



MULTIRESISTENZA AI TRIAZOLI IN CEPPI CLINICI E AMBIENTALI DI *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

A. Prigitano, V. Venier, M. Cogliati, C. Ossi, A. Grancini, A.M. Tortorano



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO
Dipartimento Scienze Biomediche per la Salute



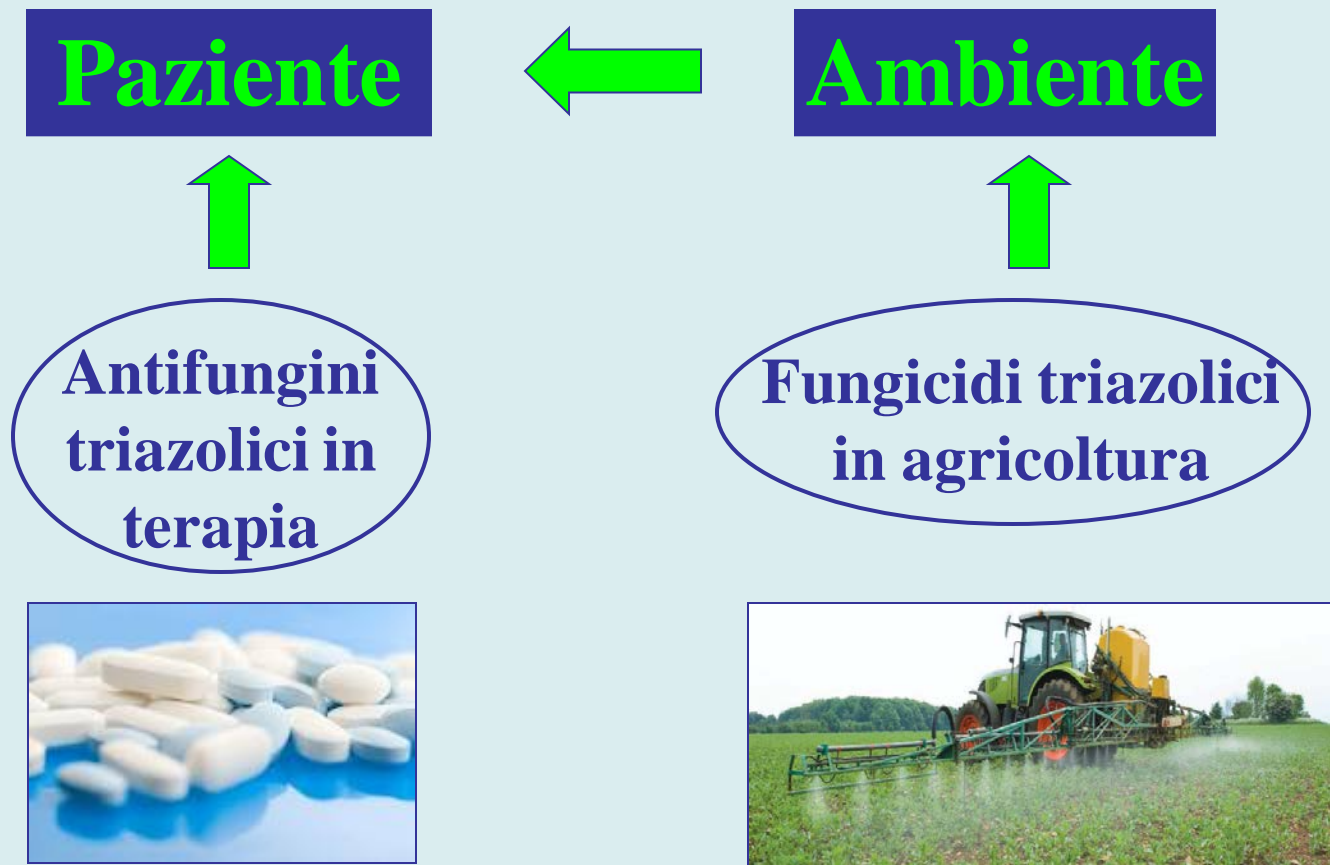


Resistenza ai triazoli in *A. fumigatus*

- Problema rilevante
- La maggioranza dei casi è stata evidenziata negli ultimi dieci anni con aumento della frequenza negli ultimi anni
- Difficile valutarne l'impatto
- Sia in pazienti in trattamento cronico sia in pazienti naïve



