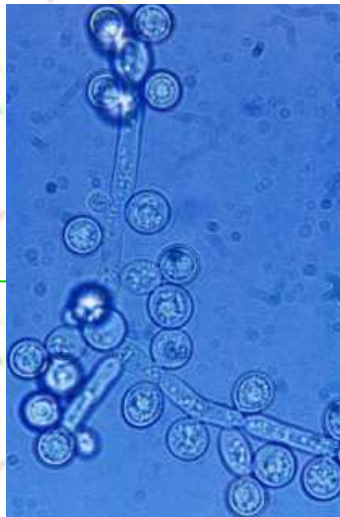


Meningoencefaliti micotiche e parassitarie

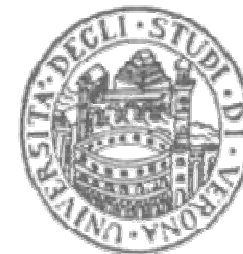


Dr.ssa Lo Cascio Giuliana

*Dipartimento Aziendale Integrato di Patologia e diagnostica, Sezione
di Microbiologia, Servizio di Microbiologia, Ospedale G. B. Rossi,
Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata di Verona
Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Verona*



AZIENDA OSPEDALIERA
ISTITUTI OSPITALIERI DI VERONA





Programma

- 
- **Agenti eziologici**
 - **Parassitosi del SNC**
 - **Micosi del SNC**
 - **Epidemiologia**
 - **Percorso Diagnostico**

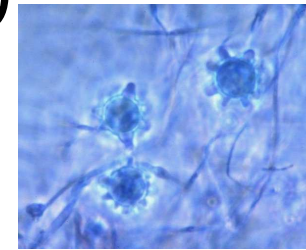


Definizione:

- Infiammazione cronica delle meningi;
- Sintomatologia neurologica superiore alle 4 settimane (sonnolenza, disorientamento, disattenzione, deficit mnesici, paralisi progressiva dei nervi cranici);
- Persistente risposta infiammatoria liquorale;

Principali agenti infettivi fungini patogeni del SNC

- Candida (neonati);
- Cryptococcus;
- Miceti ialini (*Aspergilli* e *Fusarium spp.*)
- *Miceti dimorfici* (*Blastomyces* ,
Coccidioides , *Histoplasma*)
- Zygomyceti (*Absidia*, *Mucor...*)
- *Miceti dematiacei* (*Scedosporium apiospermum* o *prolificans*)



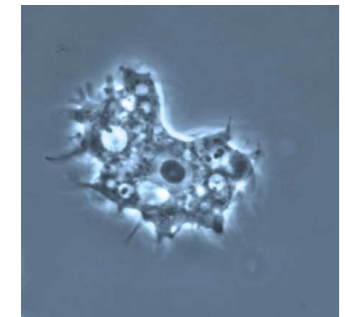
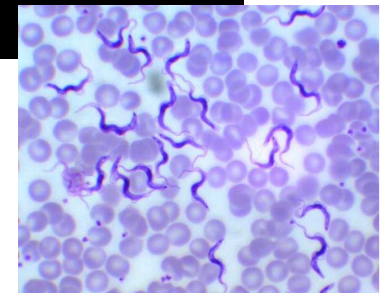
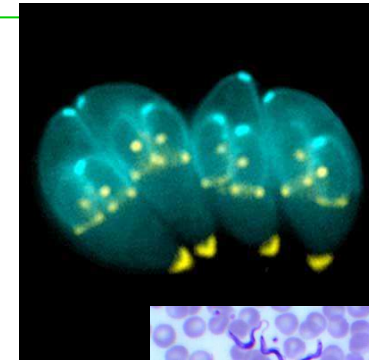
INFEZIONI FUNGINE DEL SNC CLINICA

| | Predilezione SNC | meningite | ascessi | infarto |
|-------------|------------------|-----------|---------|---------|
| Candida | + | +++ | ++ | + |
| Aspergillo | ++ | + | +++ | ++++ |
| Zigomiceti | ++ | + | + | ++++ |
| Criptococco | ++++ | ++++ | + | + |

Principali agenti infettivi parassitari patogeni del SNC

- Protozoi:

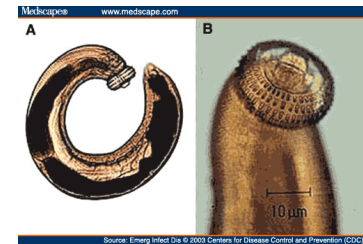
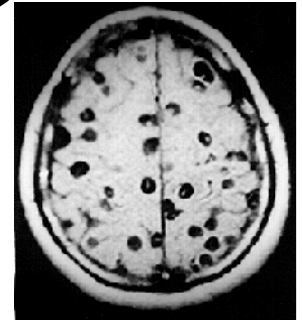
- *Toxoplasma gondii* (associati ad accessi cerebrali; AIDS)
- *Tripanosoma brucei gambiense*, *rhodesiense*
- *Acanthameba* spp (*Naegleria*, *Balamuthia*, *Acanthamoeba*)(immunodepressi e soggetti debilitati)



Principali agenti infettivi parassitari patogeni del SNC

- Elminti:

- Cisticercosi- Cisti da *Tenia solium*(cisti multiple meningi basali e idrocefalo; cisti cerebrali; calcificazioni muscolari)
- *Gnathostoma spinigerum* (ingestione crostacei crudi; comune in Thailandia e Giappone)
- *Angiostrongylus cantonensis* (ingestione crostacei crudi; comune nel Pacifico tropicale)



- *Trypanosoma brucei*

Goccia spessa e striscio (Giemsa)

Test di Woo/Bennet (centrifugazione in capillari)

Test di eritrolisi

Mini test di scambio anionico (mAECT)

Test sierologici – Agglutinazione diretta (DAT)

ELISA

Fissazione del complemento

IF

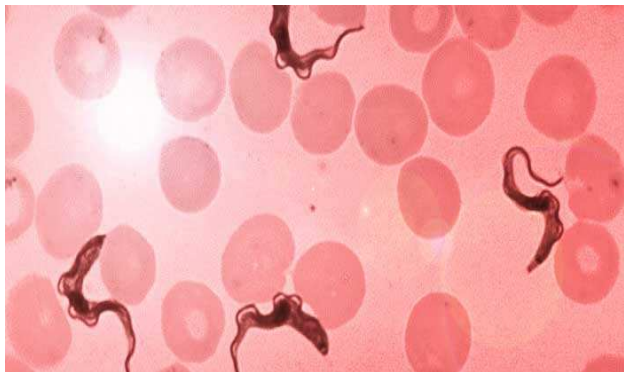
Immunolettroforesi

Emoagglutinazione

Ricerca IgM nel sangue e nel liquor

Screening- test a micrometodo (CATT,

CIATT)



- *Toxoplasma gondii*: diagnosi prevalentemente radiologica

Sierologia

Dye Test

IFI

Agglutinazione diretta (ADHS)

Emoagglutinazione

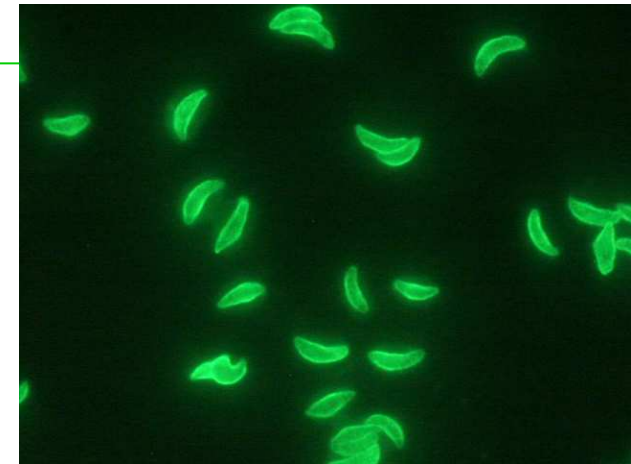
ELISA

ISAgA (Immunocattura non immunoenzimatico)

Avidità delle IgG

Immunoblotting

PCR





Toxoplasma: diagnosi molecolare su liquor

Cerebrospinal Fluid Research



Research

Open Access

Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cerebrospinal fluid from AIDS patients

Yenisey Alfonso¹, Jorge Fraga*¹, Carlos Fonseca², Narciso Jiménez², Taimy Pinillos², Alberto J Dorta-Contreras³, Raymundo Cox¹, Virginia Capó², Olga Pomier², Francisco Bandera² and Dora Ginorio¹

Results: The results obtained from 190 patients showed that this assay has a good sensitivity and specificity (83.3% and 95.7%, respectively) for the diagnosis of TE in AIDS patients.

Conclusion: PCR using the B1 gene and B22/B23 set of primers is a single, rapid and reliable method that may be valuable for discrimination between toxoplasmosis and other central nervous system (CNS) diseases.

Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis in AIDS Patients in Brazil: Importance of Molecular and Immunological Methods Using Peripheral Blood Samples

Fabio A. Colombo,¹ José E. Vidal,² Augusto C. Penalva de Oliveira,³ Adrián V. Hernandez,⁴
Francisco Bonasser-Filho,² Roberta S. Nogueira,² Roberto Focaccia,² and
Vera Lucia Pereira-Chioccola^{1*}

*Department of Parasitology, Instituto Adolfo Lutz,¹ and Departments of Infectious Disease² and Neurology,³
Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Sao Paulo, SP, Brazil, and
Erasmus Medical Center Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands⁴*


Received 9 May 2005/Returned for modification 21 June 2005

Cerebral toxoplasmosis is the most common cerebral focal infection in AIDS patients, with high morbidity and mortality in Brazil. Its occurrence is more frequent in patients with higher titers of anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies. It is directly related to the prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibodies. It is important to evaluate sensitive, less invasive, and rapid diagnostic methods using peripheral blood samples on the diagnosis of cerebral toxoplasmosis. Immunological assays can contribute to a timely diagnosis. We prospectively analyzed blood samples from 192 AIDS patients divided into two groups. The first group was composed of samples from 64 patients with cerebral toxoplasmosis diagnosed by clinical and radiological features. The second group was composed of samples from 128 patients with other opportunistic diseases. Blood collection from patients with cerebral toxoplasmosis was done before or on the third day of anti-toxoplasma therapy. PCR for *T. gondii*, indirect immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay, and an avidity test for toxoplasmosis were performed on all samples. The PCR sensitivity and specificity for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in blood were 80% and 98%, respectively. Patients with cerebral toxoplasmosis (89%) presented higher titers of anti-*T. gondii* IgG antibodies than patients with other diseases (57%) ($P < 0.001$). These findings suggest the clinical value of the use of both PCR and high titers of anti-*T. gondii* IgG antibodies for the diagnosis of cerebral toxoplasmosis. This strategy may prevent more invasive approaches.

