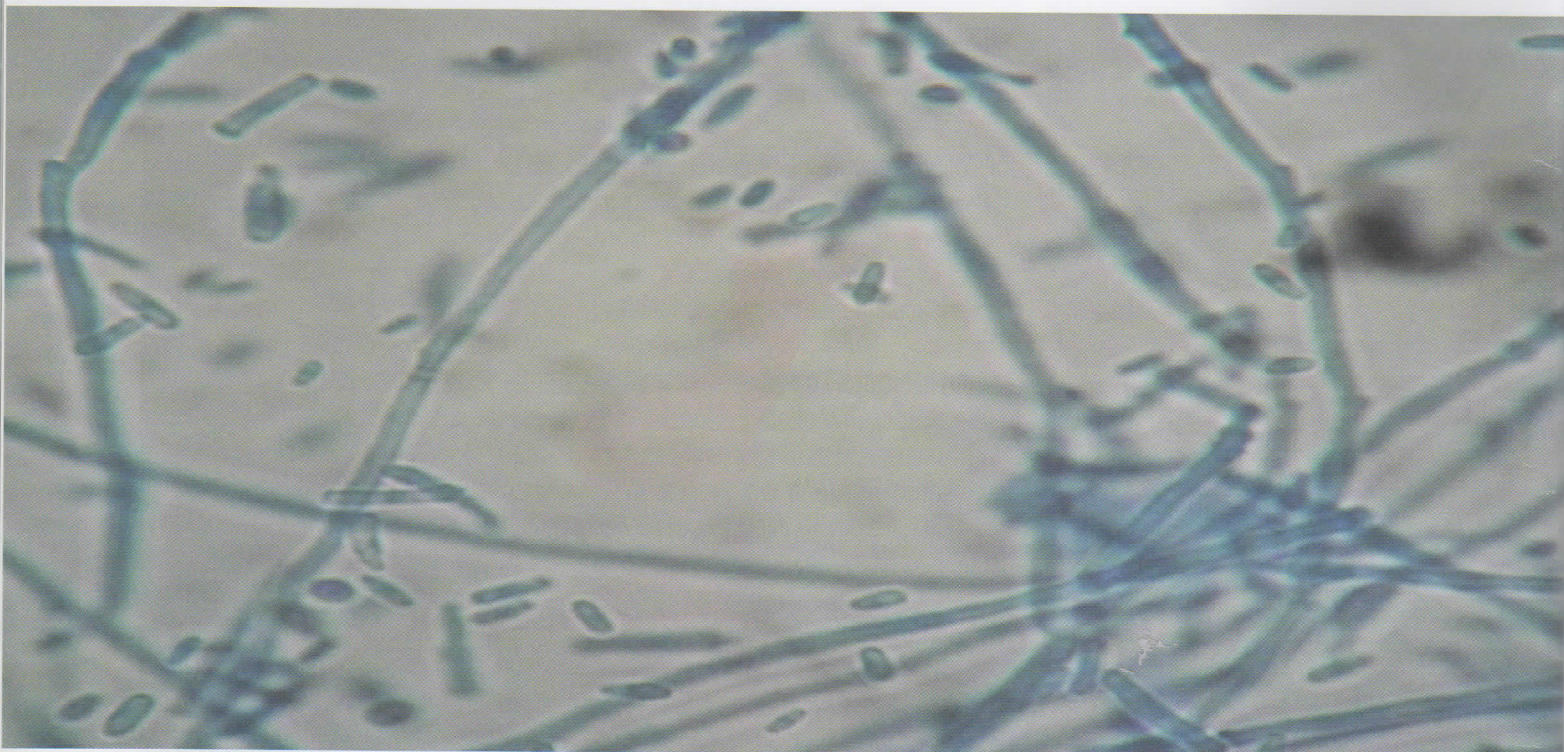


*Dipodascus capitatus.*

©T. Fasciana

Isolamento e tipizzazione di stipiti di *Dipodascus capitatus* Patogeno opportunisto emergente

TERESA FASCIANA¹
CINZIA CALÀ¹
CELESTINO BONURA¹⁻²
GIUSEPPINA CAPRA¹⁻²
GIOVANNA SEDDIO²
RITA IMMORDINO²
ROSARIA CHIARAMONTE²
ANNA GIAMMANCO¹⁻²

¹ Dipartimento di Scienze per la Promozione
della Salute e Materno Infantile "G. D'Alessan-
dro", Università degli studi di Palermo

² Unità Operativa Complessa, Servizio Analisi
di Microbiologia, Virologia e Parassitologia.
A.O.U.P. "P. Giaccone" Palermo.