Sviluppo di resistenza ai triazoli in *A. fumigatus*





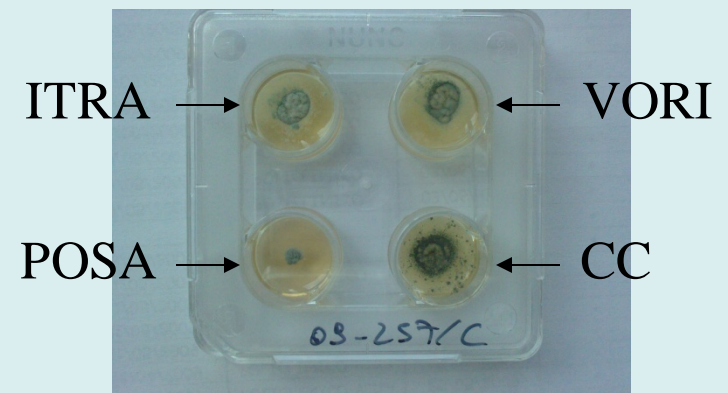
Scopo dello studio

- 1) Indagare la frequenza della resistenza ai triazoli in ceppi clinici e ambientali di *Aspergillus fumigatus* isolati in Lombardia



Ricerca di isolati clinici resistenti secondo il protocollo dello studio SCARE

- Screening di 209 ceppi clinici di *A. fumigatus* mediante l'utilizzo di piastre a 4 pozzetti contenenti terreno addizionato di itraconazolo, posaconazolo o voriconazolo in 3 pozzetti
- Valutata la crescita dopo 48 ore di incubazione a 37°C
- Raccolta di dati epidemiologici dei pazienti

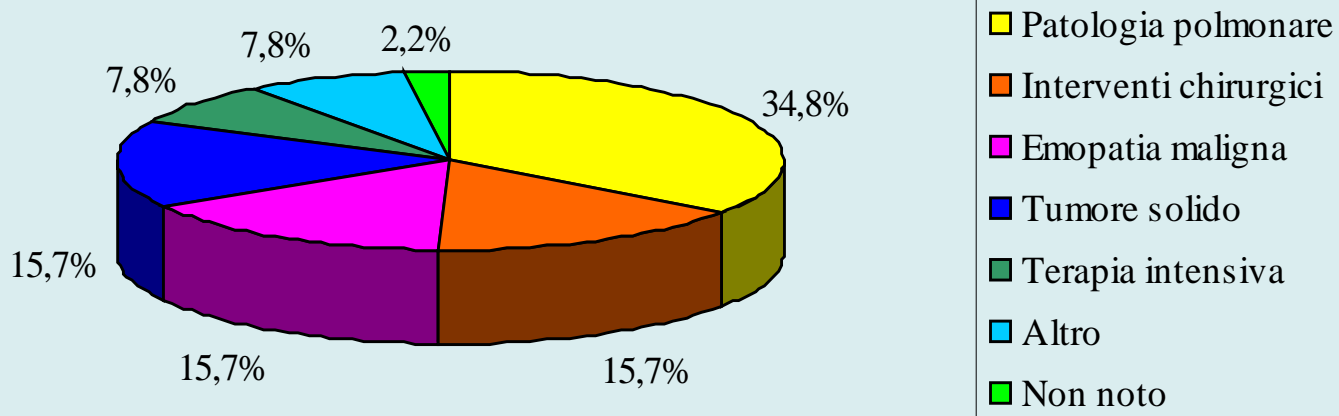




Dati clinico-epidemiologici degli 89 pazienti

53 ♂ 36 ♀

Patologia di base/fattore predisponente



Patologia aspergillare

Invasiva	11	}	23,6%
Non invasiva	7		
Aspergilloma	3		
Assente	68	⇒	76,4%



Sensibilità in vitro (metodica EUCAST) dei ceppi clinici positivi allo screening

↓

Ceppo	Crescita su piastra			MIC (mg/l) EUCAST		
	ITRA	POSA	VORI	ITRA	POSA	VORI
<u>09-0203</u>	+	+	-	>16	0,12	2
09-0248 D	+	-	-	0,12	0,06	0,5
09-0256 A	+	-	-	0,06	0,03	0,25
09-0256 B	+	-	-	0,06	0,03	0,25
09-0256 C	+	-	-	0,06	0,03	0,25
<u>09-0257 A</u>	+	+	-	>16	0,25	2
<u>09-0257 B</u>	+	+	-	>16	0,25	2
<u>09-0257 C</u>	+	+	+	>16	0,25	2
09-0701	+	-	-	0,06	0,12	1

