

I patogeni fungini nell'infezione polmonare in Fibrosi Cistica: aspetti clinici e di diagnostica microbiologica.

Graziana Manno

Laboratorio Generale di Analisi
Sezione Microbiologia della Fibrosi Cistica
Istituto G. Gaslini e Università degli Studi
Email graziana.manno@unige.it;
grazianamanno@ospedale-gaslini.ge.it;

Funghi filamentosi

Oltre alla colonizzazione da parte di un certo numero di patogeni batterici, soprattutto *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*- complex, che rimangono la principale causa d'infezioni e riacutizzazioni respiratorie, morbilità e mortalità, numerosi funghi filamentosi possono colonizzare le vie aeree dei pazienti affetti da Fibrosi Cistica.

Questa colonizzazione fungina delle vie respiratorie, facilitata dai frequenti e prolungati cicli di terapia antibiotica e dall'uso di corticosteroidi, può in qualche caso dar luogo ad infezioni vere; la cui frequenza aumenta in modo regolare con l'aumentare dell'aspettativa di vita dei soggetti affetti da Fibrosi Cistica e con la possibilità del trapianto di polmoni. Tuttavia la sequenza degli eventi che seguono la colonizzazione fungina, così come i fattori predisponenti a questa sono ancora in gran parte da chiarire e sarebbero necessari studi approfonditi su un grande numero di pazienti.

Tra i funghi filamentosi *Aspergillus fumigatus* rimane di gran lunga la causa più frequente di colonizzazione delle vie aeree. Altri funghi filamentosi vengono sempre di più ritrovati dalle colture d'espettorato, come *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* che possono colonizzare in modo transiente. Inoltre *Scedosporium apiospermum* (la forma asessuata di *Pseudoallescheria boydii*) è ora riconosciuto come un'importante e pericoloso colonizzante in Fibrosi Cistica. Sono state poi isolate altre specie come *Exophiala dermatitidis* e *Scedosporium prolificans*. Ma la situazione potrebbe essere ancora più complessa, come suggerito da recenti descrizioni di due altre specie isolate da espettorati di pazienti con Fibrosi Cistica: *Penicillium emersonii* e *Acrophialophora fuispora*.

Sicuramente potrebbero esserci delle variazioni geografiche nella prevalenza di colonizzazione da parte di specie di funghi filamentosi, anche in relazione alle loro caratteristiche biologiche.

La prevalenza delle specie di funghi filamentosi e l'impatto sul decorso clinico è poco conosciuto dai microbiologi e dai clinici coinvolti nel follow-up dei pazienti con fibrosi Cistica; la percentuale di pazienti colonizzati è certamente bassa ma può essere sottostimata.

A. fumigatus e ABPA. *A. fumigatus* è un organismo con un ruolo importante nella degradazione dei composti organici, è ubiquitario e si diffonde nell'ambiente mediante la dispersione di spore molto piccole. *A.fumigatus* è il fungo filamentoso più conosciuto sia dai microbiologi che dai clinici; oltre che il più comune colonizzante dei pazienti con Fibrosi Cistica.

Sono state riportate tuttavia differenti percentuali di frequenza dal 9% al 57% secondo gli studi.

E' noto che *A.fumigatus* in Fibrosi Cistica è causa d'Aspergillosi Broncopolmonare Allergica (ABPA) la cui frequenza nei pazienti varia grandemente dai dati della letteratura (dal 0,9% all 11%). L'ABPA è caratterizzata da un'ipersensibilità polmonare mediata da una risposta allergica al fungo. ABPA compare in circa il 10% dei pazienti con Fibrosi Cistica ed è rara nei bambini al disotto dei 6 anni d'età. L'ABPA può causare un peggioramento acuto dello stato respiratorio ed un ulteriore declino della funzionalità polmonare; senza un adeguato trattamento può progredire ad uno stato cronico ed ad una fibrosi polmonare.

