



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

**Antibiotici derivati da insetti:
attività contro un microrganismo difficile**

**Bioactive compounds from insects: antimicrobial activity
against a recalcitrant microorganism**

Relatore:
Chiar.mo Prof.
ANDREA GIACOMETTI

Tesi di Laurea di:
GIULIA CIOTTI

A.A. 2025/2026

INDICE

1.ABSTRACT	5
2.INTRODUZIONE	5
2.1 CARATTERISTICHE GENERALI DI STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA	5
MICROBIOLOGICHE	5
IL BIOFILM	6
ENZIMI IDROLITICI	9
LIPOPOLISACCARIDE	9
2.2 NOTE CLINICHE	10
2.3 TRATTAMENTI CLASSICI ED INNOVATIVI	11
TRATTAMENTO	13
ANTIBIOTICI	14
ALTRI TRATTAMENTI	15
2.4 LA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI	16
β -LATTAMASI	16
POMPE DI EFFLUSSO	18
2.5 IL BIOFILM	19
FORMAZIONE DEL BIOFILM	19
COMPOSIZIONE DEL BIOFILM	21
ESOPOLISACCARIDI	22
PROTEINE	23
DNA EXTRACELLULARE	24
TOLLERANZA E RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI DA PARTE DEL BIOFILM	25
ETEROGENEITA' E INTERAZIONI	26
QUORUM SENSING	27
IMPORTANZA MEDICA DEL BIOFILM	28
TRATTAMENTO BIOFILM	29
2.6 GLI ANTIBIOTICI PEPTIDICI	30
RUOLO BIOLOGICO DEGLI AMPs	30
CLASSIFICAZIONE DEGLI AMPs	31
MECCANISMI D'AZIONE DEGLI AMPs	32
GLI AMPs COME AGENTI TERAPEUTICI	36
IL PEPTIDE CAMEL	39
3.SCOPO DELLA TESI	42
4.MATERIALI E METODI	43
4.1 CEPPI BATTERICI	43
4.2 CAMEL E ANTIBIOTICI	43
4.3 DETERMINAZIONE DELLA MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC) DEL CAMEL .	43
4.5 TEST TIME-KILL	44
4.6 TEST CHECKERBOARD	45
4.7 BIOFILM	46
5.RISULTATI.....	46

5.1	DETERMINAZIONE DELLA MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC)	46
5.2	TEST TIME-KILL	47
5.3	TEST CHECKERBOARD	47
5.4	ATTIVITA' ANTI-BIOFILM	48
6.DISCUSSIONE		49
7.CONCLUSIONI		52
BIBLIOGRAFIA		53

1.ABSTRACT

Lo studio valuta il peptide antimicrobico CAMEL come possibile opzione innovativa contro lo *Stenotrophomonas maltophilia*, un patogeno opportunista multiresistente produttore di biofilm.

Sono stati analizzati 10 ceppi clinici identificati con VITEK; la MIC del CAMEL è stata determinata con microdiluizione, mentre su 4 ceppi sono stati eseguiti time-kill, checkerboard e test anti-biofilm.

Il CAMEL ha mostrato attività inibente su tutti i ceppi con MIC 2-32 mg/L (MIC₅₀ 4 mg/L; MIC₉₀ 16 mg/L). Nei time-kill si osserva un effetto iniziale rapido a 2–4×MIC ma non mantenuto nel tempo. I checkerboard con antibiotici di uso clinico hanno evidenziato prevalente indifferenza senza sinergia né antagonismo.

Il CAMEL ha inoltre ridotto la biomassa di biofilm di circa 2-20% a 0,25-0,5×MIC.

In conclusione, CAMEL risulta attivo in vitro contro *S. maltophilia* e mostra un effetto anti-biofilm moderato, ma serviranno ulteriori studi per definire stabilità, ottimizzazione e potenziale traslazione clinica.

2.INTRODUZIONE

2.1 CARATTERISTICHE GENERALI DI STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA

MICROBIOLOGICHE

Stenotrophomonas maltophilia è un batterio ambientale, Gram-negativo, non fermentante e multiresistente, patogeno opportunista non particolarmente virulento, ma degno di nota in quanto emergente e associato ad importante morbilità e mortalità in alcune categorie di pazienti, come quelli fortemente debilitati. [1]

S. maltophilia è un bacillo aerobio obbligato, dotato di alcuni flagelli polari che gli conferiscono motilità. La sua capacità di produrre acido dal maltosio ma non dal glucosio è stata usata per distinguere questo germe da *Pseudomonas aeruginosa*, il quale produce acido dal glucosio ma non dal maltosio e lattosio.

Le colonie di *S. maltophilia* appaiono lisce, circolari e verdi, e caratteristicamente distinguibili da altri batteri Gram-negativi. Varie tecniche di biologia molecolare vengono

utilizzare per identificare i diversi ceppi di *S. maltophilia*, come l'amplificazione tramite PCR del gene dell'RNA 16S, prevalentemente utilizzata nei campioni di sangue di pazienti sottoposti a chemioterapia per leucemia acuta o sindrome mielodisplastica [2].

Questo batterio è ampiamente diffuso in natura, essendo stato descritto come ubiquitario e isolato in diversi contesti ambientali e clinici [3]. È stato inoltre rinvenuto in ambienti estremi, inclusi quelli antartici [4]. In particolare, numerosi studi ne hanno documentato la presenza nel suolo e nella rizosfera [5], così come in diverse fonti acquatiche, sia in ambito ospedaliero che extraospedaliero [3].

La trasmissione può avvenire per contatto diretto con la fonte, tramite aerosol generati da pazienti affetti da fibrosi cistica e attraverso le mani del personale sanitario nelle unità di terapia intensiva [6].

I principali elementi di patogenicità di *S. maltophilia* sono: il lipopolisaccaride [3], i siderofori [7], una tossina zonula occludens like (zot) trasportata da un fago [8, 9], la produzione di enzimi idrolitici, come le β -lattamasi cromosomiche L1 e L2, molteplici sistemi di efflusso multidrug e la capacità di formare facilmente biofilm sia su superfici abiotiche sia sui tessuti dell'ospite [10].

A causa dei meccanismi di resistenza intrinseca ed acquisita agli antibiotici il trattamento delle infezioni sostenute da *S. Maltophilia* rappresenta una sfida clinica rilevante [10].

II BIOFILM

Un aspetto significativo di *S. maltophilia* è la sua capacità di produrre biofilm in vari tipi di superfici inclusi Teflon, vetro, plastica e tessuti dell'ospite. [11]

S. maltophilia può formare biofilm in varie superfici che possono essere a contatto diretto o indiretto con il paziente come impianti idrici, tubi di ventilazione, cateteri, strumenti per la dialisi, deflussori per la terapia endovenosa, scarichi di lavandini domestici [12].

In questo contesto il biofilm assume una rilevanza particolarmente significativa in quanto è ritenuto responsabile del 65% delle infezioni acquisite in ospedale [13].

Studi condotti con il microscopio elettronico a scansione (SEM) evidenziano come *S. maltophilia* SM 33 sia capace di aderire alle superfici di polistirene entro 2 ore dall'inoculazione e possa formare biofilm in 24 ore.

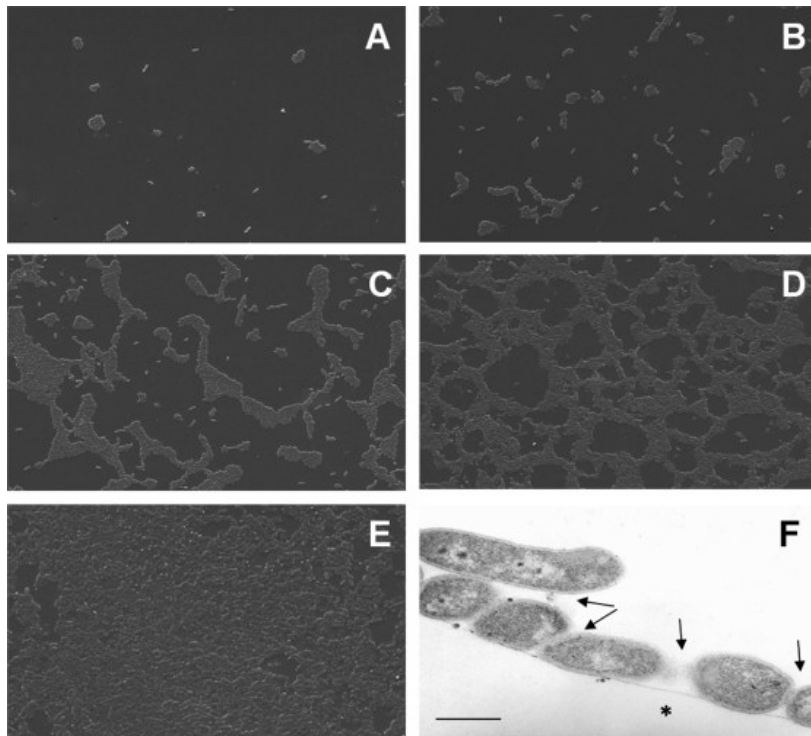


Figura 1 (Da A a E) Micrografie elettroniche a scansione di biofilm SM33 di *S. maltophilia* formati su superfici di polistirene rispettivamente a 2, 4, 8, 16 e 24 ore. Ingrandimenti, $\times 1.000$ (da A a D) e $\times 2.000$ (E). (F) Microfotografia elettronica a trasmissione di un biofilm di 24 ore prodotto da *S. maltophilia* SM33. Le frecce indicano il glicocalice che circonda i batteri. L'asterisco indica la linea limite del biofilm a contatto con la superficie di polistirene. [3].

Una delle prime fasi nella formazione del biofilm è l'adesione delle cellule batteriche ad una superficie. Studi *in vitro* hanno dimostrato che in questa fase, per l'adesione di *S. maltophilia* su un monostrato di cellule HEP-2 (cellule epiteliali di carcinoma della laringe umana utilizzate per la diagnostica di laboratorio per la ricerca di autoanticorpi), sembra essere cruciale il ruolo della fimbria 1 (SMF-1), identificata con TEM, SEM ad alta risoluzione e immunogold labeling (IGS) [11]. A conferma di ciò è stato evidenziato che l'adesione alle cellule eucariotiche è inibita da anticorpi anti SMF-1, efficaci soprattutto nelle prime fasi (prima mezz'ora) dell'infezione [11].

La formazione di biofilm è influenzata da numerosi fattori come: fosfati [14], cloruro [15], pH, temperatura, ossigeno [16], ioni di rame e argento [17].

Altre variabili che concorrono alla formazione e alla persistenza di biofilm sono le caratteristiche proprie dei batteri, come l'antibiotico resistenza; infatti, ceppi di *S. maltophilia* MDR (multi drug resistant) si sono dimostrati in grado di produrre una quantità di biofilm maggiore rispetto ai NMDR (non- multi drugs resistant). Lo studio che conferma

la precedente affermazione ha preso in esame 70 *S. maltophilia* isolati clinici, individuando, nella caratterizzazione del biofilm, una densità ottica media a 540 nm [OD540] di 0.52 per i MDR e di 0.15 per i NMDR. La formazione di biofilm è risultata essere correlata alla resistenza al ceftazidime, cefepime, ticarcillina- acido clavulanico, piperacillina tazobactam, aztreonam e gentamicina e non è correlata con la resistenza a ciprofloxacina, levofloxacina, trimetophrim-sulfametossazolo (SXT) e meropenem [18].

La formazione del biofilm da parte dello *Stenotrophomonas maltophilia* è un processo complesso e multifattoriale, nel quale sono coinvolti diversi determinanti genetici. In particolare, numerosi studi hanno evidenziato il ruolo di specifici geni associati alla capacità di adesione, maturazione e regolazione del biofilm, tra cui *spgM*, *rmlA*, *smf-1* e *rpfF* [19].

La formazione del biofilm in *S. Maltophilia* presenta una significativa variabilità fenotipica, che si manifesta con ceppi caratterizzati da capacità di produzione del biofilm debole, moderata o elevata. Tale variabilità suggerisce che la sola presenza di determinanti genetici non sia sufficiente a determinare il fenotipo di biofilm, ma che quest'ultimo dipenda anche da complessi meccanismi di regolazione dell'espressione genica e da fattori ambientali [19].

Il biofilm costituisce un importante fattore di tolleranza antimicrobica, in quanto la matrice extracellulare ostacola la diffusione degli antibiotici e può contribuire alla loro inattivazione. Le elevate concentrazioni cellulari e le condizioni di stress caratteristiche del biofilm, come lo stress ossidativo, favoriscono l'insorgenza di mutazioni e facilitano i meccanismi di trasferimento orizzontale dei geni [10].

I microrganismi presenti nel biofilm possiedono una maggiore capacità di resistere a condizioni ambientali sfavorevoli rispetto alle cellule planctoniche, tollerando più efficacemente carenze nutrizionali, alterazioni del pH e stress ossidativo [10].

Alcuni antibiotici testati a una concentrazione inferiore alla MIC hanno dimostrato efficacia nel ridurre l'adesione e la formazione di biofilm da parte di *S. maltophilia*. Uno studio su 20 *S. maltophilia* produttori di biofilm isolati in clinica ha rilevato che alla metà della MIC, tutti i fluorochinoloni testati (ciprofloxacina, grepafloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, e rufloxacina) hanno ridotto in modo significativo

(P 0.01) la massa di biofilm dello *S. maltophilia*, e a un quarto della MIC, hanno ridotto la massa di biofilm (ad eccezione della levofloxacina) [20]. La moxifloxacina è risultato essere il più efficace fluorochinolone nel prevenire l'adesione dello *S. maltophilia* e nel ridurre il biofilm preformato. Infatti, questi antibiotici sono risultati efficaci (con l'eccezione della norfloxacina) anche nel ridurre il biofilm già formato. Il trattamento con 500 µg/mL di moxifloxacina ha eradicato la massa di biofilm nel 50% degli isolati di *S. maltophilia* e ha ridotto del 95% la biomassa per il 60% degli isolati di *S. maltophilia*. [20].

ENZIMI IDROLITICI

S. maltophilia ha la capacità di produrre enzimi extracellulari inclusi proteasi, lipasi, esterasi, DNase, RNase, e fibrolisina [21] ed è capace di espletare attività citotossica [22].

Tra i principali enzimi extracellulari di *Stenotrophomonas maltophilia* si trova la proteasi secretoria StmPr1, caratterizzata in particolare da flessibilità e stabilità termica, influenzate dalla presenza di specifiche strutture secondarie, come foglietti β e α -eliche esposte sulla superficie della proteina. Inoltre, possiede un loop tra β 1 e α 5 coinvolto nella protezione dall'azione degli inibitori. Queste caratteristiche evidenziano un significativo adattamento evolutivo di StmPr1 e ne sottolineano il ruolo come importante fattore di virulenza di *S. maltophilia* [23].

LIPOPOLISACCARIDE

S. maltophilia, come tutti i batteri Gram negativi, è dotato di un lipopolisaccaride (LPS) che contiene lipide A, core oligosaccaridico ed antigene O, e rappresenta un importante fattore di virulenza. La carica e l'incompletezza dell'LPS sono in grado di influenzare la virulenza di questo batterio. Mentre un LPS carico influenza l'adesione batterica interagendo con le cariche positive presenti negli strati cellulari più profondi [24], un LPS non carico, combinato all'assenza di proteine nella membrana esterna, conferisce alla superficie batterica una carica netta positiva e di conseguenza una maggiore abilità di aderire a teflon e vetro [25].

Il LPS incompleto altera la produzione di biofilm [26], infatti un'anomalia nel LPS (assenza di spgM, importante per l'assemblaggio dell'antigene O) è responsabile della

riduzione dell'infezione in modelli di polmone di ratto, fornendo prova che un LPS completo è importante per la colonizzazione batterica [27].

2.2 NOTE CLINICHE

In passato *S. maltophilia* veniva considerato un microrganismo a bassa virulenza; tuttavia, negli ultimi anni si è affermato come un rilevante patogeno opportunisto, responsabile di infezioni severe soprattutto nei soggetti immunocompromessi o in condizioni cliniche particolarmente critiche [28]. *S. maltophilia* è implicato sia nelle infezioni nosocomiali che in quelle comunitarie [29].

È stato riportato come agente eziologico in: endocarditi, polmoniti, meningiti, endoftalmiti [28], batteriemie, infezioni respiratorie, infezioni dei tessuti molli, contaminazione delle ferite, infezioni urinarie, congiuntiviti e otiti [29].

La frequente colonizzazione da parte dei batteri di fluidi utilizzati in ambito ospedaliero, soluzione di irrigazione e / o dispositivi medici invasivi rappresenta un veicolo per bypassare le normali difese dell'ospite e causare infezioni, anche gravi, nell'uomo [11].

I principali fattori predisponenti alle infezioni sostenute da *S. maltophilia* comprendono condizioni cliniche e assistenziali quali degenze ospedaliere prolungate, con rischio maggiore se associate a procedure invasive, ricovero in terapia intensiva, trapianto d'organo, ventilazione meccanica, presenza di dispositivi intravascolari o altri presidi a permanenza, precedente esposizione ad antibiotici o terapie immunosoppressive, fibrosi cistica, neoplasie sottostanti e infezione da HIV [28].

Molti dei pazienti che contraggono infezioni da *S. maltophilia* sono affetti da altre comorbidità quali BPCO, trauma, portatori di CVC, precedente terapia antibiotica, neoplasie, precedente ospedalizzazione, infezione da HIV, o altro stato immunosoppressivo o sono portatori di impianti medici [3]. Particolare importanza assume l'infezione da *S. maltophilia* in pazienti portatori di CVC, in quanto il batterio è in grado di aderire alle pareti del catetere e dar luogo alla formazione di biofilm, e conseguentemente, setticemia [3]. In uno studio di 149 episodi di setticemia in 131 pazienti dal 1972 al 1986, *S. maltophilia* è stato il batterio più comunemente isolato nelle setticemie monomicrobiche (46%) e polimicrobiche (75%), inoltre lo studio evidenzia come, in questi casi la rimozione

del catetere sia essenziale per garantire un trattamento efficace [3]. I fattori di rischio per una batteriemia da *S. maltophilia* CVC associata sono rappresentati da: batteriemia, precedente antibiotico terapia, terapia immunosoppressiva, neutropenia persistente e fallimento nella rimozione del CVC in seguito alla diagnosi di batteriemia.

Anche l'emodialisi rappresenta un importante fattore di rischio, trattandosi di una procedura invasiva che richiede un accesso vascolare, attraverso il quale può potenzialmente verificarsi l'ingresso di microorganismi [28].

Un ulteriore fattore predisponente è rappresentato dal trapianto di midollo, in quanto associato a marcata immunodepressione, in particolare neutropenia prolungata, ed esposizione a una forte pressione selettiva antibiotica [28].

Nell'ambiente ospedaliero questo batterio è stato riscontrato in diverse fonti quali: tubi di aspirazione, ventilatori, catetere venoso centrale, nebulizzatori, endoscopi, tubi del sistema di aspirazione dentale, acqua per emodialisi e dializzato delle unità renali, disinfettanti, sapone lavamani, scarichi, rubinetti / aeratori per rubinetti, soffioni doccia, aerosol generati dal paziente con fibrosi cistica, macchina per il ghiaccio e acqua di rubinetto [3].

Nell'ambiente extraospedaliero fonti di *S. maltophilia* sono: rizosfera vegetale, insalate lavate, pesci dalla coda gialla, serpenti, capre, bufali, processo di trattamento delle acque e sistema di distribuzione, acqua di fiume, scarichi della fontana e scarichi del lavandino, soffioni doccia, acqua di rubinetto e acqua in bottiglia, distributori d'acqua microfiltrati, nebulizzatori per uso domestico di pazienti affetti da fibrosi cistica e soluzioni per lenti a contatto. Identificare le fonti ambientali di contagio assume importanza, in quanto consentirebbe l'attuazione misure preventive come, ad esempio, il controllo della fornitura di acqua.

