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:7329-7334
- 96.Vasquez JA, Beckley A, Sobel JD, Zervos MJ. Comparison of restriction enzyme analysis and pulsed-field gradient gel electrophoresis as typing systems for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1991;29:962-967
- 97.Chen KW, Lo HJ, Lin YH, Li SY. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. *Journal of Medical Microbiology* 2005;54:249–258
- 98.Wickes B, Staudinger J, Magee BB, Kwon-Chung KJ, Magee PT, Scherer S. Physical and genetic mapping of *Candida albicans*: several genes previously assigned to chromosome 1 map to chromosome R, the rDNA-containing linkage group. *Infect Immun* 1991;59:2480-2484
- 99.Scherer S, Stevens DA. A *Candida albicans* dispersed, repeated gene family and its epidemiologic applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;85:1452-1456
- 100.Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J Clin Microbiol* 2001;39(10):3466-71
- 101.Posteraro B, Romano L, Sanguinetti M, Masucci L, Morace G, Fadda G.. Commercial systems for fluconazole susceptibility testing of yeasts: comparison with the broth microdilution method. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 38:29–36

102. Barchiesi F, Arzeni D, Del Prete MS, Sinicco A, Falconi Di Francesco L, Pasticci MB, Lamura L, Nuzzo MM, Burzacchini F, Coppola S, Chiodo F, Scalise G: Fluconazole susceptibility and strain variation of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients with oropharyngeal candidosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998; 41 :541–548
103. Barchiesi F, Falconi Di Francesco L, Arzeni D, Caselli F, Gallo D, Scalise G. Electrophoretic Karyotyping and Triazole Susceptibility of *Candida glabrata* Clinical Isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18 :184–187
104. Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Redding SW, Smith J, Farinacci G, Fothergill AW, Rinaldi MA: Variations in fluconazole susceptibility and electrophoretic karyotype among oral isolates of *Candida albicans* from patients with AIDS and oral candidiasis. *J Clin Microbiol* 1994; 32:59–64
105. Lockhart SR, Fritch JJ, Meier AS, Schroppel K, Srikantha T, Galask R, Soll DR. Colonizing populations of *Candida albicans* are clonal in origin but undergo microevolution through C1 fragment reorganization as demonstrated by DNA fingerprinting and C1 sequencing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1501-1509
106. Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MAO. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20(6):349-353
107. Barton RC, van Belkum A, Scherer S. Stability of karyotype in serial isolates of *Candida albicans* from neutropenic patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33(4): 794–796
108. Magee PT, Bowdin L, Staudinger J. Comparison of molecular typing methods for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1992;30(10): 2674-2679
109. Boccia S, Posteraro B, La Sorda M, Vento G, Matassa PG, Tempera A, Petrucci S, Fadda G. Genotypic analysis by 27A DNA fingerprinting of *Candida albicans* strains isolated during an outbreak in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23:281-284
110. Williams DW, Lewis MA. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Dis* 2000; 6: 3-11
111. Kofla G, Ruhnke M. Development of a new real-time TaqMan PCR assay for quantitative analyses of *Candida albicans* resistance genes expression. *J Microbiol Methods* 2007; 68: 178–183
112. Rogers D, Barker KS. Genome-wide expression profile analysis reveals coordinately regulated genes associated with stepwise acquisition of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(4):1220–1227
113. Marr KA, Lyons CN, Rustad TR, Bowden RA, White TC. Rapid, transient fluconazole resistance in *Candida albicans* is associated with increased mRNA levels of CDR. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Oct;42(10):2584-9
114. Marr KA, Lyons CN, Ha K, Rustad TR, White TC. Inducible azole resistance associated with a heterogeneous phenotype in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001
115. Lepak A, Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Andes D. Time course of microbiologic outcome and gene expression in *Candida albicans* during and following in vitro and in vivo exposure to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(4): 1311-1319
116. Bennett JE, Izumikawa K, Marr KA. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 May;48(5):1773-7

117. Gallè F, Catania MR, Liguori G. Nosocomial *Candida* infections: epidemiology of candidaemia. *JPMH* 2006; 47: 119-126

Pubblicazioni

Riviste scientifiche

- Liguori G, **Gallè F**. Epidemiology of HIV/AIDS: what has changed? *It J Pub Health* 2005; 2 (2): 53-58
- Catalanotti P, Lanza M, Del Prete A, Lucido M, Catania MR, **Gallè F**, Boggia D, Perfetto B, Rossano F. Slime producing *Staphylococcus epidermidis* in acute bacterial conjunctivitis in soft contact-lens wearers. *New Microbiol* 2005; 28(4): 345-54
- Scherl A, Francois P, Charbonnier Y, Deshusses JM, Koessler T, Huyghe A, Bento M, Stahl-Zeng J, Fischer A, Masselot A, Vaezzadeh A, **Gallè F**, Renzoni A, Vaudaux P, Lew D, Zimmermann-Ivol CG, Binz PA, Sanchez JC, Hochstrasser DF, Schrenzel J. Exploring glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*: a combined proteomics and transcriptomics approach for the identification of resistance related markers. *BMC Genomics* 2006; 7:296
- **Gallè F**, Catania MR, Liguori G. Nosocomial *Candida* infections: epidemiology of candidaemia. *JPMH* 2006; 47: 119-126
- Liguori G, Villari P, Boccia S, **Gallè F**, Di Onofrio V, Marzuillo C, Amore R, Rossano F. Spread of vancomycin-resistant enterococci in a university hospital of southern Italy. *It J Pub Health*, in press

Posters

- Catalanotti P, Del Prete A, Lucido M, Catania MR, Visone C, **Gallè F**, Ortega De Luna L, Roselli M, Rossano F. Caratterizzazione di isolati di *Staphylococcus* spp. da portatori di lenti a contatto affetti da congiuntivite. Atti 33° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Napoli 16-19 ottobre 2005
- **Gallè F**, Ortega De Luna L, Camera A, Picardi M, Catania MR, Grimaldi F, Morelli E, Avilia S, Rossano F. Ricerca dell'antigene galattomannano per la diagnosi precoce di aspergillosi invasiva in pazienti affetti da patologia oncoematologica. Atti 35° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Catania 30 settembre – 3 ottobre 2007

Partecipazione alla stesura di libri di testo

- Medicina di laboratorio e diagnostica genetica. Sacchetti L, Cavalcanti P, Fortunato G, Pastore L, Rossano F, Salvatore D, Scopacasa F. Sorbona. Ed. Idelson-Gnocchi S.r.l. – Sorbona 2007