Abstract

L'incidenza delle infezioni micoti-
che ha subito negli ultimi decenni un
incremento rilevante, sia in ambito
ospedaliero che comunitario. In am-

biente ospedaliero il problema sta assumendo dimensioni preoccupanti poiché, sebbene *Candida spp.* si debba considerare il principale responsabile di infezioni correlate ai miceti, emergono altre specie il cui ruolo deve essere accertato.

In particolare *Dipodascus capitatus*, forma teleomorfa di *Geotrichum capitatum*, microrganismo che può risiedere nel suolo, sulla pelle e nel tratto respiratorio e gastroenterico, nel passato considerato un contaminante o un innocuo colonizzatore, da qualche anno è stato associato ad infezioni soprattutto nei pazienti immunocompromessi.

Sebbene le infezioni da tale microrganismo siano spesso favorite dall'uso di antibiotici e di cateteri, le forme invasive sembrano verificarsi in pazienti neutropenici e nei soggetti sottoposti a chemioterapia intensiva per leucemia acuta. Dai reparti ad alto rischio sono stati anche rilevati episodi epidemici *D. capitatus*-correlati. Il suo riscontro non deve quindi essere sottovalutato ed è necessario poter disporre di test semplici che ne permettano una rapida identificazione. Tra i metodi fenotipici quello che si basa sulla valutazione della crescita in terreno cromogeno è considerato ottimale, soprattutto se si utilizza il CCA (Chromogenic Candida Agar, Oxoid); ed è stato già descritto quale metodo molecolare il sequenziamento. Anche dai reparti dell'A.O.U.P. "P. Giaccone" di Palermo, nel corso dell'ultimo anno, sono stati isolati stiptipi di *D. capitatus*. Ceppi, provenienti da tre pazienti, da campioni diversi e da differenti reparti, sono stati identificati fenotipicamente, utilizzando CHROMagar Candida (BD), e la loro identificazione è stata confermata tramite sequenziamento. Inoltre, al fine di valutare l'eventuale diffusione epidemica di questi isolati, sono stati utilizzati la PCR fingerprinting che prevede l'utilizzo della sequenza del fago M13 e la RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) utilizzando il primer Ope-4 e la combinazione dei primari W80A-Ap12h.

Introduzione

D. capitatus, forma teleomorfa di *Geotrichum capitatum*, appartiene alla divisione degli Ascomyceti, e quale saprofita del suolo, è abitualmente isolato da fonti ambientali. Può far parte del normale microbiota della cute ed è anche frequentemente isolato dall'espettorato e dal tratto digestivo di soggetti sani. Negli ultimi due decenni, in seguito all'aumento di fattori predisponenti alle infezioni fungine, (chemioterapie, neutropenia, utilizzo di terapie antibiotiche ad ampio spettro, terapie steroidee e pratiche invasive come la cateterizzazione), anche il numero di infezioni dovute a questa specie emergente, ha subito un incremento. *D. capitatus* sembra oggi essere coinvolto nelle infezioni del tratto urinario, nelle meningiti, nelle osteomieliti, nelle endocarditi e nelle infezioni sistemiche [1-2].

Si tratta di manifestazioni simili alle candidosi ma che, nei pazienti neutropenici risultano fatali, nonostante la somministrazione di una terapia antifungina per via sistemica [3].

Sebbene il tratto digestivo e le vie respiratorie rappresentano le porte d'ingresso in caso di infezioni profonde, dati di letteratura riportano quali possibili fonti d'infezione anche l'uso di cateteri venosi e valvole. In particolare è stato suggerito che un certo numero di casi sono di origine nosocomiale, proveniente da una fonte comune dell'ambiente ospedaliero [4].

Sulla base di tali considerazioni diventa importante quindi una diagnosi precoce volta all'identificazione delle specie di miceti coinvolte nei processi infettivi, soprattutto per pazienti in condizioni critiche nei quali le manifestazioni possono facilmente dare origine a infezioni sistemiche difficili da trattare ed a volte fatali.

