



unito.it

UNIVERSITÀ DI TORINO

Dipartimento di Scienze Veterinarie - DSV

Tecniche di identificazione di microorganismi di origine animale (funghi)

Andrea Peano – DVM PhD
andrea.peano@unito.it



1

Sommario

- Note introduttive (funghi: caratteristiche generali, tassonomia e nomenclatura)
- Tecniche di identificazione (ID)
- Applicazioni su funghi di particolare interesse veterinario (esempi)
 - ✓ Dermatofiti
 - ✓ Lieviti (Malassezia)
 - ✓ Muffe opportuniste

2

Premessa: «one-health»

- Molte patologie ad eziologia fungina coinvolgono uomo e animali
- Animali raramente fonte diretta di infezione per l'uomo (zoonosi), in molti casi «reservoirs» importanti nel ciclo di vita dei funghi patogeni (con ambiente come fonte successiva di infezione)
- Laboratori di diagnosi micologica umana e veterinaria hanno molti target di studio/identificazione in comune (ma prevalenza delle relative infezioni spesso diversa)

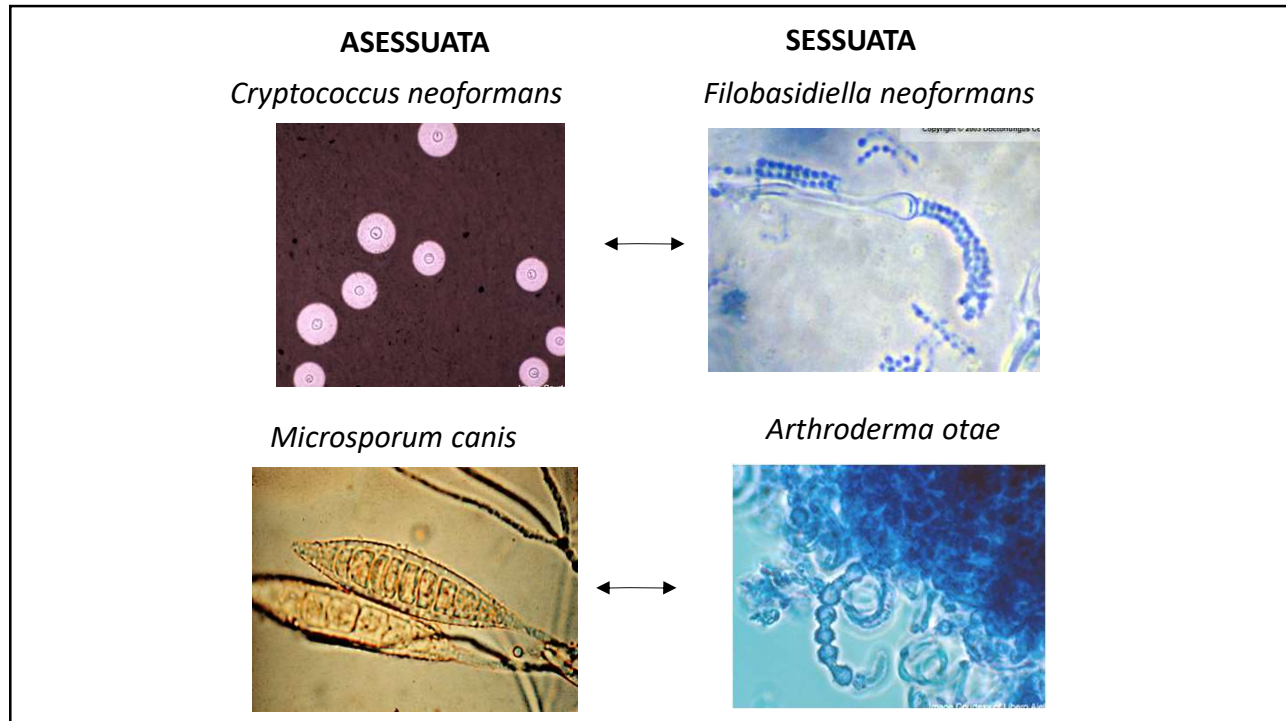
3

Note introduttive

Regno: Funghi

- Più di 100.000 specie descritte....~ 600 riportate come causa di infezione in uomo e animali (e un centinaio quelle coinvolte regolarmente)
- Numero di specie in aumento negli ultimi anni per diversi motivi
 - ✓ maggior numero di pazienti immunodepressi
 - ✓ soprattutto... aumenta il potere di discriminazione per applicazione tecniche molecolari.....1) più specie riconosciute laddove prima se ne riconosceva una sola...e 2) ridefinizione delle «parentele» con aggiustamenti degli errori di attribuzione tassonomica
- Cambio nomenclatura....una sfida (anche comunicativa)