PCR su sangue in
associazione ad alti
titoli di IgG sieriche



Programma

- 
- Agenti eziologici
 - Parassitosi del SNC
 - **Micosi del SNC**
 - **Epidemiologia**
 - **Percorso Diagnostico**

Introduzione

70.000-1.500.000 specie
fungine esistenti

Circa 300 sono associate
a infezioni nell'uomo

Circa 50 sono
possibili
patogeni del
SNC



ELSEVIER



www.elsevierhealth.com/journals/jinf

Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital[☆]

T. Lehrnbecher^{a,*}, C. Frank^a, K. Engels^b, S. Kriener^b, A.H. Groll^c,
D. Schwabe^a

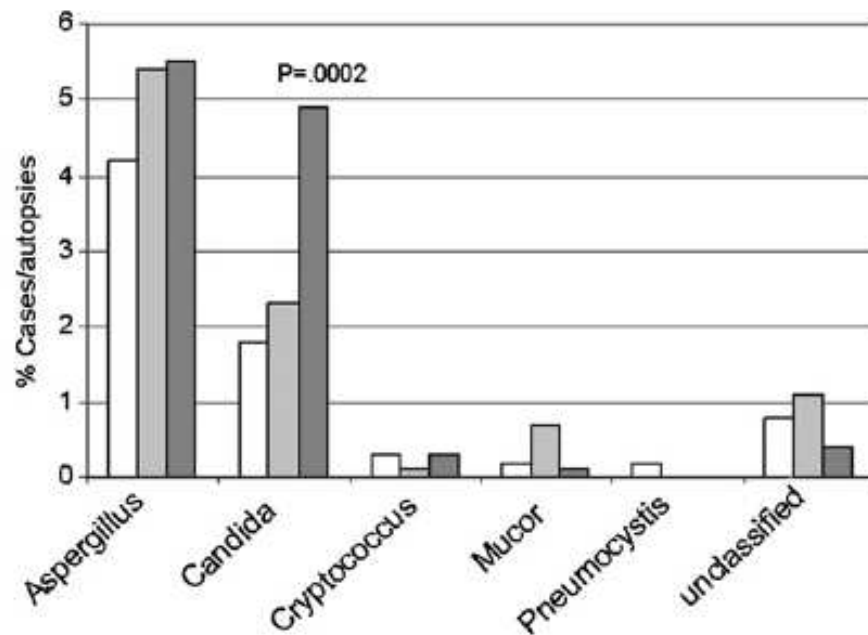


Figure 3 Prevalence of fungal pathogens over time (white column: 1993–1996, light grey column: 1997–2000, dark grey column: 2001–2005).

Nonostante progressi
terapeutici e diagnostici!!!

Perché tanto interesse?

- Incrementata incidenza di Micosi invasive negli ultimi decenni

Incremento Popolazione

1. Chemioterapia
2. Trapianti e Graft
3. Progressi in tecnologie mediche hanno aumentato la sopravvivenza anche dei pazienti più gravi che accedono alla Terapia Intensiva
4. Diabete
5. Paziente anziano
6. TRAUMI CRANICI

Aumento popolazione
fortemente suscettibile alle
infezioni fungine
"opportuniste"



Patogenesi

- Spesso porta d'entrata del micete è il polmone e secondariamente giunge al SNC;
- Trasferimento diretto dell'agente patogeno dal sangue al liquor attraverso plessi corioidei;
- Passaggio del micete dalla regione rinofaringea agli spazi subaracnoidei attraverso lamina cribrosa;
- Trasferimento del micete per contiguità (fratture craniche o focolai otomastoidei);
- Penetrazione diretta a seguito di manovre invasive non eseguite correttamente;

Owergrowth ← Modified microbiota



Mucosal colonization



Oro-pharyngeal
Upper + lower digestive tract
Genital tract
Urinary tract

Micro-invasion ←



Multiple antibiotics
Vascular accesses
Parenteral nutrition
ICU stay > 7 days
Candida colonization
Renal failure
Major abdominal surgery

Diabetes
Burn
Neutropenia
Antibiotics
Prematurity



← Candidemia

Endophthalmitis
Endocarditis
Catheter-related
Abscess
CNS
Hepato-splenic



Candidemia → Disseminated disease

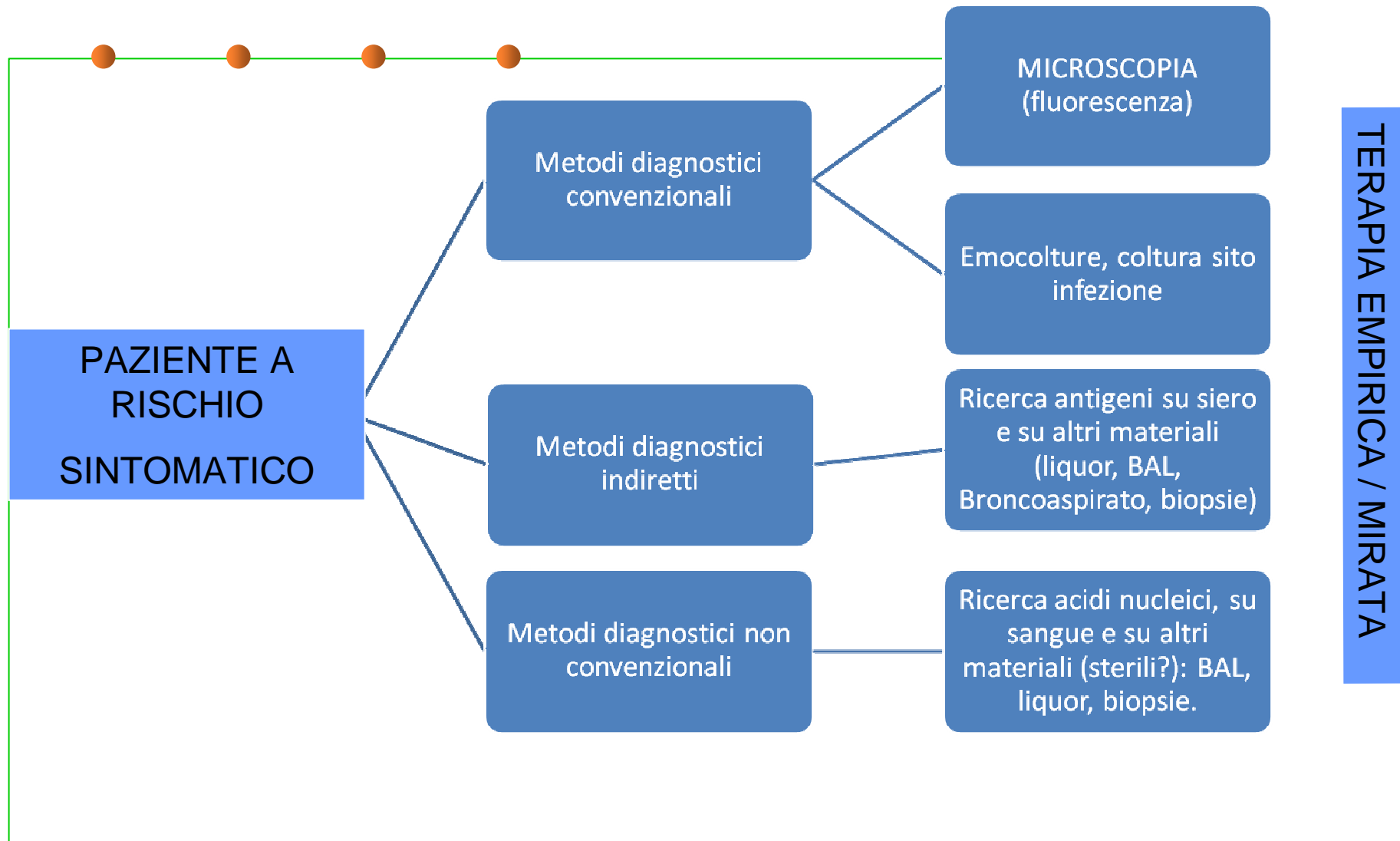
Figure 1 Pathophysiology of invasive candidiasis.

Evidenze:

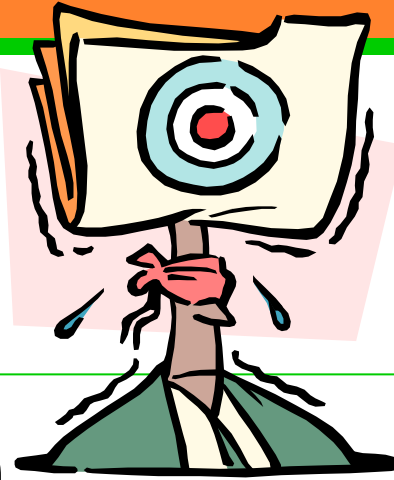


- Diagnosi precoce
- Terapia Precoce, entro i primi 10 gg.
Riduce significativamente mortalità
 - Aspergillosi (von Eiff M., Respiration 1995)
 - Candidemia (Garey KW, Clin Infect Dis 2006)
 - Zygomicosi (Chamilos G., Clin Infect Dis 2008)

Flow chart diagnostica: sintomatico



Goal?



