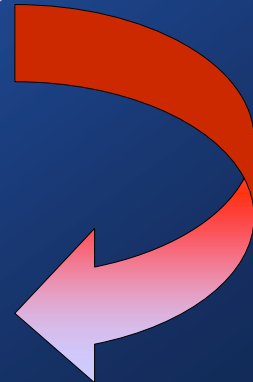
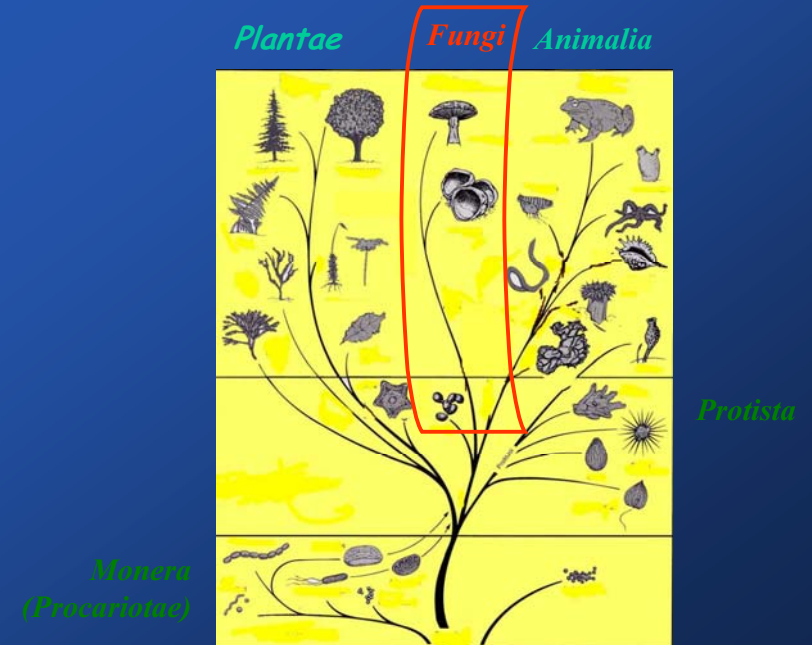


MICOLOGIA MEDICA



CLASSIFICAZIONE



	PROCARIOTI	EUCARIOTI
Organismi	Batteri e cianobatteri	Protisti, Funghi, Piante e Animali
Dimensioni cellulari	Generalmente da 1 a 10 μm di dimensioni lineari	Generalmente da 5 a 100 μm di dimensioni lineari
metabolismo	Anaerobio o aerobio	aerobio
organanuli	nessuno	Nucleo, mitocondri, cloroplasti, reticolo endoplasmatico, ecc..
DNA	DNA circolare nel citoplasma	Molecole di DNA lineare contenenti regioni non codificanti nel nucleo
Divisione cellulare	Scissione binaria	mitosi
Organizzazione cellulare	unicellulare	Unicellulari o pluricellulari
Parete Cellulare	Presente Peptidoglicano nei Batteri	Assente Chitina nei Miceti Cellulosa nei vegetali

CARATTERISTICHE PRINCIPALI DEI FUNGHI

- ❖ Organismi eucarioti
- ❖ Unicellulari (lieviti) o pluricellulari (funghi miceliali)
- ❖ Immobili (solo le zoospore e di alcuni gameti presentano flagelli)
- ❖ Aerobi obbligati o facoltativi
- ❖ Eterotrofi: il ricco corredo enzimatico permette ai funghi di scomporre i substrati più vari (lignina, chitina, cellulosa, cheratina...) di assorbire molecole organiche e inorganiche
- ❖ Tollerano alte pressioni osmotiche, ampie variazioni di pH (da pH 2 a pH 8; pH ottimale 5,6) e di temperatura (da -5°C a $+60^{\circ}\text{C}$)



I miceti sono presenti costantemente nel terreno. Inizialmente parassiti dei vegetali si sono adattati, nel corso dell'evoluzione a condizioni di parassitismo negli animali e nell'uomo.