■ R/I ■ S

Breakpoint

Itra } **R > 2mg/l**
Vori } **I = 2mg/l**
Posa **R > 0,25mg/l**
I = 0.25 mg/l

4 ceppi resistenti a ITRA e con ridotta sensibilità a VORI e POSA

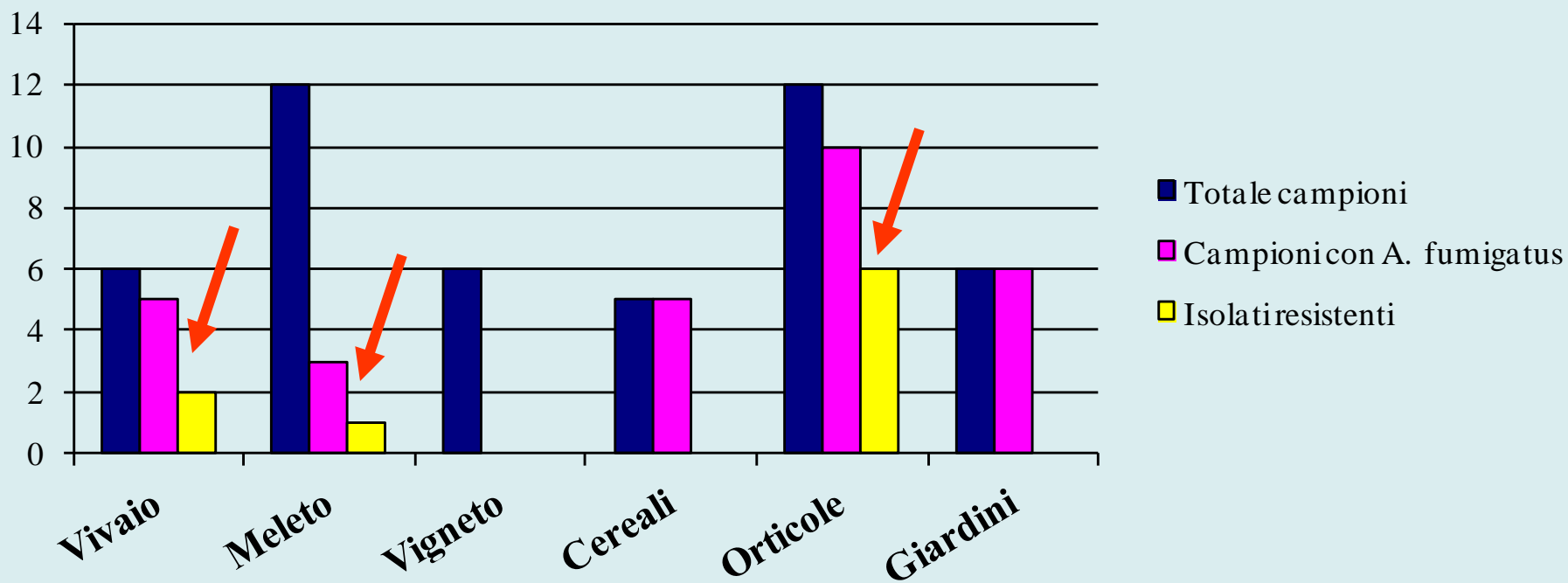


Ricerca di isolati ambientali resistenti in campioni di terra provenienti da **campi agricoli** coltivati a cereali o cucurbitacee, da **vigneti, meleti, serre florovivaistiche e giardini pubblici**

- Analisi campioni di terra mediante l'utilizzo di piastre contenenti terreno addizionato di itraconazolo (piastre senza itraconazolo per controllo crescita)
- Incubazione a 37° e 42°C
- Ogni 24 ore monitorata la crescita di colonie di *A. fumigatus* su terreno con e senza itraconazolo