L'immuno-patogenesi dell'ABPA è iniziata dai conidi d'*A.fumigatus*, che sono continuamente inalati nei bronchi e germinano *in situ*, rilasciando antigeni. Queste cellule miceliali rilasciano più di 75 differenti proteine/allergeni che scatenano la produzione di citokine e interleuchina-1, -5, -13. La risposta infiammatoria nella submucosa bronchiale causa un'eccessiva produzione di mucina, rilascio d'eosinofili, ostruzione bronchiale intermittente con atelectasie e, in qualche caso, bronchiectasie.

In Fibrosi Cistica è accettato che la diagnosi d'ABPA debba soddisfare ad almeno a 6 dei 7 "criteri definiti da Nelson:

1. respiro affannoso
2. coltura microbiologica positiva per *A.fumigatus*
3. presenza d'infiltrati visibili nella radiografia polmonare
4. reazione positiva acuta ad *A.fumigatus* con lo skin prick test
5. elevate IgE totali
6. aumento delle IgE sieriche specifiche verso *A.fumigatus*
7. aumento delle IgG sieriche specifiche verso *A.fumigatus*

Altri funghi filamentosi e malattia allergica

Sembra che anche altri *Aspergillus spp.* (non-*fumigatus*) e *Scedosporium apiospermum* possano in qualche modo causare in Fibrosi Cistica forme analoghe all'ABPA; ma ancora ci sono pochi studi ed evidenze. La diagnostica microbiologica accurata di colonizzazione fungina e l'identificazione di specie potranno dare un contributo importante in questo campo

Infezioni fungine invasive

Lo sviluppo di forme invasive fungine è un'evento molto raro nei pazienti con Fibrosi Cistica : sono stati descritti casi di

- aspergilloma
- aspergillosi disseminata anche dopo trapianto polmonare
- infezioni disseminate da *S. apiospermum* dopo trapianto polmonare

L'aumento dell'utilizzo di strategie immuno-soppressive, specialmente nel caso del trapianto di polmone, unitamente alle terapie anti-pseudomonas sempre più aggressive, potrebbero favorire nel futuro un aumento delle infezioni fungine comprese quelle invasive.

La diagnostica microbiologia

E' importante che il laboratorio di diagnostica microbiologica della Fibrosi Cistica si trovi preparato ad un'adeguata diagnostica delle infezioni fungine. Attualmente la diagnostica microbiologica dei funghi si basa prevalentemente sull'esame microscopico diretto e sulla coltura di campioni d'espettorato.

Allo stato attuale però non esiste una standardizzazione delle procedure per l'esame micologico dei campioni di pazienti con Fibrosi Cistica, non esistono raccomandazioni specifiche sui terreni di coltura, così come su i tempi e le temperature d'incubazione delle colture.

La mancanza di terreni selettivi, così come tempi d'incubazione insufficienti possono compromettere il ritrovamento di alcune specie come *S.apiospermum*, che spesso è associato ad *A.fumigatus*, di più rapida crescita. Inoltre mancano dei metodi semplici e rapidi che permettono un'accurata e facile identificazione delle specie recentemente descritte in Fibrosi Cistica. Tutto questo può spiegare le importanti variazioni sulla frequenze riportate riguardo ad alcune specie fungine nel contesto della Fibrosi Cistica.

In attesa che siano perfezionate le linee guida a riguardo delle colture e dell'identificazione dei funghi filamentosi è utile che i microbiologi pongano attenzione a

- esaminare a livello microscopico i campioni dei pazienti con isolamento ripetuto di fungo filamentoso, in particolare se colonizzati da una specie raramente riscontrata (l'osservazione delle ife fungine mediante l'esame microscopico diretto conferma che il fungo è veramente presente nel campione e non è da considerare un contaminante).
- utilizzare un terreno con agenti selettivi (es sabouraud+cloramfenicolo +gentamicina)
- tenere in incubazione le piastre per le colture fungine per 48h e se negative tenere le piastre ed osservarle dopo altre 48 h
- identificare possibilmente a livello di genere e specie, ma obbligatoriamente a livello di genere tutti i funghi filamentosi ritrovati
- segnalare sempre nel referto clinico di funghi filamentosi ritrovati e se possibile dare un'indicazione sulla loro quantità