A tal fine si trovano in commercio dei terreni cromogeni (Chromogenic Candida Agar (CCA) Oxoid e CHROMagar Candida (BD)) in grado di differenziare le diverse specie di *Candida*.

Questi terreni contengono un substrato cromogeno dell'enzima β -glucosaminidasi che metabolizzato da enzimi specie-specifici determinano una differente pigmentazione delle colonie appartenenti a differenti specie di *Candida*.

Nonostante questi terreni siano ottimali per identificare le specie di *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, Ghelardi et al., riportano una buona capacità del CCA (Chromogenic Candida Agar, Oxoid) nell'identificare oltre alle tre specie di *Candida* anche altre di miceti tra cui il *D. capitatus* [5].

In questo lavoro riportiamo la nostra esperienza sull'identificazione di *D. capitatus*, isolato da tre pazienti, tramite l'uso del CHROMagar Candida (BD). L'identificazione fenotipica è stata confermata mediante sequenziamento.

Sospettando la possibilità di una correlazione clonale tra i tre isolati, dimostrativa della circolazione di un identico clone tra i reparti dell'A.O.U.P. P. Giaccone di Palermo, abbiamo caratterizzato genotipicamente gli stiptipi.

Tra le metodiche utilizzate per la tipizzazione molecolare oggi si riscontrano la random amplification of polymorphic DNA (RAPD) e la PCR fingerprinting [6-7].

Materiali e metodi

Isolamento ed identificazione

I campioni biologici, dei 3 pazienti affetti da differenti patologie Tab.1, da cui sono stati isolati gli stiptipi di *D. capitatus*, sono stati seminati su CHROMagar Candida (BD) e messi ad incubare a 37 °C valutando l'eventuale crescita giornaliera.

Valutata la crescita è stato effettuato l'esame microscopico a fresco ponendo una goccia di sospensione microbica tra un vetrino porta oggetto e uno copri oggetto. Il preparato è stato così visionato al micro-

scopio ottico con ingrandimento 40X.

L'identificazione di genere e specie è stata confermata mediante l'amplificazione e il sequenziamento della regione ITS (Internal Transcribed Spacer).

Due µl di Dna, estratto secondo il protocollo del Kit Roche, è stato sottoposto a reazione di PCR in un volume finale di 50 µl, contenente 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP, 0,2 mM di ciascun primer (ITS1 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' e ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') e 2,5U di Ampli Taq Gold, le reazioni sono state quindi trasferite in termociclatore e sottoposte alle seguenti condizioni: una iniziale denaturazione a 94 °C per 10 min., seguita da 35 cicli di 45 s a 94°C, 45 s a 55 °C e 45 s a 72 °C, con una estensione finale a 72°C per 5 min.

I prodotti di PCR sono stati visualizzati, dopo elettroforesi, su gel di agarosio al 2% con aggiunta di bromuro di etidio. Il gene è stato sequenziato utilizzando il kit "ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystem) e lo specifico primer.

Infine l'elettroferogramma è stato analizzato il sistema National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Md., Usa) BLAST. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>.

Infine la sensibilità ad Amfotericina, Econazolo, fluconazolo, Ketoconazolo, Miconazolo e Nistatina è stata saggiata mediante metodica Kirby-Bauer su terreno YMA.

Tipizzazione molecolare

La tipizzazione molecolare è stata effettuata mediante:

- random amplification of polymorphic DNA (RAPD) utilizzando la combinazione dei primers AP12h e W-80A riportati da Gadea et al. e il singolo primer OPE-4 riportato da Ersoz et al [7];
- PCR fingerprinting utilizzando come primer la sequenza core del fago M13 [6].

Per entrambe le metodiche 5 µl di Dna, estratto mediante colonnine Roche, sono

stati sottoposti ad amplificazione in un volume finale di 25 µl, contenente 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP, 0,2 mM di ciascun primer e 2,5U di Ampli Taq Gold; le reazioni sono state quindi trasferite in termociclatore e sotto-

poste alle seguenti condizioni: una iniziale denaturazione a 94 °C per 10 min., seguita da 35 cicli di 45 s a 94°C, 45 s a 31 °C e 45 s a 72 °C, con una estensione finale a 72°C per 10 min.