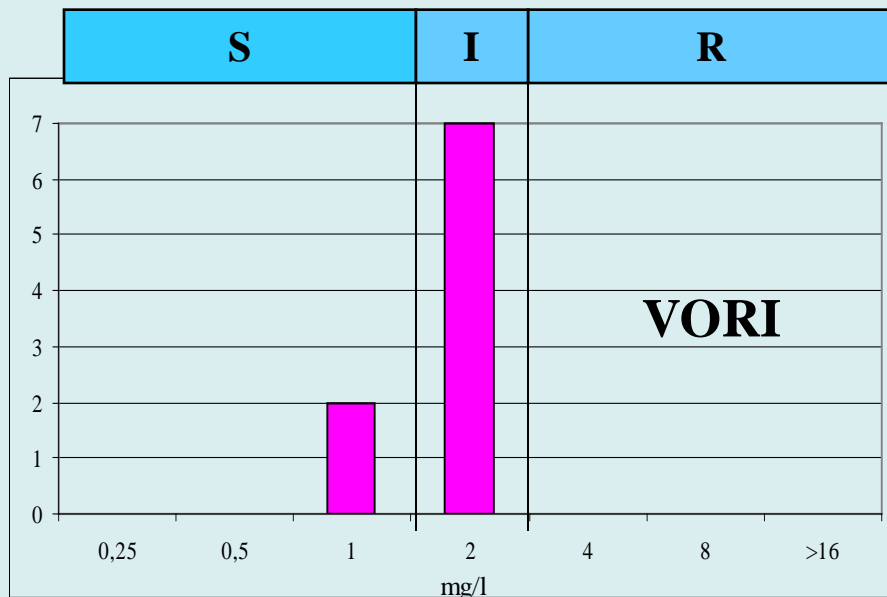
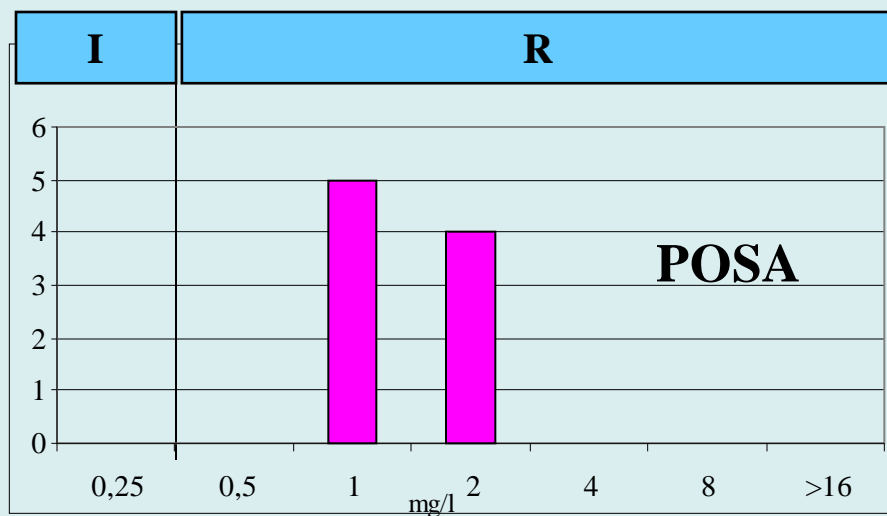
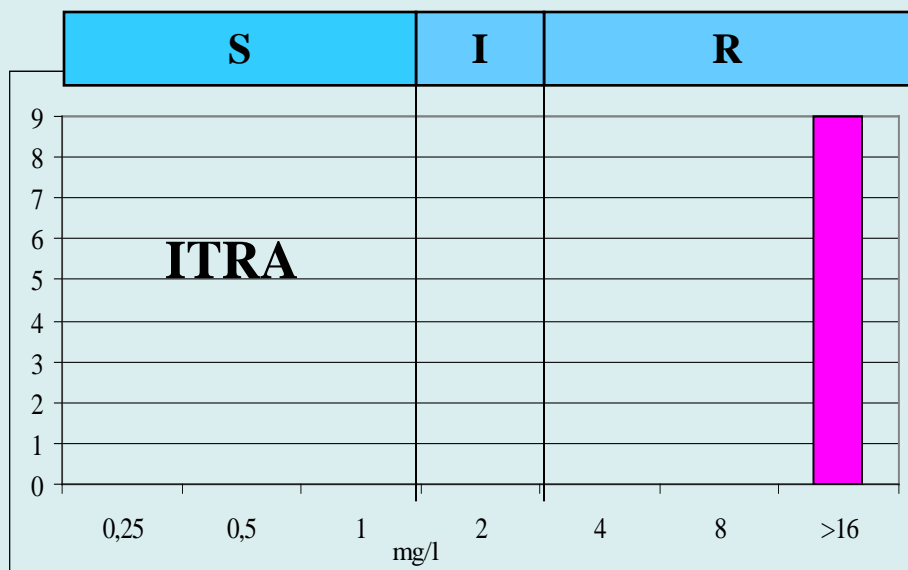


Distribuzione dei campioni di terra analizzati (47 ■),
dei campioni positivi per *A. fumigatus* (29 ■)
e dei ceppi resistenti (9 ■)





Sensibilità in vitro dei ceppi ambientali resistenti (microdiluizione in brodo secondo EUCAST)



EUCAST

9 resistenti a ITRA e
POSA

7 con ridotta
sensibilità a VORI



4 ceppi clinici e 9 ceppi ambientali resistenti

Identificazione

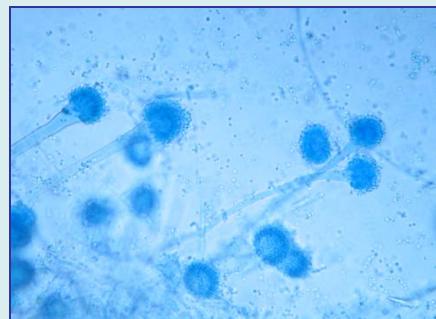
Morfologica

crescita su terreno Czapek Agar
(48-72 ore a 37°C)

Macroscopica



Microscopica



Molecolare

gene β -tubulina

- Estrazione DNA mediante kit commerciale (Applied Biosystem)
- Amplificazione con primer TubfumF-TubfumR mediante PCR
- Elettroforesi su gel d'agarosio
- Sequenziamento degli amplificati
- Confronto sequenza consensus con sequenze in banca dati per l'assegnazione della specie