4



5

Note introduttive

doi: 10.5598/imafungus.2011.02.01.14
 IMA FUNGUS · VOLUME 2 · NO 1: 105–112

The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature

ARTICLE

THE AMSTERDAM DECLARATION ON FUNGAL NOMENCLATURE

Enacted in Amsterdam, 20 April 2011

One Fungus = One Name

6

Fungal Nomenclature: Managing Change is the Name of the Game

Sarah E. Kidd,^{1,2,3} Alireza Abdolrasouli,^{3,4,5} and Ferry Hagen^{6,7,8}

¹National Mycology Reference Centre, SA Pathology, Adelaide, South Australia, Australia, ²School of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Adelaide, Adelaide, South Australia, Australia, ³Department of Medical Microbiology, King's College Hospital, London, United Kingdom, ⁴Department of Infectious Diseases, Imperial College London, London, United Kingdom, ⁵Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands, ⁶Institute of Biodiversity and Ecosystem Dynamics, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands, and ⁷Department of Medical Microbiology, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands

Table 1. Summary of Nomenclature Changes in Clinically Important Yeast-like Fungi

Previous Name(s)	Current Name	Commonly Associated Infections	Refer
<i>Candida bracarensis</i>	<i>Nakaseomyces bracarensis</i> ^a	Invasive infections including fungemia	[1]
<i>Candida catenulata</i>	<i>Diutina catenulata</i>	Invasive infections including fungemia	[1]
<i>Candida colliculosa</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Invasive infections including fungemia	[1]
<i>Candida fabianii</i>	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	Invasive infections including fungemia	[1]
<i>Candida famata</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Invasive infections including fungemia	[1]
<i>Candida glabrata</i>	<i>Nakaseomyces glabrata</i> ^a	Invasive infections including fungemia	[1]
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Invasive infections including fungemia	[1]
<i>Candida krusei</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>	Invasive infections including fungemia	[1]
<i>Candida kefyr</i> , <i>Candida pseudotropicalis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Invasive infections including fungemia	[1]
<i>Candida lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Invasive infections including fungemia	[1]
<i>Candida lusitanae</i>	<i>Clavispora lusitanae</i>	Invasive infections including fungemia	[1]
<i>Candida nivariensis</i>	<i>Nakaseomyces nivariensis</i> ^a	Invasive infections including fungemia	[1]
<i>Candida neorugosa</i>	<i>Diutina neorugosa</i>	Invasive infections including fungemia	[1]
<i>Candida norvegensis</i>	<i>Pichia norvegensis</i>	Invasive infections including fungemia	[1]
<i>Candida pararugosa</i>	<i>Diutina pararugosa</i>	Invasive infections including fungemia	[1]

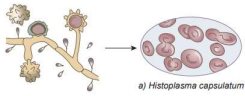
7

diagnosi.....caratterizzazione

- Nel contesto di un laboratorio diagnostico: in molti casi sufficiente una identificazione a livello di complex/gruppo tassonomico (e dunque con tecniche «base», aiutati da anamnesi, animale, aspetti clinici)
- Caratterizzazione più «spinta» in caso di correlazione di una determinata specie/genotipo con comportamento biologico di rilievo (virulenza, resistenza ai farmaci ecc.)
- Approfondimento con tipizzazione intraspecifica a scopo di ricerca

8

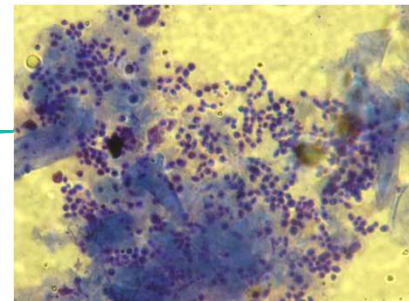
Divisione in base alla morfologia

Filamentosi		Dermatofiti, <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> Mucoracee.....
Lieviti		<i>Malassezia</i> , «gruppo <i>Candida</i> », <i>Criptococcus</i>
Dimorfi		<i>Histoplasma</i> , <i>Coccidioides</i> , <i>Paracoccidioides</i> , <i>Blastomyces</i> , <i>Sporothrix</i> , <i>Emergomyces</i>

9

Riproduzione

- Sessuata/asessuata
- Asessuata...si originano «conidi»
- Diverse modalità di produzione (conidiogenesi)....primo spunto per identificazione
- Nei tessuti.....di solito indicazione presuntiva
- In coltura, qualche volta ID sufficiente in prospettiva clinica (spesso necessario procedere con prove aggiuntive per ID precisa)



10

Note introduttive

Localizzazione/interazione

	Primarie	Opportunistiche
Superficiali	Dermatofiti	Malassezia (dermatite e otite)
Sottocutanee	<i>Sporothrix</i>	«muffe»
Invasive/disseminate	Funghi dimorfi (<i>Histoplasma</i> , <i>Coccidioides</i> , <i>Blastomyces</i>)	<i>Criptococcus</i> , <i>Candida</i> , «muffe» (<i>Aspergillus</i> , <i>Mucoraceae</i> , <i>Fusarium</i> ...)

