

# comunicazioni orali

## SESSIONE 4

### Le resistenze antibatteriche e antivirali

Giovedì 10 giugno 2004, 9.00-13.00, Sala D

---

#### CO4.1

---

#### **ANALISI MOLECOLARE DI ENTEROCOCCHI GLICOPEPTIDO-RESISTENTI D'ISOLAMENTO OSPEDALIERO NEL VENETO (2003)**

**Boldrin C., Ramon M C. °, Tommasini T.\*, Grossato A.**

°Dip. di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche [Università Padova], Lab. Analisi Chimico-cliniche e Microbiologiche dell'Ospedale di Agordo[BL],

\*Lab. di Microbiologia-Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

Questo studio è volto a valutare la diffusione della glicopeptido-resistenza tra gli enterococchi (GRE). Sono stati confrontati gli isolamenti effettuati nel 2003 presso il Servizio di Microbiologia-Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova e quelli dell'Ospedale di Agordo. In quest'ultimo ceppi GRE sono stati isolati per la prima volta. I GRE di Padova (13) provenivano prevalentemente da pazienti trapiantati (liquidi di drenaggio), mentre quelli dell'Ospedale di Agordo (7: urine da catetere, feci) erano stati isolati da anziani, ricoverati in reparti di lungo-degenza. L'identificazione di specie è stata effettuata mediante API 20strep e l'antibiotico-sensibilità saggiata sia con metodi tradizionali (Kirby-Bauer) che con microdiluzioni in terreno liquido. Il tipo di operone *van* è stato esaminato mediante PCR e la caratterizzazione molecolare eseguita con PFGE. I ceppi studiati sono risultati appartenere a 4 specie diverse: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus* con netta prevalenza di *E. faecium* (80%). Tutti presentavano fenotipo e genotipo *van A* e avevano lo stesso profilo di antibiotico-resistenza (sensibili solo a linezolid, quinupri-

stina/dalfopristina, cloramfenicolo, tetracicline). La caratterizzazione molecolare ha dimostrato che tra i ceppi di Agordo si potevano individuare tre diversi pulsotipi, di cui uno comune a quattro ceppi, isolati da pazienti diversi ma ricoverati nello stesso reparto in un breve arco di tempo. I dati anamnestici hanno rivelato che tutti i pazienti erano stati sottoposti a terapie antibiotiche (incluse vancomicina o teicoplanina). Tra gli isolati di derivazione padovana solo due ceppi presentavano profilo simile tanto da suggerire una possibile origine comune. Essi provenivano da due diversi pazienti, ospiti dello stesso reparto ma a non contemporaneamente. Poiché i pazienti da noi osservati (trapiantati, lungo-degenti) vengono considerati da autorevoli studiosi come una potenziale riserva di GRE a livello ospedaliero, la caratterizzazione molecolare è il primo passo nella prevenzione della diffusione di microrganismi di difficile eradicazione.

---

#### CO4.2

---

#### **MONITORAGGIO DEI MUTANTI RESISTENTI ALLA LAMIVUDINA NEI PAZIENTI HBV CRONICI**

**Rondinelli V.<sup>1</sup>, De Grazia R.<sup>1</sup>, Saraceno R.<sup>1</sup>, Lepore M.G.<sup>1</sup>, Masciari R.<sup>1</sup> Scerbo P.<sup>2</sup>, Scerbo A.<sup>2</sup>, Cosco L.<sup>2</sup>, Bulla F.<sup>2</sup>, Ferraro T.<sup>2</sup> Filia C.<sup>3</sup>, Vasapollo I.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Virologia e Microbiologia Azienda Ospedaliera Pugliese-Ciaccio -Catanzaro

<sup>2</sup>Malattie Infettive Azienda Ospedaliera Pugliese-Ciaccio-Catanzaro

<sup>3</sup>Microbiologia e Virologia Ospedale Jazzolino ASL N° 8 - Vibo Valentia

**Introduzione:** La terapia dell'epatite cronica da virus B (HBV) prevede, da alcuni anni, l'utilizzo della lamivudina, un analogo nucleosidico. Il prolungamento di

tale trattamento antivirale espone il paziente alla selezione di virus mutanti (comunemente noti con la sigla YMDD) capaci di determinare resistenza al farmaco e quindi un fallimento terapeutico con ricomparsa, nei casi in cui si fosse verificata un'efficace soppressione della replicazione virale, di livelli titolabili di HBV-DNA e di elevazione delle transaminasi. La percentuale di comparsa delle mutazioni è di circa il 15% durante il I° anno, di circa il 45 e il 65% rispettivamente nel II° e III° anno di terapia. I test di farmacoresistenza rappresentano dunque una necessità sia per ottimizzare il monitoraggio delle varianti mutazionali in corso di terapia sia per valutare l'opportunità di nuove e possibili opzioni terapeutiche quali l'Adefovir e l'Entecavir.