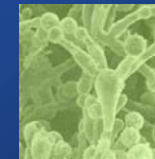


Suddivisione all'interno del Regno

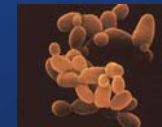
- **Funghi eduli**



- **Muffe**



- **Lieviti**



UTILITA' DEI FUNGHI

I miceti costituiscono un regno a se, anche se appartengono al regno dei vegetali. Hanno un ruolo ecologico importantissimo.

TABELLA 33-2
Prodotti industriali ottenuti attraverso l'attività dei funghi

Organismi	Prodotti
Vitamine	
<i>Eremothecium ashbyi</i>	Riboflavina
<i>Cibi e bevande</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Vino, birra, sake, lievito di birra
<i>Penicillium spp.</i>	Formaggi vari
<i>Saccharomyces rouxii</i>	Salsa di soia
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	Birra Lager
Acidi organici e solventi	
<i>Aspergillus niger</i>	Acido citrico e acido gluconico
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanolo dal glucosio
Proteine	
<i>Saccharomyces lipolytica</i>	Proteine microbiche dagli alcani del petrolio
<i>Candida utilis</i>	Proteine microbiche dai rifiuti di polpa di carta
Farmaceutici	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilline
<i>Cephalosporium acremonium</i>	Cefalosporine
<i>Rhizopus nigricans</i>	Trasformazione degli steroidi

EFFETTI DANNOSI DEI FUNGHI

- parassiti di colture agrarie
- dannosi per derrate alimentari
- agenti di malattie (micosi)

Le **MICOSI** diventano sempre più frequenti, non tanto per le mutazioni degli agenti patogeni, in questo caso dei miceti, ma per le condizioni dell'ospite (uomo) che mutano, in alcuni casi favorendo la replicazione degli agenti patogeni.



INFATTI.....

Oggi l'uomo è più suscettibile al rischio delle micosi, sia per l'aumento dell'età media sia per le terapie antibiotiche che spesso causano stati dismicrobici.



Nuovi approcci terapeutici, nuove tecniche diagnostiche, chirurgiche e strumentali, se da un lato hanno permesso di migliorare e risolvere patologie e quadri morbosi, dall'altro hanno favorito lo sviluppo ed il diffondersi delle micosi, un tempo limitate solo a soggetti esposti (anziani, prematuri, addetti al lavoro).

Con un così alto grado di diffusione delle micosi, si dovrebbe, quindi, sviluppare parallelamente una corretta conoscenza delle problematiche cliniche, diagnostiche, terapeutiche che possa permettere un adeguato approccio verso questa patologia

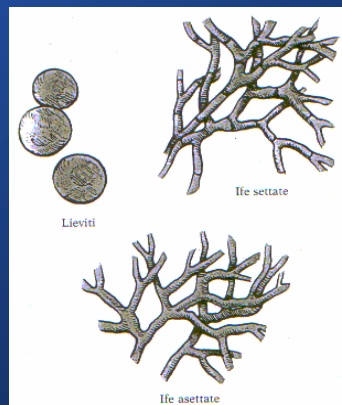
MORFOLOGIA DELLA CELLULA FUNGINA

I miceti si dividono in tre grandi gruppi:

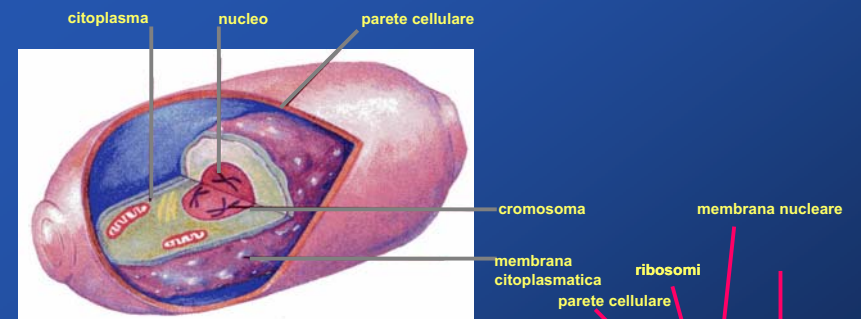
LIEVITI

MUFFE

DIMORFI

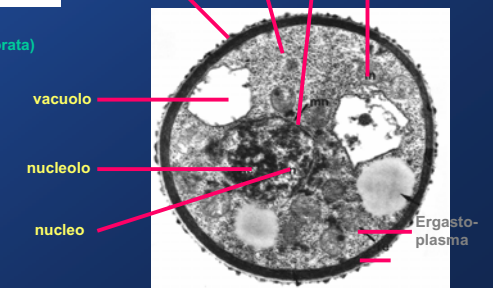


Struttura del lievito



da: L.M. Prescott, J.P. Harley, D.A. Klein, 1996 (rielaborata)