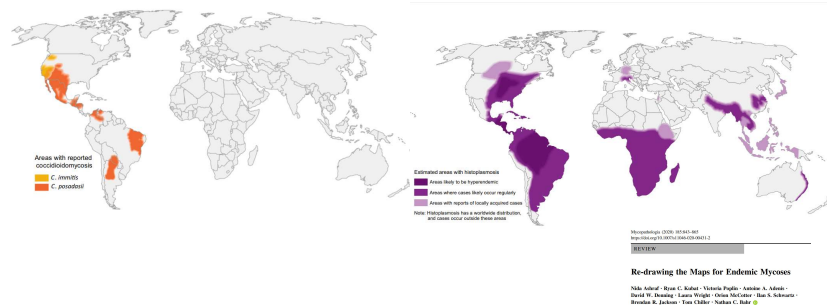
11

Note introduttive

Distribuzione

Mondiale	Dermatofiti, muffe opportuniste, <i>Candida</i> , <i>Criptococco</i> , <i>Malassezia</i>
Aree geografiche più definite (molti fuori Europa*)	Dimorfi

* casi segnalati in aree un tempo considerate indenni (Italia compresa)



12

Note introduttive

zoonosi

SI	Dermatofiti, Sporothrix
NO	Dimorfi, muffe opportuniste, Candida, Criptococco, Malassezia....



13

Note introduttive

Animali domestici e selvatici

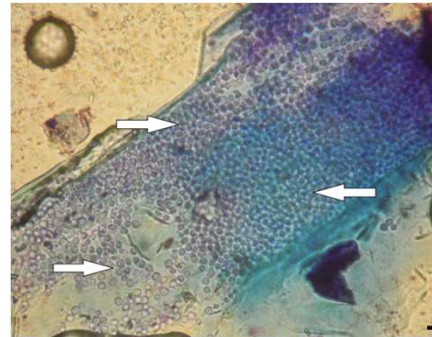
- Dermatofitosi (animali vari); Aspergillosi nel cane; cheratomicosi nel cavallo; criptococcosi nel gatto.....
- White-nose disease nei pipistrelli; chitridiomicosi negli anfibi; aspergillosi nei pinguini.....



14

Esame «diretto»

- Varie possibilità: esame senza colorazione (pelo/raschiati in olio di paraffina/NaOH); esami citologici ago-aspirati, impronte biopsie; esami istologici da biopsia/materiale rimosso con chirurgia
- Colorazioni: *citologia*, May Grunwald Giemsa, commerciali rapide; *istologia*, HE, speciali (PAS, Grocott)
- Sensibilità/utilità variabili in base all'agente fungino, tipo e qualità del campione, capacità ed esperienza dell'operatore
- Spesso fondamentale per interpretare i risultati di altri test (coltura, PCR)
- Possibilità di ID? Dipende dal fungo (aiuto da storia clinica, anamnesi, animale)



15

Coltura

- Permette di isolare l'agente eziologico (disponibile per ulteriori prove)
- Diversi terreni possibili; per primo isolamento: Sabouraud destrosio con antibiotici (muffe e lieviti), con antibiotici e cicloeximide (dermatofiti)
- Identificazione + eventuali prove *in vitro* di sensibilità agli antifungini
- Risultati ottenibili in tempo variabile (2-3 giorni in su)
- Prima identificazione basata su aspetto colonie (colore fronte e retro-piastra) e tipo di conidio-genesi (precisione dipende dal fungo). Spesso possibile (e *sufficiente*) almeno a livello di gruppo/complex
- ID definitiva con prove aggiuntive (fisiologiche, molecolari, spettrometria di massa)



16

Tecniche identificative

Coltura

<https://www.atlasclinicalfungi.org/my-account/>

Atlas of Clinical Fungi



17

Tecniche identificative

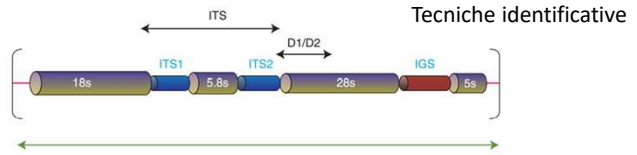
Coltura + antimicogramma?

- Non eseguito di routine (poca standardizzazione, resistenza in determinati scenari e specie fungine)
- Si per casi con sospetto su base clinica
- Spesso corretta identificazione è già informativa perché è nota per certe specie la resistenza a determinate categorie di antimicotici



18

PCR (da colonia)

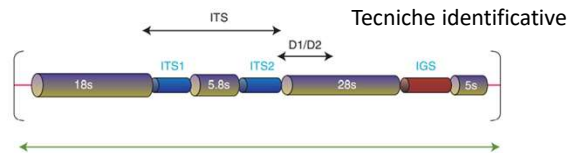


- PCR + sequenziamento varie regioni DNA fungino
- ITS, LSU, SSU, β -Tubulina, Calmodulina
- Dati generati a partire da un fungo sconosciuto possono venire confrontati con seq. contenute in database pubblici (come GenBank)
- Cautela, perché questi database non sono sottoposti a controlli, con possibilità di depositi "erranei"
- Inoltre....cambio nomenclatura!
- Consiglio: utilizzare sequenze *verificate, pubblicate, recenti*
- NB tempi abbastanza lunghi....
- Molte altre tecniche di caratterizzazione (microsatelliti, NGS ecc.)