2.3 TRATTAMENTI CLASSICI ED INNOVATIVI

S. maltophilia è intrinsecamente resistente ad una vasta gamma di antibiotici, tra cui trimethoprim-sulfametossazolo (SXT), β -lattamici, macrolidi, cefalosprine, fluorochinoloni, aminoglicosidi, carbapenemici, cloramfenicolo, tetraciline, e polimixine.

La resistenza intrinseca agli antibiotici è garantita da diversi meccanismi tra cui: la scarsa permeabilità di membrana [30], che contribuisce alla resistenza ai β -lattamici inclusi cefepime, ticarcillina-acido clavulanico, ceftazidime, e piperacillina-tazobactam [31], la presenza di pompe di efflusso [32], la produzione di β -lattamasi [33] e l'espressione di enzimi che modificano gli antibiotici [34]. La resistenza intrinseca agli antibiotici è stata acquisita da questo batterio nell'ambiente, ma essendo una caratteristica vantaggiosa anche nell'ambiente clinico, è stata conservata [35].

L'uso di antibiotici ha di certo contribuito allo sviluppo dell'antibiotico resistenza, ma non è l'unico meccanismo coinvolto [36], infatti l'apparato metabolico di *S. maltophilia* si è sviluppato in modo da degradare gli antibiotici e ricavarne nutrimento [36], inoltre la contaminazione dell'ambiente con antibiotici ha generato una pressione selettiva che ha contribuito alla comparsa e alla persistenza di batteri antibiotico resistenti, fornendo a *S. maltophilia* l'opportunità di acquisire l'antibiotico resistenza anche tramite trasferimento orizzontale di geni da questi patogeni. [37]. Nel contesto del trasferimento genico orizzontale (HGT) diversi geni di resistenza possono essere incorporati dal batterio a partire da comunità microbiche circostanti, includendo geni responsabili della resistenza ai sulfamidici, al trimethoprim e ai chinoloni [38]. Tale trasferimento è mediato da molteplici elementi genetici mobili, quali sequenze di inserzione, trasposoni e plasmidi coniugativi [38].

La coesistenza di meccanismi di resistenza intrinseca ed acquisita può determinare un progressivo incremento del profilo di resistenza di *S. maltophilia*, fino a farla evolvere da organismo multiresistente verso fenotipi a resistenza estensiva o, nei casi più estremi, pan-resistenti. Questo scenario rende il controllo terapeutico dell'infezione particolarmente complesso e ne ostacola in modo significativo la gestione in ambito clinico [38].

Confrontando l'antibiotico resistenza di diversi ceppi di *S. maltophilia* è emerso come ceppi isolati da pazienti affetti da fibrosi cistica presentino una maggiore antibiotico resistenza rispetto a quelli isolati negli altri pazienti, con un livello significativamente più alto ($P < 0.05$) di resistenza a piperacillina, cefotaxime, cefepime, moxalactam, ciprofloxacina, ofloxacina, sparfloxacina (4-g/mL resistance breakpoint), gatifloxacina (4-g/mL breakpoint), e doxiciclina (8-g/mL resistance breakpoint) [39]. A conferma di ciò uno studio tedesco enfatizza la resistenza degli *S. maltophilia* in pazienti affetti da fibrosi cistica, infatti, analizzando campioni di espettorato solo il 34.4% di quelli isolati era

suscettibile a SXT, il 25% era suscettibile alla ciprofloxacina, e tutti erano resistenti all'imipenem [40]. Alcuni studi riconoscono che l'utilizzo dell'imipenem per il trattamento delle polmoniti possa essere il responsabile di superinfezioni da *S. maltophilia*, *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* [41], tuttavia non tutti sono concordi nel definire l'impiego dell'imipenem un fattore di rischio per la sovrainfezione da *S. maltophilia*, infatti in uno studio che ha coinvolto 759 pazienti non sono state riscontrate differenze in termini di infezione da *S. maltophilia* in seguito alla somministrazione di imipenem e ceftazidime [42, 43].

TRATTAMENTO

Il trattamento di scelta per anni è stato rappresentato dal batteriostatico trimethoprim-sulfametossazolo (SXT) [44], ma negli anni è stata registrata una crescente resistenza; esemplare è la situazione rilevata in un reparto di terapia intensiva in Arabia Saudita, dove 90% degli *S. maltophilia* isolati è risultato resistente a questi antibiotici [45].

Il SXT è stato proposto come trattamento in combinazione alla ciprofloxacina, in particolare un case report del 2009 relaziona il caso del trattamento di una meningite in un neonato pre-termine con questa combinazione di antibiotici [46] tuttavia, vista la crescente resistenza al SXT, è risultato necessario il ricorso all'utilizzo di altri trattamenti.

La ticarcillina- acido clavulanico è stata identificata come possibile alternativa al SXT, ma anche in questo caso è stata rilevata una crescente resistenza, rispettivamente del 19% (1995), 32% (1996), 42% (1997) [47]. È interessante sottolineare come la crescente resistenza non fosse correlata all'aumentato utilizzo di ticarcillina-acido clavulanico, il cui uso infatti è diminuito da 21.7 kg (1995) a 17.1 kg (1996) e 11.5 kg (1997) [45], e nemmeno la conseguenza della diffusione di un unico ceppo multiresistente [come confermato dall'eterogenicità alla ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction) tra gli *S. maltophilia* multiresistenti], bensì il risultato di un crescente utilizzo di amoxicillina, amoxicillina- acido clavulanico, ticarcillina, e piperacillina tazobactam, rispettivamente del 20%, 58%, 116%, and 48%, dal 1995 al 1997 [47]. Le percentuali di resistenza di *S. maltophilia* alla ticarcillina- acido clavulanico si sono attestate al 17.0% nella sorveglianza condotta dal SENTRY

Antimicrobial Surveillance Program nel 2004 [48], del 40.9% in Brasile [30] e del 60.9% e nei Paesi dell'America latina [49].

Un'ulteriore possibilità, in caso di resistenza al trimethoprim-sulfametossazolo, è la levofloxacin [50].

ANTIBIOTICI

Secondo le raccomandazioni della Infectious Disease Society of America (IDSA), il trimethoprim-sulfametossazolo e la minociclina rappresentano i principali farmaci impiegati nel trattamento delle infezioni lievi da *S. Maltophilia* in regime di monoterapia; gli stessi antibiotici possono inoltre essere utilizzati in terapie combinate nei quadri clinici moderati o gravi. Qualora la risposta clinica alla terapia iniziale risulti inadeguata o tardiva, può essere valutata l'associazione con un secondo agente antimicrobico, tra cui la minociclina, tigeciclina, levofloxacin o cefiderocol [50].

Gli sforzi della ricerca si sono concentrati nella ricerca di sinergie tra antibiotici che potessero essere utilizzate nel trattamento dello *S. maltophilia*, queste sono state indagate con diversi metodi come: checkerboard, modelli farmacodinamici in vitro ed E-test.

Utilizzando i checkerboards, è stata trovata una sinergia tra tigeciclina e SXT, e tra tigeciclina e amikacina, nei confronti dello *S. maltophilia* [51].

Studi farmacodinamici in vitro hanno riscontrato un'aumentata attività battericida ($P < 0.0001$) nei confronti degli isolati clinici di *S. maltophilia* quando il SXT veniva combinato a ciprofloxacina, ceftazidime, o tobramicina rispetto al SXT utilizzato singolarmente [52].

Test di sinergia condotti utilizzando il metodo E-test hanno evidenziato sinergia tra SXT e ceftazidime e soprattutto tra SXT e ticarcillina- acido clavulanico; tuttavia queste sinergie non sono state completamente confermate dai checkerboards, in particolare la sinergia del SXT combinato con il ceftazidime è stata trovata solo 56% dei casi [53] mentre una sinergia o una parziale sinergia è stata individuata per le combinazioni ceftazidime e ciprofloxacina e per quella SXT e ticarcillina-acido clavulanico [54]. Di qui la deduzione che pazienti intolleranti o allergici a SXT potrebbero giovare di un trattamento che preveda la combinazione di ciprofloxacina e ceftazidime o ciprofloxacina e ticarcillina-acido clavulanico [55].

Esperienze cliniche suggeriscono altre possibili sinergie, come quella tra doxiciclina e colistina (somministrata per aerosol), utilizzata con successo nel trattamento di una polmonite associata alla ventilazione in cui la terapia con SXT era risultata inefficace [56]. Un case report del 2010 riporta il caso di uno *S. maltophilia* resistente a SXT, tetraciclina, tigeciclina, β -lattamici, fluorochinoloni, aminoglicosidi, colistina, ed eritromicina e un'insolita sensibilità a solo cloramfenicolo e rifampicina [57], questo mette in luce la necessità di non sottovalutare la possibile efficacia dei vecchi antibiotici per il trattamento delle infezioni da *S. maltophilia*.

Un antibiotico promettente per il trattamento delle infezioni da *S. maltophilia* MDR è rappresentato dalla moxifloxacin. Studi farmacocinetici in vitro volti ad indagare l'efficacia di ciprofloxacina e moxifloxacin dimostrano che è necessario utilizzarli alla massima dose tollerata per superare la resistenza della popolazione batterica e in clinica vanno somministrati ad una concentrazione superiore alla MIC [58].

I peptidi rappresentano un'importante promessa nel trattamento delle infezioni da *S. maltophilia*, essendo la resistenza del batterio nei confronti di peptidi inferiore a quella per gli antibiotici convenzionali.

Il peptide Esculina 1-b, ricavata dalle secrezioni cutanee della Rana, ha dimostrato di agire in sinergia con amikacina, probabilmente aumentando la permeabilità della membrana e quindi favorendo l'uptake di questo antibiotico [59]. Un altro peptide testato è il Cys-Val-His-Ser-Pro-Asn-Arg-Glu-Cys, che è un inibitore della β -lattamasi L1 [60].

ALTRI TRATTAMENTI

L'NB-401 (surfactant-stabilized oil-in-water nanoemulsion) rappresenta un'interessante promessa per il trattamento di infezioni da *S. maltophilia* in pazienti affetti da fibrosi cistica, esso infatti, se somministrato per via inalatoria in combinazione con soluzione salina ipertonica ha un'attività antimicrobica di cui potrebbero beneficiare pazienti infettati da *S. maltophilia* multiresistenti [61].

Un'altra possibile alternativa terapeutica che merita ulteriori studi è l'utilizzo di oli vegetali, tanto che isolati clinici di *S. maltophilia* resistenti a fosfomicina, imipenem, piperacillina e aztreonam hanno dimostrato sensibilità a oli vegetali somministrati a

concentrazioni non tossiche. Quelli che hanno mostrato una maggiore efficacia sono a base di cannella, timo e chiodi di garofano [62].

La terapia fagica potrebbe essere usata nel futuro in alternativa agli antibiotici e sembra avere potenzialità nel trattamento del biofilm, sono però necessari altri studi per verificare se cateteri rivestiti di fagi riducano la vitalità di *S. maltophilia*, e se eventualmente il batterio sviluppi resistenza ai fagi [63].

2.4 LA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

Numerosi meccanismi concorrono allo sviluppo dell'antibiotico resistenza dello *S. maltophilia*: l'attività inducibile delle beta-lattamasi [64], la scarsa permeabilità della membrana esterna, il meccanismo di pompe di efflusso [27], il trasferimento genico orizzontale (HGT) [65], la formazione di biofilm e il glicocalice [16] (*Tabella 5*).

β -LATTAMASI

S. maltophilia dispone di due β -lattamasi inducibili codificate in cromosomi, plasmidi ed elementi mobili [3] L1 ed L2, rispettivamente una metallo β -lattamasi [66] e una cefalosporinasi sensibile all'acido clavulanico [66].

L1 è in grado di idrolizzare l'imipenem, così come altri carbapenemici, ma anche l'ampicillina, la carbenicillina ed il cefotaxime, spiegandosi così la resistenza naturale di *S. maltophilia* a questi antibiotici. Non è sensibile all'acido clavulanico, ma lo è debolmente ad altri inibitori quali il sulbactam o il tazobactam [67].

L2 è nettamente meno efficace nei confronti delle penicilline, ma idrolizza molto bene l'aztreonam ed è anche sensibile all'acido clavulanico [66].

L1 appartiene alla β -lattamasi di classe B, mentre il gene L2 codifica per una β -lattamasi di classe A [68].

Nello specifico le due β -lattamasi L1 e L2 sono codificate rispettivamente dai geni blaL1 e blaL2, la cui espressione è regolata da AmpR, regolatore trascrizionale di tipo LysR [69].

In condizioni fisiologiche AmpR forma un complesso con i pentapeptidi dell'uridina difosfato N-acetilmuramico (UDP-MurNAc), precursori della sintesi del peptidoglicano, agendo così come repressore per blaL2, ma come attivatore per l'espressione di blaL1 [38].

La presenza di antibiotici β -lattamici interferisce con la sintesi della parete cellulare batterica, in particolar modo determinando la degradazione del peptidoglicano e il

conseguente accumulo di frammenti derivati, muropeptidi (AMuL) [38]. Gli AMuL si legano ad AmpR in competizione con i pentapeptidi UDP-MurNAc, determinando una variazione della funzione regolatoria della proteina, inducendo l'attivazione trascrizionale sia di blaL1 sia di blaL2, con aumento della produzione di β -lattamasi e conseguente incremento della resistenza del batterio agli antibiotici β -lattamici [38].

Il fenomeno dell'induzione delle β -lattamasi, ossia la stimolazione alla produzione di quest'ultime secondariamente all'esposizione a β lattamici, è stato evidenziato, oltre che per lo *S. maltophilia*, anche per l'*E. cloacae*, come riportato sul *Clinical Infectious Disease* [70].

Il meccanismo alla base è legato all'interferenza degli antibiotici con la sintesi della parete cellulare batterica; infatti, l'alterazione del normale turnover del peptidoglicano genera dei segnali intracellulari riconosciuti da sistemi regolatori batterici che attivano la trascrizione dei geni che codificano per le β -lattamasi e, di conseguenza, si ha una ridotta efficacia antibiotica [70].

Un ulteriore livello di complessità è rappresentato dal riciclo dei frammenti del peptidoglicano a cui partecipano la permeasi AmpG, che media il trasporto citoplasmatico dei muropeptidi, e l'amidasi AmpD, che ne consente la degradazione [71] e l'enzima NagZ, che rimuove il residuo di N-acetilglucosamina dai muropeptidi [72]. L'alterazione di questi passaggi determina un incremento dei segnali attivatori su AmpR e conduce a una sovraespressione costitutiva di ampC, responsabile di elevati livelli di resistenza ai β lattamici anche in assenza di induzione antibiotica [71].

Nelle Enterobacteriaceae e in *Pseudomonas aeruginosa*, la capacità dei β lattamici di indurre l'espressione delle β lattamasi varia considerevolmente tra le diverse molecole; infatti, alcuni antibiotici rappresentano induttori deboli, mentre altri, come imipenem, determinano una marcata attivazione dell'espressione enzimatica [73]. Questa differenza non dipende esclusivamente dall'entità del danno arrecato al peptidoglicano, ma soprattutto dalla capacità di alcuni β lattamici di favorire l'accumulo di specifici frammenti derivati dal turnover del peptidoglicano, in particolare 1,6-anidro-MurNAc-pentapeptide che interagisce più efficacemente con il regolatore trascrizionale AmpR [73].

Tale fenomeno sembrerebbe correlato anche all'inibizione dell'attività DD-carbossipeptidasica delle penicillin-binding proteins a basso peso molecolare, coinvolte nella conversione dei pentapeptidi in tetrapeptidi durante il rimodellamento del peptidoglicano [73].

In *S. maltophilia* questo modello invece appare differente, infatti, la distinzione tra β lattamici forti e deboli induttori risulta poco evidente. In questa specie, l'induzione delle β -lattamasi non dipende strettamente né dalla lunghezza delle catene peptidiche derivate dal peptidoglicano né dall'inibizione delle DD-carbossipeptidasi. La spiccata inducibilità dei sistemi L1/L2 contribuisce pertanto in maniera rilevante alla resistenza intrinseca di *S. maltophilia* verso numerosi antibiotici β lattamici [73].

POMPE DI EFFLUSSO

Un ulteriore meccanismo implicato nella multiresistenza di *S. maltophilia* è rappresentato dalle pompe di efflusso, sistemi di trasporto costituiti da un trasportatore di membrana energia-dipendente, una proteina di fusione periplasmatica e un canale localizzato nella membrana esterna [74].

La resistenza antibiotica acquisita mediata dai sistemi di efflusso può svilupparsi in seguito a mutazioni che coinvolgono sia i meccanismi regolatori dell'espressione sia le componenti strutturali delle pompe di efflusso [38].

Le mutazioni a carico dei geni regolatori causano una sovraespressione indipendente dalla presenza di antibiotico, che consente al batterio di espellere più efficacemente gli antibiotici. Invece, le mutazioni di geni codificanti per le componenti strutturali delle pompe di efflusso possono aumentarne l'attività funzionale, contribuendo ulteriormente all'aumento della resistenza batterica [38].

In *S. maltophilia* sono stati caratterizzati numerosi sistemi di efflusso codificati cromosomicamente. La maggior parte di essi appartiene alla famiglia Resistance-Nodulation-Cell Division (RND), caratterizzata dall'utilizzo del gradiente protonico H^+ come fonte di energia; tra i principali sistemi descritti figurano SmeABC, SmeDEF, SmeGH, SmeIJK, SmeOP, SmeVWX e SmeYZ [38].

Il sistema SmeDEF svolge un ruolo particolarmente rilevante, poiché contribuisce alla ridotta suscettibilità verso numerose classi antibiotiche, tra cui β -lattamici, tetracicline, macrolidi, fluorochinoloni, aminoglicosidi e cloramfenicolo [74]. L'espressione della pompa SmeDEF è repressa dal regolatore TetR-like SmeT, che si lega alle sequenze promotrici impedendo la trascrizione dei geni dell'operone. Molecole come il triclosan, sostanza con proprietà antibatteriche e antifungine, possono legarsi a SmeT

determinandone un cambiamento conformazionale, riducendone l'affinità per il DNA e favorendo la derepressione dell'operone [38].

Anche la pompa SmeGH contribuisce in maniera rilevante alla resistenza, estendendo il suo spettro a fluorochinoloni, β -lattamici, ceftazidime, polimixina B e agenti ossidativi [38].

Inoltre, *S. maltophilia* esprime anche pompe appartenenti alla famiglia ABC (ATP-binding cassette), che includono FuaABC, MacABC_{sm}, SmaAB, SmaCDEF e SmrA, e pompe della superfamiglia Major Facilitator (MFS), come EmrCAB e MfsA [38].

Le pompe di efflusso SmaAB e SmaCDEF contribuiscono rispettivamente alla ridotta sensibilità di *Stenotrophomonas maltophilia* verso aminoglicosidi e fluorochinoloni e sono regolate dal sistema a due componenti SmaRS. In particolare, mutazioni nel gene smaS determinano un'attivazione permanente del sistema regolatorio, con conseguente sovraespressione delle pompe e aumento della resistenza a entrambe le classi di antibiotici [38].

2.5 IL BIOFILM

Il biofilm è definito come un'aggregazione di microrganismi nel quale le cellule sono adese le une alle altre o ad una superficie e sono incluse in una matrice da essi prodotta composta da sostanze extracellulari polimeriche (EPS) [75].

Il biofilm rappresenta una modalità di crescita batterica in cui le cellule possono crescere come cellule singole, liberamente fluttuanti nel mezzo di coltura (forma planctonica) o come aggregati sessili strettamente adesi a superfici biotiche o abiotiche (forma di biofilm) [76].