Diagnosi provata

Identificazione di genere/specie

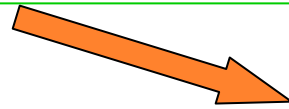
Sensibilità in vitro

Candida species
Aspergillus species
Fusarium
Zygomyceti
altri

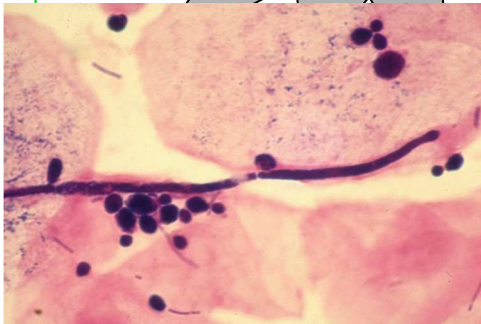
Il "gold standard" per la diagnosi di Micosi invasiva è la coltura positiva da emocoltura o da tessuto, o l'evidenza microscopica di ife in siti sterili



Fattori di rischio
manifestazioni cliniche
Evidenze radiologiche



Diagnostica di laboratorio:



**DIRETTA
convenzionale**

**DIRETTA non
convenzionale**

INDIRETTA



Microscopia
Coltura

Antigeni
Comp. Parete
cellulare
PCR,
molecolare

Anticorpi

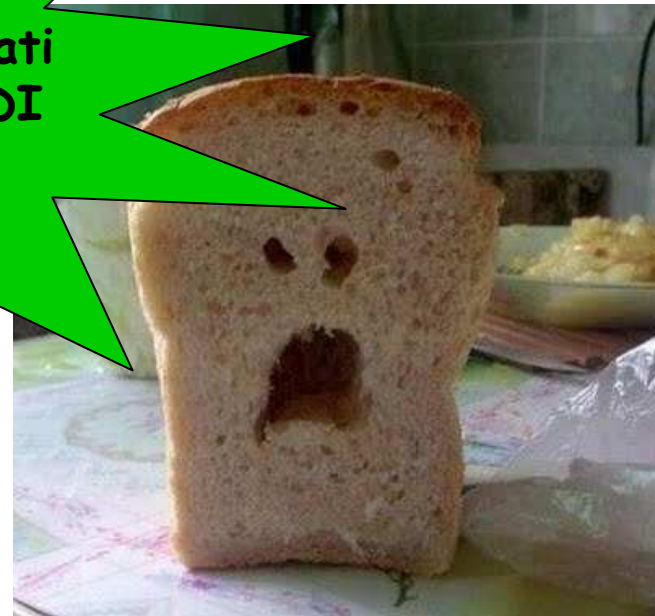
Campioni:

Biopsia, sangue,
CVC, liquor, BAL,
tamponi,....

Biopsia, sangue, liquor,
BAL, tamponi,....

- **Metodi colturali convenzionali/
microscop**

**Noti ma spesso non ben applicati
NECESSARI PER DIAGNOSI DI
CERTEZZA**





Fungal infections as
death: An autopsy

Solo il 23 % dei casi di
micosi invasiva hanno avuto
un colturale, antemortem,
positivo

**Megha S Uppin, S. V. N. Anuradha,
Shantveer G Uppin, Tara Roshni Paul,
Aruna K Prayaga, C Sundaram**

Department of Pathology, Nizam's Institute of
Medical Sciences,

24-48 h

coltura

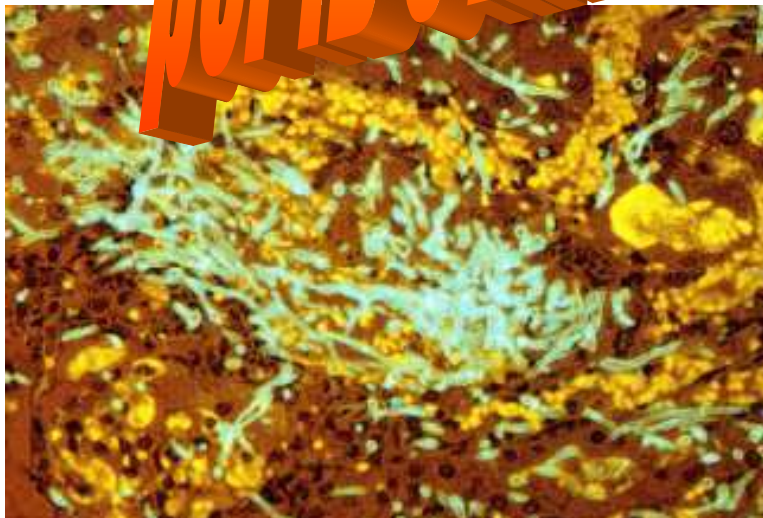
Il lavoro del lab



Li

Per ID e Antimicogramma: 2-4 gg.

Identificazione di
specie





Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry Assay of Blood Culture Broths for Rapid Identification of *Candida* Species Causing Bloodstream Infections: an Observational Study in Two Tertiary Medical Centers

Teresa Sparano,
Giulia Canu,
Instituto de Microbiologia e Imunologia

MALDI-TOF: nuova prospettiva nelle identificazioni

Da materiale clinico: SI da EMOCOLTURA

ALTRO: in fase di studio

Vol. 47, No. 9

of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Clinical Isolates

Maier,² T. Wenzel,²

M. Kostrzewa,² G. Bierbaum,¹ A. Hoerauf,¹ and H.-G. Sahl^{1*}

Institute of Medical Microbiology, Immunology and Parasitology, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, University of Bonn, Bonn, Germany¹; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany²; and Federal Institute for Drugs and Medical Devices (BfArM), Bonn, Germany³

Mass spectrometry: Pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour

Scand J Infect Dis September 2010, Vol. 42, No. 9, Pages 716-718

[Gitte Nyvang Hartmeyer¹](#), [Anne Kvistholm Jensen¹](#), [Sidsel Böcher¹](#), [Mette Damkjaer Bartels¹](#), [Michael Pedersen¹](#), [Marianne Engell Clausen¹](#), [Rawaa Abdul-Redha¹](#), [Rimtas Dargis¹](#), [Per Schouenborg²](#), [Niels Højlyng³](#), [Michael Kemp¹](#) & [Jens Jørgen E. Christensen¹](#)

Quale è allora il nostro armamentario..?

Fattori di rischio

Sintomatologia

Formula liquorale

Rete di
collaborazione
Disponibilità di
test rapidi



Epidemiologia- TOP 10

Table II. Common fungi and spectra of CNS infections caused by them.

| Genus | Incidence | Predilection for CNS | Setting | Clinicopathological manifestations of CNS disease | | |
|---------------------|------------|----------------------|---|---|---------|---------|
| | | | | Meningitis | Abscess | Infarct |
| <i>Candida</i> | Common | + | Neurosurgery Neutropenia Systemic candidiasis IV drug use | +++ | ++ | + |
| <i>Aspergillus</i> | Occasional | ++ ← | Neutropenia Invasive sinusitis HIV infection IV drug abuse | + | +++ | ++++ |
| <i>Zygomycetes*</i> | Occasional | ++ ← | <div style="background-color: orange; padding: 5px; display: inline-block;"> Mucorales e Scedosporium </div> | | + | ++++ |
| <i>Histoplasma</i> | Occasional | + | | | | + |
| <i>Blastomyces</i> | Occasional | + | Normal host | + | + | - |
| <i>Cryptococcus</i> | Common | ++++ ← | HIV infection Steroid use Normal host† | ++++ | + | + |
| <i>Coccidioides</i> | Common | +++ | Normal host HIV infection | ++++ | + | + |

Key: +++++, very common; +/-, very rare.

*Among the zygomycetes, *Rhizopus* is the most common cause of invasive disease, but other genera include *Mucor* sp. and *Cunninghamella* sp.

†More common for *C. neoformans* var. *gatti* than *C. neoformans* var. *neoformans*.



Cryptococcus neoformans

Criptococcosi

EZIOLOGIA

C. neoformans lievito capsulato rotondeggiante, 4-6 μm di diametro, che cresce a 25°C e 37°C su Sab. La capsula polisaccaridica conferisce alla colonia aspetto mucoso.





Nei tessuti il lievito sviluppa una capsula più larga (25 μm).



Criptococcosi

Patogenesi:

- Le spore sono inalate dall'ambiente. Primo focolaio al polmone con estensione ai linfonodi ilari.
- La maggior parte delle infezioni si autolimitano con guarigione della lesione primaria. Occasionalmente l'infezione non si risolve e diventa disseminata raggiungendo per via ematogena le meningi, il cervello e le altre localizzazioni secondarie.
- La risposta infiammatoria al criptococco è variabile e dipende dallo stato immunitario (cellulo-mediata) del paziente.

Criptococcosi

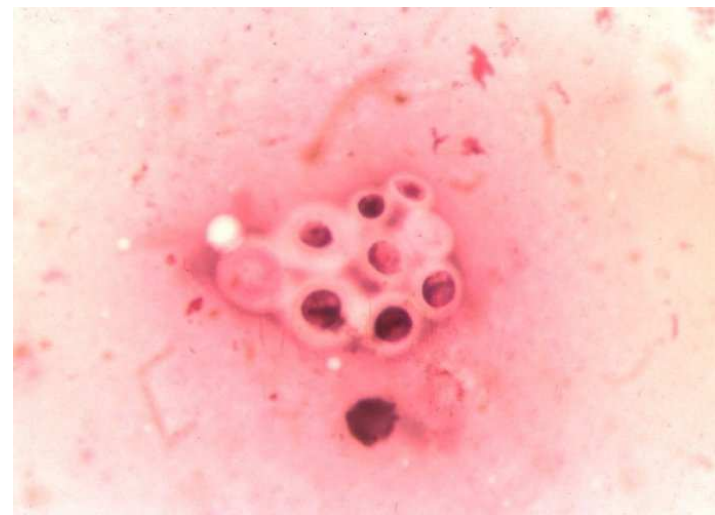
Manifestazioni cliniche

- **Criptococcosi primaria:** polmonare, apparentemente asintomatica o così sfumata che non richiede intervento medico tanto da non essere diagnosticata che raramente. Localizzazione cutanea primaria rara.
- **Meningite:** è la forma più frequente, caratterizzata da insorgenza lenta e sintomatologia aspecifica.
- Mal di testa, disturbi della vista, confusione mentale. Poi rigidità nucale, convulsioni, papilledema. Localizzazioni secondarie: cute, ossa, reni e milza. E' uno dei criteri diagnostici di AIDS.

