

TEM ed SHV; le principali sono gli enzimi di tipo PER, GES/IBC e VEB), ESBL di classe molecolare D (ad es. OXA-10, OXA-18), e le carbapenemasi a zinco di tipo IMP, VIM, SPM e GIM.

Queste ultime destano particolare preoccupazione a causa del loro spettro di substrati estremamente ampio (che include praticamente tutti i β -lattami ad eccezione dei monobattami) e della loro insensibilità agli inibitori enzimatici attualmente disponibili.

In *Acinetobacter*, infine, la resistenza acquisita ai carbapenemi può essere mediata dall'acquisizione di carbapenemasi a serina di classe D (ad es. OXA-23, OXA-24) o di carbapenemasi a zinco di tipo IMP o VIM, che rappresentano i principali tipi di β -lattamasi acquisite emergenti in queste specie.

La disseminazione dei geni per le ESBL e le carbapenemasi che attualmente circolano nei patogeni Gram-negativi è dovuta alla loro associazione con elementi genetici mobili di varia natura (plasmidi coniugativi, trasposoni, cassette genetiche mobili inserite in integroni), che possono permettere più livelli di mobilitazione, e alla espansione clonale dei ceppi che hanno acquisito il gene di resistenza.

La rilevazione dei ceppi produttori di ESBL e di carbapenemasi acquisite rappresenta un aspetto molto importante nel laboratorio di batteriologia clinica, sia a scopo diagnostico sia per la sorveglianza epidemiologica di questi geni di resistenza.

Il fenotipo di resistenza può essere suggestivo per la produzione di alcuni di questi enzimi, ma non è un indicatore sufficientemente sensibile e specifico.

Numerosi test fenotipici sono attualmente disponibili per la rilevazione dei ceppi produttori di ESBL e di carbapenemasi a zinco.

L'identificazione precisa del gene di resistenza richiede tuttavia l'impiego di indagini molecolari.

S4.5

DETERMINAZIONE DELLA FARMACORESISTENZA DI HIV

Menzo S.

Istituto di Microbiologia, Università di Ancona

Dopo alcuni anni dall'introduzione delle terapie antiretrovirali di combinazione con più classi di farmaci, è ormai chiaro che l'obiettivo di eradicare con questi l'infezione da HIV è irrealizzabile.

Per quanto potente possa essere l'azione antivirale, è stato dimostrato che *in vivo* rimane sempre una residua replicazione virale che, con il tempo, selezionerà varianti resistenti ai farmaci utilizzati.

In un tempo variabile di alcuni anni, che dipende dalle caratteristiche dei composti utilizzati, dalla precedente storia terapeutica di ogni paziente (e eventualmente del

suo virus anche prima dell'infezione) e dalla sua aderenza alla terapia, sembra inevitabile che il virus diventi resistente a tutte le classi di farmaci antiretrovirali attualmente disponibili.

Per questo motivo rilevare precocemente l'insorgere di virus resistenti è della massima importanza, per poter gestire razionalmente la terapia in ogni soggetto a livello del singolo paziente ma anche a livello di popolazione.

Gli strumenti tecnici per assolvere a questo compito non mancano, e si avvalgono di una duplice metodologia.

Da una parte lo studio del genotipo virale, inteso come sequenziamento del genoma virale ed interpretazione delle combinazioni di mutazioni associate a resistenza, dall'altra l'analisi fenotipica, ossia lo studio del virus isolato dai pazienti (o di chimere ricombinanti con porzioni genomiche amplificate *ex vivo*) e cimentato *in vitro* con i farmaci.

Quest'ultimo approccio è complesso, molto più laborioso, non è eseguibile nella maggior parte dei laboratori di virologia diagnostica e è perciò estremamente costoso.

Tuttavia il suo impiego è indispensabile per la comprensione della funzione biologica delle mutazioni di resistenza e per gettare le basi dell'interpretazione genotipica.

Al momento è anche l'unico metodo per determinare la capacità replicativa conferita dalle sequenze mutate e il potere patogeno dei virus resistenti.

In questo scenario il nostro gruppo ha svolto diversi studi per caratterizzare le relazioni tra le sequenze virali mutate isolate *in vivo* e la funzione biologica delle proteine da esse codificate.

Abbiamo messo a punto metodi di ingegneria genetica che permettono l'inserzione nello scheletro del clone molecolare virale NL4-3, opportunamente modificato, di sequenze esogene relative al gene pol o al gene env. Inoltre, esperimenti di mutagenesi sito-diretta hanno evidenziato il ruolo di specifici residui aminoacidici sul fenotipo conferito al virus ricombinante e la possibilità di modulare la capacità replicativa di varianti mutagenizzate *in vitro*.

L'insieme dei dati fenotipici accumulatosi negli anni da parte di diversi laboratori ha permesso una migliore comprensione dei meccanismi molecolari che sono alla base della selezione delle mutazioni.

Nella prospettiva di una continua rincorsa farmacologica ai virus resistenti con l'introduzione di nuovi composti antiretrovirali (appartenenti sia a nuove che a vecchie classi) gli studi fenotipici rappresentano uno strumento indispensabile per valutarne l'efficacia antiretrovirale su ceppi virali multiresistenti e ottimizzare fin dall'inizio il loro impiego.