Funghi lievitiformi: la cellula fungina ha un aspetto sferoidale o ovoidale (Dimensioni medie: 2-10mm)

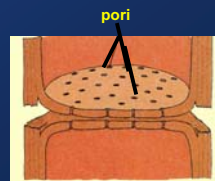


Struttura dell'ifa



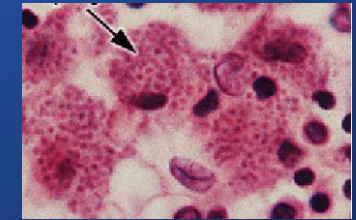
Funghi miceliali: la cellula fungina ha un aspetto cilindrico; si accresce apicalmente (ad un solo apice) e si ramifica formando una struttura filamentosa detta ifa (diametro medio: 3-15 μ m); l'insieme delle ife prende il nome di micelio o tallo

invaginazioni della membrana citoplasmatica



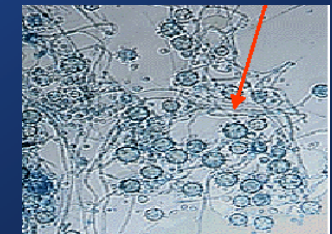
Dimorfismo fungino

Histoplasma capsulatum: lievito nei tessuti



Alcuni funghi possono presentare sia la forma miceliale sia la forma lievito (es. *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*)

Histoplasma capsulatum: forma miceliale in coltura



Caratteristiche della cellula fungina

- Assenza del peptidoglicano:** consente ai miceti di resistere all'azione di inibitori della parete cellulare batterica quali le penicilline e le cefalosporine.
- Parete cellulare:** costituita dal 75% di polisaccaridi e dal 25% di proteine e lipidi.
- Cromosomi:** in numero variabile in relazione alla specie, aploidia, diploidia, aneuploidia. Es *Candida tropicalis*: diploide, 6 paia cromosomi; *C. albicans* diploide, *C. glabrata* aploide
- Membrana citoplasmatica:** lipoproteica, spessore 8 nm. Particolarità: oltre ai fosfolipidi presenta steroli (ricca in ergosterolo)
- Nucleo:** circondato da una doppia membrana con pori. La membrana esterna è spesso associata a reticolo endoplasmatico
- Vacuoli:** delimitati da una propria membrana (tonoplasto); possono contenere pigmenti e inclusioni di materiali nutritivi quali il glicogeno Reticolo endoplasmatico, apparato del Golgi (una singola cisterna),
- I funghi differiscono anche dai batteri per il fatto che non possiedono strutture associate con la locomozione.
- Nella cellula fungina non ci sono cloroplasti

Parete della cellula fungina

Struttura costante, assenza di peptidoglicano, prevalentemente polisaccaridica (circa 75% peso secco)

Polisaccaridi di parete:

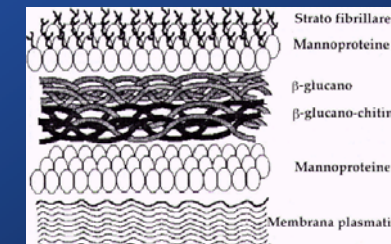
Chitina: polimero N-acetil-glucosio-amina con legami $\beta(1-4)$

Chitosano (presente negli zigomiceti): polimero glucosio-amina con legami $\beta(1-4)$

Glucani: polimeri glucosio con legami $\beta(1-6)$ e $\beta(1-3)$

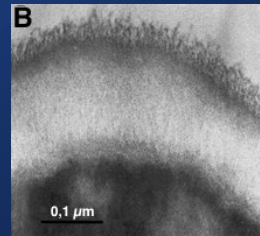
Mannani: polimeri del mannosio con legami $\alpha(1-6)$, $\alpha(1-2)$ e $\alpha(1-3)$