I biofilm sono una delle modalità di vita di maggior successo nella terra e sono estremamente diffusi, possono essere rinvenuti sia nell'ambiente sia in organismi viventi, ed essere responsabili di infezioni persistenti.

Il biofilm è un sistema complesso caratterizzato da un'alta densità cellulare, che varia da 10^8 a 10^{11} cellule per ogni grammo [77] ed è tipicamente composto da molte specie batteriche.

FORMAZIONE DEL BIOFILM

La formazione del biofilm è un processo dinamico e dipende da numerosi fattori quali ad esempio: disponibilità di nutrienti, sintesi e secrezione di materiale extracellulare,

competizione sociale, pH, temperatura, concentrazioni di sali, e si caratterizza per una sequenza ben precisa di eventi, quali (Figura 2):

- 1) Adesione alla superficie reversibile (adsorbimento);
- 2) Adesione irreversibile;
- 3) Formazione di micro-colonie;
- 4) Maturazione del biofilm;
- 5) Distacco delle cellule batteriche

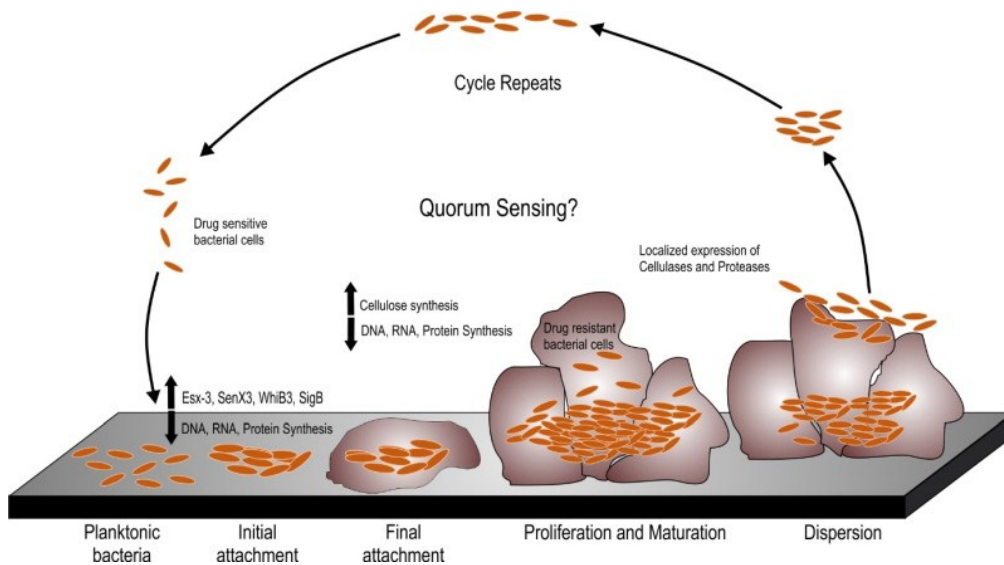


Figura 2. Fasi della formazione di biofilm

La fase di adesione è un processo fisico-chimico; inizialmente le cellule stabiliscono con la superficie legami deboli e reversibili attraverso le forze di Van der Waals, a mano a mano che la distanza con la superficie diminuisce, a circa 1,5 nm, si inizia ad avere un'adesione più resistente attraverso interazioni dipolo-dipolo, legami idrogeno e l'utilizzo di molecole di adesione come i pili. La fase di adesione è anche geneticamente mediata per via dell'espressione del gene smf-1 che codifica per le strutture fimbriali responsabili dell'adesione alle superfici biotiche e abiotiche [19].

La velocità e la forza con cui i batteri aderiscono al substrato sono influenzate dall'idrofobicità della superficie cellulare, dalla presenza di flagelli, di fimbrie, di polisaccaridi o di proteine di superficie [78].

In questo modo si viene a creare un monostrato di cellule batteriche adese alla superficie, si ha un aumento progressivo della concentrazione di batteri e la produzione di materiale

polimerico extracellulare (EPS) che va a costituire la matrice del biofilm e a formare le microcolonie.

La fase maturativa si completa con la formazione di piccoli canali, che consentono il trasporto di nutrienti alle microcolonie e la rimozione di sostanze di rifiuto. Parallelamente si sviluppano le macrocolonie, che assumono tipicamente una struttura tridimensionale simile a quella di un fungo.

La fase di dispersione prevede il distacco di singole cellule o di gruppi di cellule che possono colonizzare siti circostanti o a distanza e promuovere l'origine di un nuovo biofilm. I fattori che possono contribuire al distacco delle cellule dal biofilm sono molteplici, tra cui le forze meccaniche a cui è sottoposto lo stesso biofilm (es: flusso di sangue in un vaso sanguigno), l'inibizione della produzione della matrice extracellulare con conseguente diminuzione delle forze attrattive e la produzione di enzimi che distruggono la matrice [79].

COMPOSIZIONE DEL BIOFILM

Si stima che nella maggior parte dei biofilm, i microrganismi costituiscano circa il 10% del peso secco, mentre il restante 90% è rappresentato dalla matrice extracellulare che forma la struttura tridimensionale del biofilm ed è responsabile dell'adesione alle superfici e della coesione all'interno del biofilm stesso [80]. Essa costituisce una nicchia ambientale protettiva delle cellule batteriche in quanto fornisce benefici funzionali e strutturali come idratazione, intrappolamento di nutrienti, capacità digestive, protezione da agenti antimicrobici e facilitazione delle interazioni intercellulari [81].

L'acqua è di gran lunga il maggior costituente della matrice (fino al 97%), tanto che K. C. Marshall ha definito il biofilm "acqua dura" [82], ma essa contiene altri componenti tra cui: soluti, gel formante polisaccaridi, proteine, eDNA così come componenti insolubili come amiloide, cellulosa, fimbrie, pili e flagelli [83].

I pori e i canali tra le microcolonie svolgono la funzione di facilitare lo scambio dei liquidi, nutrienti, ossigeno ed agenti antimicrobici ispirando il concetto di un "sistema circolatorio rudimentale" del biofilm [84].

Oltre che da acqua, la matrice è formata da sostanze polimeriche extracellulari (EPS) che mediano la formazione dell'architettura del biofilm, un processo continuo e dinamico che conferisce l'organizzazione spaziale nella quale le cellule si organizzano in microcolonie [85]. Inizialmente le EPS erano state definite "polisaccaridi extracellulari", ma sono state

poi rinominate “sostanze polimeriche extracellulari” quando è diventato evidente che la matrice contiene anche proteine, acidi nucleici e lipidi [86] ed è stabilizzata da strutture batteriche extracellulari come flagelli, pili e fimbrie [87] (*Figura 3*).

La composizione delle EPS può variare molto tra differenti biofilm a seconda dei microrganismi presenti, delle forze esterne a cui è sottoposto il biofilm, della temperatura del mezzo e della disponibilità di nutrienti [80].

I componenti più rappresentati nell' EPS sono esopolisaccaridi e proteine.

Diversi studi hanno inoltre evidenziato che alcuni geni regolano la formazione e il mantenimento della matrice extracellulare. In *S. maltophilia* il gene *spgM* è stato associato ai meccanismi coinvolti nella produzione dei polisaccaridi extracellulari, mentre *rmlA* sembrerebbe contribuire alla sintesi di esosaccaridi coinvolti nella stabilità strutturale del biofilm [19]. L'espressione di tali geni è stata frequentemente riscontrata nei ceppi caratterizzati da una maggiore capacità di adesione e produzione di biofilm, promuovendo la sopravvivenza del batterio in condizioni ambientali sfavorevoli [19].

ESOPOLISACCARIDI

Gli esopolisaccaridi sono polimeri ad alto peso molecolare composti da residui di zucchero e sono prodotti dai microrganismi che compongono il biofilm e poi secreti nell' ambiente circostante.

Gli esopolisaccaridi prevalenti nel biofilm sono eteropolisaccaridi costituiti da residui di zuccheri, neutri o carichi, che possono contenere sostituenti, organici od inorganici, che ne influenzano le proprietà fisiche e biologiche.

L' EPS essendo composto in larga misura da polimeri idratati protegge il biofilm dall'essiccazione, agendo come un idrogel che trattiene acqua [80].

Il biofilm inoltre ha la capacità di catturare i nutrienti superiori e distribuirli alle cellule che vivono in forma planctonica: di questa caratteristica è responsabile la porzione di matrice composta da EPS che si comporta come una spugna dotata di capacità di assorbimento passive [88]. Questi nutrienti vengono stoccati nella matrice consentendo al biofilm di sopravvivere e persino crescere anche quando questo si trova in un ambiente oligotrofico (povero di nutrimenti) [89]. Altra fonte di nutrimento è fornita dai detriti cellulari, che possono essere “cannibalizzati” dalle cellule vitali [90]; alla stessa sorte possono essere destinati componenti dell'EPS, che, sebbene siano resistenti alla degradazione e persistano

più a lungo rispetto alle cellule che lo producono, a volte possono rappresentare una fonte di nutrimento per le cellule vitali [91].

Le capacità di assorbimento però non sono molecole-specifiche, questo significa che non possono essere accumulate solo sostanze nutritive ma anche sostanze tossiche e molecole come eritromicina, etilsuccinato, acetaminofene [92], e ormoni steroidei.

Sorprendentemente possono essere trattenute nell' EPS anche sostanze non polari come benzene, toluene e xilene, sebbene l'EPS non abbia siti di legame lipofili, ma sia spiccatamente idrofilo [93]. Anche gli ioni possono depositarsi nel biofilm, come ioni fosfato, che rafforzano la stabilità meccanica nel biofilm della placca dentale [94], ioni di calcio, ferro e manganese che contribuiscono alla stabilizzazione della matrice del biofilm grazie alla formazione di ponti tra gruppi carbossilici delle molecole di EPS [95]. Quando ad essere coinvolto è il carbonato di calcio [96], il risultato è la formazione di una crosta, il processo di litificazione e la formazione di stomatoliti [97].

PROTEINE

La matrice del biofilm può contenere anche una componente proteica che, in alcuni casi, può superare anche di molto o addirittura sostituire il contenuto dei polisaccaridi [98].

Fanno parte di questa componente proteica enzimi extracellulari secreti da batteri che compongono il biofilm, che fanno un uso molto più massiccio di questi rispetto a quanto non facciano le cellule in stato planctonico. Gli enzimi secreti dalle cellule in stato planctonico, infatti, diffondono in siti lontani dalla cellula che li ha prodotti e si diluiscono nell' ambiente acquoso, gli enzimi secreti dalle cellule che compongono il biofilm, invece, interagiscono con i componenti della EPS e si accumulano nella matrice [80]. Questa organizzazione suggerisce il concetto di sistema digerente esterno, (nozione già espressa nel 1943) [99], in grado di sequestrare e degradare i nutrienti dissolti nella fase liquida del biofilm, consentendo così il loro utilizzo come fonti di energia [86].

Grazie alla componente enzimatica, la matrice agisce anche come centro di riciclo di componenti resi disponibili da cellule lisate tra cui il DNA che costituisce una riserva di geni per il trasferimento genico orizzontale. La componente enzimatica extracellulare, in qualità di risorsa condivisa si è valsa la definizione di “funzione sociale dell'idrolisi extracellulare” [100], infatti, gli enzimi secreti non sono una risorsa esclusiva della cellula che li ha prodotti, ma una risorsa disponibile per tutti i membri della comunità.

Un esemplare modello di cooperazione è fornito dal biofilm composto da *Pseudomonas fluorescens* proteolitici e non proteolitici, in questo caso, gli idrolisati proteici prodotti dagli enzimi extracellulari generati dai ceppi proteolitici sono una risorsa di cui possono usufruire anche i ceppi non proteolitici [100].

Oltre alla funzione “digestiva” gli enzimi extracellulari rendono possibile la fase di dispersione di biofilm, ovvero la colonizzazione di altri siti e la generazione di nuovi biofilm.

DNA EXTRACELLULARE

Un altro importante componente della matrice del biofilm è il DNA extracellulare (eDNA), la cui quantità è estremamente variabile anche tra specie strettamente correlate, è infatti uno dei componenti strutturali principali del biofilm di *Staphylococcus aureus*, e invece presente in quantità esigue nei biofilm di *Staphylococcus epidermidis* [80].

Considerare l’eDNA come mero residuo delle cellule lisate è riduttivo; infatti, esso costituisce una componente strutturale della matrice, formando, ad esempio, nei batteri acquatici, un supporto stabile alla rete di filamenti costituenti il biofilm [101]. Esso inoltre può essere considerato un archivio genetico a disposizione dei batteri [80], che possono acquisire eDNA dalla matrice per trasferimento orizzontale [102].

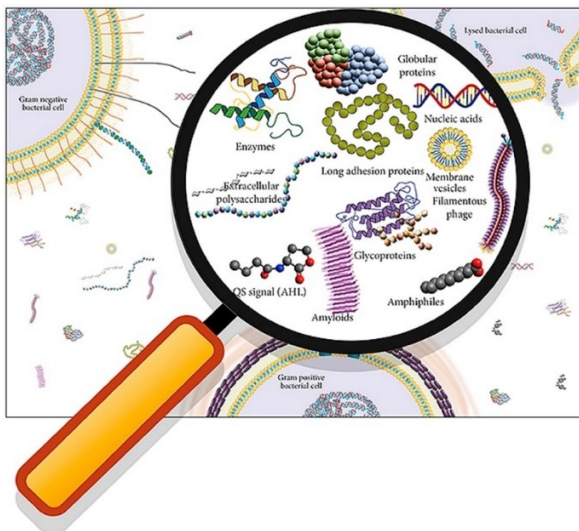


Figura 3. Sostanze polimeriche extracellulari [103]

TOLLERANZA E RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI DA PARTE DEL BIOFILM

Il biofilm si caratterizza per un'aumentata resistenza o tolleranza nei confronti degli agenti antimicrobici rispetto alle cellule batteriche in stato planctonico, ovvero per un'aumentata abilità di sopravvivere all'esposizione a componenti che sono letali per gli organismi sensibili. Per lo *S. maltophilia* tale caratteristica è stata confermata da diversi studi che hanno evidenziato come la sopravvivenza agli antibiotici dipenda sia dalla presenza di geni di resistenza sia dall'organizzazione del biofilm e dalle sue proprietà strutturali e funzionali [19, 38].

Hans-Curt Flemming nella review "Biofilms: an emergent form of bacterial life" [80] suggerisce una distinzione tra i termini tolleranza e resistenza, laddove per resistenza si intenderebbe una caratteristica genetica, ereditabile, acquisita per mutazione o scambio genetico, che permane anche quando le cellule del biofilm si disperdono e vivono in forma planctonica. Con il termine tolleranza si intenderebbe invece una caratteristica che denota il biofilm, che sarebbe persa se le cellule del biofilm vivessero in forma planctonica.

La tolleranza del biofilm è il prodotto di molteplici meccanismi, tra cui le proprietà della matrice di intrappolare e inattivare gli antimicrobici e il basso tasso di crescita che caratterizza le cellule del biofilm [103].

Nel caso di *Stenotrophomonas maltophilia*, è stato osservato come la presenza di una matrice extracellulare ben strutturata contribuisca in modo significativo alla riduzione dell'efficacia degli antimicrobici, agendo sia come barriera fisica alla diffusione dei farmaci sia come ambiente in grado di sostenere infezioni persistenti [19, 28].

I componenti dell'EPS esplicano la loro attività antimicrobica attraverso quella che viene definita diffusion-reaction inhibition che comprende processi di chelazione, degradazione enzimatica o anche reazioni in cui l'EPS si sacrifica (es. ossidando i disinfettanti) [104].

Numerosi altri meccanismi sembrerebbero contribuire alla tolleranza del biofilm come l'eterogeneità metabolica, il signalling extracellulare, reazioni con i siderofori, mutazioni genetiche e variazioni fenotipiche [105]; in particolar modo l'elevata densità cellulare tipica del biofilm favorisce lo sviluppo di mutazioni di geni di resistenza [10].

L'EPS sembra inoltre avere un ruolo nel conferire tolleranza nei confronti degli aminoglicosidi [106].

Un altro meccanismo che conferisce tolleranza al biofilm è il basso tasso di crescita e lo stato dormiente tipico di alcune cellule batteriche costituenti il biofilm [107]. Queste cellule, denominate "persister", entrano in uno stato di quiescenza, simile a quello delle

spore batteriche, che le rende completamente resistenti agli antimicrobici [108], questo meccanismo, inoltre, diventa progressivamente più spiccato dato che il numero di cellule in fase stazionaria tende ad aumentare nel tempo [109]. Ad ogni modo, il diffuso rallentamento del metabolismo delle cellule che compongono il biofilm rispetto alle cellule planctoniche conferisce a quest'ultimo una minor suscettibilità nei confronti degli antibiotici che inibiscono attività metaboliche come la sintesi del peptidoglicano, delle proteine o degli acidi nucleici [110].

In aggiunta, recenti studi su *S. maltophilia* hanno evidenziato come la comparsa di fenotipi “persisters” e stati metabolici ridotti possa rappresentare un passaggio rilevante nell'evoluzione verso forme di maggiore resistenza globale, incluse condizioni di multi e panresistenza, soprattutto in contesti ospedalieri ad alta pressione selettiva [38].

La resistenza delle cellule del biofilm è conferita dal trasferimento orizzontale di geni [111], che è favorito dall'alta densità cellulare, dall' aumentata competenza genetica e dall'accumulo di elementi genetici mobili [112]. Inoltre, la matrice fornisce un ambiente fisicamente stabile per il contatto tra cellule che è richiesto da alcuni meccanismi di scambio genetico [113]. I meccanismi più comuni di scambio genetico nel biofilm sono la coniugazione plasmidica, i sistemi di secrezione di IV tipo e l'inclusione dell'eDNA della matrice nelle cellule [113].

ETEROGENEITÀ E INTERAZIONI

La stretta vicinanza fisica di cui godono le cellule del biofilm conferisce a queste la possibilità di scambiare metaboliti, molecole di signaling, materiale genetico e molecole difensive, inoltre, l'eterogeneità tra cellule fornisce loro l'opportunità di cooperare; questa condizione ha ispirato gli studiosi a definire questa collaborazione con il termine antropomorfo “sociomicrobiology” [80].

A causa dell'eterogeneità della popolazione che compone il biofilm si vengono a creare gradienti di concentrazione di nutrienti, cataboliti, molecole segnale, pH, elettroni ed ossigeno [83] che determinano la formazione di piccoli habitats idonei per la sopravvivenza di batteri con le caratteristiche adatte a quella nicchia.

Ad esempio, i batteri presenti negli strati più profondi dispongono di una minore quantità di nutrienti e ossigeno rispetto a quelli presenti negli strati più esterni, quindi, adotteranno uno stato metabolico più lento e risulteranno resistenti verso alcuni antibiotici, come gli aminoglicosidi.

QUORUM SENSING

Il Quorum Sensing (QS) è un processo di comunicazione intercellulare che consente ai batteri di cooperare o competere tra loro (all'interno di una specie e tra specie) coordinando l'espressione dei fenotipi e regolando le attività fisiologiche [114]. Attraverso questa comunicazione, numerose specie batteriche regolano una varietà di funzioni come la formazione di biofilm, la motilità, la resistenza agli antibiotici, la produzione di tossine, la sintesi di esopolisaccaridi e la produzione di enzimi extracellulari [115].

Tutti questi fenotipi sono utili per la colonizzazione di ambienti o ospiti diversi, l'insorgenza di malattie, l'acquisizione di nutrienti e la difesa di gruppo [116].