L'identificazione di genere e specie dei funghi filamentosi si basa sull'osservazione macroscopica delle caratteristiche della colonia fungina, i tempi di crescita, i pigmenti e la morfologia microscopica del fungo. Un buon atlante e testo di micologia possono venire validamente in aiuto, così come alcuni links utili (<http://www.aspergillus.org.uk/>

<http://www.doctorfungus.org/>

<http://www.mycology.adelaide.edu.au/>

<http://www.cbs.knaw.nl/Medical/defaultpage.aspx>

È sempre opportuno rivolgersi a centri di riferimento per problematiche identificative e per stage di training.

L'identificazione a livello di specie dei funghi filamentosi presenti nei campioni dei pazienti è un dato importante che il microbiologo può offrire al clinico. La segnalazione della presenza di una determinata specie fungina potrà essere valutata, ad es. nel contesto di una possibile ABPA (caso d'*A. fumigatus* ed altri *Aspergillus spp.*); potrà essere data evidenza di una colonizzazione cronica; sarà un'indicazione indispensabile nel caso di pazienti in lista di trapianto di polmone. La colonizzazione fungina potrebbe essere una causa di complicanze infettive gravi, compresa l'infezione disseminata, quando il paziente sarà trattato con farmaci immuno-soppressori nel decorso post trapianto. La conoscenza delle specie fungine colonizzanti darà al clinico indicazioni per l'eventuale profilassi e trattamento antimicotico più adeguato. Naturalmente non è richiesto che il laboratorio di microbiologia esegua i tests di sensibilità agli antimicotici dei funghi filamentosi isolati, in quanto è il pattern di sensibilità di molte specie è noto da studi microbiologici. Alcune specie fungine possono essere altamente farmaco-resistenti *in vitro* e/o *in vivo*.

A.fumigatus è intrinsecamente resistente al fluconazolo ma, l'itraconazolo e il voriconazolo sono sensibili sia *in vitro* che *in vivo*;

A.terreus è altamente resistente all'amfotericina B sia *in vitro* che *in vivo*.

S.apiospermum è resistente *in vitro* a miconazolo, itraconazolo, voriconazolo e caspofungina, inoltre le MICs di amfotericina B sono spesso elevate e corrispondono ad un'inefficacia del trattamento delle infezioni.

S.prolificans è resistente a quasi tutti gli antimicotici disponibili.

***Candida albicans* ed altri lieviti**

Candida spp. (in particolare *C.albicans*) è la specie fungina più frequentemente isolata dalle colture espettorato con *A.fumigatus*. *Candida spp.* è spesso di origine da una colonizzazione mucocutanea a livello oro-faringeo, favorita dai trattamenti con antibiotici, che alterano la composizione della flora microbica e dai corticosteroidi. In qualche caso può essere presente una colonizzazione cronica bronchiale; in rarissimi casi *Candida spp.* è causa d'infezione polmonare cronica o candidosi invasiva. Spesso la colonizzazione *C.albicans* provoca una produzione di IgE specifiche e questo dato può essere un marker immunologico correlabile allo sviluppo di ABPA quando è presente anche *A.fumigatus*.

I ceppi di *C.albicans* isolati in Fibrosi Cistica sono normalmente sensibili agli azoli, in qualche ceppo, isolato da pazienti trattati con itraconazolo può svilupparsi resistenza a questo farmaco e crociata con il fluconazolo.