Per confermare i risultati ottenuti en-

Caso	Età/sexo	Patologia Primaria	Patologia	Campione	Reparto
1	51/M	Carcinoma alla tiroide	Polmonite	Espettorato	Medicina Interna
2	21/M	L.A.L	Febbre	Espettorato	Ematologia
3	66/F	Cardiopatia ischemica, ipertensione	Febbre	Espettorato	Cardioangiologia L.A.L. Leucemia finfoblastica acuta

Tabella 1. Patologie, campioni clinici, reparti di provenienza dei tre pazienti in esame.

Caso 1	Caso 2	Caso 3	Antimicotico
S	S	S	Nistatina
I	S	S	Fluconazolo
S	S	S	Miconazolo
S	S	S	Econazolo
S	S	S	Ketoconazolo
R	R	S	AmfotericinaB

Tabella 2. Sensibilità degli isolati agli antimicotici.

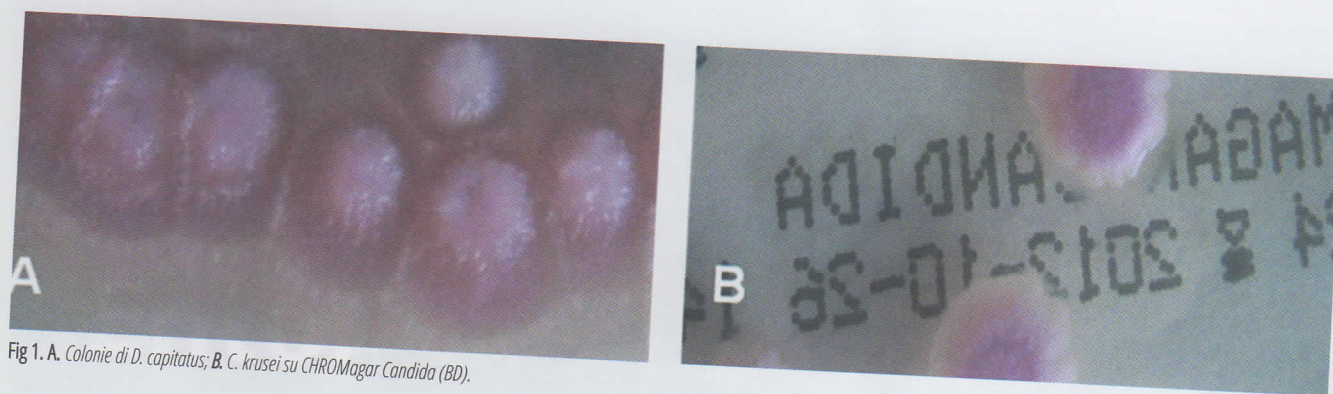


Fig 1. A. Colonie di *D. capitatus*; B. *C. krusei* su CHROMagar Candida (BD).

©T. Fasciana

trambe le metodiche sono state riportate in due esperimenti indipendenti.

Risultati

Isolamento, identificazione e profilo di resistenza

Gli isolati di *D. capitatus* provenivano da tre campioni di espettorato di tre differenti soggetti ricoverati, in diversi reparti dell'U.O.P. di Palermo, per varie patologie.

I 3 stipi dopo tre giorni di coltivazione su CHROMagar Candida (BD), presentano colonie di colore rosa chiaro e con aspetto fimbriato e ruvido che le rendevano facilmente distinguibili da quelle di *C. krusei* che normalmente appaiono rosa scuro e lisce. (Fig. 1 A e B).

L'esame microscopico, eseguito direttamente dalla colonia, ha rilevato la presenza di filamenti e conidiofori striscianti o ascendenti, abbondantemente ramificati con cellule coenocitiche con disposizione ad angolo retto, assenza di cicatrici nei punti di separazione dei conidi.

I conidi presentavano forma cilindrica o claviforme con l'apice arrotondato e la base piatta (Fig 2).

La sequenza del DNA di tutti gli isolati si è appaiata con il gene 18S rRNA di *D. capitatus* (*G. capitatum*) del Database GenBank DNA (HQ014712), per cui tutti gli isolati sono stati identificati come *D. capitatus*.

Il profilo di resistenza ai farmaci è riportato in tabella 2.

Gli isolati hanno mostrato una buona sensibilità agli antimicotici esaminati rilevando una percentuale di resistenza del 75% all'amfotericina B.

Tipizzazione molecolare

I risultati della tipizzazione molecolare mediante RAPD-PCR e DNA fingerprinting sono riportati nella Figura 3.