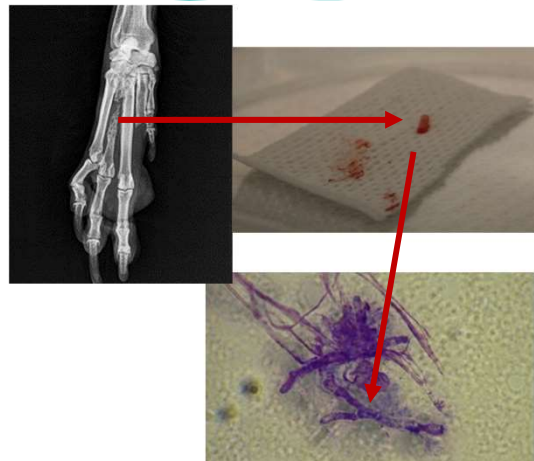


19

PCR (da campione biologico)



- «panfungal» PCR (ITS)
- Nb : fondamentale interpretazione (risultato deve corrispondere al quadro cito/istologico)
- PCR target (con primers/sonde specifici)



20

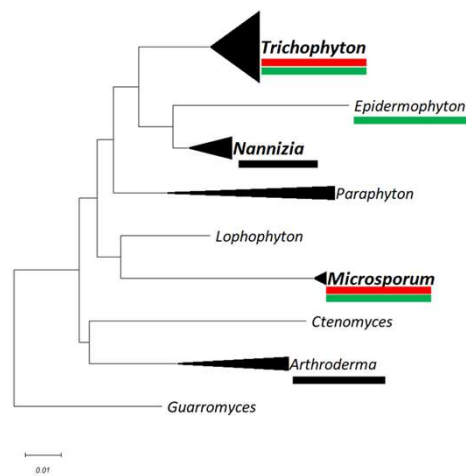
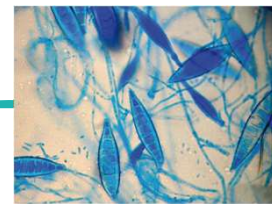
Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF)

- Identificazione rapida di specie microbiche basata sulla composizione peptidica (componente ribosomiale)
- Costi molto bassi dei test, costo del macchinario elevato
- Vengono generati «spettri» che vengono confrontati con una library di riferimento
- Punti di forza: veloce, non richiede (di solito) preparazioni complesse
- Punti di debolezza: necessità di avere libraries che includono le specie (più rappresentanti per specie) di interesse, possibile variabilità in base alle condizioni di crescita dei funghi



21

Dermatofiti



Antropofili
Zoofili
Geofili

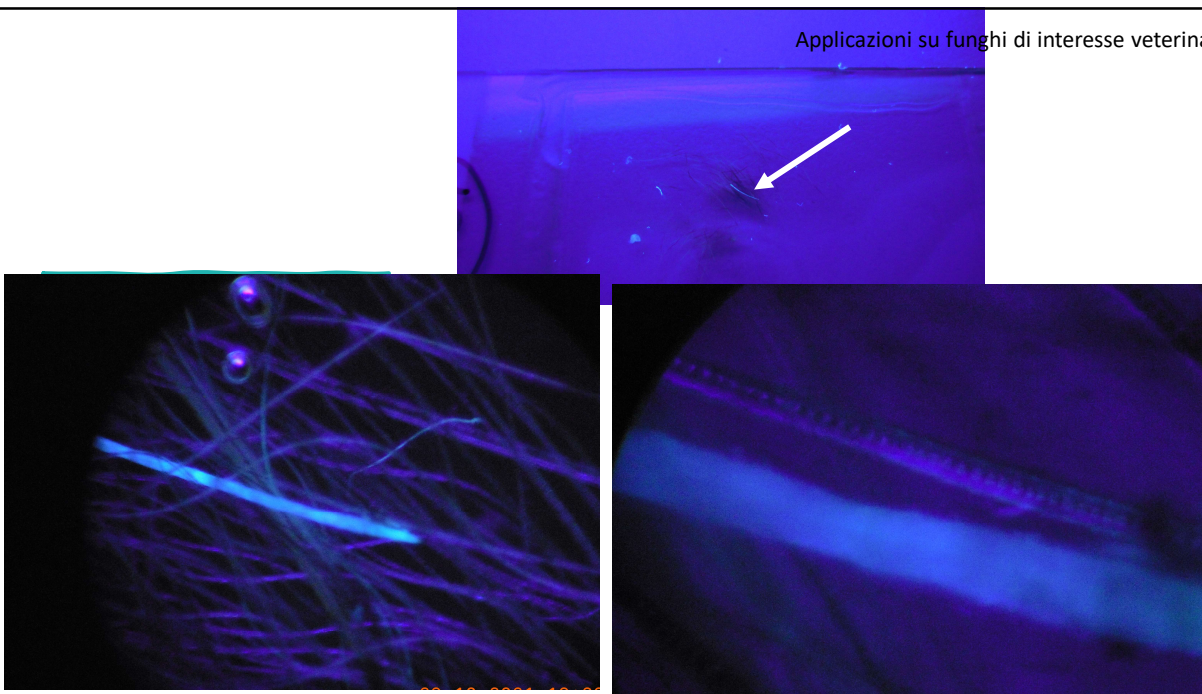
22

Applicazioni su funghi di interesse veterinario

	"serbatoio" principale	Animali in cui viene più frequentemente riportato come causa di infezione
<i>Microsporium canis</i>	Soprattutto il gatto	Gatto Cane
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Conigli, topi	Coniglio Cane Gatto Cavallo
<i>Trichophyton benhamiae</i> , <i>T. europaeum</i> , <i>T. japonicum</i>	Cavia	Cavia Cane
<i>Trichophyton erinacei</i>	Riccio	Riccio Qualche caso descritto nel cane e nel bovino
<i>Trichophyton verrucosum</i>	Bovino	Bovino, molto più sporicamente nella Pecora e Capra
<i>Trichophyton equinum</i>	Cavallo	Cavallo