Le interazioni basate sul QS dipendono dalla densità cellulare e in questo tipo di comunicazione ogni singolo batterio produce una piccola quantità di una o più molecole segnale, spesso definite auto-induttori, che sono successivamente rilasciate nell'ambiente e riconosciute da specifiche proteine recettoriali localizzate nel citoplasma (batteri Gram-negativi) o nella membrana (batteri Gram-positivi). Quando la concentrazione di tali molecole raggiunge un livello soglia, nota anche come "livello di quorum" [117] si ha l'attivazione o la repressione di alcuni geni [118]. In questo modo ogni singola cellula può percepire la densità batterica locale, cosicché l'intera popolazione può organizzare una risposta coordinata [119].

Sono stati identificati diversi tipi di segnali che partecipano al QS. In base alla loro struttura e funzioni specifiche sono classificati in tre classi: (I) i lattoni acil-omoserina (AHL - AI-1), piccole molecole con un anello di lattone e una catena laterale acilica, principalmente coinvolti nella mediazione del QS da batteri Gram-negativi [120]; (II) i peptidi autoinduttori (AIP), brevi catene peptidiche prodotte nella cellula, che richiedono proteine di trasporto della membrana per attraversare la membrana cellulare e regolare il QS nei batteri Gram-positivi [121]; (III) autoinduttore-2 (AI-2) sono molecole di segnale derivate dal furanone (ad esempio, furanosil borato diestere) con caratteristiche combinate di AHL e AIP, mediano il QS in batteri Gram-negativi e positivi (molecole di segnalazione "universali") [122].

Approcci anti-patogenetici alternativi ai comuni antibiotici rivolti a indurre un'interruzione del QS sono considerati promettenti, questo perché agiscono su percorsi che non sono essenziali per la crescita delle cellule batteriche. A differenza degli antibiotici, queste linee

di attacco riducono al minimo l'emergere di ceppi di resistenza e garantirebbero un'efficacia a lungo termine. Tuttavia, devono essere applicati con prudenza per limitare la selezione di ceppi più virulenti.

È stato dimostrato che i batteri possono sviluppare diversi meccanismi di resistenza ai QSI (quorum sensing inhibitor), come mutazioni nei circuiti QS, pompe di efflusso che possono limitare la disponibilità di QSI, inattivazione o persino modifica del target [123].

Lo sviluppo di resistenze agli approcci di inibizione del QS dipenderà sicuramente dalla strategia utilizzata [124].

Nel complesso, l'inibizione delle vie QS è indubbiamente promettente per combattere i batteri multiresistenti. Devono essere studiate le direzioni future in questo campo, relative all'applicabilità, ai metodi di trattamento, alla specificità, alla sicurezza e ai costi [117].

IMPORTANZA MEDICA DEL BIOFILM

Si stima che circa il 65% di tutte le infezioni batteriche sia associato a biofilm batterici [125] che possono formarsi sia in presenza che in assenza di dispositivi medici.

Per quanto riguarda le infezioni correlate a dispositivi medici si stima che queste siano: 2% per le protesi mammarie; 2% per protesi articolari; 4% per valvole cardiache meccaniche; 10% per shunt ventricolari; 4% per pacemaker e defibrillatore e circa il 40% per dispositivi ventricolari assistiti [126]. I biofilm possono formarsi anche sulla superficie o all'interno di dispositivi medici interni come lenti a contatto, cateteri venosi centrali, cateteri per dialisi peritoneale, cateteri urinari e protesi fonatorie [127] e possono essere composti da una sola o da diversi tipi di specie microbiche.

La formazione di biofilm polimicrobici può dipendere dal tipo di dispositivo medico e dalla durata dell'impianto [81]: per esempio, i biofilm su cateteri urinari inizialmente possono essere costituiti da una singola specie, ma tempi di permanenza prolungati portano inevitabilmente formazione di biofilm polimicrobici [128].

Tra le infezioni più rilevanti associate a biofilm si annoverano le endocarditi, l'otite media, le prostatiti croniche, sovra infezioni in pazienti affetti da fibrosi cistica [81], le periodontiti e le osteomieliti [129]. Queste infezioni possono essere particolarmente rilevanti per i pazienti immunocompromessi, che non hanno la capacità di difendersi dal patogeno.

Tuttavia, gli esatti processi attraverso i quali gli organismi associati ai biofilm provocano malattie nell'ospite umano sono solo parzialmente compresi. I meccanismi suggeriti

includono: (I) il distacco di cellule o aggregati cellulari da biofilm localizzati nei dispositivi medici interni, con conseguenti infezioni del circolo sanguigno o del tratto urinario, (II) produzione di endotossine, (III) resistenza al sistema immunitario ospite e (IV) protezione dagli antibiotici e induzione alla generazione di organismi resistenti (attraverso fenomeni mutazionali o di scambio genetico orizzontale) [81].

L'importanza clinica delle infezioni correlate al biofilm è principalmente ascrivibile alla refrattarietà dei microrganismi ai composti antimicrobici. Sebbene sulla base di test standard di laboratorio i microrganismi coinvolti nell'infezione risultino suscettibili al farmaco scelto per il trattamento, c'è il rischio che la terapia antibiotica sistemica sia in grado di eliminare solo i batteri in fase planctonica rilasciati dal biofilm, mentre risulti inefficace verso le cellule immerse nella matrice che, una volta terminata la terapia, si propagano di nuovo all'esterno del biofilm e continuano la disseminazione con conseguente persistenza o aggravamento dei sintomi dell'infezione [81].

TRATTAMENTO BIOFILM

Come già espresso nei paragrafi precedenti, gli organismi costituenti il biofilm mostrano tolleranza ad un ampio spettro di agenti antimicrobici, ma il grado di tolleranza a diversi agenti può variare sostanzialmente.

Solitamente, gli agenti antimicrobici che inibiscono la sintesi della parete cellulare (ad es. Glicopeptidi) possono essere poco efficaci, poiché i batteri che compongono il biofilm presentano tassi di crescita sostanzialmente ridotti.

Al contrario, gli agenti che penetrano nella matrice del biofilm, come la rifampicina e i fluorochinoloni, hanno dimostrato di essere efficaci. È stato anche riferito che i macrolidi riducono l'EPS e consentono una maggiore penetrazione di altri agenti antimicrobici, suggerendo l'utilità in alcuni casi di combinare agenti antibatterici dotati di diversi meccanismi di azione. Ad esempio, la rifampicina ha notevolmente migliorato l'efficacia dei glicopeptidi e linezolid contro i biofilm di stafilococco mentre la gentamicina ha ridotto significativamente la concentrazione minima inibente di ampicillina, vancomicina e linezolid contro le specie di *Enterococcus* (nell'ambito del biofilm) [130].

Un approccio per il trattamento dei biofilm localizzati in cateteri intravascolari è l'“antimicrobial lock” (ALT), che consiste nella somministrazione di un'alta concentrazione di un agente antimicrobico nel catetere per un tempo sufficiente per garantire la prevenzione della colonizzazione e della formazione di biofilm [130].

Preoccupazioni riguardo all'uso di ALT sono il potenziale rischio di tossicità per il paziente derivante dalla diffusione accidentale della soluzione nella circolazione sistemica e il rischio di sviluppo di antibiotico resistenza.

2.6 GLI ANTIBIOTICI PEPTIDICI

Nel contesto di una crescente preoccupazione per l'antibiotico-resistenza, che potrebbe potenzialmente condurre ad una "era post-antibiotica" in cui le attuali terapie antimicrobiche potrebbero rivelarsi del tutto inefficaci, urge la ricerca di nuovi agenti terapeutici che possano far fronte a questa minaccia.

Gli antibiotici di natura peptidica, detti anche "peptidi antimicrobici" (AMPs) stanno emergendo come potenziali e promettenti candidati, non solo come nuovi agenti antimicrobici, ma anche come modulatori della risposta immunitaria, promotori della riparazione delle ferite e preventivi per l'adesione post-chirurgica.

Gli effetti degli AMPs già introdotti nel mercato e i risultati nei clinical trials sono incoraggianti e forniscono una ragione di ottimismo per la loro applicazione in diversi ambiti.

RUOLO BIOLOGICO DEGLI AMPs

La caratterizzazione della funzionalità degli AMPs è stato oggetto di studio a partire dagli anni '60, quando furono descritte per la prima volta le defensine, una famiglia di proteine antimicrobiche ubiquitarie [131].

Da allora, molti altri peptidi antimicrobici sono stati isolati da batteri, funghi, animali e piante e ad oggi si conoscono più di 3000 peptidi (consultabili in diversi database es. <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).

La conservazione dei peptidi nel corso dell'evoluzione e l'evidenza che vengano prodotti da tutte le forme di vita, dai procarioti all'uomo, forniscono una conferma del loro ruolo cruciale [132].

Negli organismi più complessi, gli AMPs, in quanto componenti dell'immunità innata, costituiscono la prima linea di difesa contro una grande varietà di agenti esterni [133], proteggendo l'ospite nei confronti delle infezioni.

Nei batteri invece, la produzione di AMPs è finalizzata all'eliminazione dei microrganismi che competono per la stessa nicchia ecologica [134].

La loro potenzialità antimicrobica può essere sia diretta, molto estesa in quanto rivolta verso batteri Gram positivi, Gram negativi, funghi, virus e protozoi unicellulari [132], che indiretta, attraverso la modulazione della risposta immunitaria [135].

Nei mammiferi gli AMPs si trovano soprattutto nei granuli dei neutrofili e in localizzazioni strategiche quali le secrezioni di cellule cutanee e mucosali [136] che sono distretti primariamente esposti al contatto con i microrganismi.

In molti casi gli AMPs sono localizzati in clusters, quindi co-espressi e rilasciati insieme nello stesso sito d'azione [137].

Molti degli AMPs sono prodotti in qualità di precursori inattivi e richiedono un taglio proteolitico ad opera di proteasi per diventare attivi [138].

Gli AMPs possono essere o prodotti costitutivamente e immagazzinati come precursori inattivi nei granuli e quindi rilasciati localmente nel sito di infiammazione o infezione oppure la loro produzione può essere indotta in risposta a PAMPs (profili molecolari associati ai patogeni) o citochine [132,137] sottolineando, ancora una volta, la loro partecipazione come prima barriera difensiva nei confronti degli agenti infettivi [139].

CLASSIFICAZIONE DEGLI AMPs

Pur variando considerevolmente nella dimensione e struttura secondaria, i peptidi antimicrobici presentano caratteristiche comuni; la maggior parte presenta una carica netta positiva a pH neutro e la tendenza a formare strutture anfipatiche in ambiente idrofobico. Queste caratteristiche consentono ai peptidi di interagire con la membrana cellulare e influenzarne le normali funzioni fisiologiche formando canali ionici o pori, dissolvendo la membrana con un'azione simile a quella dei detergenti, o determinando la comparsa di danni nella membrana stessa [140].

In base a composizione amminoacidica, dimensioni e struttura conformazionale, gli AMPs possono essere divisi in diverse categorie, ma la classificazione più utilizzata si basa sulla loro struttura secondaria, che prevede la distinzione in: strutture ad α elica [141] (lattoferrina umana e LL-37), strutture a β foglietto stabilizzate da ponti disolfuro (defensine umane), strutture estese/random-coil (indolicidina, un AMP bovino) [142] (*Figura 4*).

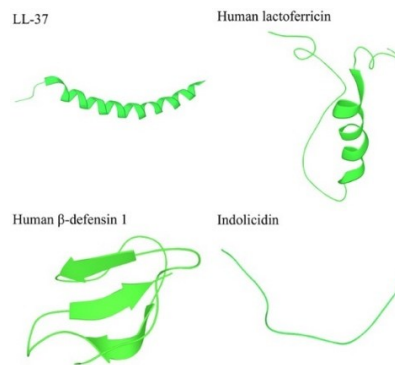


Figura 4. Peptidi che rappresentano le tre categorie principali delle strutture secondarie degli AMPs. LL-37 e lattoferritina umana rappresentano peptidi ad α -elica, β -defensina 1 umana rappresenta i peptidi a β foglietto e indolicidina rappresenta le strutture estese / random coil. Le strutture provengono dalla Protein Data Bank europea.

MECCANISMI D'AZIONE DEGLI AMPs

Sebbene l'esatto meccanismo con cui i peptidi antimicrobici svolgano la loro azione microbica non sia stato ancora del tutto chiarito, si ritiene che l'interazione del peptide con la membrana citoplasmatica dei microrganismi giochi un ruolo centrale sia che il target sia rappresentato dalla membrana stessa, sia che il bersaglio sia intracellulare [142].

I meccanismi di azione degli AMPs sembrano essere fondamentalmente due: la permeabilizzazione della membrana cellulare, con conseguente lisi e morte cellulare, e l'azione su bersagli intracellulari [142].

In particolare, evidenze più recenti hanno ampliato la visione tradizionale, mostrando che molti AMPs non agiscono esclusivamente come agenti membrano-attivi, ma possono esercitare effetti multitarget sia a livello di membrana sia a livello intracellulare [143].

Le differenze tra le membrane delle cellule eucariotiche e quelle delle cellule procariotiche garantiscono la selettività di azione degli AMPs nei confronti dei microrganismi.

Tenendo presente che la maggior parte degli AMPs possiede carica netta positiva per la presenza di residui basici distribuiti lungo la catena peptidica, questi tenderanno a formare dei legami di natura elettrostatica con i fosfolipidi anionici tipici delle membrane microbiche [142]. Le membrane cellulari batteriche risultano infatti composte principalmente da fosfolipidi carichi negativamente, quali fosfatidilserina, fosfatidilglicerolo e bisfosfatidilglicerolo [144], mentre le membrane delle cellule eucariotiche sono ricche di fosfolipidi zwitterionici quali fosfatidilcolina, sfingomieline e colesterolo, tutte molecole che presentano carica neutra a pH fisiologico [145]. I possibili legami che si possono stabilire tra AMPs e membrane eucariotiche sono quindi di tipo

idrofobico, legami deboli se paragonati alle interazioni elettrostatiche che si possono realizzare tra AMPs e membrane batteriche (Figura 5).

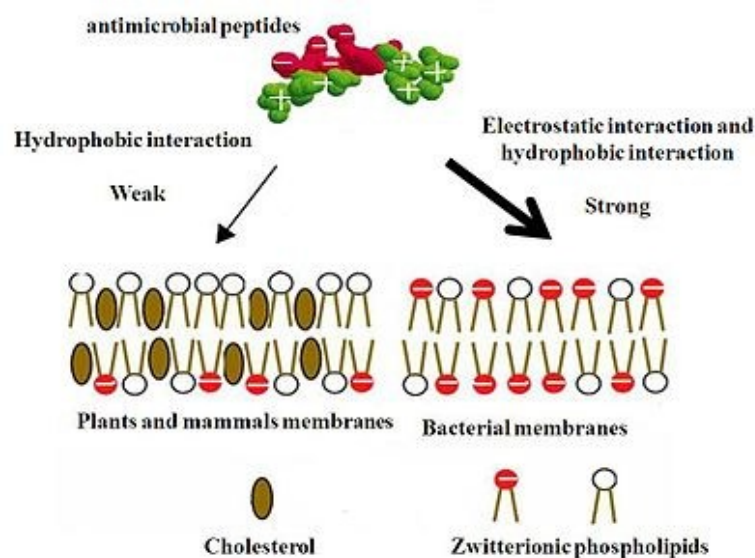


Figura 5. Membrane bersaglio dei peptidi antimicrobici. La differente composizione delle membrane batteriche rispetto a quelle eucariotiche ne determina la specificità d'interazione.

Il colesterolo, infatti, tipico delle cellule eucariotiche, conferisce resistenza alla membrana, ostacolando l'azione del peptide [139] e il potenziale transmembrana più negativo (tra -130 mV e -150mV) delle cellule batteriche rispetto a quello delle cellule eucariotiche (tra -90mV e -110mV) facilita l'interazione del peptide con lo strato lipidico contribuendo alla selettività degli AMPs per le cellule procariotiche [145].

Tuttavia, è stato osservato come i peptidi α -elicoidali possano essere distinti in due grandi gruppi, che comprendono i peptidi antimicrobici selettivi, che agiscono soprattutto su membrane batteriche, e i peptidi litici non selettivi, che possono invece danneggiare anche cellule eucariotiche; quest'ultimi causano effetti citotossici e lisi cellulare, in particolar modo quando raggiungono concentrazioni elevate o se possiedono una marcata idrofobicità [146].

Per limitare gli effetti citotossici sulle cellule eucariotiche alcuni studi hanno cercato di evidenziare come modifiche strutturali mirate possano portare allo sviluppo di peptidi antimicrobici caratterizzati da una maggiore selettività [147].

In particolar modo uno studio mirato su peptidi derivati dalle catelicidine ricchi di triptofano e prolina ha dimostrato come la sostituzione della prolina con residui di lisina (Nlys) possa aumentare l'indice terapeutico, riducendo la tossicità nei confronti delle

cellule eucariotiche. Questo miglioramento deriva da una diversa modalità di interazione con il doppio strato lipidico; infatti, mentre i peptidi ricchi in triptofano e prolina esercitano un'azione prevalentemente membranolitica, le varianti contenenti lisina mostrano una minore tendenza a destabilizzare il bilayer lipidico, ma presentano piuttosto la capacità di attraversare la membrana senza danneggiarla e raggiungendo direttamente bersagli intracellulari responsabili dell'effetto antibatterico [147].

Generalmente nelle prime fasi dell'interazione batterio-peptide, quest'ultimo si lega con i suoi aminoacidi basici a molecole cariche negativamente esposte sulla superficie batterica, quali gli acidi teicoici e teicuronici dei batteri Gram-positivi o a componenti del lipopolisaccaride (es. lipide A) dei batteri Gram-negativi [148] dopo aver spiazzato i cationi divalenti legati all' LPS [149].

In seguito a tale interazione elettrostatica, i peptidi raggiungono la membrana citoplasmatica batterica sottostante, che nella maggior parte dei casi rappresenta il loro principale bersaglio d'azione.

A questo punto, in prossimità della membrana batterica gli AMPs, che nella maggior parte dei casi non hanno preferenze conformazionali in soluzione, assumono la struttura anfipatica secondaria mediante un meccanismo di ripartizione-ripiegamento.

A seguito di tale cambiamento conformazionale i peptidi tendono ad inserirsi mediante le loro porzioni idrofobiche nel doppio strato lipidico determinando un'alterazione della permeabilità della membrana [150].

La perturbazione della membrana citoplasmatica dovuta all'assemblaggio dei peptidi, e quindi la sua permeabilizzazione, causa la perdita del contenuto intracitoplasmatico con un abbassamento del gradiente protonico, la fuoriuscita di metaboliti essenziali, il blocco della produzione di ATP e il rallentamento di altri processi metabolici, fino all'inevitabile lisi e morte cellulare [145].

Uno studio, effettuato da Yang e collaboratori, ha approfondito le modalità con cui la melittina, peptide appartenente alla classe degli AMPs, interagisce con il doppio strato lipidico [151].

È stato evidenziato come la melittina agisca secondo il modello d'azione toroidale, ossia la tendenza a formare pori a cui partecipano sia i peptidi sia le teste polari dei lipidi, che inducono una marcata curvatura della membrana fino a comprometterne la stabilità strutturale [151]. La formazione di questi pori determina un'alterazione della permeabilità

cellulare, con conseguente perdita di ioni e metaboliti, fino alla morte della cellula microbica [151].

Oltre alla capacità di formare pori transmembrana, evidenze sperimentali indicano che la melittina può indurre anche una significativa perturbazione dell'assetto del doppio strato lipidico [152]. In particolare, l'interazione con i fosfolipidi anionici favorisce l'inserzione progressiva della molecola nella membrana, con conseguente aumento del disordine lipidico e perdita della normale organizzazione strutturale del bilayer [152]. A concentrazioni più elevate, tale effetto può evolvere verso una permeabilizzazione diffusa della membrana, con caratteristiche assimilabili all'azione dei detergenti.