Altri costituenti: proteine ricche di residui cisteinici, melanina (in alcuni funghi)



Componenti	(%)	Funzioni	Antigenicità
Glucano*	40-60	Rigidità e integrità cellulare	scarsa
Mannano**	20-23	Adesività	forte
Chitina***	1-2,7	Morfogenicità	
Proteine	3-6	Immunogenica, enzimatica	forte
Lipidi	2		

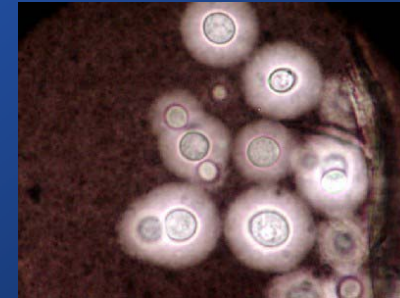
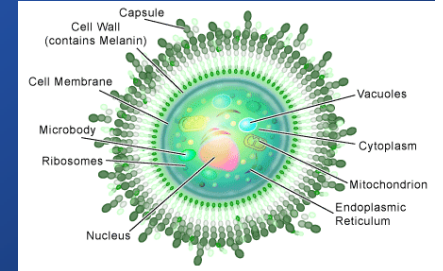
il cell-wall del lievito è indispensabile affinché il micete eserciti con successo la sua virulenza, in quanto stabilisce il contatto tra micete e ospite



Capsula

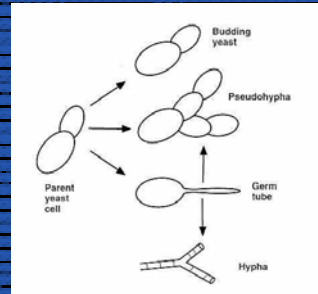
struttura non costante, polisaccaridica; presente in alcuni lieviti patogeni

Es. *Cryptococcus neoformans* costituita da galatto-xilomannano e glicuron-xilomannano



LIEVITI

Forme unicellulari tondeggianti che si riproducono per gemmazione

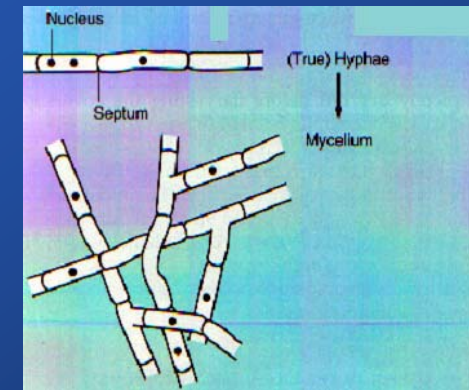


Le gemme neoformate possono estroflettersi e formare un **tubulo germinativo (pseudoife)**

Le gemme neoformate possono rimanere unite e dare origine a **formazioni filamentose simili a pseudoife**

MUFFE

Forme filamentose unicellulari o pluricellulari



TALLO (o micelio)

ACCRESIMENTO FUNGINO

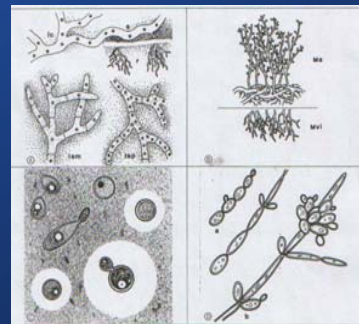
Lieviti: accrescimento limitato

Funghi miceliali: accrescimento continuo all'apice dell'ifa dove si accumulano vescicole contenenti materiale parietale e enzimi

Micelio vegetativo: Micelio aereo (apogeo)
Micelio immerso nel terreno (ipogeo)

Micelio riproduttivo: nei miceti d'interesse medico fa parte del micelio aereo ed è deputato alla riproduzione

Aggregazioni miceliali: i miceti non formano dei veri e propri tessuti ma soltanto intrecci più o meno serrati di ife es: sclerozio, ascocarpo, carpoforo