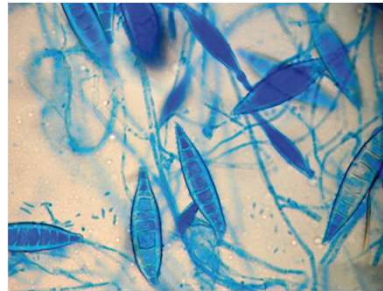
23

Applicazioni su funghi di interesse veterinario



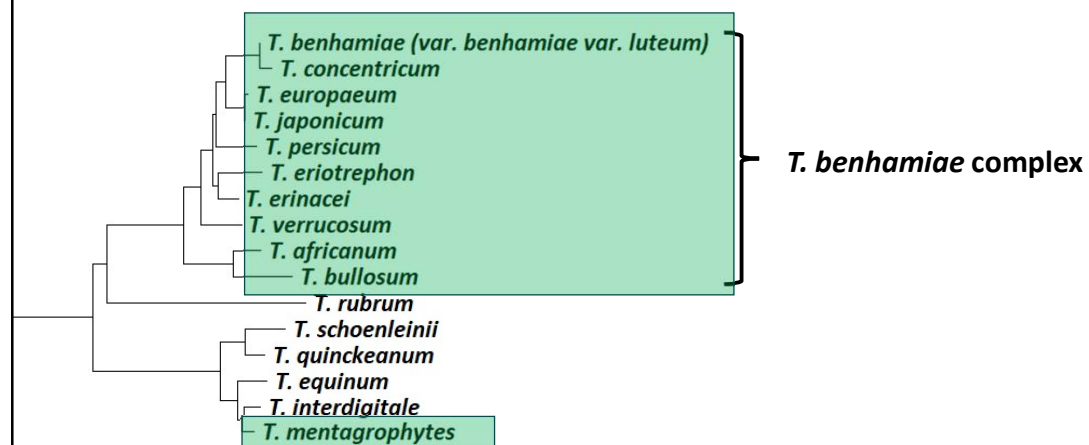
24

Applicazioni su funghi di interesse veterinario

Microsporium canis

25

Applicazioni su funghi di interesse veterinario

***Trichophyton* spp.**

26

Applicazioni su funghi di interesse veterinario



T. mentagrophytes/
***T. benhamiae* complex**

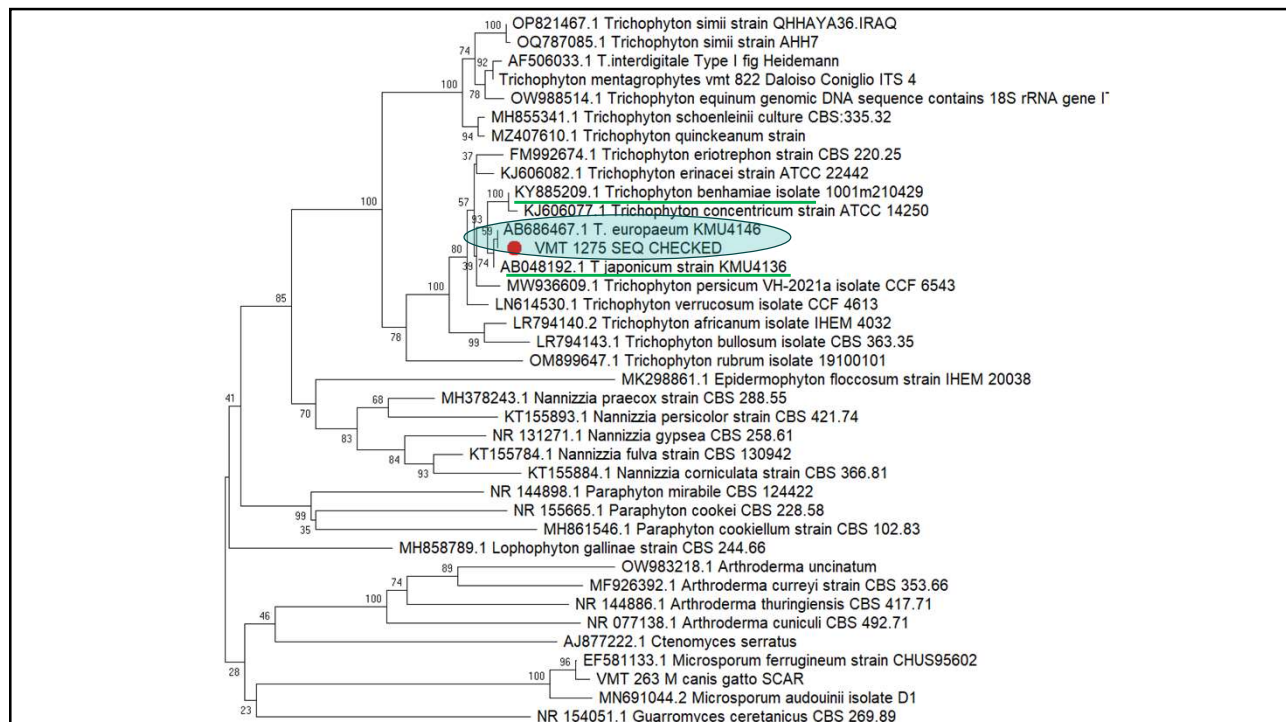
27

Applicazioni su funghi di interesse veterinario



T. mentagrophytes/
***T. benhamiae* complex**

28



31

Grugliasco, 18/07 /2022

Oggetto: esito esame micologico

Proprietario Sig./Sig.ra: [REDACTED]

Caso Clinico N°:

Richiedente Dott./Dott.ssa: [REDACTED]

Specie: cane Nome:

Razza: Setter Inglese

Età: 8 anni

Data visita: 08/07/22

Campione: pelo/scaglie

Analisi effettuata: coltura (numero 6772)

Esito/Interpretazione :

Si rileva la crescita di numerose colonie di un fungo filamentoso. Le colonie appaiono bianche, di consistenza polverosa, con colore del retro-piastrella marrone (foto nelle pagine successive). A livello microscopico si notano micro-conidi rotondi portati da strutture "a tralcio d'uva", e macro-conidi a forma di sigaro. Le caratteristiche morfologiche descritte sono compatibili con quelle di alcune specie di funghi dermatofiti (*Trichophyton mentagrophytes* e specie del gruppo "*Trichophyton benhamiae*", come, ad esempio, *Trichophyton europaeum*). Tutte queste specie sono patogeni e responsabili di problemi dermatologici negli animali e nell'uomo.

Il Responsabile Laboratorio Parassitologia e Micologia
 Dott. Andrea Peano

32

PLOS PATHOGENS

PEARLS

The emergence and worldwide spread of the species *Trichophyton indotineae* causing difficult-to-treat dermatophytosis: A new challenge in the management of dermatophytosis

Anuradha Chowdhary^{1,2*}, Ashutosh Singh^{1,2}, Amtoj Kaur¹, Ananta Khurana³

