

**Sviluppo e valutazione di una tecnica
di ibridazione in situ per la rapida
identificazione di *Candida spp.* in emocolture**

Samuele Roman

Lavoro di diploma

Istituto Cantonale di Microbiologia

Scuola Superiore Medico Tecnica

Formazione Tecnico Analisi Biomediche

Gennaio 2010 – Giugno 2010

Responsabile del posto di stage: Dr. Antonella Demarta

Abstract

Species of the fungal genus *Candida*, in particular *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* complex are feared pathogens that may cause severe, often fatal infections in immunocompromised patients. In particular, candidaemia often ends with a fatal outcome. The response to antimycotic therapy differs among *Candida* species: *C. glabrata* and *C. krusei* are mostly resistant to fluconazole, whereas *C. albicans* and *C. parapsilosis* complex are susceptible. A reliable but quick identification of these agents is therefore crucial for a timely and targeted treatment because a delay in the choice of the appropriate therapy may increase dramatically the risk of death of the patient. Identification of *Candida* still relies on conventional physiological, morphological and biochemical tests. More recently molecular methods have been introduced in fungal taxonomy and are useful in the characterisation of *Candida* species. All these methods, however, are relatively costly and time-consuming; presently, the identification of *Candida* species in positive blood cultures may take up to 2 days or even longer.

We have developed a fluorescent in situ hybridization (FISH) protocol for a rapid differential diagnose of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis* complex in blood cultures using specific rRNA fluorescently labelled oligonucleotides. The method has been tested using pure cultures and, subsequently, blood cultures spiked with fungal cells. FISH results were compared with those obtained by DNA sequencing, MALDI-TOF mass spectrometry and classical biochemical methods. FISH has high specificity and sensitivity, identification are available after 4-6 hours from the begin of the procedure and therefore the use in the routine laboratory is possible.

Riassunto

Le specie fungine appartenenti al genere *Candida*, in particolare *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* complex possono causare infezioni severe e spesso fatali in pazienti immunocompromessi. In particolare le candidemie spesso hanno un esito letale. La risposta alla terapia antimicotica differisce tra le specie: *C. glabrata* e *C. krusei* sono perlopiù resistenti al fluconazolo, mentre *C. albicans* e *C. parapsilosis* complex sono suscettibili. Un'affidabile e rapida identificazione di questi patogeni è quindi cruciale per un tempestivo e mirato trattamento, in quanto un ritardo nella scelta dell'appropriata terapia può fare aumentare drammaticamente il rischio di morte per il paziente. L'identificazione di *Candida* si affida ancora prevalentemente ai convenzionali test fisiologici, morfologici e biochimici, ma metodi molecolari sono usati sempre di più nella tassonomia dei funghi. Questi metodi sono utili nella caratterizzazione di *C. albicans*, tuttavia sono relativamente costosi e richiedono tempo: l'identificazione di *Candida* spp in emocolture positive può richiedere diversi giorni.

In questo lavoro è stato sviluppato un protocollo di ibridazione in situ con sonde fluorescenti (FISH) per una rapida diagnosi differenziale di *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* complex in emocolture usando oligonucleotidi marcati a fluorescenza e specifici per l'rRNA. Il metodo è stato verificato usando colture pure ed, emocolture inoculate con cellule fungine. I risultati della tecnica FISH sono stati comparati con quelli ottenuti dal sequenziamento del DNA, dalla spettrometria di massa MALDI-TOF e dai metodi biochimici classici. La FISH si è dimostrata altamente specifica e sensibile, fornisce risultati attendibili dopo 4-6 ore dall'inizio del procedimento e perciò un suo uso nelle analisi di routine sarebbe possibile.

Indice

Abstract.....	2
Introduzione.....	5
Il genere <i>Candida</i> nella clinica	5
Le infezioni da <i>Candida</i>	5
Antimicotici e strategie terapeutiche nel trattamento di setticemie da <i>Candida spp.</i>	6
Metodi di identificazione in caso di setticemie da miceti	8
Rilevamento di crescite microbiche e fungine mediante emocoltura	8
Metodi biochimici e di coltura per miceti.....	9
Metodi molecolari per l'identificazione di miceti.....	10
Sequenziamento del DNA	10
Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).....	11
Ibridazione cellulare <i>in situ</i> (FISH).....	12
Obiettivi dello studio.....	13
Materiali e metodi	14
Selezione di ceppi.....	14
Sequenziamento del DNA.....	14
Estrazione del DNA.....	14
PCR.....	15
Elettroforesi	15
Purificazione del prodotto PCR	15
Reazioni di sequenza	16
Purificazione dei prodotti della reazione di sequenza.....	16
Determinazione automatica della sequenza nucleotidica, correzione manuale della stessa e identificazione.....	16
Spettrometria di massa Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight (MALDI-TOF)	17
Identificazione di specie fungine mediante test biochimici	17
Inoculo e crescita dei ceppi in flaconi di emocolture	17
Ibridazione cellulare <i>in situ</i>	18
Preparazione dei vetrini.....	18

Fissazione di colture pure	19
Preparazione e fissazione del campione: metodo 1	19
Preparazione e fissazione del campione: metodo 2	19
Ibridazione su cellule integre utilizzando singolarmente differenti sonde marcate con il medesimo fluorocromo	20
Ibridazione su cellule integre utilizzando accoppiamenti di sonde marcate con fluorocromi differenti.....	20
Lavaggio.....	21
Contro-colorazione	21
Visualizzazione	21
Risultati.....	22
Identificazione di <i>C.albicans</i> , <i>C. parapsilosis complex</i> , <i>C.krusei</i> e <i>C. glabrata</i> in colture pure mediante FISH.....	22
Combinazione di sonde marcate con fluorocromi differenti	22
Campioni di emocoltura	23
Confronto tra le diverse tecniche di identificazione di <i>Candida spp.</i>	24
Paragone con ibridazioni cellulari <i>in situ</i>	25
Paragone con metodi di coltura classici e biochimici.....	25
Paragone con spettrometria di massa MALDI-TOF MS	26
Confronti di sensibilità e specificità.....	27
Discussione	29
Conclusioni.....	32
Bibliografia.....	33
Lessico	36
Allegati.....	37
Allegato 1: Terreni di coltura	37
Allegato 2: Soluzioni e tamponi.....	38
Allegato 3: Protocollo di esecuzione ID32C bioMérieux.....	40
Allegato 4: Protocollo di purificazione prodotti PCR.....	41
Allegato 5: Ceppi selezionati.....	43
Allegato 6: Risultati dei confronti.....	44
Allegato 7: Allineamento tra le sequenze della sonda <i>Calb</i> e di parte del 18S rRNA di <i>C. dubliniensis</i>	45
Ringraziamenti	46