

\*Luciano Polonelli  
 \*\*José Ponton  
 \*\*\*Stefano Frigeri  
 \*Mara Gerloni  
 \*Walter Magliani  
 \*Maria Grazia Menozzi  
 \*\*\*\*Luigino Fiamminghi

\*Istituto di Microbiologia  
 Università degli Studi di Parma  
 Direttore: Prof. C. Chezzi  
 \*\*Departamento de Microbiología e Inmunología,  
 Facultad de Medicina y Odontología,  
 Universidad del País Vasco, Bilbao, Spagna

\*\*\*Istituto di Clinica Odontoiatrica  
 Università degli Studi di Parma  
 Direttore: Prof. P.U. Gennari  
 \*\*\*\*Scuola di Specializzazione in  
 Odontostomatologia  
 Direttore: Prof. L. Fiamminghi

# Significato diagnostico di IgA secretorie adese a cellule lievitiiformi nelle candidosi orali

Diagnostic potential of IgA coated candida cells in mucous membrane candidiasis

## RIASSUNTO

Il significato di IgA secretorie adese *in vivo* a cellule lievitiiformi per la diagnosi di candidosi orale è stato esaminato mediante un saggio di immunofluorescenza diretta in 42 pazienti, sintomatici ed asintomatici, risultati positivi all'esame micologico culturale. La maggior parte dei pazienti con candidosi orale clinicamente sospetta ha evidenziato una positività al saggio immunologico in contrasto con la maggioranza dei pazienti asintomatici.

Il nuovo approccio diagnostico ha mostrato di essere correlato con i sintomi clinici, la persistenza dell'infezione, la risposta alla terapia antifungina eventualmente adottata ed i dati semiquantitativi dell'esame culturale.

Parole chiave: IgA. Candidosi orale.

## SUMMARY

The significance of *in vivo* IgA coated yeast cells for the diagnosis of candidiasis of the oral mucosal membranes was evaluated by direct immunofluorescence in 42 patients with or without clinical symptoms, shown to be positive for yeast growth in the cultural test. Most of the patients with clinically suspected candidiasis of the mucosal membranes gave positive results by serologic assays in contrast to the majority of symptomless patients. The diagnostic approach proved to be essentially consistent with the clinical signs, persistence of infection, response to antifungal therapy and quantitative cultural data.

Key words: IgA. Oral candidiasis.

Polonelli L, Ponton J, Frigeri S e coll. Significato diagnostico di IgA secretorie adese a cellule lievitiiformi nelle candidosi orali. *G It Endo* 1991; 3: 102-105

## INTRODUZIONE

La formulazione di una corretta diagnosi di candidosi orale può risultare problematica sulla base della sola osservazione clinica a causa di possibili infezioni recidivanti, di fattori predisponenti, della soggettività della sintomatologia e del concorso di altri potenziali agenti eziologici.

La frequente colonizzazione della mucosa orale da parte di specie del genere *Candida* rende poco affidabile la diagnosi di laboratorio basata esclusivamente sull'esame culturale.

Nelle candidosi vaginali è stata stabilita una chiara correlazione tra manifestazioni patologiche della mucosa e la quantità di lieviti isolati in coltura dai materiali clinici (1).

Saggi di immunofluorescenza diretta per la determinazione di anticorpi adesi a batteri (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) e lieviti (9) in sedimenti urinari si sono dimostrati variamente diagnostici nel determinare il presunto sito di infezione batterica e nel differenziare la significatività del lievito isolato dall'urocoltura.

Nella patogenesi delle candidosi mucocutanee un'importanza crescente è stata attribuita, nel corso degli ultimi anni, all'adesività dei lieviti alla superficie delle cellule epiteliali dell'ospite.

Le IgA, ed in particolare le IgA secretorie, possono svolgere un importante ruolo nel sistema immunitario delle mucose prevenendo, *in vivo*, l'adesione dei microorganismi (10, 11, 12, 13).