¹ Medical Mycology Unit, Department of Microbiology, Vallabhbhai Patel Chest Institute, University of Delhi, Delhi, India, ² National Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance in Fungal Pathogens, Vallabhbhai Patel Chest Institute, University of Delhi, Delhi, India, ³ Department of Dermatology, Dr. RML Hospital and Atal Bihari Vajpayee Institute of Medical Sciences, New Delhi, India

Extensive Dermatophytosis Caused by Terbinafine-Resistant *Trichophyton indotineae*, France

Arnaud Jabet,¹ Sophie Brun,¹ Anne-Cecile Normand, Sebastien Imbert, Mohammad Akhouni, Eric Dannaoui, Laetitia Audiffred, Francois Chasset, Arezki Izri, Liliane Laroche, Renaud Piarroux, Claude Bachmeyer, Christophe Hennequin, Alicia Moreno Sabater.

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2801.210883>

¹These first authors contributed equally to

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 28, No. 1, January 2022

33

Journal of Dermatological Science 70 (2013) 123–129

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Dermatological Science

journal homepage: www.elsevier.com/jds

Development and validation of a microsatellite marker-based method for tracing infections by *Microsporium canis*

Mario Pasquetti^a, Andrea Peano^{a,*}, Dominga Soglia^a, Anna Rita Molinar^a, Florian Pankewitz^b, Torsten Ohst^b, Yvonne Gräser^b

^a Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Università di Torino, Via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco, Italy

^b Institute of Microbiology and Hygiene, Universitätsmedizin Berlin – Charité, Hindenburgdamm 27, D-12203 Berlin, Germany



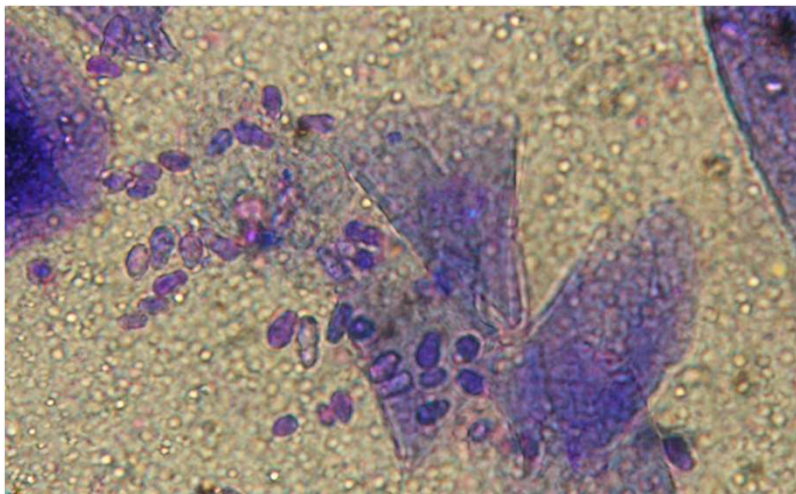
34

Malassezia

- Lieviti opportunisti
- Microorganismi commensali cane, gatto, altre specie animali, uomo
- Diverse specie (tradizionalmente considerate) lipido-dipendenti
- 1 specie “non lipido dipendente” (*Malassezia pachydermatis*)
- Casi di infezioni setticemiche in pazienti con vari fattori sottostanti

