



FIMUA

FEDERAZIONE ITALIANA MICOPATOLOGIA UMANA E ANIMALE

XIV CONGRESSO NAZIONALE FIMUA

PESARO

MERCURE HOTEL PESARO CRUISER
Viale Trieste 281

19-20 OTTOBRE 2018

PROGRAMMA SCIENTIFICO

**STUDIO ARIa: STUDIO MULTICENTRICO PROSPETTICO
SULLA RESISTENZA AGLI AZOLI IN CEPPI DI *ASPERGILLUS* ISOLATI
DA DIFFERENTI TIPOLOGIE DI PAZIENTI E CORRELAZIONE
CON CEPPI AMBIENTALI**

**A. Prigitano¹, M.C. Esposito¹, A. Grancini², A. Biffi², P. Innocenti³, C. Cavanna²,
F. Lallitto⁴, R. Bandettini⁵, C. Ossi⁶, Oltolini⁶, M. Passera⁷, A.M. Tortorano¹,
L. Romanò¹**

¹ Università degli studi di Milano

² Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico Milano

³ A.S. Alto Adige Osp. Bolzano

⁴ IRCCS S. Matteo Pavia

⁵ Istituto Gaslini IRCCS, Genova

⁶ Osp. San Raffaele Milano

⁷ ASST 'Papa Giovanni XXIII, Bergamo

La resistenza agli azoli in *Aspergillus spp* è un problema emergente in numerosi Paesi europei ed è stata riscontrata anche in Italia con l'isolamento di ceppi di *A. fumigatus* resistenti sia dall'ambiente sia da pazienti in terapia antifungina e naïve. Alla base della resistenza vi sono mutazioni puntuali di *cyp1A*, gene che codifica per l'enzima bersaglio di azoli.

Lo studio multicentrico prospettico (ARIa) ha come obiettivi: stimare la prevalenza di azolo-resistenza in aspergilli isolati da diverse forme cliniche (colonizzazione, aspergilloso cronica, aspergilloso invasiva) e in diverse tipologie di pazienti, indagare il meccanismo molecolare della resistenza, valutare la correlazione tra ceppi clinici resistenti e ceppi resistenti provenienti dall'ambiente limitrofo.

METODO. Lo studio ha coinvolto sette laboratori di microbiologia clinica del nord Italia.

I ceppi di aspergilli isolati nell'attività di routine, indipendentemente dal significato clinico, sono stati inviati al centro coordinatore (Laboratorio di micologia medica dell'Università degli Studi di Milano). Al fine di evidenziare la resistenza agli azoli, i ceppi sono stati sottoposti ad un test di screening su terreni selettivi contenenti itraconazolo (4 mg/L), posaconazolo (1 mg/L), voriconazolo (0,5 mg/L). I ceppi positivi allo screening sono stati sottoposti a microdiluzione in brodo secondo la metodica EUCAST. In presenza di resistenza fenotipica è stata eseguita l'analisi molecolare mediante sequenziamento del gene *cyp51A*. I ceppi sono stati sottoposti al sequenziamento del gene della β -tubulina per una corretta identificazione.

L'invio dei ceppi da parte dei laboratori è stato accompagnato da una scheda contenente dati in forma anonimizzata quali: materiale biologico e data di isolamento, sesso ed età del paziente, tipo di reparto, eventuale trattamento fungino nei sei mesi precedenti l'isolamento, forma di aspergilloso. I pazienti nei quali è stato isolato un ceppo fungino resistente agli azoli hanno effettuato prelievi del terreno dalle aree limitrofe al luogo di residenza e/o di lavoro. Tali campioni sono stati processati secondo la metodica di Snelders (Appl Environ Microbiol 2009; 75: 4053-7) per la ricerca di ceppi resistenti.

RISULTATI. Tra settembre 2016 e giugno 2018 sono stati analizzati 391 ceppi, isolati da secrezioni respiratorie nel 95% dei casi, da 328 pazienti. Le specie più frequentemente isolate sono state: *A. fumigatus* (68,3%), *A. flavus* (14%), *A. niger* (9,7%), *A. terreus* (6,1%).

La resistenza agli azoli è stata evidenziata nel 5,1% degli isolati e precisamente in 18 ceppi di *A. fumigatus sensu stricto* (6,7%), in uno di *A. thermomutatus* (specie criptica di *A. fumigatus*) e in un ceppo di *A. insuetus* (specie criptica di *A. ustus*). Diciannove dei 20 ceppi resistenti sono stati isolati da due laboratori: Laboratorio di Microbiologia del Policlinico di Milano con una frequenza di resistenza del 7,7% (9 resistenti/117 ceppi) e Laboratorio di Microbiologia delle Fibrosi cistiche di Milano, con una frequenza del 8,3% (10/121). Considerando i soli ceppi di *A. fumigatus*, la frequenza di resistenza sale al 10,5% (8/76) e 10,7% (10/93) rispettivamente nei due centri. Il meccanismo molecolare di resistenza dei ceppi di *A. fumigatus* è risultato TR34/L98H in 11 ceppi, F219I in 2 ceppi, D262Y e G54R in un ceppo ciascuno. Un ceppo ha presentato più mutazioni (F46Y+M172V+N248T+D255E+E427K). In un ceppo è stata osservata una mutazione non senso ed un ceppo ha presentato un meccanismo di resistenza non associato al gene *cyp51A*.

Per quanto riguarda l'ambiente, dai campionamenti effettuati negli ambulatori di fibrosi cistica sono stati isolati ceppi di *A. fumigatus* sensibili agli azoli. Dall'ambiente domestico/lavorativo di cinque pazienti e dai prelievi di terra effettuati dagli stessi, sono stati isolati ceppi di *Aspergillus non-fumigatus* e di *A. fumigatus*, non correlabili con i ceppi di *A. fumigatus* isolati negli stessi pazienti.

CONCLUSIONI. La percentuale di resistenza messa in evidenza in due centri partecipanti al progetto è risultata elevata (10,6%), superiore a quanto ritrovato in precedenti studi condotti in Italia (studio SCARE, 2%; studio retrospettivo in Lombardia, 6,9%; studio fibrosi cistiche Milano, 8,2%). È da notare che in altri centri non sono state ritrovate resistenze per *A. fumigatus*. Lo studio rimane in fase di completamento.