Un'inibizione dell'adesività all'epitelio della mucosa orale umana è stata anche dimostrata *in vitro* per ceppi di *Candida albicans* (14). Immunoglobuline delle classi A e G sono state inoltre evidenziate adese a cellule di *C. albicans* in 10 pazienti su 29 esaminati per reperto culturale micologico positivo (15). Nessuna interpretazione è stata tuttavia formulata sul possibile significato diagnostico di tale osservazione.

In questo lavoro vengono per la prima volta riportati i risultati di uno studio atto a valutare, mediante immunofluorescenza diretta, il significato diagnostico dell'adesione a miceti lievitiiformi *in vivo* di IgA e, comparativamente, di altre classi immunoglobuliniche, nel corso di infezioni della mucosa orale in pazienti sintomatici ed asintomatici.

## MATERIALI E METODI

### Pazienti e materiali clinici

Sono state condotte, su un gruppo selezionato di 42 pazienti, 54 indagini microbiologiche.

I pazienti esaminati erano considerati sintomatici quando presentavano segni o sintomi, rilevabili clinicamente o soggettivamente, riferibili a candidosi orale.

I campioni clinici, per ogni indagine effettuata, erano rappresentati da due tamponi prelevati dalla mucosa della cavità orale.

### Diagnosi di laboratorio

Il primo dei due tamponi era seminato in piastre di Sabouraud dextrose agar addizionato di cloramfenicolo (Becton Dickinson Italia S.p.A., Milano).

L'eventuale crescita fungina era valutata dopo 24-48 ore di incubazione delle piastre a 37°C.

I lieviti sviluppati venivano identificati con il saggio del tubo di germinazione ed, eventualmente, con il sistema semiautomatizzato Vitek (Vitek System, Inc. Hazelwood,

Missouri, U.S.A.).

### Saggio di immunofluorescenza diretta per la rivelazione di IgA adese a cellule lievitiiformi (IF-IgA)

Il secondo dei due tamponi era stemperato in 1 ml di tampone fosfato (PBS, Oxoid limited, U.K.); 10 µl del sedimento, ottenuto dalla sospensione opportunamente centrifugata (2000 rpm per 10 minuti), erano posti in 4 pozzetti di due vetrini per fluorescenza. I preparati venivano lasciati asciugare a temperatura ambiente e, successivamente, fissati al calore.

In due pozzetti del primo vetrino erano aggiunti 20 µl di una soluzione di anticorpi di capra antiimmunoglobuline A umane, coniugati con biotina (Amersham International, Amersham, U.K.), diluiti 1:75 in PBS. Il terzo ed il quarto pozzetto erano saggiati con solo PBS (20 µl) ed impiegati come controllo.

In caso di saggio IF-IgA negativo, il secondo vetrino era utilizzato, comparativamente, per la rivelazione di immunoglobuline totali adese alle cellule lievitiiformi impiegando 20 µl di una soluzione di anticorpi di capra anti-immunoglobuline umane totali (Amersham) diluiti 1:75 in PBS. I vetrini erano incubati a 37°C, in umida, per 60 minuti, lavati in PBS (3 volte per 10 minuti in agitazione) e lasciati asciugare all'aria. Successivamente in ogni pozzetto erano posti 30 µl di una soluzione di streptavidina coniugata con isotiocianato di fluoresceina (Amersham) diluita 1:30 in PBS, ed i vetrini incubati a 37°C, in camera umida, per 15 minuti. Dopo 3 lavaggi in PBS (3 volte per 10 minuti in agitazione), in ogni pozzetto erano aggiunti, per 30 secondi, 50 µl di una soluzione di contrasto (Eriochrome Black, Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, New Jersey, U.S.A.), ed i vetrini, coperti con un coprioggetto, venivano osservati al microscopio a fluorescenza (Axiophot Zeiss, Germany, con filtro barriera 515-565).