Criptococcosi

Diagnosi

- Microscopia diretta su liquor (inchiostro di china, KOH 20%, gram): capsula mucopolisaccaridica.



Criptococcosi

Diagnosi

- Colturale su Sabouraud destrósio agar: a 37°C.
- No pseudoife.
- No clamidospore.
- Germ tube neg.
- Test biochimici di assimilazione e fermentazione.
- Test dell'ureasi (positivo).
- Produzione dell'enzima fenolossidasi positivo (Bird Seed Agar (caffaic acid agar) consente lo sviluppo di colonie di colore dal bruno al nero in base all'attività fenolo-ossidasi del micete).



Ricerca Ag

Rilevazione dell'antigene capsulare
polisaccaridico
GLUCURONOXILOMANNANO

Nei fluidi biologici:

-liquor

-BAL

-siero

-urine

Test rapido: 30 min

Sensibilità: 99%

Specificità: 98%





Diagnosi di *Aspergillo*si invasive





ECIL (European Conference on Infections in Leukemia) raccomandazioni per l'uso di biomarker nella diagnosi di infezioni fungine in pazienti ematologici (2011)

- Galattomannano (GM) per aspergillosi invasiva (IA) **(AII)**
- β -glucano (BG) per candidosi invasiva IC e per IA **(BII)**
- Cryptococcus Ag per cryptococcosi sia siero che CSF **(AII)**
- mannani (Mn) Ag/anti-mannani (A-Mn) Ab per candidemia **(CII)**
- mannani (Mn) Ag/anti-mannani (A-Mn) Ab per candidosi epato-splenica **(BIII)**
- PCR Non raccomandata. Manca standardizzazione e validazione clinica

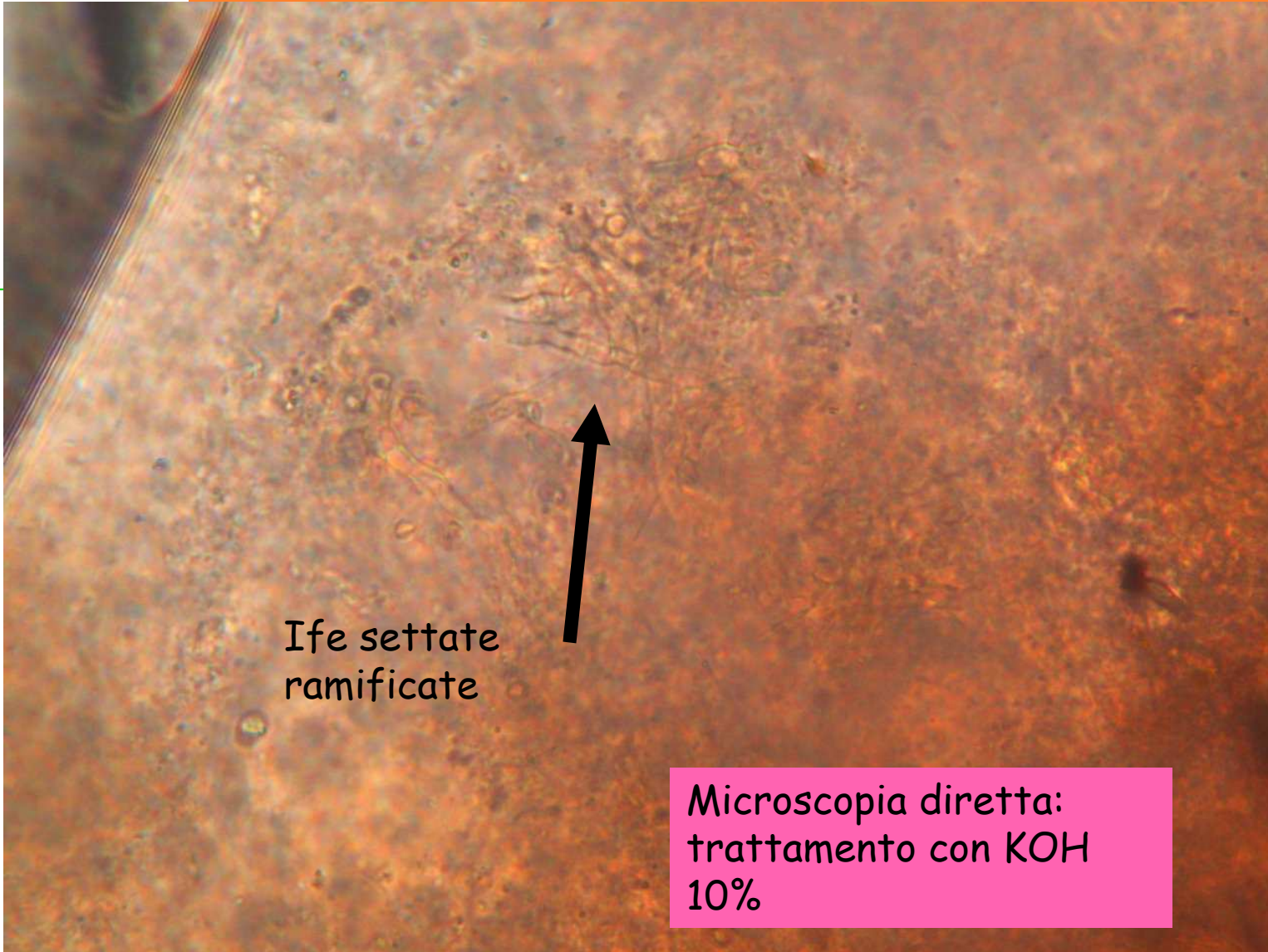


Microscopia e coltura

- Crescita del microrganismo da liquor:
- Necessità di almeno 10 ml di liquor
- Semina e microscopia da sedimento
-
- sensibilità molto bassa
- Positività:~20%

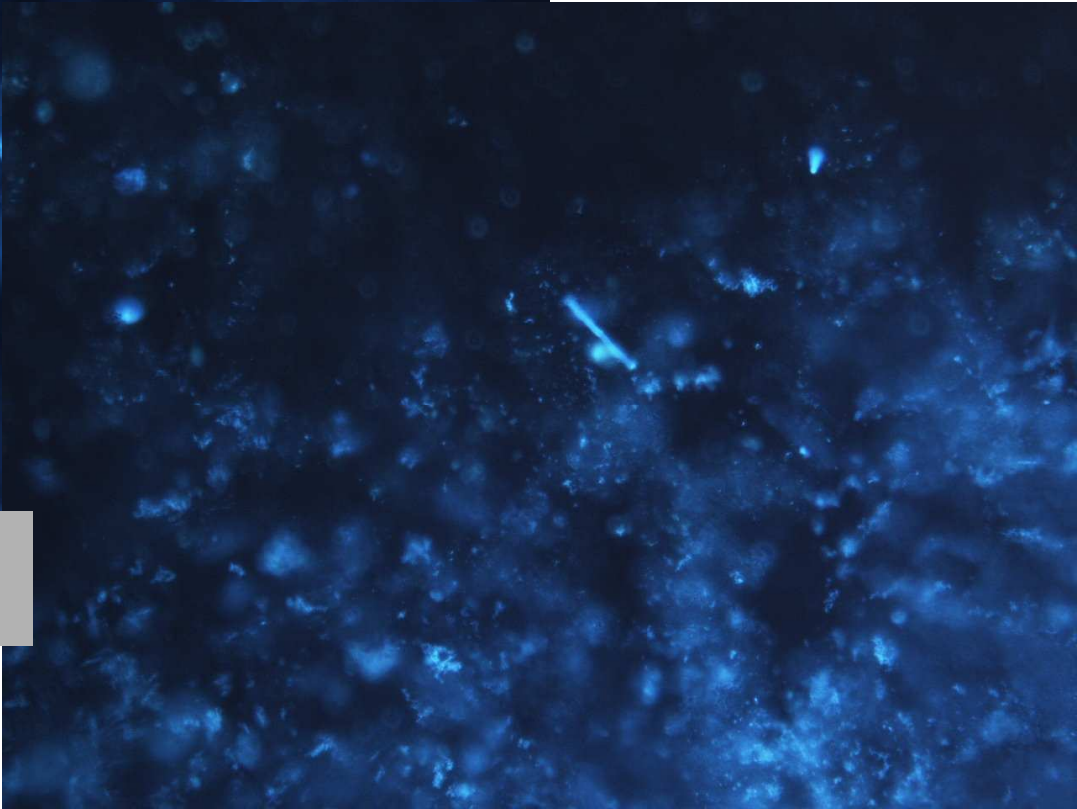
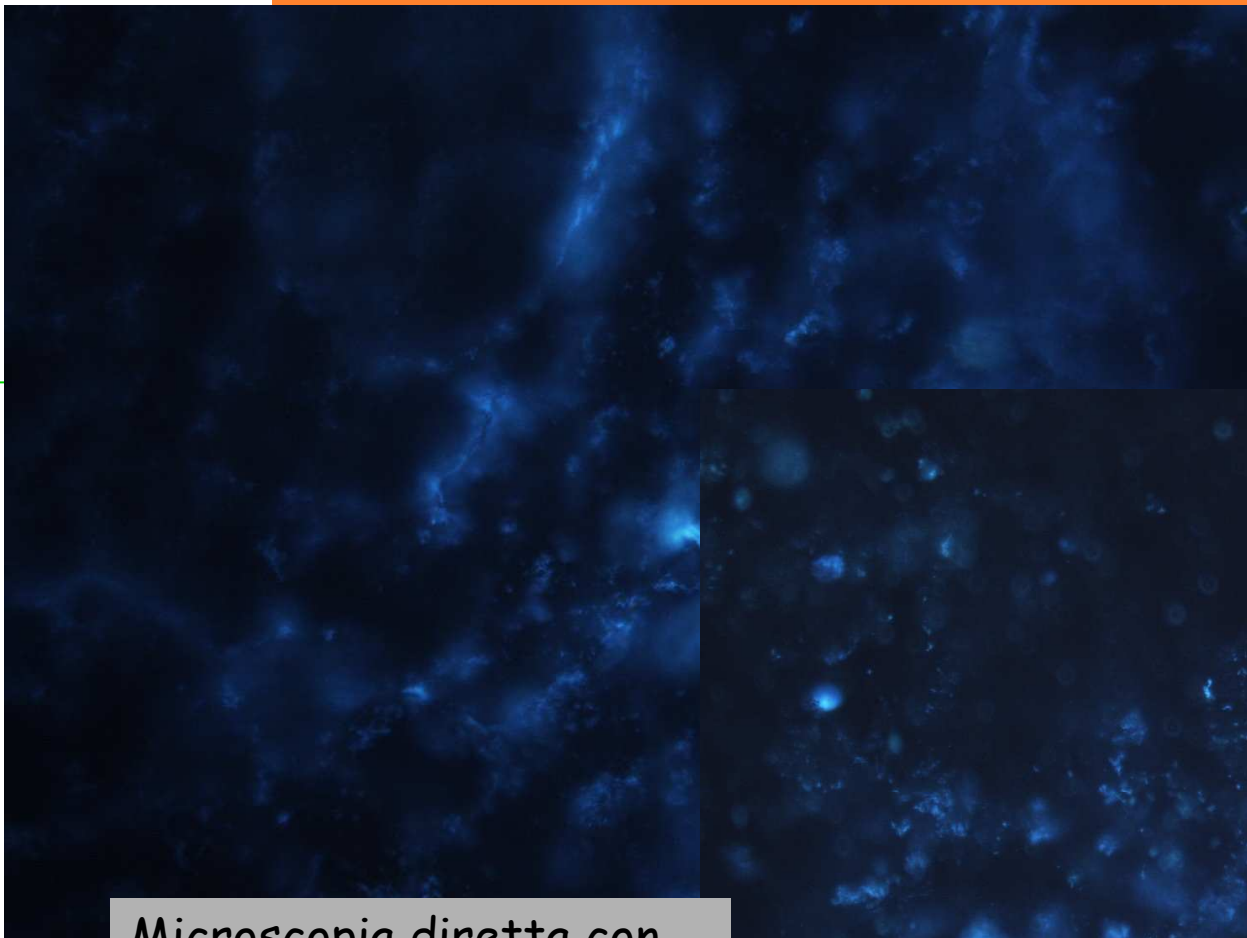
- Evidenza di Ife: (IFI PROVATA secondo EORTC)
- Tempo: da 1/2 h a 21gg.