Dai risultati ottenuti si evince che il potere discriminatorio, sia delle due metodiche sia della differente combinazione di primers, è comparabile; questo mostra una comune fonte di infezione esistente nei re-

parti di Medicina interna e Cardioangiologia. Nella RAPD-PCR, infatti, i pattern di bande ottenuti sia con la combinazione dei primer AP12h e W-80 A sia con il singolo primer OPE-4 mostrano una correlazione genetica tra gli isolati di *D. capitatus* provenienti dai reparti di Medicina interna e di Cardioangiologia; tale dato è stato anche confermato dal pattern conseguito dopo analisi del DNA fingerprinting. L'isolato ottenuto dal reparto di ematologia ha mostrato invece con entrambe le metodiche un pattern di bande differente dagli altri due isolati.

I risultati acquisiti da esperimenti condotti separatamente hanno sempre confermato i dati ottenuti (dati non mostrati).

Conclusioni

D. capitatus è un fungo ubiquitario la cui patogenicità nell'uomo è stata solo documentata di recente, ed il numero crescente di infezioni segnalate suggeriscono che si tratta di un microrganismo emergente.

Tale infezioni, nella maggior parte dei casi coinvolgono soggetti immunocompromessi, pur tuttavia alcuni dati di letteratura riportano casi d'infezione in soggetti con lievi immunocompromissioni [1].

Per il loro isolamento è stato utilizzato il CHROMagar Candida (BD) considerato dalla letteratura di riferimento come metodo per il rilevamento e l'identificazione di alcune specie appartenenti al genere *Candida*.



©T. Fasciana

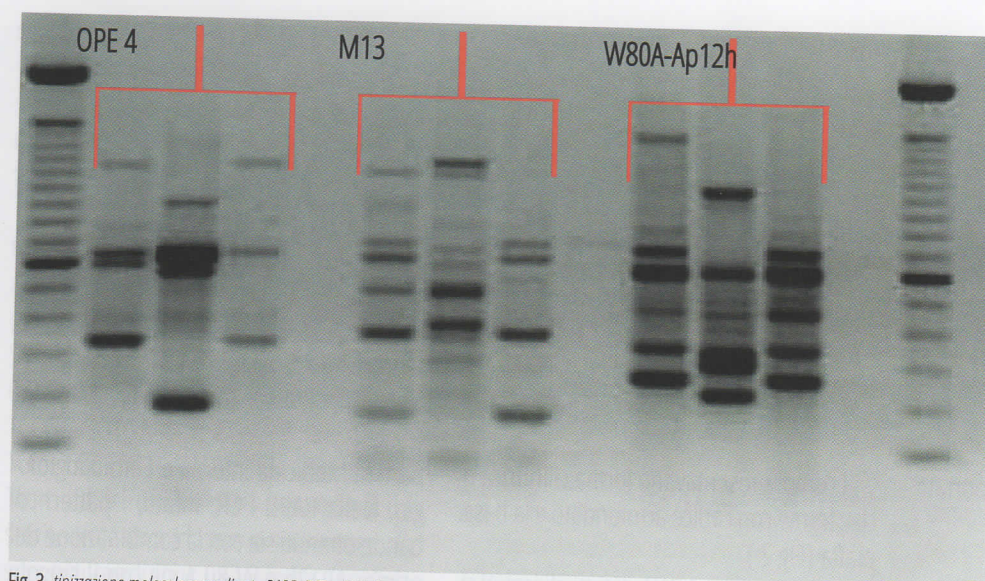


Fig. 3. tipizzazione molecolare mediante RAPD-PCR e DNA fingerprinting L= ladder 100bp, 1= Caso 1, 2= Caso 2, 3= Caso 3.

©T. Fasciana

Tramite il sequenziamento abbiamo potuto dimostrare che il CHROMagar Candida (BD) può essere considerato un sistema rapido in grado di identificare in tempi brevi e con un basso costo *D. capitatus*.

Per quanto riguarda la valutazione dell'attività degli antimicotici il National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) non fornisce nessuna linea guida specifica sia per l'esecuzione di tali test che per i farmaci da valutare [9-10].

Alcuni autori riportano l'amfotericina B quale farmaco attivo nei confronti di *D. capitatus*.

Dal nostro studio purtroppo emergono, sull'attività del suddetto farmaco, dati preoccupanti infatti il 75 % degli isolati mostrano resistenza.