## RISULTATI

Il lievito opportunisto più frequentemente i-

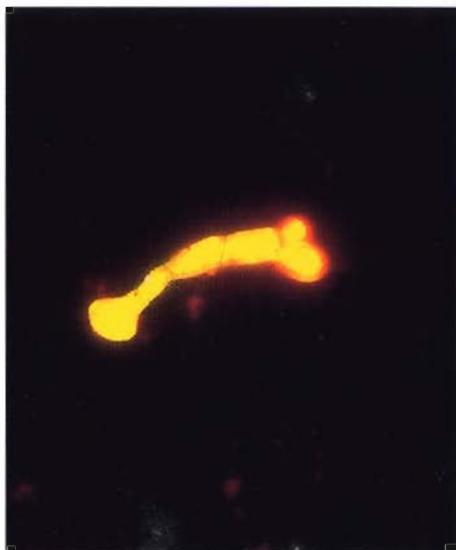


Fig. 1

solato è stato *C. albicans*, sebbene siano stati identificati anche *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. tropicalis* e *Torulopsis candida*.

Nella tabella sono stati riportati i dati relativi agli aspetti clinici, colturali, immunologici, e all'eventuale adozione di terapia specifica, dei 42 pazienti selezionati per essersi mostrati almeno una volta positivi all'esame micologico colturale.

Ventisei di questi pazienti presentavano una sintomatologia clinicamente riferibile a candidosi orale, mentre i rimanenti 16 erano considerati asintomatici.

Il saggio IF-IgA si è dimostrato positivo nella maggior parte dei casi (1a, 2a, 3a, 4a, 5a, 10a, 10b, 12a, 14a, 15a, 19b, 20a, 28a, 29a, 33b, 33c, 35a, 35c, 36a, 38a, 39a, 40a, 41a, 42a, 42b) (Figg. 1 e 2) riferibili a pazienti con sospetta candidosi orale e negativo nella maggioranza dei soggetti asintomatici (casi 2b, 9a, 11a, 16a, 18a, 19a, 22a, 23a, 24a, 25a, 26a, 32a, 37a).

Rare e a volte intermittenti discrepanze sono state osservate in pazienti sintomatici negativi al saggio immunologico proposto (casi 6a, 7a, 20b, 20c, 27a, 33a, 35b) o in pazienti asintomatici positivi (casi 8a, 17a, 21a, 34a), rispettivamente.

Nei preparati microscopici ottenuti dai materiali clinici di alcuni pazienti con sintomatologia riferibile a candidosi orale (casi 28b, 30a, 31a) e di un paziente (caso 13a) privo di sintomatologia e con scarsa crescita colturale non è stato possibile rilevare la presenza di cellule lievitiiformi.

## DISCUSSIONE

Le IgA secretorie hanno mostrato di possedere un'elevata specificità per antigeni di origine batterica e virale e per macromolecole alimentari quali le proteine del latte (16). Molti studi hanno evidenziato la capacità delle IgA di prevenire il legame tra microor-

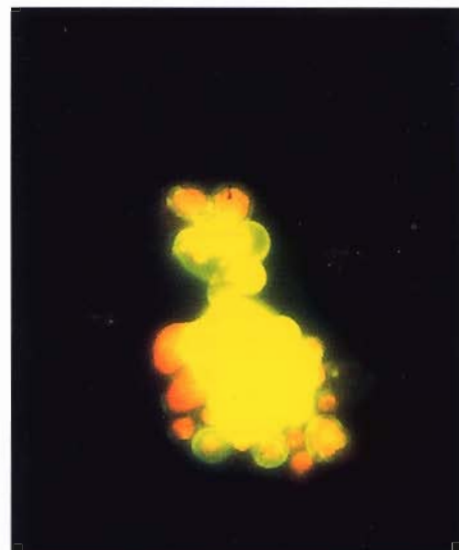


Fig. 2

ganismi e cellule epiteliali della mucosa dell'ospite (14-17). L'inibizione di tale legame svolge un ruolo di primaria importanza nella difesa immunitaria, in quanto l'adesività rappresenta un prerequisito essenziale per la colonizzazione e l'invasività da parte dei microorganismi.