Risultati

4 Ceppi clinici e 9 ceppi ambientali
resistenti

Identificazione molecolare



Aspergillus fumigatus sensu stricto



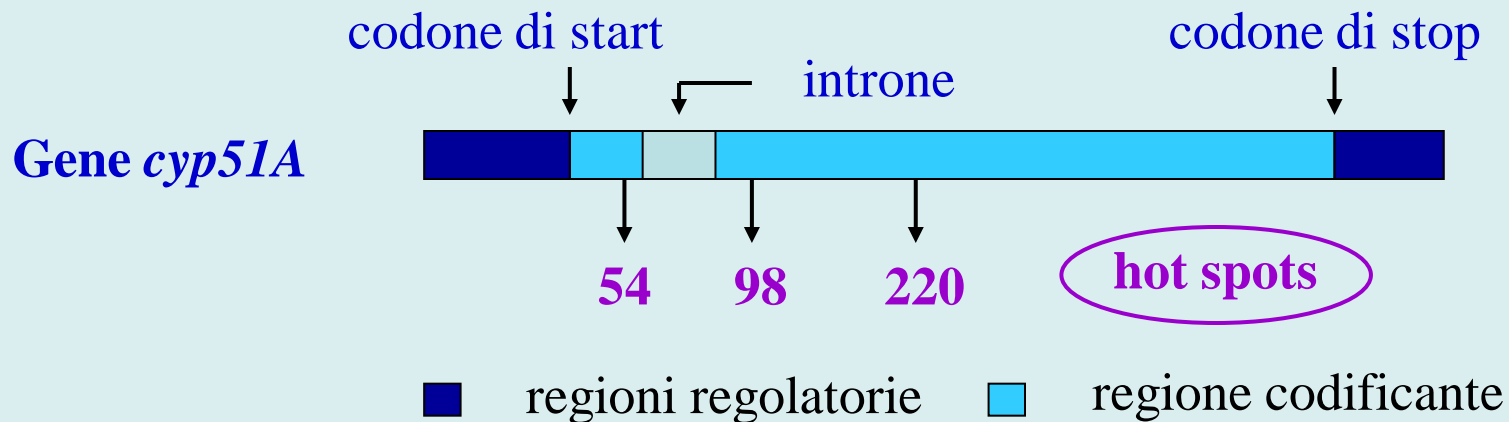
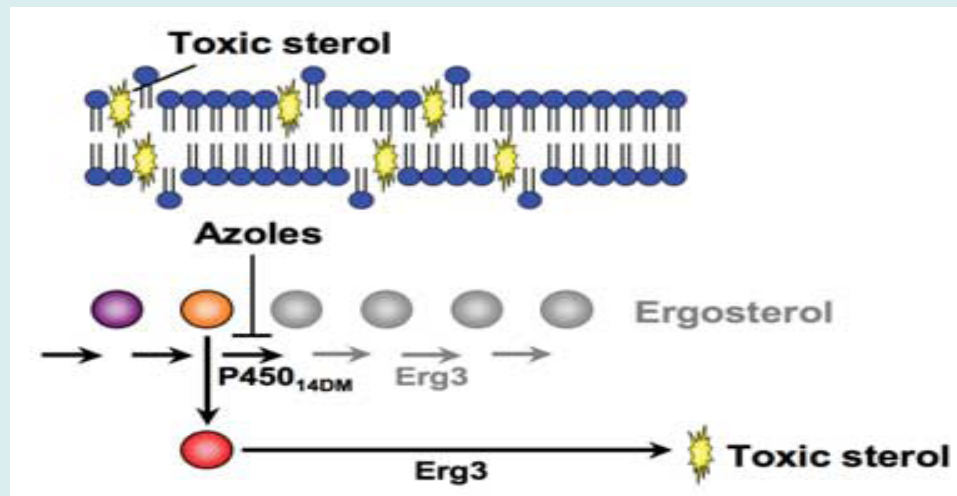
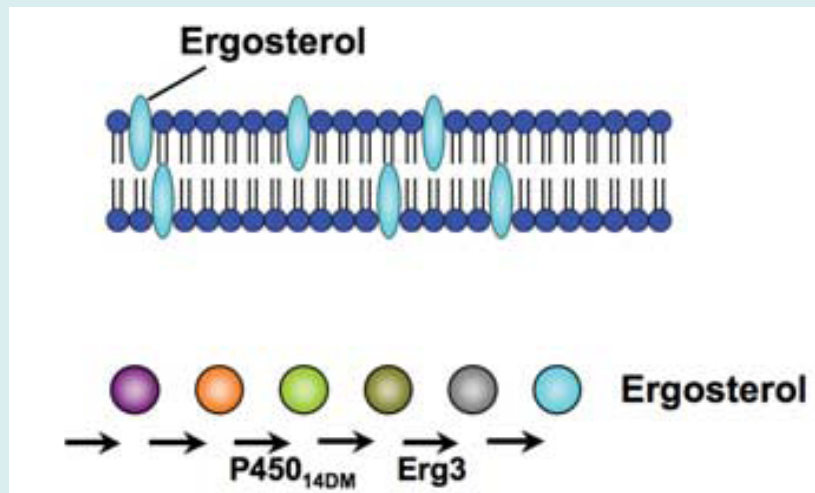
Scopo dello studio