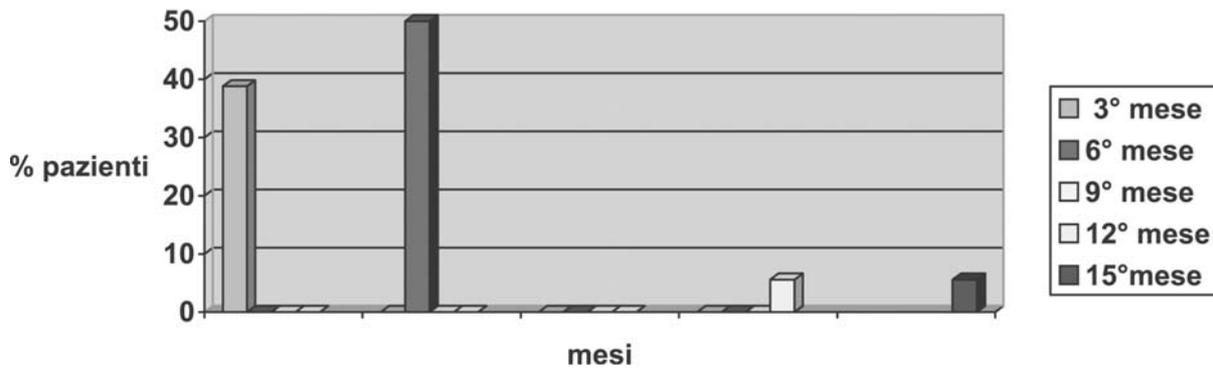
**Scopo:** Il nostro studio monitorizza la comparsa, nei pazienti con epatite cronica da HBV in trattamento con lamivudina, di mutanti resistenti e ne rileva l'incidenza; valuta la percentuale di successo terapeutico e l'impatto clinico del test di farmacoresistenza.

**Materiali e Metodi:** Nel 2002 abbiamo arruolato 30 pazienti (22 di sesso maschile ed 8 di sesso femminile, età media 38 anni) con epatite cronica da HBV eleggibili al trattamento con lamivudina alla dose di 100 mg/die per os per 18 mesi. Tale coorte comprendeva 14

soggetti già trattati con Interferone (IFN) e non responder e 16 naive ad antiretrovirali. Prima dell'inizio della terapia abbiamo eseguito il test di farmacoresistenza per escludere eventuali mutanti preesistenti. Il protocollo di studio prevedeva il controllo mensile dell'ALT, il controllo trimestrale dell'HBV-DNA e quello semestrale della farmacoresistenza. Per il dosaggio della viremia abbiamo utilizzato il kit HBV Monitor della ditta Roche. Per la rilevazione dei mutanti resistenti abbiamo utilizzato il kit INNO-LiPA HBV DR della ditta Innogenetics che prevede l'amplificazione nested dei domini B e C del gene della DNA polimerasi seguita da una reazione di ibridizzazione inversa del DNA su striscia sulla quale sono presenti 19 probes che consentono l'identificazione sia dei ceppi wild-type sia di quelli che presentano mutazioni ai codoni 528, 552 e 555. Per genotipizzare il virus abbiamo utilizzato anche il sequenziamento (TRUGENE HBV Genotyping della ditta Bayer) e la comparazione delle sequenze ottenute con quelle di consenso (genotipi A-G, software Open-Gen Systems) ha consentito di rilevare mutazioni sia nella regione dell'Antigene di superficie (SAg) che in quella della polimerasi (RT/Pol).