L'approccio diagnostico mediante il saggio IF-IgA ha mostrato di possedere un'elevata specificità per discriminare la significatività dell'esame micologico colturale positivo in pazienti sintomatici e asintomatici clinicamente sospetti per candidosi orale.

Sebbene nella nostra esperienza il saggio IF-IgA sia stato applicato esclusivamente ai materiali clinici di pazienti con esame colturale micologico positivo, esso potrebbe essere esteso a tutti i campioni pervenuti al laboratorio, al fine di incrementare la sensibilità dell'indagine. La positività microscopica potrebbe risultare valida per allertare il clinico sulla presenza di lieviti in pazienti a rischio al fine di valutare la possibile insorgenza di candidosi.

Nonostante la maggior parte delle IgA del sistema immunitario delle mucose sia di tipo secretorio, non si può escludere che alcune possano derivare dal canale circolatorio per un aumento della permeabilità conseguente al processo infiammatorio. Ulteriori indagini sulla natura di queste immunoglobuline, secrete *in vivo*, potrebbero essere condotte utilizzando anticorpi specificamente diretti contro il componente secretorio.

Il saggio immunologico proposto si è dimostrato di facile esecuzione ed ha permesso di ottenere una risposta entro poche ore dal prelievo del campione clinico.

L'eventuale adozione di una specifica terapia antifungina ha coinciso con la scomparsa della sintomatologia e dei dati microscopici e colturali per la ricerca di miceti lievitiiformi eventualmente adesi di IgA (casi 20c, 39b). Questi risultati sembrano avvalorare l'ipotesi che una delle principali componenti del meccanismo di azione di questi farmaci



Tab. 1 - Correlazioni cliniche, sierologiche e terapeutiche in pazienti con esame colturale positivo con o senza sintomi riferibili a candidosi orale

Paziente (numero)	Data sintomi	Lievito	Crescita isolato	Saggio di in coltura	Terapia immunofluorescenza		anti fungina
					IgA	Igtot	
1a	24-01-89	+	Candida krusei	++	+	(*)	-
			C. lusitaniae	++	-	(*)	-
2a	01-02-89	+	C. albicans	+++	+++++	(*)	-
2b	28-07-89	-	C. albicans	+	-	(*)	-
3a	08-02-89	+	C. albicans	++	+	(*)	-
4a	09-03-89	+	C. albicans	+++	+++++	(*)	-
5a	09-03-89	+	C. albicans	+++	+++++	(*)	-
6a	09-03-89	+	C. albicans	+	-	(*)	-
7a	13-03-89	+	C. albicans	+	-	+	-
8a	21-03-89	-	C. albicans	+++	+++++	(*)	-
9a	15-05-89	-	C. albicans	+	-	++	-
10a	30-05-89	+	C. albicans	++	++	(*)	-
10b	24-07-89	+	C. albicans	++	++	(*)	-
11a	07-06-89	-	C. albicans	+	-	++	-
12a	22-06-89	+	C. albicans	++	+	(*)	-
13a	07-07-89	-	C. albicans	+	(**)	(*)	-
14a	25-07-89	+	C. albicans	+++	++++	(*)	-
15a	30-08-89	+	C. albicans	++	++	(*)	-
16a	23-01-90	-	C. albicans	+	-	-	-
17a	24-01-90	-	C. guilliermondii	+	++	(*)	-
18a	26-01-90	-	C. albicans	+	-	-	-
19a	26-01-90	-	C. albicans	+	-	-	-
19b	30-01-90	+	C. albicans	+	+	(*)	-
20a	31-01-90	+	C. albicans	+	+	(*)	-
20b	09-02-90	+	C. albicans	+	-	+	-
20c	16-02-90	+	C. albicans	+	-	-	+(1)
21a	31-01-90	-	C. albicans	+	+	(*)	-
22a	31-01-90	-	C. albicans	+	-	+	-
23a	31-01-90	-	C. albicans	+	-	+	-
24a	02-02-90	-	C. glabrata	+	-	-	-
25a	02-02-90	-	C. tropicalis	+	-	-	-
26a	02-02-90	-	C. tropicalis	+	-	+	-
27a	06-02-90	+	C. glabrata	++++	-	+++	-
28a	07-02-90	+	C. albicans	+	+	(*)	-
28b	22-02-90	+	C. albicans	+	(**)	+	-
29a	08-02-90	+	C. albicans	+	+	(*)	-
30a	08-02-90	+	C. albicans	+	(**)	-	-
31a	14-02-90	+	C. albicans	+	(**)	-	-
32a	09-02-90	-	C. albicans	+	-	-	-
33a	16-02-90	+	C. albicans	+	-	+	-
33b	21-02-90	+	C. albicans	+	+	(*)	-
33c	28-03-90	+	C. albicans	+	+	(*)	-
34a	23-02-90	-	Torulopsis candida	+	+	(*)	-
35a	20-02-90	+	C. albicans	+	+++	(*)	-
35b	26-02-90	+	C. albicans	+	-	-	-
35c	15-05-90	+	C. albicans	+	+	(*)	-
36a	26-02-90	+	C. albicans	+	++	(*)	-
37a	27-02-90	-	C. albicans	+	-	+	-
38a	08-03-90	+	C. albicans	+	+	(*)	-
39a	15-03-90	+	C. albicans	+	++	(*)	-
39b	27-03-90	-	-	-	-	(*)	+(1)
40a	16-03-90	+	C. albicans	++	++	(*)	-
41a	21-03-90	+	C. albicans	+	+	(*)	-
42a	22-05-90	+	C. albicans	+	+	(*)	-
42b	13-06-90	+	C. krusei	+	+	(*)	-