MECCANISMI DI RIPRODUZIONE

Riproduzione asexuata: porta alla formazione di spore in seguito a **divisione mitotica**

Riproduzione sessuata: porta alla formazione di spore in seguito a **divisioni meiotiche**

Anamorfi: miceti che presentano riproduzione asexuata

Teleomorfi: Miceti che presentano riproduzione sessuata

Oloomorfi: Miceti che le presentano entrambe

La gran parte dei funghi d'interesse medico presenta soltanto la **riproduzione asexuata** (Deuteromiceti o funghi imperfetti: **Anamorfi**)

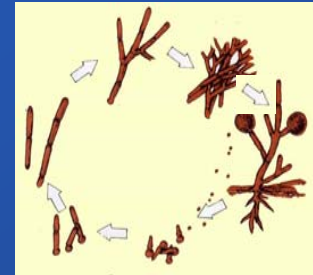
RIPRODUZIONE

➤ **ALESSUATA** sporulazione (muffe) **Funghi imperfetti**
 gemmazione (lieviti) **(Deuteromycetes)**

➤ **SESSUATA** oospore **Funghi perfetti**
 zigospore
 ascospore
 basidiospore

➤ **PARASESSUATA**

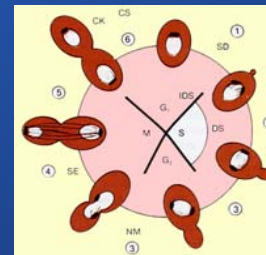
RIPRODUZIONE ASESSUATA



Le spore che originano da divisioni mitotiche prendono il nome di:

Sporangiospore: quando si formano all'interno di una struttura chiusa in seguito a mitosi nucleare e clivaggio citoplasmatico

Conidi: quando sono prodotte da ife specializzate



da: R.F. Boyd, 1987

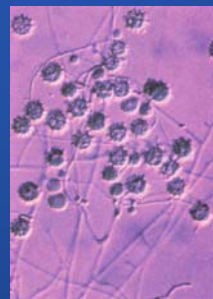
Gemmazione nei lieviti

Formazione di una cellula figlia da una cellula madre il cui nucleo si divide per mitosi mentre contemporaneamente si ha estroflessione della membrana citoplasmatica e lisi della parete cellulare

SPORANGIOSPORE

Spore alessuate fungine che si originano all'interno delle ife

Clamidospore



Clamidospore tubercolate di *Histoplasma capsulatum*

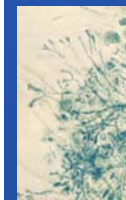
Artrospore



Artrospore di *Coccidioides immitis*

MACRO E MICROCONIDI

Spore alessuate che si originano da ife specializzate



Microconidi
Trichophyton schoenleinii



Microconidi clavati e piriformi e macroconidi sottili e allungati
Trichophyton rubrum



Macroconidi grossi e fusiformi, settati (4-6), ad estremità arrotondate e pareti sottili
Microsporum gypseum



Macroconidi e microconidi
Trichophyton verrucosum

Macroconidi grossi e fusiformi, settati (6-12), ad estremità appuntite e pareti spesse
Microsporum canis



Macroconidi brevi e claviformi, settati (2-4)
Epidermophyton floccosum

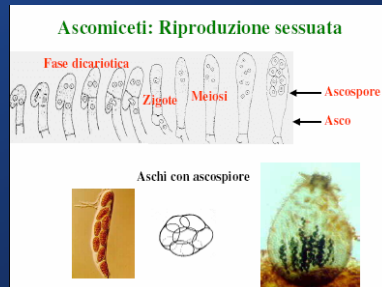
RIPRODUZIONE SESSUATA

La riproduzione sessuata comporta l'unione di due cellule aploidi compatibili seguita dalla fusione dei loro citoplasmi [plasmogamia con conseguente stadio dicariotico (= 2 nuclei)]; successivamente avviene la fusione dei due nuclei (cariogamia) con formazione dello zigote.