• (Kontoyannis et al, Clin Inf Dis. 2000; Hope WW., Lanc Infect Dis 2005)

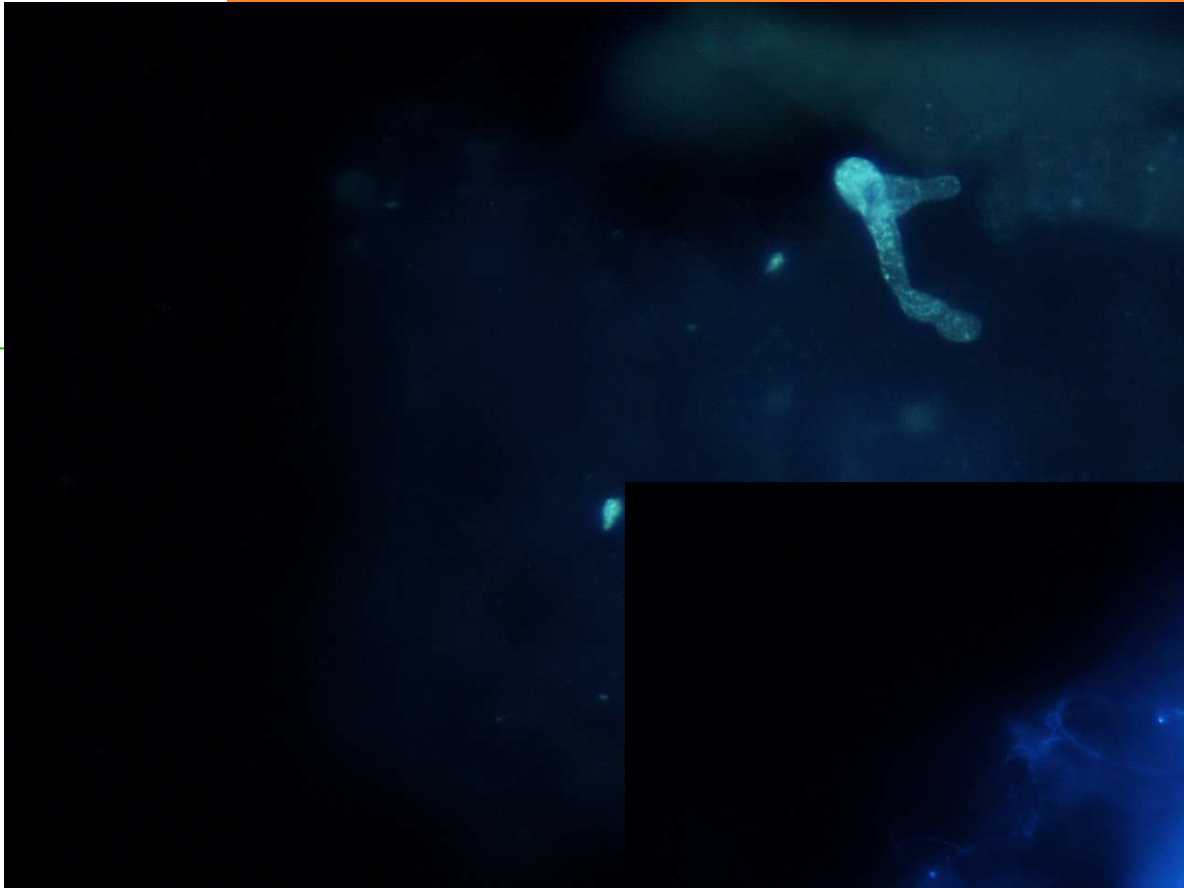


Ife settate
ramificate

Microscopia diretta:
trattamento con KOH
10%



Microscopia diretta con
Calcofluor- White



**Capillari!!!
Immagini
ingannevoli!!!**



Identificazione rapida di *A. fumigatus*

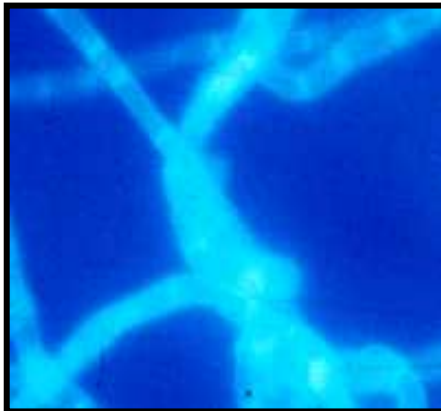
±1 hr



24-48 hrs
a 35-37° C

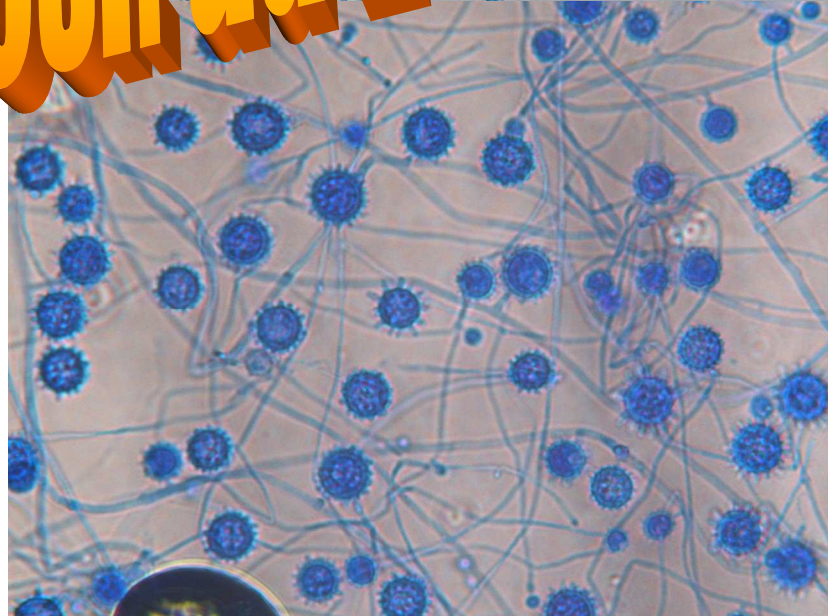


3-7 giorni





per ID filamentosi: da 2-28 gg.