+ Il numero di + è riferito a dati quantitativi.  
 (\*) Saggio non riportato perchè cellule lieviformi erano positive al saggio per IgA o non erano rilevabili all'esame microscopico.

(\*\*) Cellule lieviformi non rilevabili all'esame microscopico.

(1) Terapia locale con nistatina.

sia l'inibizione dell'adesività di *C. albicans* alle cellule epiteliali della mucosa dell'ospite (18).

Un'interessante correlazione è stata evidenziata, in pazienti con sospetta candidosi orale, tra il grado di reattività immunofluorescenza ed il dato colturale semiquantitativo (casi 2a, 4a, 5a, 14a).

Il potenziale diagnostico del saggio IF-IgA in campioni clinici prelevati dalla mucosa orale si è dimostrato altamente significativo in pazienti asintomatici con esame colturale micologico positivo. In alcuni di questi casi il saggio immunologico, negativo per IgA, si è dimostrato positivo per altre classi di immunoglobuline adese *in vivo* a cellule lievitiiformi. Questi risultati sembrano evidenziare una correlazione tra il saggio proposto, la sintomatologia riferibile a candidosi orale, la guarigione clinica ed il ruolo difensivo delle IgA secretorie.

Il saggio IF-IgA può trovare una proficua applicazione per l'indagine di materiali patologici provenienti dal cavo orale di pazienti che presentino problemi di diagnosi differenziale per la concomitante infezione da agenti eziologici diversi. In pazienti presentanti una sintomatologia soggettiva, la negatività del saggio (casi 6a, 7a, 20b, 20c, 27a, 33a, 35b) potrebbe comportare la necessità di condurre ulteriori indagini atte ad accertare la responsabilità di agenti eziologici diversi evitando l'inutile impiego di antimicotici. Al contrario, la positività del saggio in soggetti asintomatici (casi 8a, 17a, 21a, 34a) potrebbe attestare l'efficacia del ruolo protettivo esercitato dalla IgA nei confronti dei miceti lievitiiformi infettanti la mucosa. Controlli supplementari sarebbero necessari per accertare la possibile reversione del saggio in assenza dell'insorgenza di sintomi.

La valutazione della significatività del saggio immunologico proposto, caratterizzato da rapidità di esecuzione e non invasività, potrebbe permettere la formulazione di corrette diagnosi cliniche e l'adozione di appropriate scelte terapeutiche.