Questo comportamento suggerisce quindi che l'attività della melittina non sia limitata alla sola formazione di pori, ma possa includere anche un meccanismo più generale di destabilizzazione fisico-chimica della membrana batterica [152].

Un altro peptide appartenente alla classe degli AMPs è protegrin, la cui attività antimicrobica si esplica mediante un'interazione diretta con il doppio strato lipidico della membrana batterica. In seguito all'attrazione elettrostatica con i fosfolipidi anionici presenti sulla superficie microbica, il peptide si inserisce all'interno della membrana alterandone l'organizzazione strutturale. Tale interazione induce modificazioni dell'assetto lipidico e della permeabilità di membrana, favorendo la formazione di strutture porose [153].

In aggiunta a questi effetti correlati all'interazione con le membrane, studi più recenti hanno evidenziato che alcuni AMPs possono attraversare la membrana senza causarne la lisi immediata e interagire con bersagli intracellulari [143]. Tra i principali bersagli sono inclusi la sintesi degli acidi nucleici e delle proteine, con conseguente inibizione della replicazione del DNA, della trascrizione dell'RNA e della traduzione proteica.

In altri casi, gli AMPs possono legarsi a proteine o enzimi coinvolti in vie metaboliche fondamentali, alterandone la funzionalità e inducendo un effetto batteriostatico o battericida, senza causare però danno alla membrana [154].

Questo meccanismo contribuisce a spiegare la difficoltà nello sviluppare resistenze stabili nei confronti degli AMPs, rafforzandone il potenziale come alternativa terapeutica ai classici antibiotici [143].

GLI AMPs COME AGENTI TERAPEUTICI

1. Azione antimicrobica

Come già affermato in precedenza, l'inquietante scenario dell'incipiente antibiotico resistenza ha indirizzato la ricerca verso lo studio di nuovi agenti antimicrobici che possano agire in sostituzione o in combinazione con gli attuali farmaci antimicrobici. L'interesse suscitato dallo studio dei peptidi antimicrobici quale nuova classe di agenti antibatterici ad uso terapeutico, è giustificato da alcune importanti caratteristiche di cui essi sono dotati. Tra queste rivestono particolare importanza: 1) l'ampio spettro di azione rappresentato, oltre che da batteri, anche da funghi, parassiti e virus; 2) la relativa stabilità e selettività nei confronti delle membrane dei microrganismi; 3) il rapido meccanismo di azione che, nella maggior parte dei casi, produce un effetto battericida nell'arco di pochi minuti; 4) la bassa frequenza nella selezione di mutanti resistenti e l'efficacia contro agenti patogeni multi-farmacoresistenti; 5) la capacità, in alcuni casi, di produrre un effetto sinergico con antibiotici convenzionali, permettendo a questi ultimi di risultare attivi a più basse concentrazioni; 6) la capacità, infine, di legare l'endotossina batterica e di neutralizzarne gli effetti biologici [149].

Oltre all'azione antimicrobica diretta, alcuni AMPs sono in grado di modulare la risposta immunitaria dell'ospite, richiamando cellule del sistema immunitario e favorendo la riparazione di tessuti danneggiati; tali proprietà ampliano il loro potenziale utilizzo clinico [155].

La comprensione dei meccanismi alla base dell'efficacia degli AMPs potrebbe consentire di sviluppare degli analoghi sintetici con maggiore stabilità, ridotta tossicità e attività potenziata contro microrganismi multiresistenti [156].

2. Azione anti-biofilm

Gli studi degli ultimi anni si sono rivolti anche verso la possibilità di utilizzare, in alternativa o in sinergia con i comuni antibiotici, gli AMPs contro agenti patogeni in grado di formare biofilm, in quanto questi ricoprono un ruolo significativo nelle infezioni umane, in particolare se si pensa a infezioni legate a cateteri e altri dispositivi medici.

Si stima infatti che oltre il 65% delle infezioni microbiche nel corpo umano sia correlato alla formazione di biofilm e che queste contribuiscano, in maniera significativa, alla morbilità e mortalità, specialmente in ambiente ospedaliero [125].

L' applicazione dei peptidi non solo contro i microrganismi planctonici, ma anche contro i biofilm potrebbe rilevarsi particolarmente promettente e rappresenta un importante obiettivo della ricerca e oggetto di studio di questa tesi.

Come già espresso, infatti, la resistenza dei biofilm batterici agli antibiotici è ascrivibile in parte al lento ritmo di crescita ed alla ridotta attività metabolica dei batteri che li costituiscono e, poiché il meccanismo di azione della maggior parte dei AMPs consiste nel danneggiamento della membrana plasmatica, tali peptidi potrebbero avere la potenzialità di agire anche su batteri in fase di replicazione molto lenta o del tutto assente [79].

Inoltre, la rapida cinetica di killing di molti AMPs, rispetto alla maggior parte degli antibiotici convenzionali, potrebbe essere una caratteristica adatta nel controllo di una comunità dinamica ed in rapida evoluzione come un biofilm microbico [157].

Ulteriori vantaggi nell'uso di AMPs contro i biofilm microbici potrebbero essere rappresentati: (I) dall'abilità di produrre un effetto sinergico quando usati in combinazione con antibiotici convenzionali, sinergismo, che potrebbe disgregare la matrice del biofilm per consentire agli AMPs di colpire le cellule batteriche e promuovere la loro dispersione [158]; (II) dalla capacità di agire contro batteri multiresistenti ai farmaci [159]; (II) dalla bassa frequenza di induzione di resistenze [160]; (III) dalla capacità di agire in diverse fasi della formazione del biofilm e con diversi meccanismi di azione, come la downregulation del QS, la degradazione del biofilm preformato, l'inibizione della formazione di biofilm e l'inibizione dell'adesione [161].

Un recente ed interessante studio che ha esaminato l'attività di quattro AMPs chimerici contro i biofilm di *A. baumannii* multiresistente ha affermato che questi hanno mostrato una potente attività antibatterica e anti-biofilm, sinergismo con antibiotici convenzionali e, soprattutto, bassa citotossicità contro le cellule della pelle umana [162].

3. Altri impieghi terapeutici e prospettive per il futuro

La potenzialità di questi agenti terapeutici non è limitata al loro impiego come agenti antimicrobici, ma questi potrebbero nel futuro avere altre indicazioni terapeutiche.

Per citare alcuni esempi, il peptide LL-37 è uno dei peptidi più studiati ed è stato recentemente valutato in studi clinici come possibile trattamento nel favorire la riparazione

delle ulcere venose [142] o ancora il peptide PXL01 in una formulazione in gel a base di acido ialuronico, è stato oggetto di studio come trattamento preventivo delle adesioni post-chirurgiche [142].

Oltre alla somministrazione esogena dei peptidi, nuove frontiere della ricerca sono rappresentate dalla somministrazione di sostanze che possano indurre il rilascio endogeno dei peptidi, come ad esempio la vitamina D3 che ha manifestato la capacità di modulare l'espressione di diversi AMPs [142].

4. Sfide nello sviluppo di AMPs da utilizzare in clinica

Sebbene gli AMPs siano farmaci molto promettenti, è doveroso sottolineare come ci sia una considerevole discrepanza tra il numero degli AMPs individuati dagli studi scientifici come possibili candidati terapeutici e i risultati dei trials clinici [142].

Esistono infatti limiti non trascurabili per lo studio e l'impiego di questi farmaci, come la bassa correlazione tra l'attività antimicrobica in vitro e l'effettiva efficacia in vivo, la scarsa stabilità metabolica di queste molecole, la bassa biodisponibilità orale, lo scarso assorbimento intestinale e la breve emivita quando somministrati per via endovenosa [142].

Come precedentemente affermato la discrepanza tra i risultati in vitro e in vivo rende molto difficile prevedere la potenziale efficacia di un determinato peptide in clinica.

Numerosi studi hanno constatato che peptidi risultati efficaci quando sperimentati in vivo sono inattivi o minimamente attivi quando la loro efficacia è stata saggiata in presenza di concentrazioni fisiologiche di sali o siero [142].

Questo apparente paradosso può essere chiarito con diverse possibili spiegazioni: la suscettibilità batterica nei confronti degli AMPs può essere significativamente più alta nell'ambiente ionico dell'organismo che non è riproducibile nel saggio di determinazione delle minime concentrazioni inibenti o battericide; inoltre essi nell'organismo possono agire sinergicamente con altre classi di AMPs, essere prodotti ed accumulati localmente a concentrazioni al di sopra della MIC, come nel caso di situazioni di infiammazione e ancora, l'effetto battericida potrebbe essere mediato più dal meccanismo immunomodulatorio piuttosto che dal meccanismo battericida diretto [142].

D'altra parte, è anche vero che AMPs sperimentati in vitro che hanno dimostrato bassi valori di MIC/MMC potrebbero rivelarsi inattivi in vivo a causa della rapida degradazione proteolitica o del legame con proteine.

IL PEPTIDE CAMEL

CAMEL o CA (1–7) M (2-9) è un peptide ibrido (15 residui) contenente frammenti di due peptidi con diverse attività antimicrobiche [163].

I primi sette residui di aminoacidi sono derivati dalla sequenza di cecropina A, un peptide isolato dalle larve di falena di seta, *Hyalophora cecropia*, gli altri otto residui di aminoacidi sono derivati dalla sequenza di melittina, il principale componente attivo dell'apitossina (veleno d'api) [164].

Sintetizzato dal gruppo di ricerca di David Andreu negli anni '90 a partire da composti ibridi più lunghi, è il risultato dell'intento di creare strutture relativamente semplici che potessero essere facilmente accessibili dalla sintesi chimica e dotate di analoghe proprietà antibiotiche rispetto ai loro progenitori.

CAMEL come agente antimicrobico

I vantaggi di questa nuova molecola consistono nella combinazione delle attività antimicrobiche di entrambi i peptidi genitori contro un ampio spettro di batteri aerobi Gram-positivi e Gram-negativi, nell'aver anche attività antimalarica e nel non avere le proprietà emolitiche indesiderate della melittina [165].

Un'ipotesi del meccanismo d'azione antimicrobica degli ibridi cecropina-melittina è che formino canali ionici nella membrana citoplasmatica batterica, che interrompano l'omeostasi ionica della cellula batterica e portino alla morte cellulare [166].

Questo meccanismo rimane un'ipotesi, non essendo stato confermato. Infatti, in uno studio molto recente (2018) "Unravelling a Mechanism of Action for a Cecropin A-Melittin Hybrid Antimicrobial Peptide: The Induced Formation of Multilamellar Lipid Stacks" vengono utilizzate una vasta gamma di tecniche (SANS, SAXD, DSC, ITC, CD e microscopia confocale ed elettronica) al fine di caratterizzare completamente l'interazione del peptide antimicrobico ibrido cecropin A-melittin, CA (1- 7) M (2-9) con una membrana modello batterica di POPE / POPG nel tentativo di svelare il suo meccanismo d'azione.

Si evince che CA (1-7) M (2-9) interrompe le vescicole, inducendo la condensazione della membrana e formando una struttura a cipolla costituita da pile multilamellari tenute insieme dai peptidi intercalati. L'energetica dell'interazione dipende dalla temperatura e i risultati ITC (Isothermal titration calorimetry) indicano che CA (1-7) M (2-9) interagisce con il foglio esterno. Ciò supporta ulteriormente l'idea di un'interazione superficiale che

porta alla condensazione della membrana e non alla formazione dei pori [167].

Meccanismi alternativi che sono stati proposti per questi peptidi sono un'attività simile a un detergente sulla membrana citoplasmatica e la stimolazione dell'auto-lisi [165].

Tuttavia, nello studio “Antianaerobic activity of a cecropin–melittin peptide” il peptide CA(1-7) M (2-9) NH₂ è stato testato con esiti soddisfacenti contro batteri anaerobi e i risultati non mostrano grandi differenze tra le attività di questo peptide su organismi Gram-positivi e Gram-negativi, come ci si potrebbe aspettare se il meccanismo implicasse la stimolazione dell'autolisi [168]. L'assenza di differenze tra le attività sugli organismi Gram-positivi e Gram-negativi indica che la membrana esterna degli anaerobi Gram-negativi non serve da barriera per CA (1–7) M (2–9) NH₂, come fa per i peptidi di cecropina più grandi con aerobi Gram-negativi [169].

CAMEL come agente antitumorale

Il CAMEL così come altri peptidi antibatterici presenti in natura mostra attività antitumorale. Poiché sono relativamente facili da ottenere e modificare e mostrano una notevole efficacia terapeutica, tali peptidi sono considerati agenti promettenti per nuove terapie antitumorali. Alcuni di questi peptidi agiscono sulle cellule neoplastiche distruggendo la loro membrana cellulare, mentre altri causano la distruzione delle membrane mitocondriali [170].

A causa delle differenze nella struttura della membrana cellulare, della maggiore superficie e della presenza di villi, le cellule neoplastiche sono penetrate dal peptide antimicrobico in modo più selettivo rispetto alle cellule normali [171]. Dopo l'internalizzazione cellulare, CAMEL si localizza nei mitocondri e abbassa il potenziale mitocondriale, causando rigonfiamento degli organelli, una diminuzione del livello di ATP cellulare e, infine, la rottura cellulare. Questo effetto non è stato osservato negli eritrociti, essendo privi di mitocondri, a differenza di quanto succede per il suo progenitore melittina che è un peptide emolitico [172].

Uno studio condotto su cellule di melanoma murino [172] afferma che il CAMEL uccide le cellule neoplastiche a concentrazioni più basse rispetto a diverse sostanze antimicrobiche che mostrano proprietà antitumorali, come citropina (LC₅₀ circa 50 µM), cecropina A e B (LC₅₀ circa 20 µM) e magainina (LC₅₀ circa 200 µM) [173].

La dose efficace inferiore di CAMEL ha implicazioni terapeutiche in quanto riduce la probabilità di effetti collaterali che si verificano spesso durante il trattamento.

Questo studio enfatizza le potenzialità del CAMEL in quanto, sembra che combinazioni specifiche CAMEL e DNA plasmidico portatore di IL-12 possano inibire la crescita tumorale e prevenire la ricaduta del tumore.

3.SCOPO DELLA TESI

La crescente resistenza dei microrganismi agli attuali agenti terapeutici rappresenta un'emergenza per i sistemi sanitari di tutto il mondo.

In questo panorama, alcuni microrganismi emergenti come *S. maltophilia* destano una rilevante preoccupazione.

Il trattamento delle infezioni da *S. maltophilia* è complesso a causa della sua intrinseca resistenza a molti antibiotici comuni, inclusi i carbapenemi.

Le linee guida aggiornate (IDSA 2024/2025) sottolineano l'importanza della terapia di combinazione per le infezioni gravi:

- Trimetoprim-Sulfametossazolo (TMP-SMX), nelle infezioni gravi viene spesso utilizzato in combinazione con un secondo agente
- TMP-SMX + Minociclina
- TMP-SMX + Levofloxacina
- Ceftazidime-Avibactam + Aztreonam (particolarmente efficace contro ceppi multi-resistenti).
- Cefiderocol
- Minociclina o Tigeciclina
- Levofloxacina: utilizzata come alternativa, sebbene la resistenza stia aumentando
- Aztreonam-Avibactam, recentemente approvato, ha mostrato un'attività del 99,5% contro gli isolati clinici, inclusi quelli resistenti al TMP-SMX

In questo contesto, i peptidi sono candidati molto promettenti per lo sviluppo di molecole con attività antibatterica.

L'obiettivo di questa tesi è studiare l'attività antimicrobica del CAMEL verso i ceppi di *S. maltophilia* isolati da campioni clinici e valutare la possibile sinergia tra questo peptide e gli antibiotici comunemente utilizzati nella pratica clinica.

Inoltre, considerata la predisposizione di *S. maltophilia* alla formazione di biofilm, è stata valutata anche la capacità del peptide di inibirne lo sviluppo.

4.MATERIALI E METODI

4.1 CEPPI BATTERICI

Per questo studio sono stati scelti dieci ceppi di *S. maltophilia* isolati da campioni clinici di pazienti ricoverati presso la Clinica Malattie Infettive dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria delle Marche.

L'identificazione di specie e i test di suscettibilità sono stati svolti tramite sistema VITEKII (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France).

Su tutti i ceppi è stata eseguita la determinazione della minima concentrazione inibente (MIC), mentre 4 di questi (A52, 492961/3, 493490, 425519) sono stati utilizzati per gli esperimenti successivi, ovvero checkerboard test, time-kill e biofilm.

4.2 CAMEL E ANTIBIOTICI

Il peptide CAMEL o CA (1–7) M (2-9), peptide ibrido formato da 15 aminoacidi sintetizzato a partire da composti ibridi più lunghi (sette aminoacidi dalla cecropina A, peptide isolato dalle larve di falena di seta, *Hyalophora cecropia*, e otto aminoacidi derivati dalla melittina, componente attivo del veleno d'api), è stato utilizzato per i saggi di sensibilità.

Per gli esperimenti di checkerboard sono stati usati in combinazione con il peptide gli antibiotici Sulfametossazolo-Trimethoprim, Minociclina, Levofloxacina, Ceftazidime-Avibactam-Aztreonam, Cefiderocol, Tigeciclina.

4.3 DETERMINAZIONE DELLA MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC) DEL CAMEL

La sensibilità dei ceppi agli antibiotici e al peptide è stata valutata mediante la determinazione delle MIC eseguendo il test delle microdiluzioni in brodo.

La procedura utilizzata è quella indicata dal Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) e dalla European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Utilizzando una piastra microtiter da 96 pozzetti con fondo a U, sono stati distribuiti 50 µL di brodo cation-adjusted Mueller Hinton (MH II, Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italia), in tutti i pozzetti ad eccezione di quelli della prima colonna.

È stata preparata una soluzione dell'antibiotico/peptide ad una concentrazione doppia rispetto a quella più elevata da saggiare.

100 µL di soluzione madre sono stati prelevati e inseriti in tutti i pozzetti della prima colonna della piastra microtiter.

Da questa colonna, sono stati prelevati 50 µL con la micropipetta e sono stati aggiunti alla seconda colonna, dove erano già presenti 50 µL di brodo MH II in questo modo è stata eseguita una diluzione 1:2 dell'antibiotico nella seconda colonna. Il contenuto di quest'ultima è stato mescolato tramite micropipetta e altri 50 µL sono stati prelevati e aggiunti al contenuto della terza colonna e così via fino alla penultima colonna.

In questo modo sono state eseguite delle diluizioni seriali in piastra dell'antibiotico.

I 50 µL prelevati dalla penultima colonna sono stati buttati, poiché l'ultima colonna viene utilizzata come controllo di crescita positivo e quindi preparata solamente con MH II.

La sospensione batterica finale per determinare la MIC doveva avere una concentrazione di 5×10^5 CFU (colony forming units) /mL: per raggiungere questo valore la brodocoltura è stata diluita ed è stata determinata la densità ottica a 625nm (OD_{625}), tenendo presente la relazione: un valore di OD_{625} di 0,100 corrisponde 1×10^8 CFU/mL.

Una volta impostato "bianco" misurando l'assorbanza del brodo MH II da solo, sono state misurate tutte le altre brodocolture: se l'assorbanza del campione superava 0.100, allora è stato diluito con MH II. Una volta ottenuta la sospensione batterica standardizzata a OD_{625} di 0,1, questa è stata diluita 1:100 in brodo MH II, mescolando 50 µL della sospensione batterica con 5 mL di brodo MH II e ottenendo una concentrazione di 1×10^6 CFU/mL.

In ogni riga della piastra è stato inoculato un ceppo batterico differente, pipettando 50 µL di sospensione batterica standardizzata in ogni pozzetto.

La concentrazione batterica finale così ottenuta stata di 5×10^5 CFU/mL.