Galattomannano 0 Antigene aspergillare

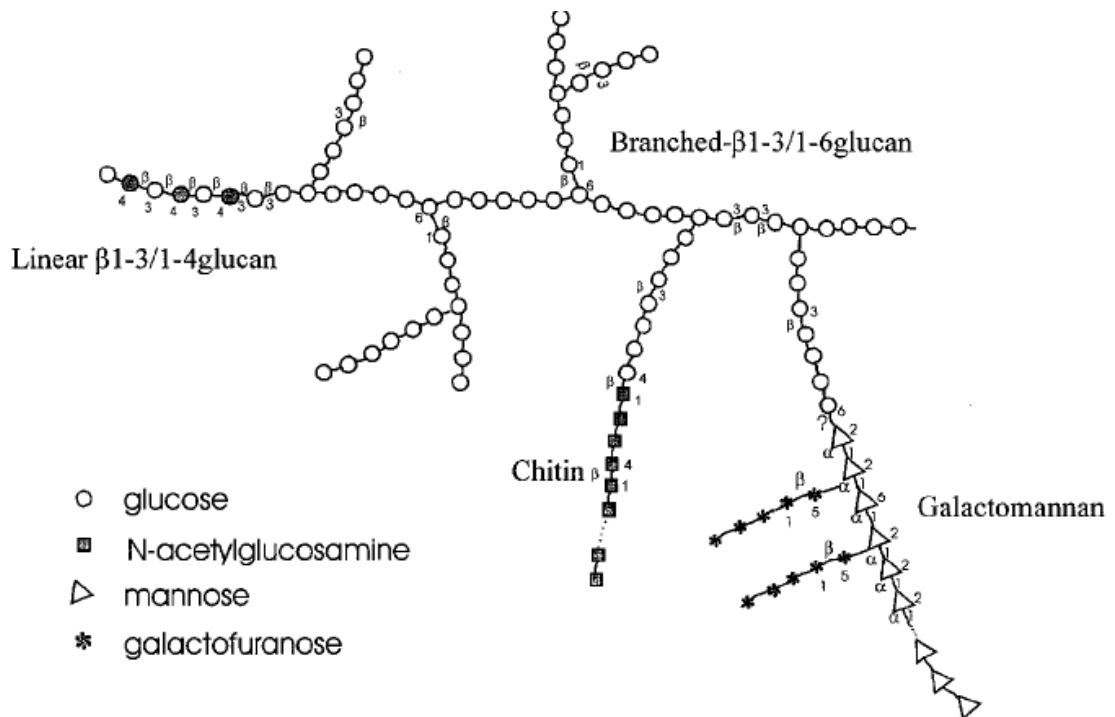


Platelia Aspergillus (Biorad) is a 1-stage immunoenzymatic sandwich microplate kit, for the detection of antigen galactomannan.



Ricerca galattomannano

FIG. 14. Tentative representation of the polysaccharide organization in the structural alkali-insoluble core of the *A. fumigatus* cell wall.





Migliore performance:

- Popolazione ad alto rischio:
 - Neutropenia prolungata
 - Immunosoppressori per GVHD dopo HSCT
- Monitoraggio 2-3 vv/w
- Cut-off: ≥ 0.5 su due campioni consecutivi, > 0.8 su singolo prelievo

SENSIBILITA': 59%

89% se non farmaci antifungini

Problematiche nella rivelazione del GM

- La sensibilità del saggio si riduce in corso di trattamento antifungino

- Risultati a

- Possibilità di

- Anticorpi

- reattivi

- Trasfusi

- antigeni cross-

- Nutrizioni enterali con

- Colonizzazione intestinale con *Bifidobacterium*

- Altre infezioni

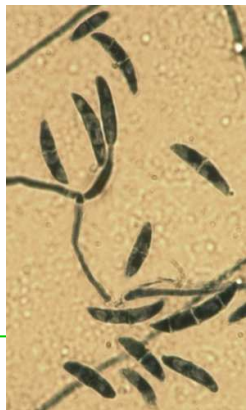
- Fusariosi (submitted), Istoplasmosi³

galactomannano Positive in Siero/BAL/CSF
Accettato come criterio micologico

¹ Marr *et al.*, CID 2005

² Machetti and Viscoli, AAC 2005

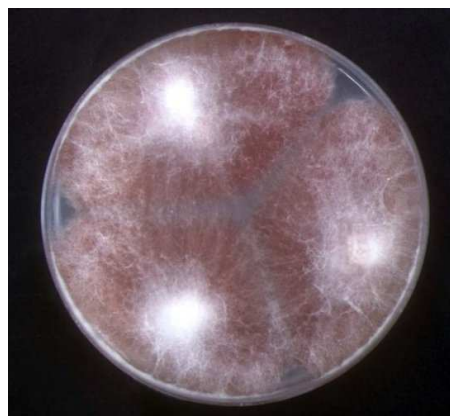
³ Wheat *et al.*, ICAAC 2006



Cross-reactivity of *Fusarium* spp in the *Aspergillus* galactomannan enzyme linked immunosorbent assay

Anna Maria Tortorano, Maria Carmela Esposto, Anna Prigitano, Anna Grancini, Cristina Ossi,
Caterina Cavanna, Giuliana Lo Cascio

J. Clin. Microbiol. **JCM.05946-11**; published ahead of print 28 December 2011,



Aspergillus Galactomannan Antigen in the Cerebrospinal Fluid of Bone Marrow Transplant Recipients with Probable Cerebral Aspergillosis

Claudio Viscoli,^{1,2*} Marco Machetti,¹ Paola Gazzola,^{1,3} Andrea De Maria,⁴ Dimitri Paola,⁵
Maria Teresa Van Lint,⁶ Francesca Gualandi,⁶ Mauro Truini,⁷ and Andrea Bacigalupo⁶

Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro,¹ Dipartimento di Oncologia, Biologia e Genetica,² Dipartimento di Scienze Neurologiche e della Visione,³ Dipartimento di Medicina Interna,⁴ Dipartimento di Medicina Sperimentale,⁵ and Dipartimento Diagnostico di Laboratorio, di Anatomia Patologica e Medico Legale,⁷ Università di Genova, and Ospedale San Martino,⁶ Genoa, Italy

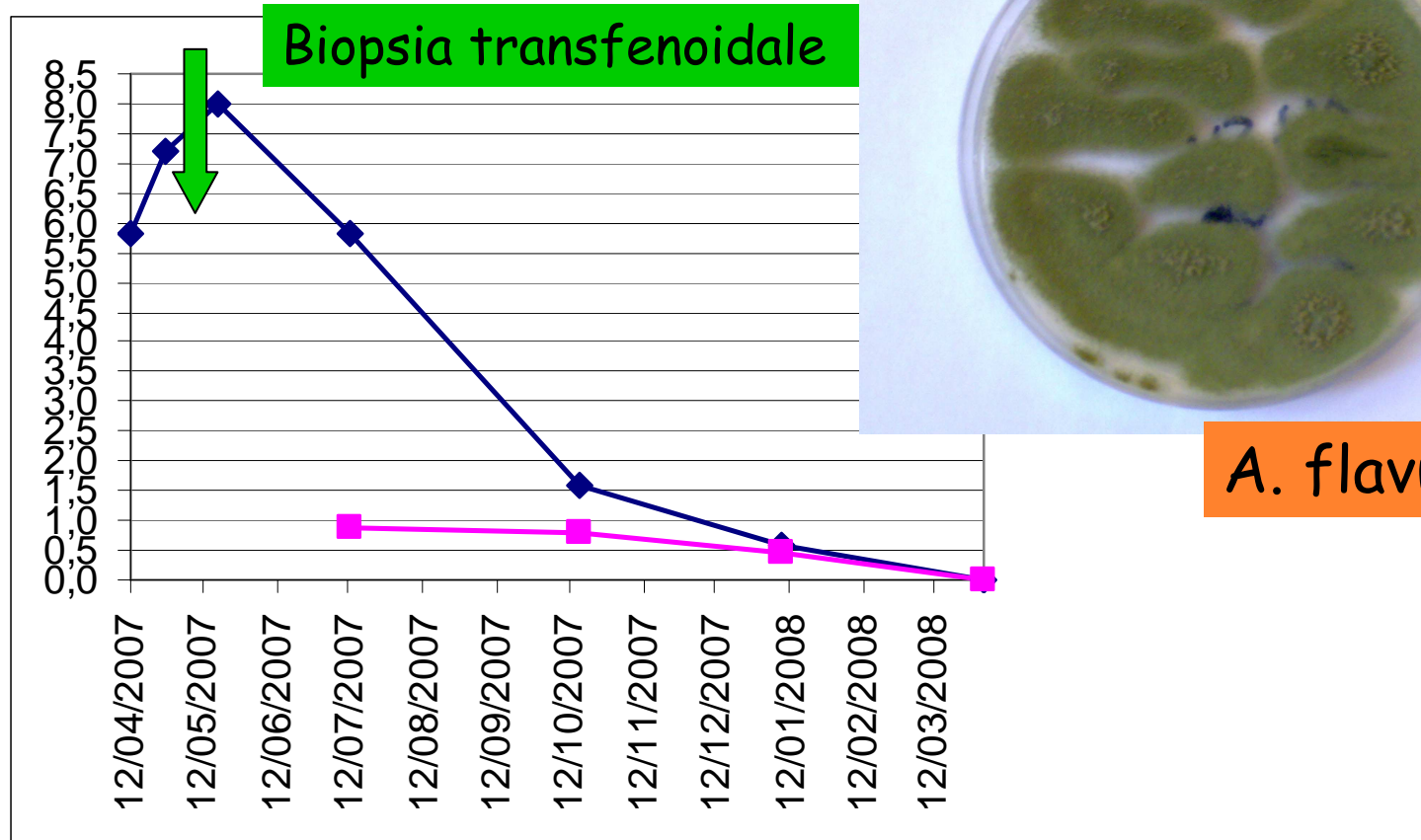
Received 10 May 2001/Returned for modification 26 September 2001/Accepted 23 November 2001

The *Aspergillus* galactomannan test was performed on cerebrospinal fluid and serum samples from 5 patients with probable cerebral aspergillosis and from 16 control patients. Cerebrospinal fluid galactomannan levels were significantly higher in aspergillosis patients, and most galactomannan was produced intrathecally. Comparison of serum galactomannan values in pulmonary and cerebral aspergillosis patients showed significant overlapping. Detection of *Aspergillus* galactomannan in cerebrospinal fluid may be diagnostic of cerebral aspergillosis.