- 2) Ricercare il meccanismo di resistenza TR/L98H nei ceppi clinici e ambientali resistenti



Triazoli e meccanismo di resistenza

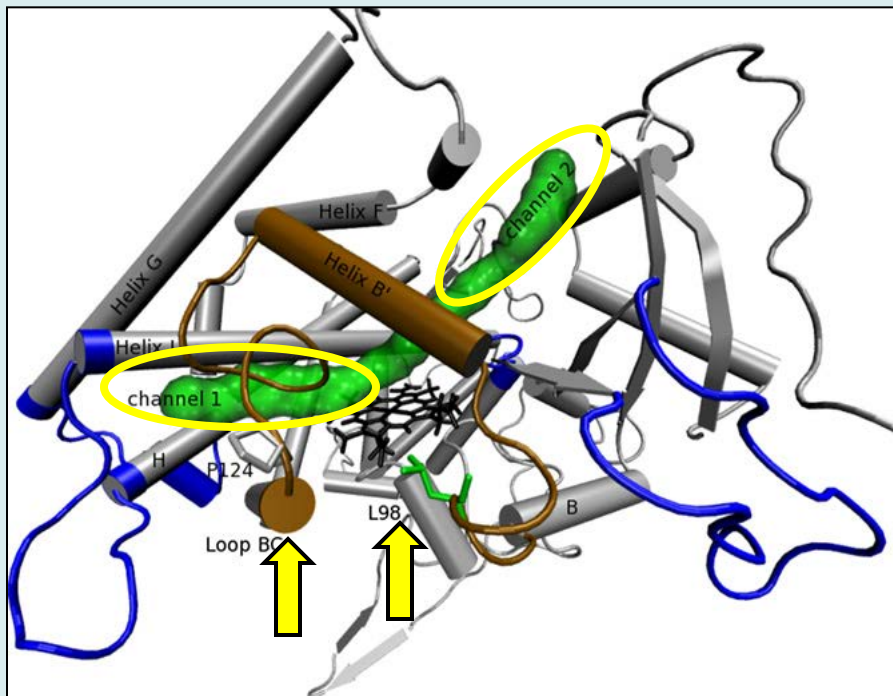
Inibiscono l'enzima 14 α -demetilasi citocromo P450 dipendente (gene *cyp51A*) coinvolto nella biosintesi dell'ergosterolo





Meccanismo di resistenza TR/L98H

Mutazione puntiforme t364a che porta alla sostituzione di leucina (L) con istidina (H) e tandem di 34 paia di basi ripetute nel promotore del gene (TR)



Dominante in Olanda:

- 94% degli isolati clinici
- 86% degli isolati ambientali



Ricerca mutazioni nel gene *cyp51A*

Regione codificante

Promotore

Estrazione DNA

Amplificazione
PCR

Primer
Cyp51AF1-Cyp51AR2

Primer PA5-PA7

Condizioni:

94°C x 5'
94°C x 30'
58°C x 45'' } 28 cicli
72°C x 1'
72°C x 7'

Condizioni:

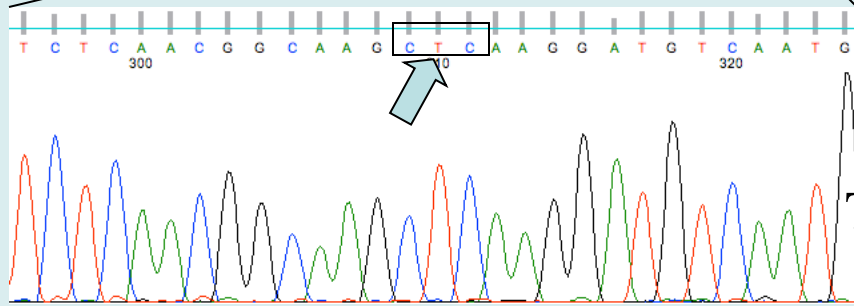
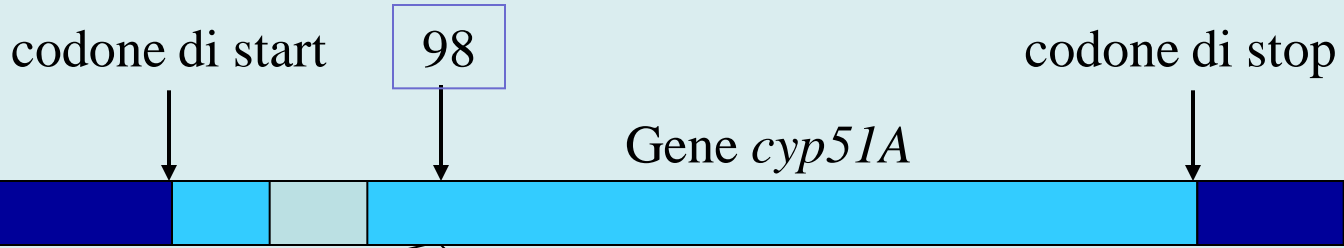
94°C x 5'
94°C x 30'
58°C x 30'' } 30 cicli
72°C x 1'
72°C x 5'