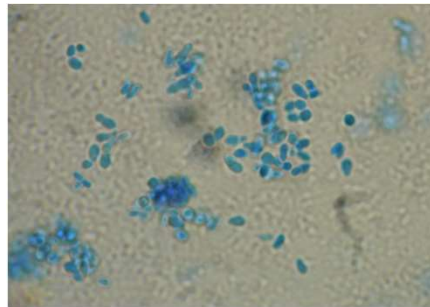
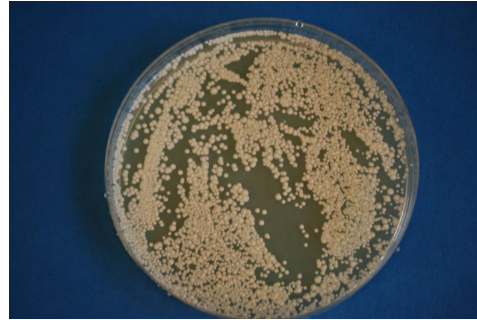
35

Diagnosi/identificazione....citologia



36

Coltura



37

Medical Mycology Case Reports 23 (2019) 58–61

Contents lists available at ScienceDirect

Medical Mycology Case Reports

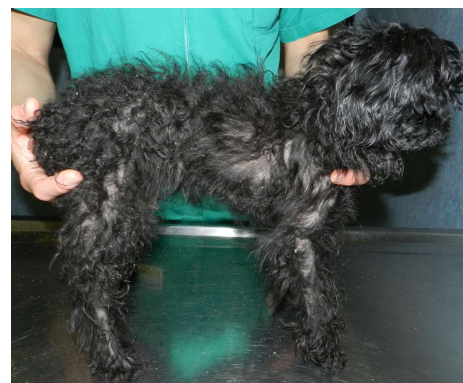
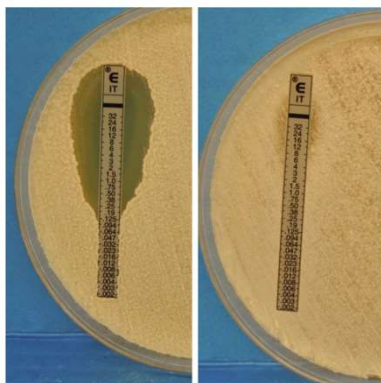
journal homepage: www.elsevier.com/locate/mmycr

Azole resistance of *Malassezia pachydermatis* causing treatment failure in a dog

Martina Angileri^a, Mario Pasquetti^b, Michela De Lucia^a, Andrea Peano^{b,*}

^a San Maria Veterinary Clinic, Via dell'Industria 3, 35030 Veggione, Italy

^b Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Largo Paolo Braccini 2, 10095 Grugliasco, Italy



38

Resistenza

- Mutazioni del Gene ERG-11 che codifica per la lanosterolo 14- α demethylase fungina (enzima chiave nella sintesi dell'ergosterolo di membrana, target dei farmaci azolici)
- Descritte inizialmente in Candida, poi ritrovate anche in Malassezia
- PCR per individuare dette mutazioni, tracciando quindi in modo più oggettivo (rispetto ai test di sensibilità *in vitro*) la presenza di ceppi resistenti