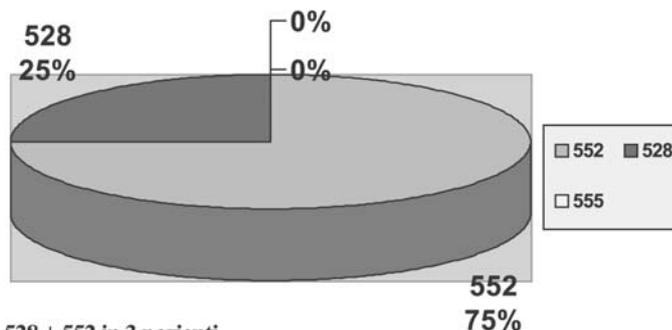
**Grafico 1**

**NEGATIVIZZAZIONE HBV-DNA**



**Grafico 2**

**% codoni di resistenza**



N.B. : 528 + 552 in 3 pazienti

**Risultati:** Al termine dello studio, in 18 (60%) dei 30 pazienti arruolati l'HBV-DNA non è stato rilevabile: 7 (38,8%) non sono stati viremici già al 3° mese, 9 (50%) al 6° mese, 1 (5,6%) al 12° ed infine 1 (5,6%) al 15° mese (vedi grafico 1) con normalizzazione dell'ALT che ha sempre preceduto la negativizzazione dell'HBV-DNA. Non sono state riscontrate negativizzazioni al 9° mese. In 7 pazienti, in seguito, abbiamo apprezzato una ripresa della viremia per insorgenza di farmacoresistenza. In 12 pazienti, invece, l'HBV-DNA è risultato persistentemente titolabile.

Complessivamente sono stati rilevati, con significativa ricomparsa della viremia, 12 casi di mutanti resistenti alla lamivudina di cui 5 (41,7%) appartenenti ai 12 pazienti non-responder e 7 (58,3%) ai 18 inizialmente considerati tutti responder. La mutazione sul codone 552 è stata riscontrata in 9 pazienti (75%) mentre quella sul codone 528 in 3 (25%). Nessuna mutazione ha coinvolto il codone 555. Interessante il dato che in tre pazienti sono state rilevate bande di mutazione sia nel codone 528 che nel 552 (vedi grafico 2). In un paziente relapser il test di ibridizzazione su striscia ha messo in evidenza la presenza di ceppi mutanti prima del test di genotipizzazione tramite sequenziamento.

**Discussione e conclusioni:** L'analisi dei risultati ci consente alcune considerazioni:

- la negativizzazione della viremia nei pazienti in trattamento con lamivudina si verifica soprattutto nel secondo trimestre dall'inizio della terapia;
- il fallimento terapeutico riguarda, tra non-responder e relapser, 19 pazienti (circa il 64%);
- il fallimento terapeutico non è necessariamente imputabile all'insorgenza di mutazioni: 7 pazienti su 12 intrinsecamente non rispondono al trattamento con lamivudina;
- il successo terapeutico, al termine dei 18 mesi di protocollo, riguarda 11 pazienti (circa 36%);
- il test di ibridizzazione è in grado di rilevare precocemente la presenza di mutanti forse anticipandone la rilevazione tramite sequenziamento;
- il test di farmacoresistenza è uno strumento importante per il clinico in quanto consente anche una corretta valutazione delle opzioni terapeutiche.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aberle SW, Kletzmayr J, Watschinger B, et al. Comparison of sequence analysis and the INNO-LiPA HBV DR line probe assay for detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus strains in patients under various clinical conditions. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001: May, 1972-74
2. Pas SD, De Man R, Fries E, et al. Can we efficiently detect YMDD variants of hepatitis B virus during lamivudine therapy? 5<sup>th</sup> Annual Meeting of the ESCV, 2001, September, Finland.
3. Niesters GM, Pas SD, Wolters L, et al. The use of accurate measurement of HBV DNA in combination with the INNO LiPA HBV resistance during lamivudine treatment: implications for disease management. 51<sup>st</sup> American Association for the Study of Liver Diseases 2000, October: Vol. 32, n° 4.
4. Sablon E., Yuen M.F, Decraemer H, et al. Early and sensitive detection of drug resistance-associated mutations in Hepatitis B infected patient during lamivudine therapy: the INNO-LiPA HBV DR assay proves to be superior to direct sequencing. 52<sup>nd</sup> American Association for the Study of Liver Diseases 2001, November: Vol. 34, n° 4.