Casi di Aspergillosi: Mediana GM index 10

Casi controllo: mediana GM index 0.28

Pachimeningite in diabetico, pouffer di tabacco



A. flavus



Aspergillus PCR formidable challenges and progress

Medical Mycology 2009, Vol. 47, No. s1 , Pages S241-S247 (doi:10.1080/13693780802616823)

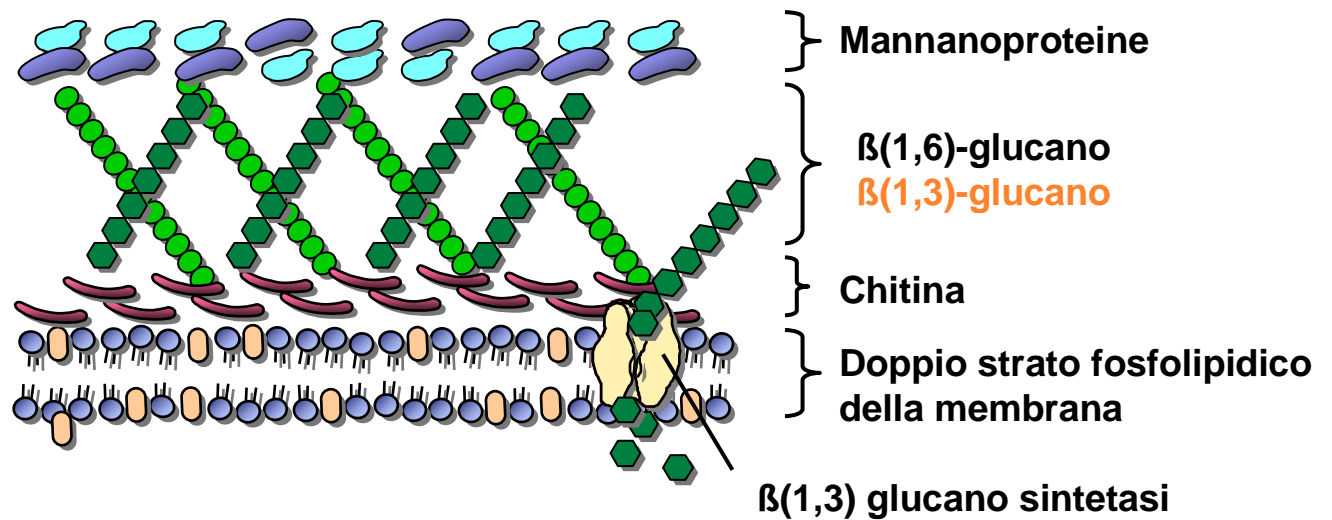
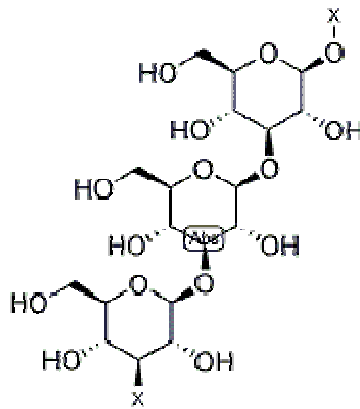
[Lena Klingspor^{1†} and Juergen Loeffler²](#)[Karolinska Institute, Department of Laboratory Medicine, Division of Clinical Microbiology, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden](#)

[2Medical Hospital II, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany](#)

Working Group 'EAPCRI' (European Aspergillus PCR Initiative)

(1-3) β - D- glucano

- Polimeri (1-3)- β -D-di glucosio, parte esterna della parete cellulare dei principali miceti patogeni (eccetto *Cryptococco* e *zygomiceti*).



Si basa sull'abilità della emolinfa del
Limulus di aggregare
D-glucani.

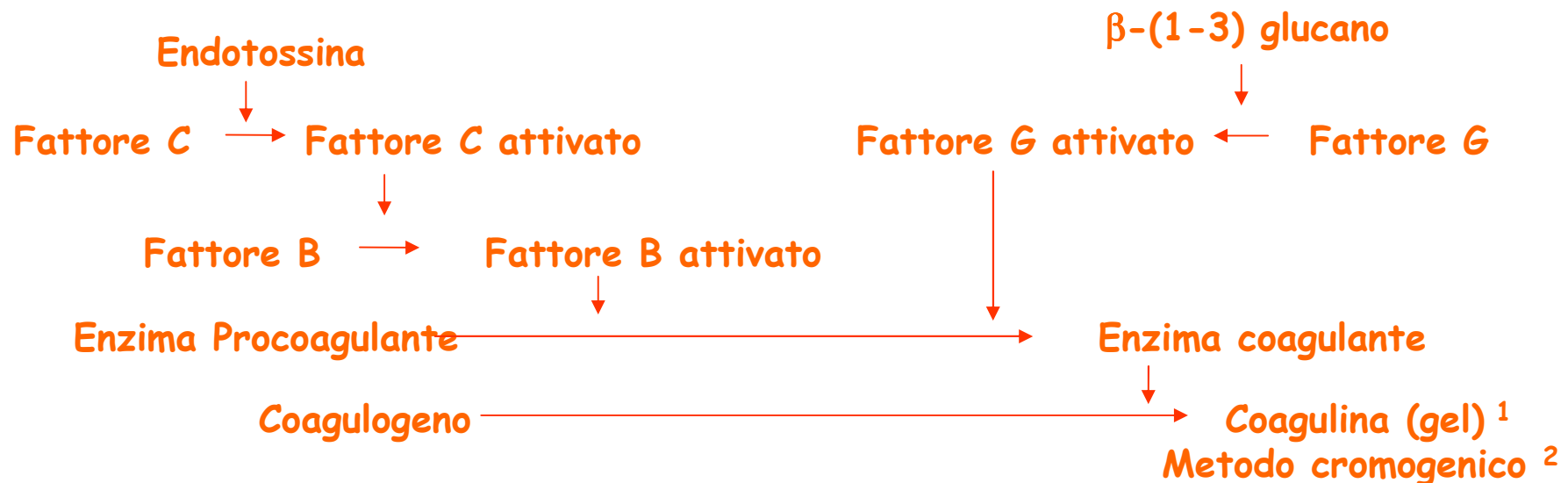


Schema del test per la rivelazione del β -(1-3)-glucano

- Attiva il lisato degli amebociti di *Limulus*
- Il fattore G innesca la cascata coagulativa. Il risultato è

misurato tramite:

- Torbidità dopo precipitazione in gel: WB003 (Wako Pure Chem. Indust.)¹
- Substrato cromogenico: Fungitec G test (Seikagaku) e Fungitell, (Assoc. Cape Cod)²



pbinternational

"Fungitell®"

UN NUOVO MODO PER NON PERDERE TEMPO NELLE INFEZIONI FUNGINE



Glucan Detection Reagent Kit

TELL™

For Use Only

- GlucateLL(R), a Horseshoe Crab blood-based reagent, measures (1,3)-beta-D-glucan present in patient serum. (1,3)-beta-D-glucan is a fungal wall compound that is shed into the blood during the course of fungal infections. GlucateLL(R) detects beta-glucan in the serum of patients.



Miceti evidenziati

- Tutte le specie di *Candida* e *Aspergillus*
- *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Trichosporon* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Scedosporium apiospermum* and *prolificans*.
- *Histoplasma capsulatum*
- *Pneumocystis jiroveci*

- No *Cryptococcus neoformans*
- No *Zygomycetes*



BG cut off diagnostico
Dati validi per siero

Non ci sono ancora evidenze

ELIANGITELI cutoff:
sull'uso con altri materiali

- 80 pg/ml POSITIVO
- < 60 pg/ml NEGATIVO,
- Valori fra 60 and 79 pg/ml
INDETERMINATO

Cerebrospinal Fluid and Plasma (1→3)- β -D-Glucan as Surrogate Markers for Detection and Monitoring of Therapeutic Response in Experimental Hematogenous *Candida* Meningoencephalitis[∇]

Ruta Petraitiene,^{1,2} Vidmantas Petraitis,^{1,2} William W. Hope,¹ Diana Mickiene,^{1,2} Amy M. Kelaher,¹ Heidi A. Murray,¹ Christine Mya-San,¹ Johanna E. Hughes,¹ Margaret P. Cotton,¹ John Bacher,³ and Thomas J. Walsh^{1*}

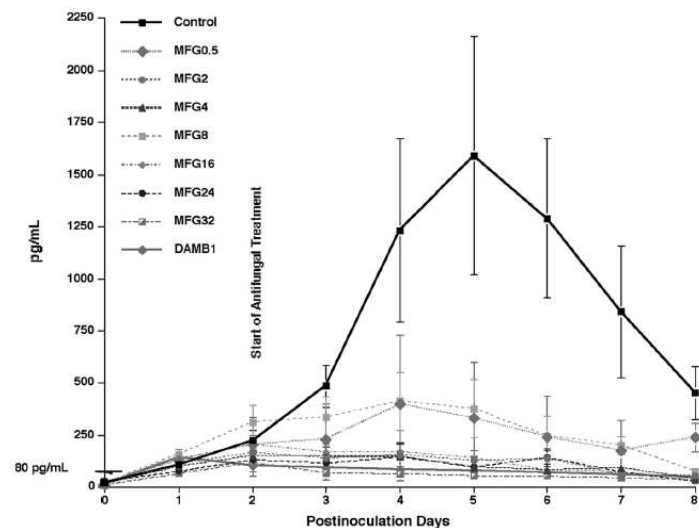
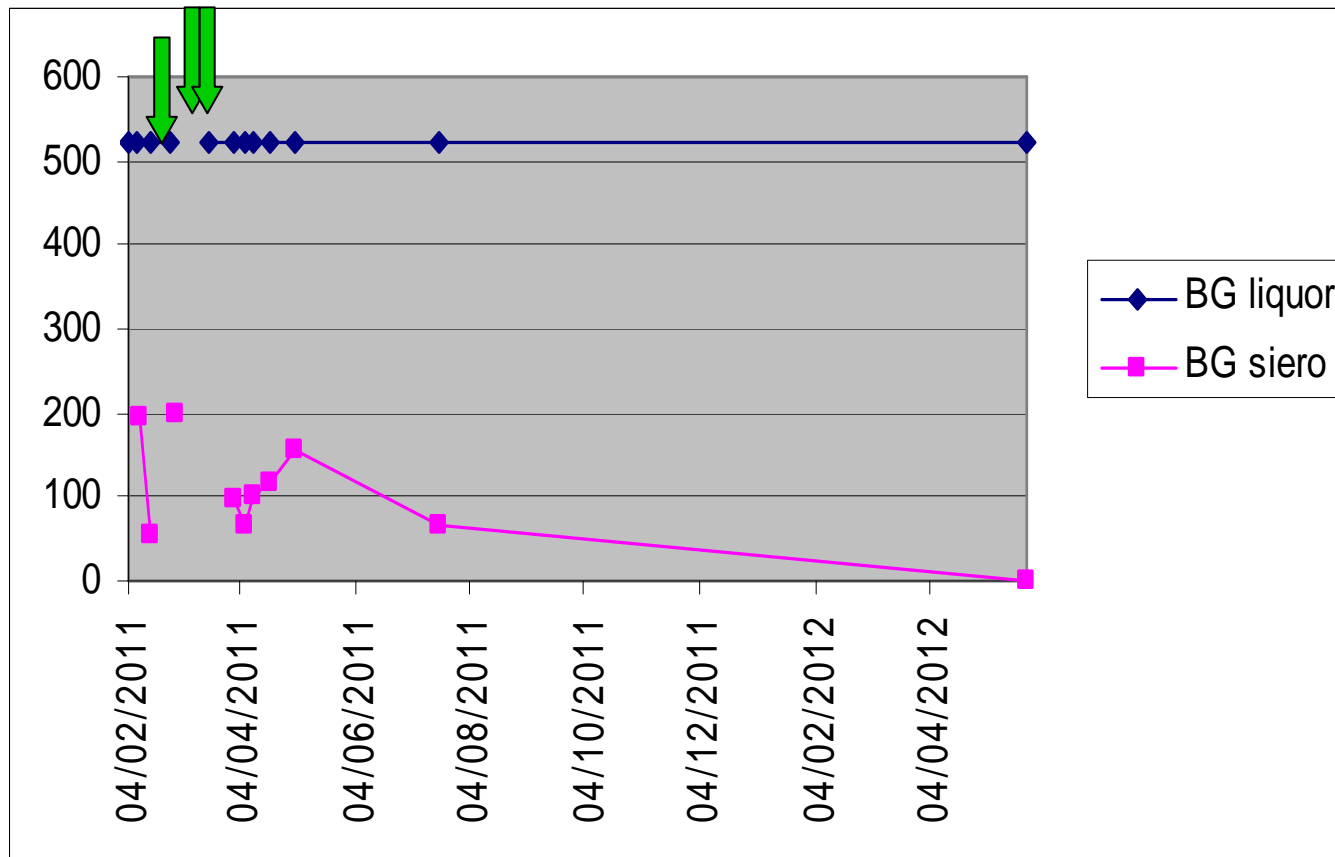