Necessitano comunque studi che confermino i dati ottenuti e che valutino possibili terapie alternative.

Sarebbe opportuno inoltre, considerata l'emergente diffusione del microrganismo e la sua presenza in reparti diversi effettuare, proprio al fine di escludere l'esistenza di una fonte comune d'infezione, eventuali correlazioni filogenetiche tra gli stipiti isolati.

Invece, relativamente alla tipizzazione molecolare 2 ceppi su 3 sono risultati identici con entrambi i metodi, facendo supporre una possibile origine clonale dei due

isolati, sebbene i primer utilizzati siano considerati validi anche per la tipizzazione di altre specie fungine [10-11] e potrebbero quindi non permettere un'analitica discriminazione degli stipiti. Si deve infine secondo alcuni autori tener presente che *D. capitatus* appare come un fungo geneticamente omogeneo.

Sulla base delle considerazioni espresse, dell'esiguo numero di isolati inclusi nella casistica, del non dimostrato isolamento del microrganismo da una fonte ambientale comune all'interno della struttura ospedaliera, i risultati ottenuti devono essere interpretati con cautela. ●

©Riproduzione riservata

BIBLIOGRAFIA

- 1 Buchta, V., P. Zak, A. Kohout, and M. Otčenasek. 2001. Case report. Disseminated infection of *Blastoschizomyces capitatus* in a patient with acute myelocytic leukaemia. *Mycoses* 44:505-512.
- 2 Pagano, L., G. Morace, E. Ortu-La Barbera, M. Sanguinetti, and G. Leone. 1996. Adjuvant therapy with rhGM-CSF for the treatment of *Blastoschizomyces capitatus* systemic infection in a patient with acute myeloid leukemia. *Ann. Hematol.* 73:33-34.
- 3 Martino R, Salavert M, Parody R, Tomás JF, de la Cámara R, Vázquez L, et al. *Blastoschizomyces capitatus* infection in patients with leukemia: report of 26 cases. *Clin Infect Dis* 2004; 38:335-341.
- 4 Ersoz G, Otag F, Erturan Z, Aslan G, Kaya A, Emekdas G, Sugita T. An outbreak of *Dipodascus capitatus* infection in the ICU: three case reports and review of the literature. *Jpn J Infect Dis.* 2004 Dec;57(6):248-52.
- 5 Ghelardi E, Pichiari G, Castagna B, Barnini S, Tavanti A, Campa M. Efficacy of Chromogenic Candida Agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species *Clin Microbiol Infect.* 2008 Feb;14(2):141-7.
- 6 Gadea I, Cuenca-Estrella M, Prieto E, Díaz-Guerra TM, García-Cía JI, Mellado E, Tomás JF, Rodríguez-Tudela JL. Genotyping and antifungal susceptibility profile of *Dipodascus capitatus* isolates causing disseminated infection in seven hematological patients of a tertiary hospital. *J Clin Microbiol.* 2004 Apr;42(4):1832-6.
- 7 Ersoz G, Otag F, Erturan Z, Aslan G, Kaya A, Emekdas G, Sugita T. An outbreak of *Dipodascus capitatus* infection in the ICU: three case reports and review of the literature. *Jpn J Infect Dis.* 2004 Dec;57(6):248-52.
- 8 Savini V, Catavittello C, Balbinot A, Masciarelli G, Astolfi D, Pompilio A, Di Bonaventura G, D'Amario C, D'Antonio D. Multidrug-resistant *Geotrichum capitatum* from a haematology ward. *Mycoses.* 2011 Nov;54(6):542-3. doi: 10.1111/j.1439-0507.2010.01894.x. Epub 2010 May 17.
- 9 Girmenia C, Pizzarelli G, D'Antonio D, Cristini F, Martino P. In vitro susceptibility testing of *Geotrichum capitatum*: comparison of the E-test, disk diffusion, and Sensititre colorimetric methods with the NCCLS M27-A2 broth microdilution reference method. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3985-3988.
- 10 Díaz-Guerra, T., J. Martínez-Suarez, F. Laguna, and J. Rodríguez-Tudela. 1997. Comparison of four molecular typing methods for evaluating genetic diversity among *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive patients with oral candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 35:856-861.
- 11 Enger, L., S. Joly, C. Pujol, P. Simonson, M. Pfaller, and D. R. Soll. 2001. Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. *J. Clin. Microbiol.* 39:658-669.