Elettroforesi su gel
d'agarosio

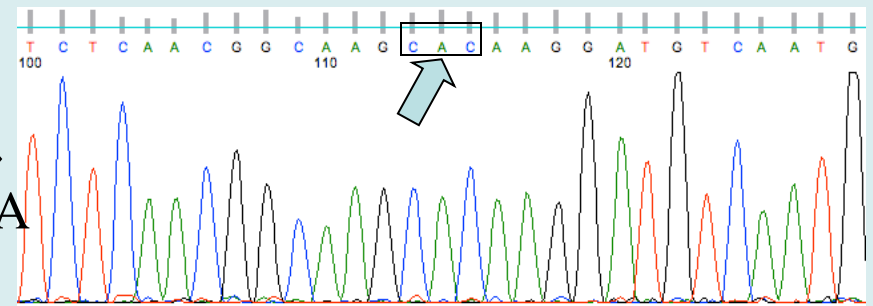
Ricerca mutazione
puntiforme **T364A**

Sequenziamento
amplificati

Ricerca **tandem repeat**



T364A

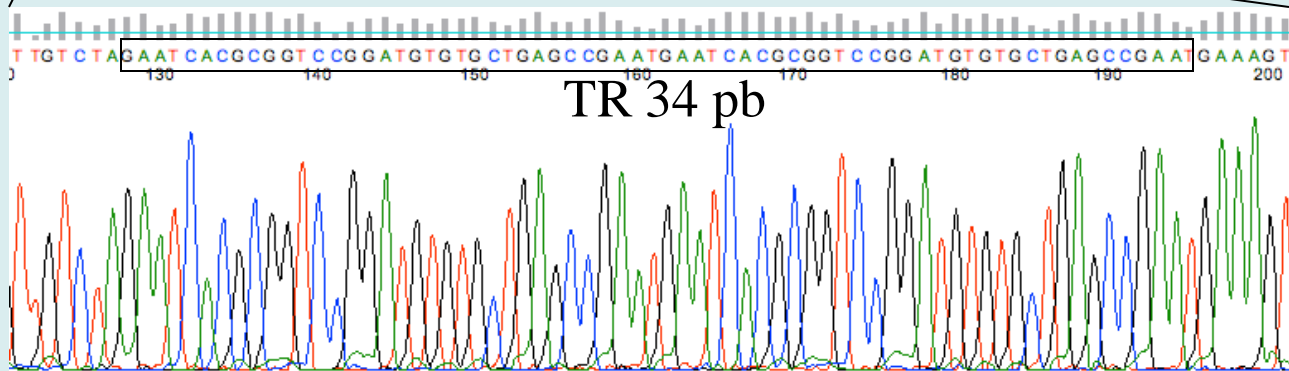
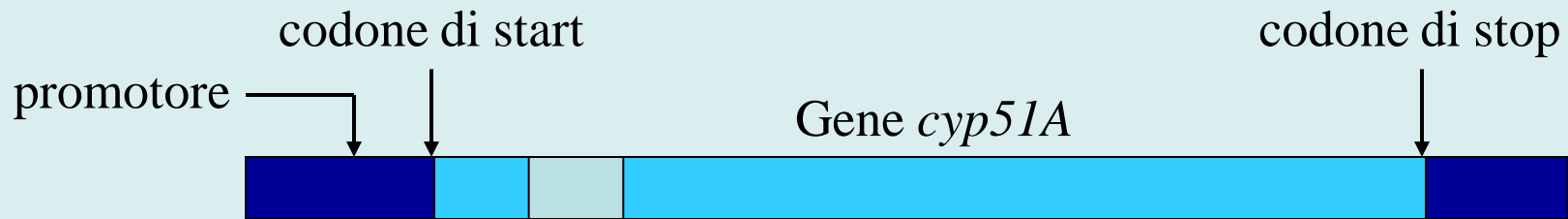


Ambientali R	87A	TCTCAACGGCAAGC C AAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATAGTCCAT
	88E	TCTCAACGGCAAGC C AAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATAGTCCAT
	99A	TCTCAACGGCAAGC C AAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATAGTCCAT
	104A	TCTCAACGGCAAGC C AAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATAGTCCAT
	104B	TCTCAACGGCAAGC C AAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATAGTCCAT
	104D	TCTCAACGGCAAGC C AAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATAGTCCAT
	317C	TCTCAACGGCAAGC C AAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATAGTCCAT
Clinici R	317D	TCTCAACGGCAAGC C AAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATAGTCCAT
	396	TCTCAACGGCAAGC C AAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATAGTCCAT
	203	TCTCAACGGCAAGC C AAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATAGTCCAT
	257A	TCTCAACGGCAAGC C AAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATAGTCCAT
Ambientali S	257B	TCTCAACGGCAAGC C AAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATAGTCCAT
	257C	TCTCAACGGCAAGC C AAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATAGTCCAT
	87C	TCTCAACGGCAAGC C AAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATAGTCCAT
104E	TCTCAACGGCAAGC C AAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATAGTCCAT	