FIG. 6. Expression of β -glucan concentrations in HCME nonneutropenic rabbit plasma in the treatments with micafungin (MFG) and amphotericin B (DAMB); dosages (in milligrams/kilogram) are indicated after each drug abbreviation.

BG liquor: correla
con quantità di
Candida ottenuta
dai tessuti. Non
valido siero.

Meningoencefalite da *C. albicans*, bimba pakistana di 18 mesi





Possibili Falsi positivi BG

- Emodialisi: uso di membrane di cellulosa
- Albumina
- Immunoglobuline Intravenose
- Uso di filtri di cellulosa per somm. Intravenose
- Garze sulla superficie sierosa (chirurgia addominale)
- Intravenosa amoxicillina-clavulanico



Considerazioni sul test Beta-glucano

- BG sono diffusi in natura. Tutti i materiali utilizzati devono essere “glucan free”.
- La procedura del test richiede grande attenzione a possibili (e impossibili!!!) contaminazioni, necessaria esperienza di lettura e interpretazione dei risultati.
- La procedura è completamente manuale, eccetto che la lettura e interpretazione dei risultati; necessità di personale dedicato!!!



ESCMID diagnostic and management guideline for Candida diseases 2011

- ● ● ●
- **Candidosi invasiva:**

- coltura dei tessuti/biopsie: raccomandato (immunoistochimica)
- Mannani/Ab Antimannani : non raccomandati; pochi dati
- Beta-glucano: raccomandato; prelievi seriali almeno 2/w; alto NPV; non specifico x candida;



- Identificazione del DNA fungino nel sangue ed in altri fluidi biologici

An evaluation of the analytical and preliminary clinical performance of Myconostica MycAssay™ Aspergillus when testing serum specimens for the diagnosis of Invasive Aspergillosis.

436 Table 2. Ability of PCR assays in detecting DNA extracted from different

ett , Gillian

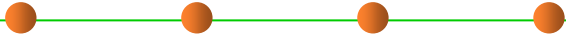
437 *Aspergillus* species.

447 Table 3. *Aspergillus* serum PCR performance when testing clinical specimens

| Species (Input per reaction) | Strain identity | MycAssay™ Aspergillus | "In-house" PCR | | |
|------------------------------|-------------------------------|---------------------------|-----------------|-----------------------------------|--|
| | | MycAssay™ Aspergillus PCR | | "In-house" <i>Aspergillus</i> PCR | |
| | | PCR positivity defined by | | PCR positivity defined by | |
| Parameter | Single positive | Mu | | | |
| <i>A. fumigatus</i> (2) | | | | | |
| <i>A. fumigatus</i> (5) | | | | | |
| <i>A. flavus</i> (5000) | | | | | |
| <i>A. terreus</i> (500) | | | | | |
| <i>A. niger</i> (5000 c) | Sensitivity 70.0% (39.7-89.2) | 60 | | | |
| <i>A. nidulans</i> (50) | Specificity 90.5% (71.1-97.4) | 100% (84.5-100) | 100% (84.5-100) | 100% (84.5-100) | |
| <i>A. versicolor</i> (5) | LR +tve 7.37 | ∞ (>60) | ∞ (>80) | ∞ (>50) | |
| <i>A. sclerotiorum</i> | LR -tve 0.33 | 0.4 (0.4) | 0.2 (0.2) | 0.5 (0.51) | |
| <i>A. glaucus</i> (500) | DOR 22.2 | ∞ (>150) | ∞ (>400) | ∞ (>98.0) | |

10 casi di PROVATA

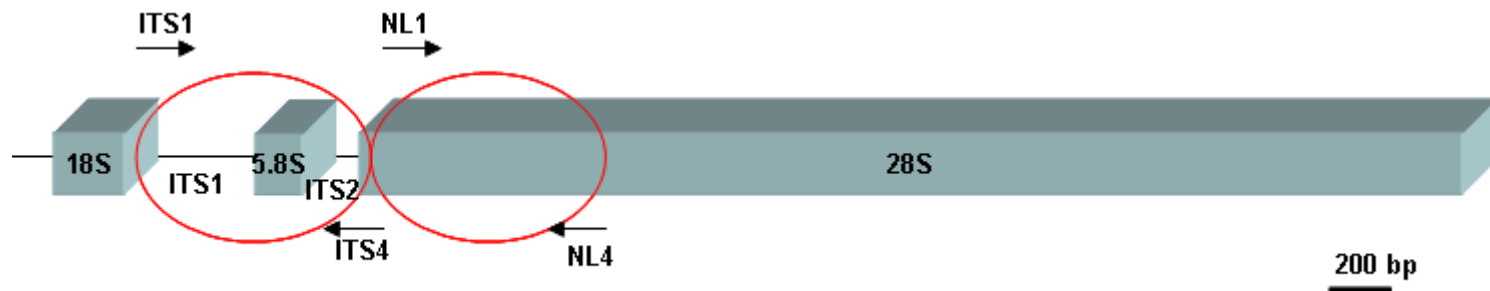
Su siero viene evidenziato DNA libero



• PCR non ancora considerata nei criteri micologici diagnostici

PCR essenziale per sequenziamento

Map of fungal rRNA from the 3' end of the 18S rRNA gene to the 3' end of the 28S rRNA gene. PCR primers for sequencing and PCR assay development



Sintesi conclusiva!!!



Percorso diagnostico infezioni SNC

LIQUOR



EMOCOLTURA DA VENA PERIFERICA E CVC (se presente)

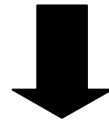
URINOCOLTURA

liquor coltura + Ag solubili
liquor coltura Ricerca DNA/RNA HSV CMV EBV
liquor coltura miceti
Ag Asp e b-glu liquor
Ag Asp e b-glu Sangue
Ag Cryptococcus su liquor e sangue
liquor coltura BK

BIOPSIA MENINGEA/PUS ASCESSI CEREBRALI

Percorso diagnostico sepsi

SANGUE



EMOCOLTURA DA VENA PERIFERICA E CVC (se presente)

URINOCOLTURA

COLTURA DI MATERIALE A SECONDA DEL FOCOLAIO DI PARTENZA:

- BIOPSIA CUTE INFETTA
- TAMPONE CUTANEO
- TAMPONE FERITA CHIRURGICA
- VIE RESPIRATORIE (ESCREATO, BASP, BAL)
- ADDOME (RACCOLTE, DRENAGGI, FISTOLE)
- LIQUOR

**Livello
diagnostico base**

Sorveglianza/diagnostica
colturale

Identificazione di specie-
terreni cromogeni- AST
solo da siti sterili

**I Livello
diagnostico**

Sospetta Candida

Beta-glucano +
Mannani/Antimannani

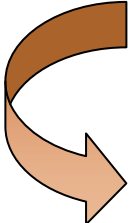
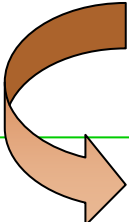
Sospetta Micosi da
filamentosi

Beta-glucano +
Galattomannano (siero-
BAL)

**II Livello
diagnostico**

PCR Aspergillo (siero –
BAL)
PCR universale:
sequenziamento

Identificazione di specie-
MICETI FILAMENTOSI-
AST solo da siti sterili su
filamentosi





Fungal snowman

Grazie per
l'attenzione



ERROR: undefined
OFFENDING COMMAND: Lo

STACK:

```
(6)  
/Title  
( )  
/Subject  
(D:20121116110651+01'00')  
/ModDate  
( )  
/Keywords  
(PDFCreator Version 0.9.5)  
/Creator  
(D:20121116110651+01'00')  
/CreationDate  
(5317841)  
/Author  
-mark-
```