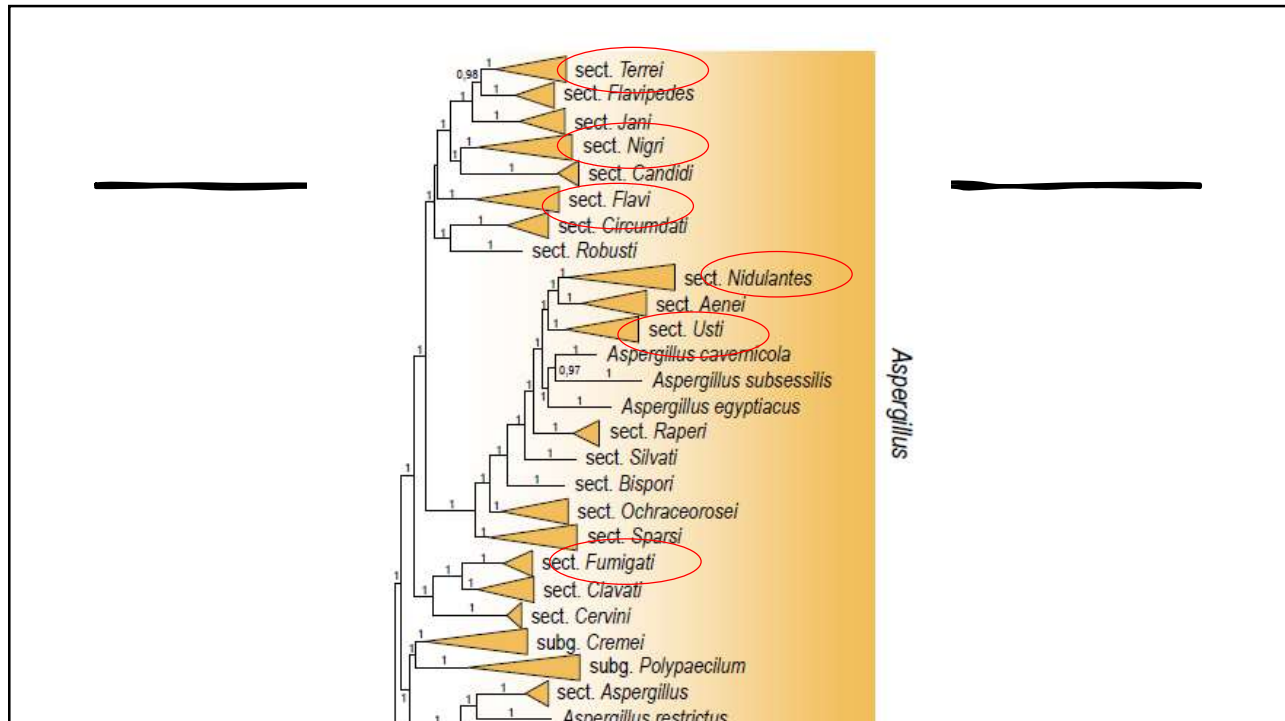
39

Muffe opportuniste

- **Aspergillus**, Penicillium, Zigomiceti
- Implicate in numerose forme cliniche (infezioni nasali/sistemiche cane; infezioni retrobulbari gatto; cheratomicosi cavallo; forme respiratorie uccelli ecc.)
- Id morfologica genere/gruppo/sezione
- Id molecolare (PCR + seq. B-Tubulina e altri)
- Maldì?



40



41

Applicazioni su funghi di interesse veterinario

Cane con discospondilite (sospetta micosi), coltura urina
per cistocentesi



Aspergillus terreus complex

42

Grugliasco, 11/12/2023

Oggetto: esito esame micologico

Proprietario Sig./Sig.ra: [REDACTED]

Caso Clinico N°:

Richiedente Dott./Dott.ssa: [REDACTED]

Specie: cane Nome: [REDACTED]

Razza:

Età:

Campioni: urina (cisto-centesi, cane in terapia antimicotica per infezione fungina profonda)

Raccolti in data: 06/12/2023

Analisi effettuata: coltura (iniziata il 06/12/23), a 25 e 37°C

Esito/Interpretazione:

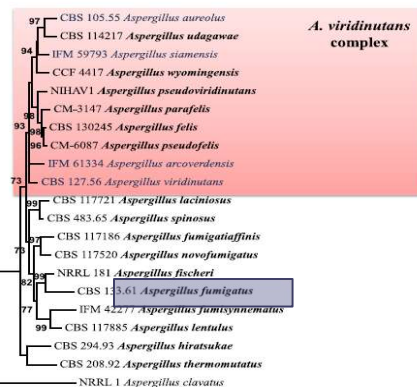
Si osserva la crescita, a tutte e due le temperature, di colonie fungine con caratteristiche morfologiche compatibili con una specie dell'*Aspergillus terreus species complex*. E' altamente probabile che il fungo isolato sia il responsabile dell'infezione in atto, dato che: 1) l'urina è stata raccolta tramite cisto-centesi (questo rende improbabile l'ipotesi che le colonie rinvenute siano esito di contaminazione ambientale); 2) il fungo è cresciuto in purezza da ambedue le piastre; 3) *Aspergillus terreus*, una delle specie più importati del complex, è una tra le più frequentemente implicate in corso di infezione fungina profonda nel cane.

NB: *Aspergillus terreus* è considerato intrinsecamente resistente al farmaco antifungino Amfotericina B

43

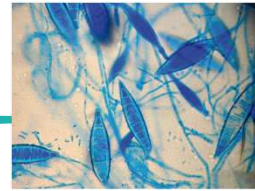
Applicazioni su funghi di interesse veterinario

Aspergillosi sino/orbitale felina dovuta a specie **criptiche** della sezione Fumigati (*A. viridinutans*-complex)



44

Take-home messages



- Numero di funghi di interesse veterinario (a scavalco con medicina umana...prospettiva one-health) in aumento
- Identificazione: da tecniche ed attrezzature base (potere di discriminazione «medio») ad esami più complessi e costosi (PCR, MALDI.....potere di discriminazione «elevato»)
- E' probabile che l'uso di tecniche più avanzate permetterà di migliorare le conoscenze sulla diffusione e sui fattori connessi di funghi «tradizionali» agenti di infezione (ma anche di micosi «esotiche»)
- In tema di nomenclatura, sono molto importanti gli aspetti legati alla comunicazione (nei report di laboratorio, nelle pubblicazioni scientifiche o divulgative ecc.). Utilizzare i nomi aggiornati, ma (almeno per qualche tempo) menzionare anche il «vecchio» nome a cui la comunità scientifica era abituata