Le piastre sono state infine incubate a 37°C per 18-24 ore.

Al termine delle 24 ore è stata determinata la MIC, ossia la più bassa concentrazione di antibiotico alla quale non si osservava crescita visibile.

4.5 TEST TIME-KILL

Il test di time-kill è stato utilizzato per valutare l'attività antimicrobica *in vitro* in relazione al tempo. L'esperimento è stato eseguito con i ceppi di *S. maltophilia* A52, 492961/3, 493490, 425519. Il CAMEL è stato testato in concentrazioni di MIC 1x, MIC 2x, MIC 4x, inoculando 1×10^7 CFU/mL in provette contenenti 5 mL di brodo MH II.

Le provette sono state incubate a 37°C e ad intervalli di tempo regolari, in particolare a mezz'ora, un'ora, due ore, quattro ore, otto ore, sono stati prelevati 10 µL di brodocoltura che sono stati diluiti in fattori di 1:10 e inoculati su piastre di Mueller Hinton Agar (Liofilchem).

Per valutare l'attività antimicrobica è stato preso in considerazione il numero di CFU/mL cresciute per ogni intervallo di tempo.

4.6 TEST CHECKERBOARD

L'interazione del CAMEL con gli altri antibiotici è stata studiata con il metodo "checkerboard titration" utilizzando piastre microtiter in polistirene da 96 pozzetti. In tutti i pozzetti sono stati inseriti 50 µL di MH II. Nei pozzetti della prima riga sono stati distribuiti 50 µl del CAMEL a una concentrazione 4X rispetto a quella massima da saggiare, ad eccezione dell'ultimo pozzetto in cui la concentrazione del peptide inserita era 8X. È stata poi eseguita una diluizione scalare dalla prima riga alla penultima, lasciando l'ultima riga come controllo. L'antibiotico da testare è stato posto nell'ultima colonna a una concentrazione 4X. È stata effettuata anche in questo caso una diluizione scalare a partire dall'ultima colonna fino alla seconda, con l'esclusione della prima, utilizzata come colonna di controllo. Infine, sono stati distribuiti in tutti pozzetti 50 µl di inoculo batterico standardizzato ad una concentrazione di 1×10^6 UFC/mL. La piastra è stata poi incubata a 37°C per 18-24 ore. Dopo l'incubazione, nella fase di osservazione si è potuta valutare la MIC del CAMEL nella prima colonna, la MIC dell'antibiotico nell'ultima riga, e il controllo di crescita positivo del ceppo nell'ultimo pozzetto dell'ultima riga. Dal rapporto tra la MIC in combinazione e la MIC del solo CAMEL e del solo antibiotico abbiamo ottenuto la concentrazione di inibizione frazionaria (FIC). La FIC del CAMEL sommata alla FIC dell'antibiotico determina l'indice di concentrazione frazionaria inibitoria (FICI). Quando FICI è inferiore o uguale a 0,5 i due composti agiscono sinergicamente, se invece è maggiore di quattro parliamo di antagonismo. Un valore di FICI compreso tra 0,5 e 4 indica che i due composti sono indifferenti tra loro, ossia la loro attività si somma, senza sinergismo o antagonismo.

4.7 BIOFILM

L'azione del CAMEL sul biofilm è stata studiata mediante la colorazione con cristalvioletto. I batteri sono stati fatti crescere su Brain Heart Infusion Broth (BHIB, Liofilchem), con un supplemento dell'1% glucosio, a 37°C. Le colture ottenute sono state diluite 1:10 standardizzate a OD625 di 0,1. Le piastre utilizzate sono microtiter da 96 pozzetti, con fondo piatto e trattato per l'adesione. Per ridurre errori casuali sono stati impiegati 4-6 pozzetti per ogni ceppo, lasciando degli spazi tra un ceppo e l'altro per evitare contaminazioni, e 4-6 pozzetti per il bianco (BHIB+1% glucosio). Sono stati seminati 200 µl della diluizione a 0,1 nei pozzetti, con l'aggiunta di CAMEL alla concentrazione di 0,25 e 0,5 MIC, e la piastra è stata incubata a 37°C per 24 ore. Dopo l'incubazione, viene eliminato il BHIB e i pozzetti in cui è cresciuto biofilm sono stati lavati tre volte con 200 µl di soluzione fisiologica. La piastra è stata quindi lasciata asciugare in stufa a 60°C per un'ora. Il biofilm è stato colorato utilizzando 100 µl di cristalvioletto per 10 minuti a temperatura ambiente. L'eccesso colorante stato è stato eliminato lavando per tre volte i pozzetti con acqua. Infine, il cristalvioletto è stato solubilizzato con etanolo assoluto (EtOH 95%, 100 µL/pozzetto), lasciato agire per 10 minuti a temperatura ambiente, in agitazione. L'assorbanza stata letta a 690 nm utilizzando Multiscan Ascend (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). I risultati sono espressi, come media dei 4-6 campioni ± deviazione standard.

5.RISULTATI

5.1 DETERMINAZIONE DELLA MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE (MIC)

Il test di sensibilità al CAMEL, testato sui 10 ceppi di *S. maltophilia* da noi selezionati, ha rilevato i seguenti risultati:

Valori MIC (mg/L)	Numero ceppi
MIC =2	2
MIC=4	4
MIC=8	2
MIC=16	1
MIC=32	1

Tabella 1. Determinazione della MIC

Tutti i ceppi testati si sono dimostrati sensibili all'azione del CAMEL, con MIC comprese tra 2 e 32 mg/L. La MIC₅₀ era 4 mg/L mentre la MIC₉₀ era di 16 mg/L.

5.2 TEST TIME-KILL

Quando i batteri sono stati esposti a CAMEL a concentrazione pari a MIC 2X e MIC 4X, il test time-kill ha dimostrato una riduzione della crescita batterica nei primi 30 e 60 minuti dall'inizio del test; tuttavia, questa attività si è andata riducendo nel tempo, poiché la crescita batterica a otto ore risultava soltanto di poco inferiore a quella del controllo (*Figura 6*).

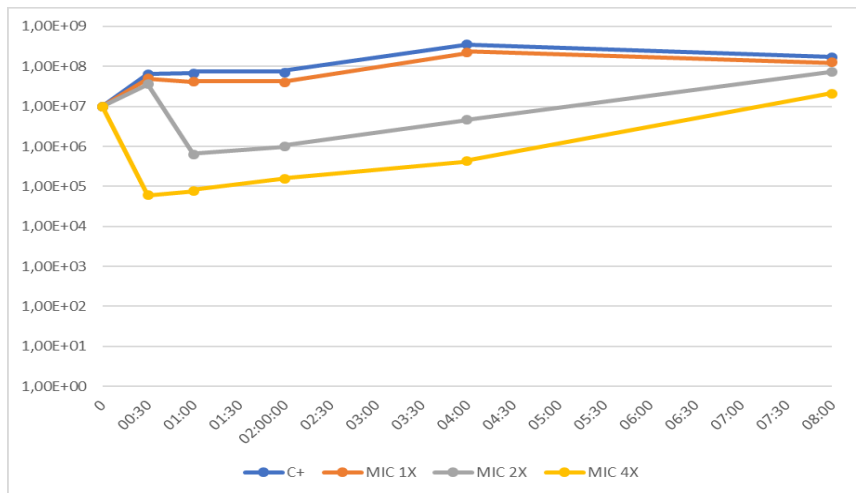


Figura 6. Curve di crescita di *S. maltophilia* esposti a CAMEL

5.3 TEST CHECKERBOARD

I test checkerboard hanno purtroppo nel complesso evidenziato un rapporto di indifferenza tra il CAMEL e gli antibiotici testati (*Tabella 2*).

In ogni caso l'attività delle molecole è risultata additiva, ossia si somma l'azione di ciascun farmaco, senza fenomeni di antagonismo o sinergismo.

Combinazioni	Ceppi			
	425519	A52	492961/3	493490
Minociclina/CAMEL	0,560	1,000	1,500	0,750
Levofloxacina/CAMEL	1,000	1,000	1,000	1,000
Tigeciclina/CAMEL	0,560	1,000	1,500	1,500
Aztreonam/CAMEL	0,500	1,000	1,125	1,000
Sulfametossazolo-Trimetoprim/CAMEL	1,000	0,625	1,000	1,000
Ceftazidime-Avibactam-Aztreonam/CAMEL	1,000	1,000	1,000	1,000
Cefiderocol/CAMEL	0,560	0,560	1,000	0,560

Tabella 2. Valori di FICI ottenuti dalla combinazione di CAMEL e vari antibiotici.

5.4 ATTIVITA' ANTI-BIOFILM

Il CAMEL ad una concentrazione di 0,25 MIC e 0,5 MIC ha dimostrato una moderata attività anti-biofilm, risultando capace di ridurre la biomassa batterica di circa il 2-20% a seconda del ceppo batterico testato.

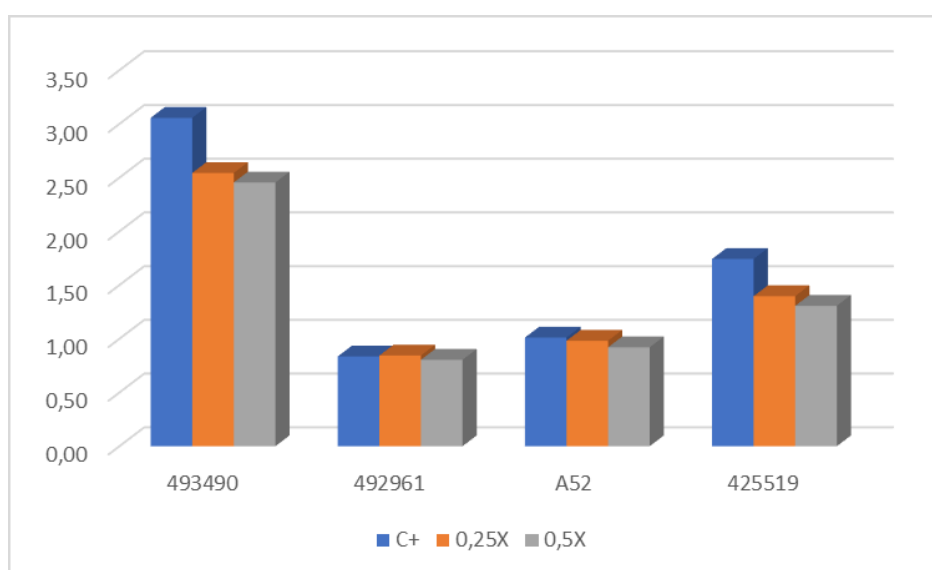


Tabella 3. Attività antibiofilm del CAMEL

6.DISCUSSIONE

Nel contesto di una crescente e allarmante antibiotico resistenza, nasce la necessità di cercare nuovi agenti terapeutici che possano essere utilizzati in combinazione o in sostituzione ai trattamenti convenzionali.

L'utilizzo degli AMPs nei confronti di batteri dotati di spiccata antibiotico resistenza rappresenta una sfida promettente.

S. maltophilia, infatti, si caratterizza per avere un'intrinseca antibiotico resistenza che lo rende un candidato ideale per lo studio di queste nuove molecole.

Il AMPs preso in esame è il CAMEL, un peptide ibrido ottenuto in laboratorio a partire da composti più lunghi quali la cecropina A e la melittina.

Abbiamo testato il CAMEL nei confronti di *S. maltophilia*, e trovato che tutti i ceppi considerati si sono dimostrati sensibili all'azione di questo peptide, con MIC comprese tra 2 e 32 mg/L.

La MIC₅₀ è risultata essere 4 mg/L mentre la MIC₉₀ 16 mg/L.

Dalla letteratura emerge che questo peptide è stato testato nei confronti di altri batteri quali *A. baumannii* e *S. aureus*. È stata determinata la minima concentrazione inibente e valori ottenuti per questi batteri sono risultati compresi tra 0,25 e 8 mg/L per *A. baumannii* [174] e tra 1-16 mg/L per *S. aureus* [175]. La MIC₉₀ di *S. aureus* è emersa essere di un valore 8 mg/L [176].

Il CAMEL è stato inoltre studiato con la metodica checkerboard nei confronti di *S. maltophilia*, ma non abbiamo rilevato nessuna sinergia tra CAMEL e gli antibiotici presi in considerazione.

Altri studi presenti in letteratura hanno dimostrato invece un meccanismo sinergico tra CAMEL e amoxicillina-acido clavulanico quando utilizzati nei confronti di *A. baumannii* [174] e *S. aureus* [175].

S. maltophilia è stato oggetto dell'attenzione di studi volti ad indagare l'efficacia dei peptidi antimicrobici nei confronti di questo batterio.

Sono stati presi in considerazione peptidi derivati dagli anfibi quali, ESC 1-8 dalla *Rana esculenta*, temporine A, B e G dalla *Rana temporaria* e bombina H2 dalla *Bombina variegata* [177].

Da questo studio emerge che le temporine sono risultate più efficaci verso i batteri gram + piuttosto che nei confronti dei batteri gram -, nei confronti dei quali, per ottenere un effetto battericida sono richieste concentrazioni relativamente elevate.

In questo scenario è interessante sottolineare come tre ceppi di *A. baumannii* e un ceppo di *S. maltophilia* abbiano mostrato sensibilità alla temporina quando esposti concentrazioni pari o inferiori a quelle richieste per ottenere lo stesso effetto in batteri gram +.

Da qui si evince che minime differenze nel LPS o in altre proteine di superficie possano influenzare la suscettibilità dei batteri gram - all'azione delle temporine.

Il peptide ESC 1-8 è risultato attivo contro batteri gram -, tra cui *S. maltophilia* e agisce a concentrazioni molto più basse di quelle richieste dagli altri peptidi presi in esame nello stesso studio. Un'altra potenzialità di ESC 1-8 è la sua provata sinergia con gli antibiotici colistina e amikacina [159].

Tra le specie batteriche testate, *S. maltophilia* ha mostrato la più alta variabilità tra ceppi diversi nella suscettibilità alle temporine (TA, TB e TG) e alla bombina H2, con concentrazioni battericide che variano in un intervallo di 4 diluizioni.

Tale variabilità tra ceppi diversi non sembra essere correlata al fenotipo di resistenza agli antibiotici, essendo molto simile per i tre ceppi di *S. maltophilia*. Piuttosto, potrebbe essere spiegata da differenze intrinseche nella composizione delle molecole di superficie, che possono interferire con le interazioni tra temporine e H2 e la superficie batterica determinando differenze nella suscettibilità a questi peptidi.

Un altro studio [178] investiga sulle proprietà di lenti a contatto rivestite dal peptide Mel-4, che sembra garantire un'attività antimicrobica nei confronti di batteri Gram negativi, tra cui *S. maltophilia*, spesso resistenti all'azione dei peptidi cationici e comunemente implicati in eventi avversi correlati all'uso di lenti a contatto.

L'azione del CAMEL nei confronti di *S. maltophilia* è stata monitorata nel tempo tramite il test time-kill, da cui si evince la proprietà dei peptidi di avere un'azione battericida rapida ma non duratura. Questa caratteristica da noi convalidata è confermata da altri studi come quello precedentemente citato [159]. In questo caso tutti i peptidi testati, quindi ESC 1-8, temporine e bombina H2 hanno dimostrato una cinetica di uccisione molto rapida nei confronti di *S. maltophilia*; a due volte le concentrazioni battericide hanno ucciso il ceppo di questa specie batterica entro 2-5 min incubazione.

Lo stesso risultato è emerso per i peptidi Esc (1-18) e H2 utilizzati contro *A. baumannii* (tempi di uccisione, da 2 a 5 minuti), mentre le attività delle temporine contro la stessa specie sono risultati piuttosto lenti (tempi di uccisione, 30 min).

Infine, *P. aeruginosa* non è stato ucciso da nessuno dei peptidi utilizzati alle concentrazioni battericide dopo 30 minuti di incubazione, mentre un effetto battericida era evidente dopo

10-30 min di incubazione quando i peptidi sono stati usati in due volte concentrazioni battericide.

La rapida azione battericida non è una prerogativa esclusiva del CAMEL, quanto piuttosto dei peptidi, infatti, anche l'uccisione da parte del peptide citropina 1.1 si è dimostrata molto rapida quando utilizzato nei confronti di ceppi: *S. aureus* ATCC 29213 sensibili alla meticillina, *S. aureus* ATCC 43300 resistente alla meticillina, *E. faecalis* ATCC 29212 sensibile alla vancomicina, *E. faecalis* ATCC 51299 sensibile alla vancomicina, e *S. pyogenes* ATCC 19615.: la sua attività è stata completata dopo 10-40 minuti ad una concentrazione di $2 \times \text{MIC}$.

Abbiamo studiato anche la capacità di CAMEL di inibire la crescita di biofilm di *S. maltophilia* mediante la colorazione con cristalvioletto, e abbiamo segnalato una attività da parte del CAMEL, seppur debole, nell'inibire la crescita di biofilm. Attualmente in letteratura non c'è nessun lavoro equivalente sebbene altri peptidi siano stati oggetto di studio in relazione alla loro capacità di inibire il biofilm [179].

Di recente, de la Fuente-Nunez et al. [180] [181] hanno riferito che i peptidi sintetici anti-biofilm IDR-1018, DJK-5 e DJK-6 sono in grado di legarsi e innescare il degrado di ppGpp, prevenendo così l'accumulo intracellulare di questo secondo messaggero e quindi prevenendo la formazione di biofilm in patogeni Gram-negativi e Gram-positivi.

Questi risultati mostrano che i peptidi anti-biofilm possono essere usati come inibitori del biofilm ad ampio spettro. Inoltre, questi peptidi hanno agito sinergicamente contro diversi agenti patogeni Gram-negativi con uno o più dei principali antibiotici convenzionali quali ceftazidime, ciprofloxacina, imipenem e tobramicina [181] [182], abbassando le loro concentrazioni effettive fino a 64 volte. IDR-1018 ha anche mostrato sinergia con l'agente antisettico clorexidina contro il biofilm orale multispecie [183] e DJK-6 ha migliorato l'attività dell'imipenem contro la *Klebsiella pneumoniae* produttrice di carbapenemasi trasportata da plasmidi, evidenziando come i peptidi possano essere usati per riqualificare gli antibiotici convenzionali.

Il trattamento delle infezioni batteriche causate dai microbi produttori di biofilm è attualmente una sfida difficile e complessa, ma è importante a causa della loro grave minaccia per la salute umana. Le infezioni correlate al biofilm sono altamente resistenti a numerosi antibiotici e molte infezioni di questo tipo non possono essere adeguatamente trattate con un singolo farmaco antimicrobico. Attualmente, non ci sono composti disponibili che affrontano specificamente le infezioni da biofilm e la mancanza di metodi

clinici adeguati a determinare i profili di resistenza degli isolati clinici in condizioni di crescita del biofilm è un problema importante.

L'incapacità di trattare le infezioni croniche che di solito sono causate dal biofilm evidenzia l'urgente necessità di nuove strategie per combattere queste infezioni.

Alte concentrazioni di antibiotici, che potrebbero inibire o disperdere la crescita del biofilm, possono essere tossiche per il corpo umano e anche questi non garantiscono un trattamento soddisfacente di tali infezioni.

Quindi, trovare un trattamento innovativo rappresenta una strategia promettente.

Nei nostri esperimenti, il CAMEL ha determinato una riduzione della massa del biofilm di circa il 2-20%. Non è possibile ricavare, da questi valori e dalle tempistiche in vitro utilizzate, dati di predittività su una eventuale efficacia ed utilità clinica.

7.CONCLUSIONI

I peptidi antimicrobici rappresentano prospettive entusiasmanti in quanto hanno dimostrato attività ad ampio spettro, in molti studi hanno esercitato *in vitro* azione sinergica con gli antibiotici convenzionali e sembrano essere meno inclini a causare meccanismi di resistenza.