Dal punto di vista della diagnostica microbiologica la presenza di *Candida spp.* deve essere sempre segnalata quando è in contocolonie significativa; per quanto riguarda l'identificazione di specie può essere utile l'utilizzo di un terreno cromogenico per lieviti (es CHROMagar Candida) che è in grado di identificare morfologicamente e discriminare la *C.albicans* da altre

tre specie di *Candida* spp. (*glabrata*, *krusei*, *tropicalis*). Va ricordato che in qualche raro caso ceppi identificati come *C.albicans* con questi terreni, ad una successiva identificazione biochimica si sono rivelati essere *Candida dublinensis*, una specie fenotipicamente simile a *C.albicans* ma geneticamente distinta. Questa specie può essere resistente al fluconazolo.

Bibliografia

Hilliard T, Edwards S, Buchdahl R, Francis J, Rosenthal M, Balfour-Lynn I, Bush A, Davies J. Voriconazole therapy in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2005 Dec;4(4):215-20.

Moss RB. Pathophysiology and immunology of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Med Mycol.* 2005 May;43 Suppl 1:S203-6

Tillie-Leblond I, Tonnel AB. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy.* 2005 Aug;60(8):1004-13.

Slavin RG, Hutcheson PS, Chauhan B, Bellone CJ. An overview of allergic bronchopulmonary aspergillosis with some new insights. *Allergy Asthma Proc.* 2004 Nov-Dec;25(6):395-9

Knutsen AP, Bellone C, Kauffman H. Immunopathogenesis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2002 Jun;1(2):76-89

Levy MB. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and cystic fibrosis. *Front Biosci.* 2003 May 1;8:s579-83
1: Jayamohan Y, Ribes JA.

Virnig C, Bush RK. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: a US perspective. *Curr Opin Pulm Med.* 2007 Jan;13(1):67-71

4: Webb AK, Woolnough E. *Candida albicans* infection in adults with cystic fibrosis. *J R Soc Med.* 2006;99 Suppl 46:13-6. Review. No abstract available.

Hagerman JK, Hancock KE, Klepser ME. Aerosolised antibiotics: a critical appraisal of their use. *Expert Opin Drug Deliv.* 2006 Jan;3(1):71-86

Saubolle MA, McKellar PP. Laboratory diagnosis of community-acquired lower respiratory tract infection. *Infect Dis Clin North Am.* 2001 Dec;15(4):1025-45

Elphick H, Southern K. Antifungal therapies for allergic bronchopulmonary aspergillosis in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;(4):CD002204. Review.

Nagano Y, Millar BC, Goldsmith CE, Elborn JS, Rendall J, Moore JE. Emergence of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Arch Dis Child.* 2007 Jul;92(7):607.

Guignard S, Hubert D, Dupont B, Anract P, Alioua D, Guerini H, Paugam A, Dougados M. Multifocal *Scedosporium apiospermum* spondylitis in a cystic fibrosis patient. *J Cyst Fibros.* 2007 Jun 11

Vázquez-Tsuji O, Campos Rivera T, Rondán Zárate A, Mirabal García M. Endobronchitis by *Scedosporium apiospermum* in a child with cystic fibrosis. *Rev Iberoam Micol.* 2006 Dec;23(4):245-8.

4: Symoens F, Knoop C, Schrooyen M, Denis O, Estenne M, Nolard N, Jacobs F. Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2006 May;25(5):603-7

Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, Carrère J, Bailly E, Symoens F, Diouri M, Hallet JN, Bouchara JP. Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2002 Jun;40(6):2108-14.

6: Williamson EC, Speers D, Arthur IH, Harnett G, Ryan G, Inglis TJ. Molecular epidemiology of *Scedosporium apiospermum* infection determined by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences in patients with chronic lung disease. *J Clin Microbiol.* 2001 Jan;39(1):47-50.

Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalotte JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000 Jan;19(1):53-6.

Hennequin C, Benailly N, Silly C, Sorin M, Scheinmann P, Lenoir G, Gaillard JL, Berche P. In vitro susceptibilities to amphotericin B, itraconazole, and miconazole of filamentous fungi isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Sep;41(9):2064-6.