Lo zigote va incontro a divisioni meiotiche con formazione di nuove cellule aploidi (es oospore, zigospore, ascospore, basidiospore)

Zigomiceti: riproduzione sessuata e asessuata

Ascomiceti: Riproduzione sessuata



PATOGENESI DELLE MICOSI

ADESIONE

VARIABILITA' ANTIGENICA

INVASIONE

Nelle muffe l'invasione dei tessuti sembra facilitata dalla spinta meccanica che dipende dall'allungamento ifale. Nei lieviti la diffusione del micete sembra sia determinata dalla fagocitosi

Dal primitivo focolaio infiammatorio, che nelle forme esogene è quasi sempre polmonare e clinicamente silente, l'infezione può diffondersi ad altri organi e tessuti per via ematica o linfatica

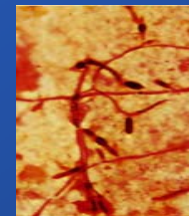
FATTORI DETERMINANTI LA PATOGENICITÀ

DIMENSIONI

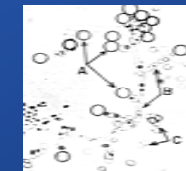
- Soprattutto le muffe possono avere dimensioni maggiori di quelle delle cellule fagocitarie, in particolare dei leucociti polimorfonucleati neutrofili (PMN), e quindi eludere per questa ragione la fagocitosi, uno dei primi meccanismi dell'immunità innata che interviene per difendere l'ospite dall'infezione
- Talvolta le dimensioni della spora non sono tali da impedire la fagocitosi ma una volta fagocitata l'energia meccanica prodotta durante la formazione dell'ifa spinge l'ifa stessa al di fuori del fagocita.
- L'accumulo delle cellule fagocitarie intorno alle ife in accrescimento non riesce a distruggerle

DIMORFISMO

Capacità reversibile dei miceti di presentarsi in forma di ifa in coltura e in aspetto di lievito allo stato parassitario, con l'eccezione di *Candida*, che manifesta un dimorfismo opposto



tessuti parassitati



coltura

La conversione morfologica si accompagna a modificazioni quantitative nella composizione del cell wall, associate ad altre modificazioni qualitative nel profilo delle mannoproteine, nella struttura degli oligosaccaridi e di conseguenza, nella espressione di antigeni specifici.

Il passaggio intermittente dalla forma di lievito a quella filamentosa determina **pleiomorfismo antigenico** invalidando la risposta immunitaria suscitata nell'ospite

DIAGNOSI DELLE INFEZIONI MICOTICHE

- ESAME CLINICO
- ESAME ISTOPATOLOGICO
- ESAME MICROBIOLOGICO

L'efficacia dell'intervento diagnostico in un paziente in cui si sospetti un'infezione micotica dipende dalla possibilità di mantenere un corretto rapporto informativo tra queste tre attività

ESAME MICROBIOLOGICO

La natura micotica di una affezione cutanea e/o mucosa, o di una infezione sistemica già sospettata in base ad elementi clinici, va sempre documentata attraverso la dimostrazione della presenza del micete

Inoltre, in caso di negatività e in presenza di lesioni fortemente sospette, l'esame microbiologico va ripetuto anche in sede diversa della lesione.

MODALITÀ DI RACCOLTA, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Tutti i campioni biologici, i materiali di Laboratorio e le colture per l'isolamento dei miceti devono essere considerati come potenzialmente infettivi e quindi maneggiati secondo le norme di sicurezza previste

Tutti i materiali biologici devono essere raccolti in contenitori sterili, inviati al Laboratorio ed inoculati su terreni culturali appropriati entro breve tempo dall'arrivo. Qualora l'esame non possa essere eseguito nei tempi richiesti, il campione deve essere conservato a 4°C fino al momento dell'inoculo, ad eccezione del sangue e del liquido cefalo-rachidiano (30-37°C) e dei campioni dermatologici (15-30°C).