Mutazione puntiforme in ceppi resistenti:

4/4 clinici

7/9 ambientali



Tandem repeat in ceppi resistenti:

4/4 clinici

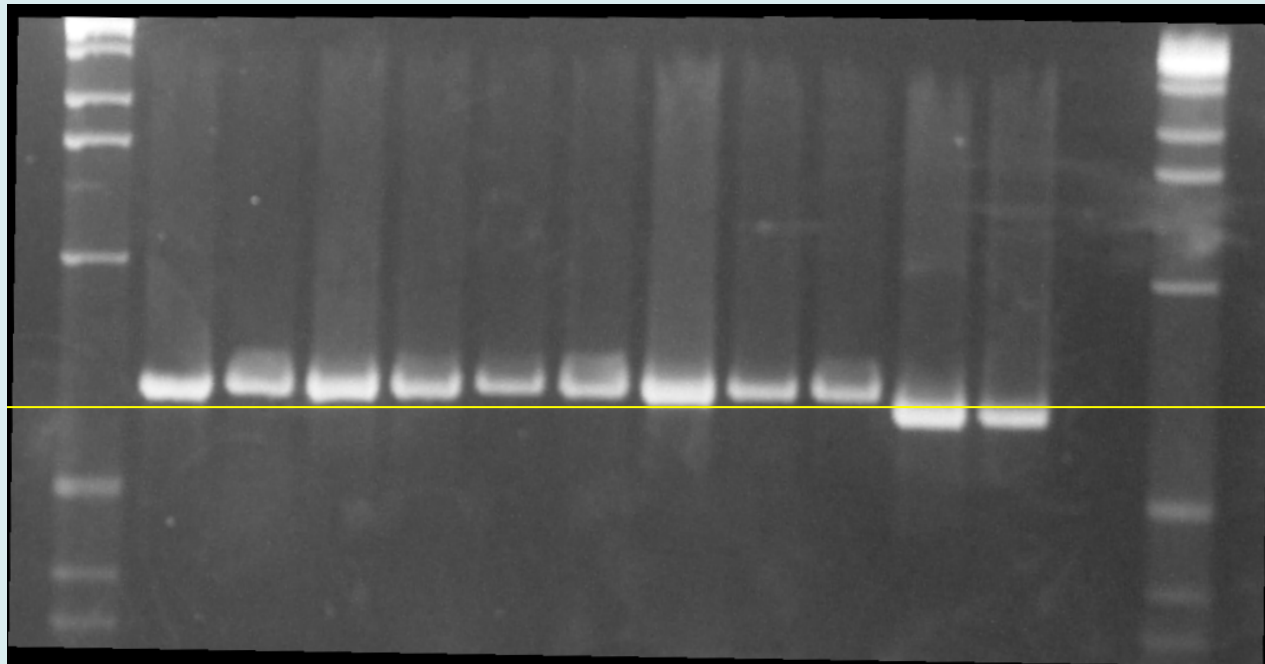
7/9 ambientali



TR+

TR-

257C 203 317C 317D 396 99A 104D 104A 87A 104E 87C





Conclusioni

Studio SCARE (isolati clinici)

- Frequenza di resistenza:
2% Italia vs 0-4,2% nei diversi Paesi
- Meccanismo di resistenza TR/L98H:
4/4 Italia; 21/39 SCARE (Olanda, Italia, Danimarca, Austria, Belgio, Francia)



Conclusioni

Resistenza nell'ambiente

- Resistenza in campioni di terra positivi per *A. fumigatus*:
17,2% (5/29) Italia vs 20,4% Olanda; 11% Danimarca
- Meccanismo di resistenza TR/L98H:
78% (7/9) Italia vs 86% Olanda; 100% Danimarca



Conclusioni

Presenza anche in Italia di ceppi clinici e ambientali di *A. fumigatus* resistenti ai triazoli (meccanismo TR/L98H dominante)

Necessarie:

- Sorveglianza della resistenza tramite saggi di sensibilità in vitro nelle pratiche di routine dei laboratori di diagnostica
- Riconsiderazione dei farmaci di prima scelta per il trattamento delle aspergillosi invasive in base alla prevalenza di resistenza
- Valutazione del rischio di induzione e/o selezione di funghi resistenti patogeni per l'uomo a seguito dell'impiego di triazoli in agricoltura



Grazie dell'attenzione