In sintesi, l'attuale ricerca ha dimostrato che la combinazione di antibiotici convenzionali con un peptide nato dalla unione di due molecole di derivazione naturale potrebbe offrire una possibilità di trattamento sia nelle infezioni da microrganismi dispersi in forma planctonica, sia nelle forme in cui è prevalente la formazione del biofilm che dell'infezione dispersa, costituendo così la base per nuove terapie adiuvanti.

BIBLIOGRAFIA

- [1] L. A. Carmody, T. Spilker e J. J. LiPuma, «Reassessment of *Stenotrophomonas maltophilia* Phenotype,» *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 49, pp. 1101-1103, 2010.
- [2] A. Nakamura, Y. Sugimoto, K. Ohishi, Y. Sugawara, A. Fujieda, F. Monma, K. Suzuki, M. Masuya, K. Nakase, Y. Matsushima, H. Wada, N. Katayama e T. Nobori, «Diagnostic Value of PCR Analysis of Bacteria and Fungi from Blood in Empiric-Therapy-Resistant Febrile Neutropenia,» *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 48, pp. 2030-2036, 2010.
- [3] J. S. Brooke, «*Stenotrophomonas maltophilia*: an Emerging Global Opportunistic Pathogen,» *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 25, pp. 2-41, 2012.
- [4] S. C. Vazquez, L. N. Rios Merino, W. P. MacCormack e E. R. Fraile, «Protease-producing psychrotrophic bacteria isolated from Antarctica,» *Polar Biology*, vol. 15, 1995.
- [5] P. Alavi, M. R. Starcher, G. G. Thallinger, C. Zachow, H. Müller e G. Berg, «*Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria,» *BMC Genomics*, vol. 15, p. 482, 2014.
- [6] B. Schable, M. E. Villarino, M. S. Favero e J. M. Miller, «Application of Multilocus Enzyme Electrophoresis to Epidemiologic Investigations of *Xanthomonas Maltophilia*,» *Infection Control & Hospital Epidemiology*, vol. 12, pp. 163-167, 1991.
- [7] V. Kalidasan, N. Joseph, S. Kumar, R. Awang Hamat e V. K. Neela, «Iron and Virulence in *Stenotrophomonas Maltophilia*: All We Know So Far,» *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 8, 2018.
- [8] M. Hagemann, D. Hasse e G. Berg, «Detection of a Phage Genome Carrying a Zonula Occludens like Toxin Gene (zot) in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*,» *Archives of Microbiology*, vol. 185, pp. 449-458, 2006.
- [9] A. A. Adegoke, T. A. Stenström e A. I. Okoh, «*Stenotrophomonas maltophilia* as an Emerging Ubiquitous Pathogen: Looking Beyond Contemporary Antibiotic Therapy,» *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, 2017.
- [10] Pompilio A, Di Bonaventura G. «An Unexpected Inverse Relationship Between Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*.» *Antibiotics* (Basel). 2026 Jan 15;15(1):85. doi: 10.3390/antibiotics15010085. PMID: 41594122; PMCID: PMC12838282.
- [11] D. Oliveira-Garcia, M. Dall'Agnol, M. Rosales, A. C. G. S. Azzuz, N. Alcántara, M. B. Martinez e J. A. Girón, «Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces,» *Cellular Microbiology*, vol. 5, pp. 625-636, 2003.
- [12] A. J. H. A. D. K. S. S. Brooke JS, «Investigation of bacterial pathogens on seventy frequently used environmental surfaces in a large urban U.S. university. J.,» *Environ. Health*, vol. 71, p. 17-22, 2009.
- [13] C. Potera, «MICROBIOLOGY:Forging a Link Between Biofilms and Disease,» *Science*, vol. 283, pp. 1837-1839, 1999.

- [14] J. S. Brooke, «Biofilm production of clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* altered by sodium phosphate buffer supplementation of the medium,» *Annals of Microbiology*, vol. 57, pp. 677-679, 2007.
- [15] M. M. Critchley, N. J. Cromar, N. C. McClure e H. J. Fallowfield, «The influence of the chemical composition of drinking water on cuprosolvency by biofilm bacteria,» *Journal of Applied Microbiology*, vol. 94, pp. 501-507, 2003.
- [16] G. Di Bonaventura, S. Stepanović, C. Picciani, A. Pompilio e R. Piccolomini, «Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates,» *Folia Microbiologica*, vol. 52, pp. 86-90, 2007.
- [17] H.-Y. Shih e Y. E. Lin, «Efficacy of Copper-Silver Ionization in Controlling Biofilm- and Plankton-Associated Waterborne Pathogens,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, pp. 2032-2035, 2010.
- [18] S.-J. Liaw, Y.-L. Lee e P.-R. Hsueh, «Multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucomutase (SpgM), and melanin and biofilm formation,» *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 35, pp. 126-130, 2010.
- [19] Sameni F, Hajikhani B, Hashemi A, Owlia P, Niakan M, Dadashi M. «The Relationship between the Biofilm Genes and Antibiotic Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. » *Int J Microbiol.* 2023 Aug 31; 2023:8873948. doi: 10.1155/2023/8873948. PMID: 37692920; PMCID: PMC10484654.
- [20] G. Di Bonaventura, I. Spedicato, D. D'Antonio, I. Robuffo e R. Piccolomini, «Biofilm Formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: Modulation by Quinolones, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, and Ceftazidime,» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 48, pp. 151-160, 2003.
- [21] L. C. Crossman, V. C. Gould, J. M. Dow, G. S. Vernikos, A. Okazaki, M. Sebahia, D. Saunders, C. Arrowsmith, T. Carver, N. Peters, E. Adlem, A. Kerhornou, A. Lord, L. Murphy, K. Seeger, R. Squares, S. Rutter, M. A. Quail, M.-A. Rajandream, D. Harris, C. Churcher, S. D. Bentley, J. Parkhill, N. R. Thomson e M. B. Avison, «The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants,» *Genome Biology*, vol. 9, p. R74, 2008.
- [22] P. M. S. Figueirêdo, M. T. Furumura, A. M. Santos, A. C. T. Sousa, D. J. Kota, C. E. Levy e T. Yano, «Cytotoxic activity of clinical *Stenotrophomonas maltophilia*,» *Letters in Applied Microbiology*, vol. 43, pp. 443-449, 2006.
- [23] Sommer M, Negm A, Outzen L, Windhorst S, Gabdulkhakov A, Weber W, Betzel C. «Unveiling the structure, function and dynamics of StmPr1 in *Stenotrophomonas maltophilia* virulence.» *Sci Rep.* 2025 Jun 20;15(1):20193. doi: 10.1038/s41598-025-06177-5. PMID: 40542111; PMCID: PMC12181431.
- [24] S. A. Makin e T. J. Beveridge, «The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces,» *Microbiology*, vol. 142, pp. 299-307, 1996.

- [25] B. A. Jucker, H. Harms e A. J. Zehnder, «Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* 70401 to glass and Teflon.,» *Journal of Bacteriology*, vol. 178, pp. 5472-5479, 1996.
- [26] J. S. Brooke, A. Vo, P. Watts e N. A. Davis, «Mutation of a lipopolysaccharide synthesis gene results in increased biofilm of *Stenotrophomonas maltophilia* on plastic and glass surfaces,» *Annals of Microbiology*, vol. 58, pp. 35-40, 2008.
- [27] G. A. McKay, D. E. Woods, K. L. MacDonald e K. Poole, «Role of Phosphoglucomutase of *Stenotrophomonas maltophilia* in Lipopolysaccharide Biosynthesis, Virulence, and Antibiotic Resistance,» *Infection and Immunity*, vol. 71, pp. 3068-3075, 2003.
- [28] Erinmez M, Aşkın FN, Zer Y. «*Stenotrophomonas maltophilia* outbreak in a university hospital: epidemiological investigation and literature review of an emerging healthcare-associated infection. » *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2024 Jul 29;66:e46. doi: 10.1590/S1678-9946202466046. PMID: 39082485; PMCID: PMC11295291.
- [29] M. E. Falagas, A. C. Kastoris, E. K. Vouloumanou e G. Dimopoulos, «Community-acquired *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review,» *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 28, pp. 719-730, 2009.
- [30] A. C. Nicodemo e J. I. G. Paez, «Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections,» *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 26, pp. 229-237, 2007.
- [31] M. AKOVA, G. BONFIGLIO e D. M. LIVERMORE, «Susceptibility to β -lactam antibiotics of mutant strains of *Xanthomonas maltophilia* with high- and low-level constitutive expression of L1 and L2 β -lactamases,» *Journal of Medical Microbiology*, vol. 35, pp. 208-213, 1991.
- [32] A. Al-Hamad, M. Upton e J. Burnie, «Molecular cloning and characterization of SmrA, a novel ABC multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*,» *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 64, pp. 731-734, 2009.
- [33] D. B. B. A. Al Naiemi N, «A CTX-M extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*,» *J. Med. Microbiol*, vol. 55, p. 1607–1608, 2006.
- [34] S. K. P. I. King BA, «Aminoglycoside 6=N acetyltransferase production by an isolate of *Pseudomonas maltophilia*,» *J. Antimicrob. Chemother*, vol. 4(5), pp. 467-8, 1978.
- [35] G. Berg, L. Eberl e A. Hartmann, «The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria,» *Environmental Microbiology*, vol. 7, pp. 1673-1685, 2005.
- [36] J. L. Martinez, «Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments,» *Science*, vol. 321, pp. 365-367, 2008.
- [37] V. Cattoir, L. Poirel, C. Aubert, C.-J. Soussy e P. Nordmann, «Unexpected Occurrence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in Environmental *Aeromonas* spp.,» *Emerging Infectious Diseases*, vol. 14, pp. 231-237, 2008.
- [38] Vattanaviboon P, Dulyayangkul P, Tipanyo P, Mongkolsuk S, Charoenlap N. «Acquired resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: Mechanisms underlying the shift from multidrug to pandrug

resistance». *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2026 Mar 4;16(1):40-52. doi: 10.1556/1886.2026.00004. PMID: 41779040; PMCID: PMC13003763.

- [39] R. Cantón, S. Valdezate, A. Vindel, B. Sánchez Del Saz, L. Maíz e F. Baquero, «Antimicrobial susceptibility profile of molecular typed cystic fibrosis *Stenotrophomonas maltophilia* isolates and differences with noncystic fibrosis isolates,» *Pediatric Pulmonology*, vol. 35, pp. 99-107, 2003.
- [40] G. Valenza, D. Tappe, D. Turnwald, M. Frosch, C. König, H. Hebestreit e M. Abele-Horn, «Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis,» *Journal of Cystic Fibrosis*, vol. 7, pp. 123-127, 2008.
- [41] M. P. Fink, D. R. Snyderman, M. S. Niederman, K. V. Leeper, R. H. Johnson, S. O. Heard, R. G. Wunderink, J. W. Caldwell, J. J. Schentag e G. A. Siami, «Treatment of severe pneumonia in hospitalized patients: results of a multicenter, randomized, double-blind trial comparing intravenous ciprofloxacin with imipenem-cilastatin. The Severe Pneumonia Study Group.,» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 38, pp. 547-557, 1994.
- [42] Y. Carmeli e M. H. Samore, «Comparison of Treatment with Imipenem vs. Ceftazidime as a Predisposing Factor for Nosocomial Acquisition of *Stenotrophomonas maltophilia*: A Historical Cohort Study,» *Clinical Infectious Diseases*, vol. 24, pp. 1131-1134, 1997.
- [43] A. A. Adegoke, T. A. Stenström e A. I. Okoh, «*Stenotrophomonas maltophilia* as an Emerging Ubiquitous Pathogen: Looking Beyond Contemporary Antibiotic Therapy,» *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, 2017.
- [44] A. Gales, R. Jones, K. Forward, J. Liñares, H. Sader e J. Verhoef, «Emerging Importance of Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Species and *Stenotrophomonas maltophilia* as Pathogens in Seriously Ill Patients: Geographic Patterns, Epidemiological Features, and Trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–1999),» *Clinical Infectious Diseases*, vol. 32, pp. S104–S113, 2001.
- [45] S. M. Al Johani, J. Akhter, H. Balkhy, A. El-Saed, M. Younan e Z. Memish, «Prevalence of antimicrobial resistance among gram-negative isolates in an adult intensive care unit at a tertiary care center in Saudi Arabia,» *Annals of Saudi Medicine*, vol. 30, pp. 364-369, 2010.
- [46] P. Rojas, E. Garcia, G. M. Calderón, F. Ferreira e M. Rosso, «Successful treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis in a preterm baby boy: a case report,» *Journal of Medical Case Reports*, vol. 3, p. 7389, 2009.
- [47] N. Barbier-Frebour, I. Boutiba-Boubake, M. Nouvello e J.-F. Lemelan, «Molecular investigation of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates exhibiting rapid emergence of ticarcillin-clavulanate resistance,» *Journal of Hospital Infection*, vol. 45, pp. 35-41, 2000.
- [48] K. A. Fedler, D. J. Biedenbach e R. N. Jones, «Assessment of pathogen frequency and resistance patterns among pediatric patient isolates: Report from the 2004 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program on 3 continents,» *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 56, pp. 427-436, 2006.

- [49] D. J. Farrell, H. S. Sader e R. N. Jones, «Antimicrobial Susceptibilities of a Worldwide Collection of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates Tested against Tigecycline and Agents Commonly Used for *S. maltophilia* Infections,» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 54, pp. 2735-2737, 2010.
- [50] Bostanghadiri N, Sholeh M, Navidifar T, Dadgar-Zankbar L, Elahi Z, van Belkum A, Darban-Sarokhalil D. « Global mapping of antibiotic resistance rates among clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review and meta-analysis. » *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2024 Mar 19;23(1):26. doi: 10.1186/s12941-024-00685-4. PMID: 38504262; PMCID: PMC10953290.
- [51] M. P. Entenza JM, « Tigecycline in combination with other antimicrobials: a review of in vitro, animal and case report studies,» *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 34:8.e1–8.e9, 2009.
- [52] S. A. Zelenitsky, H. Iacovides, R. E. Ariano e G. K. M. Harding, «Antibiotic combinations significantly more active than monotherapy in an in vitro infection model of *Stenotrophomonas maltophilia*,» *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 51, pp. 39-43, 2005.
- [53] D. Gülmez, A. Çakar, B. Şener, G. Hasçelik, J. Karakaya e D. Gülmez, «Comparison of different antimicrobial susceptibility testing methods for *Stenotrophomonas maltophilia* and results of synergy testing,» *Journal of Infection and Chemotherapy*, vol. 16, pp. 322-328, 2010.
- [54] Liaw SJ, Teng LJ, Hsueh PR, Ho SW, Luh KT. «In vitro activities of antimicrobial combinations against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. » *J Formos Med Assoc*. 2002 Jul;101(7):495-501. PMID: 12353342.
- [55] M. E. Falagas, P.-E. Valkimadi, Y.-T. Huang, D. K. Matthaiou e P.-R. Hsueh, «Therapeutic options for *Stenotrophomonas maltophilia* infections beyond co-trimoxazole: a systematic review,» *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 62, pp. 889-894, 2008.
- [56] G. C. Wood, E. L. Underwood, M. A. Croce, J. M. Swanson e T. C. Fabian, «Treatment of Recurrent *Stenotrophomonas maltophilia* Ventilator-Associated Pneumonia with Doxycycline and Aerosolized Colistin,» *Annals of Pharmacotherapy*, vol. 44, pp. 1665-1668, 2010.
- [57] Savini V, «Chloramphenicol and rifampin may be the only options against *Stenotrophomonas maltophilia*. A tale of a colonized bladder device in a patient with myelofibrosis.,» *Infez. Med*, vol. 18, p. 193–197, 2010.
- [58] B. B. Ba, H. Feghali, C. Arpin, M.-C. Saux e C. Quentin, «Activities of Ciprofloxacin and Moxifloxacin against *Stenotrophomonas maltophilia* and Emergence of Resistant Mutants in an In Vitro Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Model,» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 48, pp. 946-953, 2004.
- [59] G. Maisetta, M. L. Mangoni, S. Esin, G. Pichierri, A. L. Capria, F. L. Brancatisano, M. Di Luca, S. Barnini, D. Barra, M. Campa e G. Batoni, «In vitro bactericidal activity of the N-terminal fragment of the frog peptide esculentin-1b (Esc 1–18) in combination with conventional antibiotics against *Stenotrophomonas maltophilia*,» *Peptides*, vol. 30, pp. 1622-1626, 2009.

- [60] F. Sanschagrín e R. C. Levesque, «A specific peptide inhibitor of the class B metallo- β -lactamase L-1 from *Stenotrophomonas maltophilia* identified using phage display,» *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 55, pp. 252-255, 2005.
- [61] J. J. LiPuma, S. Rathinavelu, B. K. Foster, J. C. Keoleian, P. E. Makidon, L. M. Kalikin e J. R. Baker, «In Vitro Activities of a Novel Nanoemulsion against *Burkholderia* and Other Multidrug-Resistant Cystic Fibrosis-Associated Bacterial Species,» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 53, pp. 249-255, 2008.
- [62] A. Fabio, C. Cermelli, G. Fabio, P. Nicoletti e P. Quaglio, «Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections,» *Phytotherapy Research*, vol. 21, pp. 374-377, 2007.
- [63] R. M. Donlan, «Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage,» *Trends in Microbiology*, vol. 17, pp. 66-72, 2009.
- [64] Li Zhang, «SmeDEF Multidrug Efflux Pump Contributes to Intrinsic Multidrug Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*,» *AMS Journals*, vol. 12, pp. 3497-3503, 2001.
- [65] María B Sánchez, «Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants,» *BMC Microbiology*, vol. 8, n. 148, 2008.
- [66] T. R. Walsh, A. P. MacGowan e P. M. Bennett, «Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*,» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 41, pp. 1460-1464, 1997.
- [67] M. Denton e K. G. Kerr, «Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*,» *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 11, pp. 57-80, 1998.
- [68] Cheng-wen Lin, «The role of AmpR in regulation of L1 and L2 beta-lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*,» *Research in microbiology*, vol. 160 2, pp. 152-8, 2009.
- [69] Aki Okazaki, «Induction of L1 and L2 β -Lactamase Production in *Stenotrophomonas maltophilia* Is Dependent on an AmpR-Type Regulator,» *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 52(4), p. 1525–1528, 2008.
- [70] B. Wiedemann, H. Dietz e D. Pfeifle, «Induction of β -Lactamase in *Enterobacter cloacae*,» *Clinical Infectious Diseases*, vol. 27, pp. S42--S47, 1998.
- [71] Zamorano L, Reeve TM, Juan C, Moyá B, Cabot G, Vocadlo DJ, Mark BL, Oliver A. «AmpG inactivation restores susceptibility of pan-beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.*» 2011 May;55(5):1990-6. doi: 10.1128/AAC.01688-10. Epub 2011 Feb 28. PMID: 21357303; PMCID: PMC3088256.
- [72] W. Vötsch e M. F. Templin, «Characterization of a β -N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and Elucidation of Its Role in Muropeptide Recycling and β -Lactamase Induction,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, pp. 39032-39038, 2000.