Se il medico curante sospetta la presenza di una particolare patologia micotica, il Laboratorio deve esserne informato, perchè alcuni miceti richiedono terreni e condizioni di incubazione particolari

INDAGINI DI LABORATORIO

- ❖ ESAME MICROSCOPICO DIRETTO
- ❖ ESAME CULTURALE (isolamento del micete in terreno di coltura)
- ❖ IDENTIFICAZIONE DI GENERE E DI SPECIE sulla base dei caratteri macroscopici, microscopici e fisiologici del micete isolato (velocità di crescita, temperatura di crescita, morfologia e colore delle colonie)

ESAME MICROSCOPICO "A FRESCO"

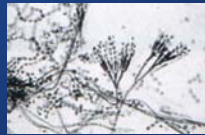
Esame microscopico a fresco con idrossido di potassio (KOH) al 10-20%.
KOH serve a chiarificare i preparati di annessi cutanei dissolvendo la cheratina. Gli elementi fungini presenti, invece, non vengono intaccati e possono essere individuati abbastanza facilmente.

Esame microscopico a fresco con soluzione di blu di lattofenolo

Campioni di materiale fluido (liquido cefalo-rachidiano, peritoneale, pleurico e articolare, urina, lavaggio bronchiale e broncoalveolare), una volta centrifugati, possono essere esaminati al microscopio, dopo aver mescolato una parte del sedimento con una parte di blu di lattofenolo. Ha un'azione chiarificante e colora di blu le strutture fungine.



Fusarium spp.



Penicillium spp.



Acremonium spp.

ESAME MICROSCOPICO DIRETTO

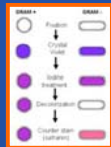
deve essere sempre effettuato, sia per una diagnosi presuntiva e sia per la scelta di terreni appropriati.

Identificazione presuntiva

- | | | |
|--|---|--------------------------------|
| Ife (3-6 μ) regolari, ramificate, con angoli di 45° e setti distinti | ⇒ | <i>Aspergillus spp</i> |
| Ife (2-3 μ) regolari, alcune ramificate con talvolta artrospore rettangolari | ⇒ | Dermatofiti |
| Ife con distinti punti di restrizione (pseudoife) e spesso forme a lievito gemmanti | ⇒ | <i>Candida spp</i> |
| Cellule lievitiformenti, sferiche, irregolari (5-20 μ), alcune capsulate con una o più gemme attaccate mediante restrizione | ⇒ | <i>Criptococcus neoformans</i> |
| Filamenti corti e settati, spore arrotondate (1-2 μ), isolate o a grappolo. | ⇒ | <i>Malassezia furfur</i> |

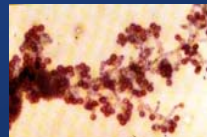
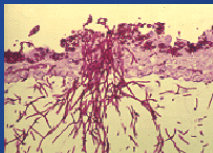
ESAME MICROSCOPICO DOPO COLORAZIONE

Colorazione di GRAM



Colorazione al PAS

Comunemente utilizzate nei Laboratori di Istologia, consentono di evidenziare la presenza di elementi fungini nelle sezioni di tessuto.



ESAME COLTURALE

Isolamento ed identificazione del micete

- Agar Sabouraud
- Agar Sabouraud Gentamicina Cloramfenicolo
- Agar Sabouraud Cloramfenicolo Actidione
- Agar Sabouraud Cloramfenicolo Cicloesimide
- Agar all'infuso cuore e cervello
- Agar all'infuso cuore e cervello + antibiotici
- Agar Sabouraud + antibiotici e rosso fenolo
- Albicans ID 2



Il terreno di coltura più utilizzato è l'Agar Sabouraud addizionato di antibiotici per evitare l'inquinamento batterico.

L'identificazione si basa sulla fermentazione di vari zuccheri



INDAGINI SIEROLOGICHE NELLE MICOSI

RICERCA di ANTICORPI

	ID	Aggl. dir.	Aggl. pass.	FC	IF ind.	Ra. Imm.	Imm. enz.
CANDIDOSI	++	+	++ (1:8)		+		+
CRIPTOCOCCOSI		+			+	+	
ASPERGILLOSI	++			+			
BLASTOMICOSI	++			+			
COCCIDIOIDOMICOSI	++		+	++ (1:16)			
ISTOPLASMOSI	++		+	++ (1:16)			
PARACOCCIDIOIDOMICOSI	++			+			
SPOROTRICOSI		++ (1:4)	++ (1:8)				