Nei nostri Istituti è attualmente in corso una più vasta indagine, tesa a valutare il valore diagnostico del saggio proposto in gruppi selezionati di pazienti (con immunodeficienza acquisita, diabetici, nefropatici) ed il ruolo differenziale delle IgA mono e dimeriche.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 - Odds FC, Webster CE, Mayuranathan P, Simmons PD. *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *J Med Vet Mycol* 1988; 26: 277-283
- 2 - Gibbons RJ, Spinell DM, Skobe Z. Selective adherence as a determinant of the host tropisms of certain indigenous and pathogenic bacteria. *Infect Immun* 1976; 13: 238-246
- 3 - Jones SR. Antibody-coated bacteria in urine. *N Engl J Med* 1976; 295: 1380
- 4 - Mundt KA, Polk BF. Identification of site of urinary-tract infections by antibody-coated bacteria assay. *Lancet* 1979; 1172-1175
- 5 - Rubin RH, Cotran RS. Immunological aspects of urinary tract infection, with a critical survey of the antibody-coated bacteria assay. p. 128-134. In H. Losse, A.W. Asscher, and A.E. Lison (ed.), *Pyelonephritis*, vol.4: *Urinary tract infections*. George Thieme Verlag, Stuttgart, 1980
- 6 - Thomas V, Shelokov A, Forland M. Antibody-coated bacteria in the urine and the site of urinary-tract infection. *N Engl J Med* 1974; 290: 558-590
- 7 - Thomas VL, Harris RE, Gilstrap LC, Shelokov A. Antibody-coated bacteria in the urine of obstetrical patients with acute pyelonephritis. *J Infect Dis* 1975; 131: S57-61
- 8 - Thomas VL, Forland M. Antibody-coated bacteria in urinary-tract infection. *Kidney Int* 1984; 23: 1-7
- 9 - Taiwar P, Pal SR, Poonamjit K, Kaiwar R, Jayashree T, Rao MS, Vaidyanathan S. Standardization and demonstration of antibody-coated *Candida* in urine by direct immunofluorescence test. *Mycopathologia* 1986; 94: 39-44
- 10 - Kalo A, Segal E, Sahar E, Dayan D. Interaction of *Candida albicans* with genital mucosal surfaces: involvement of fibronectin in adherence. *J Infect Dis* 1988; 157: 1253-1256
- 11 - Klotz SA, Penn RL. Multiple mechanisms may contribute to the adherence of *Candida* yeasts to living cells. *Curr Microbiol* 1987; 16: 119-122
- 12 - Lehrer N, Segal E, Lis H, Gov Y. Effect of *Candida albicans* cell wall components on the adherence of the fungus to human and murine vaginal mucosa. *Mycopathologia* 1988; 102: 115-121
- 13 - Segal E. Pathogenesis of human mycoses: role of adhesion to host surfaces. *Microbiol Sciences* 1987; 4: 344-347
- 14 - Vudhichamnon K, Walker DM, Ryley HC. The effect of secretory immunoglobulin A on the *in vitro* adherence of the yeast *Candida albicans* to human oral epithelial cells. *Arch Oral Biol* 1982; 27: 617-621
- 15 - Gough PM, Warnock DW, Richardson MD, Mansel NJ, King JM. IgA and IgG antibodies to *Candida albicans* in the genital tract secretions of women with or without vaginal candidosis. *J Med Vet Mycol* 1984; 22: 265-271
- 16 - Walker WA, Wu M, Isselbacher KJ, Bloch KJ. Intestinal uptake of macromolecules. III Studies on the mechanism by which immunization interferes with antigen uptake. *J Immunol* 1975; 11: 854-861
- 17 - Harding SA, Merz WJ. Evaluation of antibody coating of yeasts in urine as an indicator of the site of urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 1975; 2: 222-225
- 18 - Vuddhakul V, McCormack JG, Seow WK, Smith SE, Thong YH. Inhibition of adherence of *Candida albicans* by conventional and experimental antifungal drugs. *J Antimicrob Chemother* 1988; 21: 755-763