- [73] C. Juan, G. Torrens, M. González-Nicolau e A. Oliver, «Diversity and regulation of intrinsic β -lactamases from non-fermenting and other Gram-negative opportunistic pathogens,» *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 41, pp. 781-815, 2017.
- [74] A. Alonso e J. L. Martinez, «Cloning and Characterization of SmeDEF, a Novel Multidrug Efflux Pump from *Stenotrophomonas maltophilia*,» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 44, pp. 3079-3086, 2000.
- [75] Vert, «Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012,» *Pure and Applied Chemistry*, vol. 84(2), pp. 377-410, 2012.
- [76] Niels Høiby, «The clinical impact of bacterial biofilms,» *International Journal of Oral Science* volume , vol. 3, p. 55–65 , 2011.
- [77] M. Balzer, N. Witt, H.-C. Flemming e J. Wingender, «Faecal indicator bacteria in river biofilms,» *Water Science and Technology*, vol. 61, pp. 1105-1111, 2010.
- [78] &NA, «Erratum to Singh et al,» *Clinical Nuclear Medicine*, vol. 31, p. 309, 2006.
- [79] G. Batoni, G. Maisetta, F. Lisa Brancatisano, S. Esin e M. Campa, «Use of Antimicrobial Peptides Against Microbial Biofilms: Advantages and Limits,» *Current Medicinal Chemistry*, vol. 18, pp. 256-279, 2011.
- [80] H.-C. Flemming e J. Wingender, «The biofilm matrix,» *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, pp. 623-633, 2010.
- [81] R. M. Donlan e J. W. Costerton, «Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms,» *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 15, pp. 167-193, 2002.
- [82] R. Otto e G. Otto, *Was für einen Spaß sie hatten*, VS Verlag für Sozialwissenschaften, 2009, pp. 221-224.
- [83] H.-C. Flemming, J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice e S. Kjelleberg, «Biofilms: an emergent form of bacterial life,» *Nature Reviews Microbiology*, vol. 14, pp. 563-575, 2016.
- [84] P. R., «Biofilms and antimicrobial resistance,» *Clin Orthop Relat Res*, vol. 437, pp. 41-7, 2005 .
- [85] T. R. Neu e J. R. Lawrence, «Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales,» *Trends in Microbiology*, vol. 23, pp. 233-242, 2015.
- [86] N. T. F. H. Wingender J., What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances?, 1-19, pp. 1-19.
- [87] Z. X., «The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix,» *molecular microbiology*, vol. 39, pp. 1452-1463, 2001.
- [88] N. Billings, A. Birjiniuk, T. S. Samad, P. S. Doyle e K. Ribbeck, «Material properties of biofilms—a review of methods for understanding permeability and mechanics,» *Reports on Progress in Physics*, vol. 78, p. 36601, 2015.
- [89] T. J. Battin, K. Besemer, M. M. Bengtsson, A. M. Romani e A. I. Packmann, «The ecology and biogeochemistry of stream biofilms,» *Nature Reviews Microbiology*, vol. 14, pp. 251-263, 2016.

- [90] D. López, H. Vlamakis, R. Losick e R. Kolter, «Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*,» *Molecular Microbiology*, vol. 74, pp. 609-618, 2009.
- [91] K. Zrelli, O. Galy, P. Latour-Lambert, L. Kirwan, J. M. Ghigo, C. Beloin e N. Henry, «Bacterial biofilm mechanical properties persist upon antibiotic treatment and survive cell death,» *New Journal of Physics*, vol. 15, p. 125026, 2013.
- [92] R. Métivier, I. Bourven, J. Labanowski e G. Guibaud, «Interaction of erythromycin ethylsuccinate and acetaminophen with protein fraction of extracellular polymeric substances (EPS) from various bacterial aggregates,» *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 20, pp. 7275-7285, 2013.
- [93] R. Späth, H.-C. Flemming e S. Wuertz, «Sorption properties of biofilms,» *Water Science and Technology*, vol. 37, pp. 207-210, 1998.
- [94] W. M. JL, «Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale,» *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 9, pp. 113-6, 2016.
- [95] V. Körstgens, H.-C. Flemming, J. Wingender e W. Borchard, «Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*,» *Water Science and Technology*, vol. 43, pp. 49-57, 2001.
- [96] Y. Oppenheimer-Shaanan, O. Sibony-Nevo, Z. Bloom-Ackermann, R. Suissa, N. Steinberg, E. Kartvelishvily, V. Brumfeld e I. Kolodkin-Gal, «Spatio-temporal assembly of functional mineral scaffolds within microbial biofilms,» *npj Biofilms and Microbiomes*, vol. 2, 2016.
- [97] A. W. Decho, «Overview of biopolymer-induced mineralization: What goes on in biofilms?,» *Ecological Engineering*, vol. 36, pp. 137-144, 2010.
- [98] F. B, «Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin,» *Water Research*, vol. 30, pp. 1749-1758, 1996.
- [99] Z. CE, «The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity,» *J Bacteriol*, vol. 46(1), p. 39–56, 1943.
- [100] R. A. Smucker e C. K. Kim, *Chitinase Activity in Estuarine Waters*, Springer New York, 1991, pp. 249-269.
- [101] B. U, «Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure» *FEMS Microbiol Lett*, vol. 262(1), pp. 31-8, 2006 .
- [102] B. Y. Wang, B. Chi e H. K. Kuramitsu, «Genetic exchange between *Treponema denticola* and *Streptococcus gordonii* in biofilms» *Oral Microbiology and Immunology*, vol. 17, pp. 108-112, 2002.
- [103] S. T, «Extracellular polymeric substances of biofilms: Suffering from an identity crisis» *Water Research*, vol. 151, pp. 1-7, 2009.
- [104] Daddi Oubekka S, «Correlative time-resolved fluorescence microscopy to assess antibiotic diffusion-reaction in biofilms» *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 56(6), p. 3349–3358, 2012.
- [105] J. J. Harrison, H. Ceri e R. J. Turner, «Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms,» *Nature Reviews Microbiology*, vol. 5, pp. 928-938, 2007.

- [106] W. e. a. Khan, «Aminoglycoside resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms modulated by extracellular polysaccharide,» *Int. Microbiol*, vol. 13, p. 207–212 , 2010.
- [107] Brown, «Resistance of bacterial biofilms: a growth-related effect,» *J. Antimicrob. Chemother*, vol. 22, p. 777–783, 1988.
- [108] S. R. e. al, «Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study,» *JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY*, vol. 58, p. 8, 2009.
- [109] M. Monzón, C. Oteiza, J. Leiva, M. Lamata e B. Amorena, «Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics,» *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 44, pp. 319-324, 2002.
- [110] S. M. Amato, C. H. Fazen, T. C. Henry, W. W. K. Mok, M. A. Orman, E. L. Sandvik, K. G. Volzing e M. P. Brynildsen, «The role of metabolism in bacterial persistence,» *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, 2014.
- [111] T.-F. Mah, «Biofilm-specific antibiotic resistance,» *Future Microbiology*, vol. 7, pp. 1061-1072, 2012.
- [112] C. A. Fux, J. W. Costerton, P. S. Stewart e P. Stoodley, «Survival strategies of infectious biofilms,» *Trends in Microbiology*, vol. 13, pp. 34-40, 2005.
- [113] J. S. Madsen, M. Burmølle, L. H. Hansen e S. J. Sørensen, «The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer,» *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, vol. 65, pp. 183-195, 2012.
- [114] S. M. Borges A, «Quorum Sensing Inhibition by Marine Bacteria,» *Mar Drugs*, vol. 17(7), p. 427, 2019.
- [115] M. B. M. a. B. L. Bassler, «Quorum Sensing in Bacteria,» *Annual Review of Microbiology*, vol. 55, pp. 165-199, 2001.
- [116] J. KK, «What drives bacteria to produce a biofilm?,» *FEMS Microbiol Lett.*, vol. 236(2), pp. 163-73, 2004.
- [117] L. R. Hmelo, «Quorum Sensing in Marine Microbial Environments,» *Annual Review of Marine Science*, vol. 9, pp. 257-281, 2017.
- [118] J. Janssens, *L'ÂME-MIROIR*, Leuven University Press, 2008, pp. 203-218.
- [119] T. Czárán e H. Rolf F., «Janus-headed communication promotes bacterial cooperation and cheating: Is quorum sensing useful against infections?,» *Virulence*, vol. 1, pp. 402-403, 2010.
- [120] W. R. J. D. Galloway, J. T. Hodgkinson, S. D. Bowden, M. Welch e D. R. Spring, «Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria: Small-Molecule Modulation of AHL and AI-2 Quorum Sensing Pathways» *Chemical Reviews*, vol. 111, pp. 28-67, 2011.
- [121] Sturme MH, Kleerebezem M, Nakayama J, Akkermans AD, Vaughn EE, de Vos WM. «Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria.» *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002 Aug;81(1-4):233-43. doi: 10.1023/a:1020522919555. PMID: 12448722.

- [122] K. Janda, « Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing,» *Chem. Soc. Rev.*, vol. 37(7), pp. 1337-46, 2008.
- [123] S. Koul, J. Prakash, A. Mishra e V. C. Kalia, «Potential Emergence of Multi-quorum Sensing Inhibitor Resistant (MQSIR) Bacteria,» *Indian Journal of Microbiology*, vol. 56, pp. 1-18, 2015.
- [124] J. Bzdrenga, D. Daudé, B. Rémy, P. Jacquet, L. Plener, M. Elias e E. Chabrière, «Biotechnological applications of quorum quenching enzymes,» *Chemico-Biological Interactions*, vol. 267, pp. 104-115, 2017.
- [125] K. Lewis, «Riddle of Biofilm Resistance,» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 45, pp. 999-1007, 2001.
- [126] R. O. Darouiche, «Treatment of Infections Associated with Surgical Implants,» *New England Journal of Medicine*, vol. 350, pp. 1422-1429, 2004.
- [127] R. Donlan, «Biofilms and Device-Associated Infections,» *Emerging Infectious Diseases*, vol. 7, pp. 277-281, 2001.
- [128] D. J. Stickler, N. S. Morris e T. J. Williams, «An assessment of the ability of a silver-releasing device to prevent bacterial contamination of urethral catheter drainage systems,» *BJU International*, vol. 78, pp. 579-588, 1996.
- [129] J. M., «Bacterial biofilm and associated infections,» *Journal of the Chinese Medical Association*, vol. 21, pp. 7-11, 2018.
- [130] R. M. Donlan, «Biofilm Elimination on Intravascular Catheters: Important Considerations for the Infectious Disease Practitioner,» *Clinical Infectious Diseases*, vol. 52, pp. 1038-1045, 2011.
- [131] S. J. K. Zeya H. I., «Cationic Proteins of Polymorphonuclear Leukocyte Lysosomes II. Composition, Properties, and Mechanism of Antibacterial Action,» *Journal of Bacteriology*, vol. 91 (2), pp. 755-762, 1966.
- [132] C. Hancock, The Christine Hancock column, *Nursing Standard*, vol. 15, p. 27, 2000.
- [133] B. HG., «Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts,» *J Intern Med. Sep.*, vol. 254(3), pp. 197-215, 2003.
- [134] H. M., «Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance,» *Journal of applied microbiology*, vol. 113, pp. 723-736, 2012.
- [135] R. E. W. Hancock e H.-G. Sahl, «Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies,» *Nature Biotechnology*, vol. 24, pp. 1551-1557, 2006.
- [136] H. RE, «Peptide antibiotics,» *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 43(6), pp. 1317-23., 1999 .
- [137] G. R. Lai Y, «AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense,» *Trends in immunology*, vol. 30, pp. 131-141, 2009.
- [138] H. Bals e C. Reichard, *Das neue kommunale Haushalts- und Rechnungswesen*, Gabler Verlag, 2000, pp. 203-233.
- [139] M. Zasloff, «Antimicrobial peptides of multicellular organisms,» *Nature*, vol. 415, pp. 389-395, 2002.

- [140] R. A., «Antimicrobial peptides from amphibian skin: an expanding scenario: Commentary» *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 6, pp. 799-804, 2002.
- [141] R. M. Epanand e H. J. Vogel, «Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1462, pp. 11-28, 1999.
- [142] Mahlapuu M, «Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents» *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 6, p. 194, 2016.
- [143] Talapko J, Meštrović T, Juzbašić M, Tomas M, Erić S, Horvat Aleksijević L, Bekić S, Schwarz D, Matic S, Neuberg M, Škrlec I. «Antimicrobial Peptides-Mechanisms of Action, Antimicrobial Effects and Clinical Applications. » *Antibiotics (Basel)*. 2022 Oct 16;11(10):1417. doi: 10.3390/antibiotics11101417. PMID: 36290075; PMCID: PMC9598582.
- [144] Gidalevitz D, «Interaction of antimicrobial peptide protegrin with biomembranes» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100 (11), pp. 6302-6307, 2003.
- [145] M. R. Yeaman e N. Y. Yount, «Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance» *Pharmacological Reviews*, vol. 55, pp. 27-55, 2003.
- [146] Y. Shai, «Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1462, pp. 55-70, 1999.
- [147] Zhu W. L., «Cathelicidin-derived Trp/Pro-rich antimicrobial peptides with lysine peptoid residue (Nlys): therapeutic index and plausible mode of action» *Journal of Peptide Science*, vol. 13, pp. 529-535, 2007.
- [148] P. Riley, *The Cambridge Companion to Rousseau*, Cambridge University Press, 2001.
- [149] R. E. W. Hancock e D. S. Chapple, «Peptide Antibiotics» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 43, pp. 1317-1323, 1999.
- [150] J. H., «Peptide antimicrobial agents» *Clin Microbiol Rev.*, vol. 19(3), pp. 491-511., 2006.
- [151] L. Yang, T. A. Harroun, T. M. Weiss, L. Ding e H. W. Huang, «Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores,» *Biophysical Journal*, vol. 81, pp. 1475-1485, 2001.
- [152] A. S. Ladokhin e S. H. White, «'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1514, pp. 253-260, 2001.
- [153] S. Yamaguchi, T. Hong, A. Waring, R. I. Lehrer e M. Hong, «Solid-State NMR Investigations of Peptide-Lipid Interaction and Orientation of a β -Sheet Antimicrobial Peptide, Protegrin†,» *Biochemistry*, vol. 41, pp. 9852-9862, 2002.
- [154] M. R. Yeaman e N. Y. Yount, «Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance» *Pharmacological Reviews*, vol. 55, pp. 27-55, 2003.
- [155] Jenssen, «Peptide antimicrobial agents,» *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 19, p. 491-511, 2006.
- [156] S. M. Vizioli J, «Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates,» *Trends Pharmacol Sci. Nov.;*., vol. 23(11), pp. 494-6, 2002.
- [157] M. G. Batoni G, «In Vitro Bactericidal Activity of Human β -Defensin 3 against Multidrug-Resistant Nosocomial Strains,» *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 50(2), p. 806-809, 2006.

- [158] K. R. Chunga P. Y., «Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria,» *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, vol. 50, pp. 405-410, 2017.
- [159] M. L. Mangoni, G. Maisetta, M. Di Luca, L. M. H. Gaddi, S. Esin, W. Florio, F. L. Brancatisano, D. Barra, M. Campa e G. Batoni, «Comparative Analysis of the Bactericidal Activities of Amphibian Peptide Analogues against Multidrug-Resistant Nosocomial Bacterial Strains,» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 52, pp. 85-91, 2007.
- [160] A. Bahar e D. Ren, «Antimicrobial Peptides,» *Pharmaceuticals*, vol. 6, pp. 1543-1575, 2013.
- [161] S. Y. Arslan, K. P. Leung e C. D. Wu, «The effect of lactoferrin on oral bacterial attachment,» *Oral Microbiology and Immunology*, vol. 24, pp. 411-416, 2009.
- [162] Gopal R, «Synergistic effects and antibiofilm properties of chimeric peptides against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains,» *Antimicrob Agents Chemother.*, vol. 58(3, p. 1622–1629, 2014.
- [163] D. Andreu, J. Ubach, A. Boman, B. Wåhlin, D. Wade, R. B. Merrifield e H. G. Boman, «Shortened cecropin A-melittin hybrids Significant size reduction retains potent antibiotic activity,» *FEBS Letters*, vol. 296, pp. 190-194, 1992.
- [164] H. Oh, M. Hedberg, D. Wade e C. Edlund, «Activities of Synthetic Hybrid Peptides against Anaerobic Bacteria: Aspects of Methodology and Stability,» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 44, pp. 68-72, 2000.
- [165] H. M. Edlund C., «Antianaerobic activity of a cecropin-melittin peptide,» *Clinical microbiology and infection*, vol. 4, pp. 181-185, 1998.
- [166] B. Christensen, J. Fink, R. B. Merrifield e D. Mauzerall, «Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes.,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 85, pp. 5072-5076, 1988.
- [167] T. Silva, B. Claro, B. F. B. Silva, N. Vale, P. Gomes, M. S. Gomes, S. S. Funari, J. Teixeira, D. Uhríková e M. Bastos, «Unravelling a Mechanism of Action for a Cecropin A-Melittin Hybrid Antimicrobial Peptide: The Induced Formation of Multilamellar Lipid Stacks,» *Langmuir*, vol. 34, pp. 2158-2170, 2018.
- [168] G. Bierbaum, «Influence of cationic peptides on the activity of the autolytic endo- β -N-acetylglucosaminidase of *Staphylococcus simulans* 22,» *FEMS Microbiology Letters*, vol. 58, pp. 223-227, 1989.
- [169] P. Engström, A. Carlsson, A. Engström, Z. J. Tao e H. Bennich, «The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*,» *The EMBO Journal*, vol. 3, pp. 3347-3351, 1984.
- [170] J. S. Mader e D. W. Hoskin, «Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment,» *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 15, pp. 933-946, 2006.
- [171] D. W. Hoskin e A. Ramamoorthy, «Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1778, pp. 357-375, 2008.

- [172] R. Smolarczyk, T. Cichoń, W. Kamysz, M. Głowala-Kosińska, A. Szydło, Ł. Szultka, A. L. Sieroń e S. Szala, «Anticancer effects of CAMEL peptide,» *Laboratory Investigation*, vol. 90, pp. 940-952, 2010.
- [173] D. W. Hoskin e A. Ramamoorthy, «Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1778, pp. 357-375, 2008.
- [174] Giacometti A., «Comparative activities of cecropin A, melittin, and cecropin A–melittin peptide CA(1–7)M(2–9)NH₂ against multidrug-resistant nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*,» *Peptides*, vol. 4, pp. 1315-1318, 2003.
- [175] Giacometti A., «In vitro activity and killing effect of the synthetic hybrid cecropin A–melittin peptide CA(1–7)M(2–9)NH₂ on methicillin-resistant nosocomial isolates of *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics,» *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 49, pp. 197-200, 2004.
- [176] J. M. Błazewicz I, «Activity of antimicrobial peptides and conventional antibiotics against superantigen positive *Staphylococcus aureus* isolated from patients with atopic dermatitis.,» *Postepy Dermatol Alergol.*, vol. 35(1), pp. 74-82, 2018.
- [177] Mangoni ML, «Comparative Analysis of the Bactericidal Activities of Amphibian Peptide Analogues against Multidrug-Resistant Nosocomial Bacterial Strains,» *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 52 (1), pp. 85-91, 2007.
- [178] D. D., «Activity of a melimine derived peptide Mel4 against *Stenotrophomonas*, *Delftia*, *Elizabethkingia*, *Burkholderia* and biocompatibility as a contact lens coating,» *Contact lenses & anterior eye*, vol. 40, p. 175–183, 2017.
- [179] H. Pletzer, «Antibiofilm Peptides: Potential as Broad-Spectrum Agents,» *J Bacteriol.* , vol. 198(19), p. 2572–2578, 2016 .
- [180] de la Fuente-Nunez C, «Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response.,» *PLoS Pathog.* vol. 10, p. 1004152, 2014.
- [181] de la Fuente-Nunez C, «D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections.,» *Chem Biol.* , vol. 22, p. 196–205, 2015.
- [182] Reffuveille F, «A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms.,» *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 58, p. 5363–5371, 2014.
- [183] Wang Z, «Treatment of oral multispecies biofilms by an anti-biofilm peptide,» *PLoS One.*, vol. 10:e, p. 0132512, 2015.