

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA IN VITRO DI PROTEGRIN-1 (PG-1) NEI CONFRONTI DI CEPPI CLINICI DI *ACINETOBACTER BAUMANNII* MULTIDRUG-RESISTANT

Relatore:
Prof.Andrea Giacometti

Tesi di Laurea di:
Nicolò Vecchiarelli

A.A. 2025 / 2026

INDICE

INTRODUZIONE 1

1. *Acinetobacter baumannii* 1

1.1. Trasmissione 1

1.2. Fattori di virulenza 2

1.3. Meccanismi di difesa immunologici 4

1.4. Antibiotico-resistenza 5

1.5. Manifestazioni cliniche 6

1.6. Opzioni terapeutiche 7

2. Peptidi Antimicrobici 8

2.1. Storia 9

2.2. Classificazione 9

2.3. Meccanismo d'azione 10

2.4. AMPs come agenti terapeutici 13

3. Protegrin-1 (PG-1) 14

SCOPO DELLA TESI 15

MATERIALI E METODI 16

1. Ceppi batterici 16

2. PG-1 e antibiotici 17

3. Determinazione della sensibilità a PG-1 17

4. Test Time-kill 18

5. Checkerboard 19

6. Biofilm 19

7. Induzione di resistenza 20

RISULTATI 21

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI 24

BIBLIOGRAFIA 27

INTRODUZIONE

1. *Acinetobacter baumanii*

Acinetobacter baumannii è uno dei patogeni più problematici per le istituzioni sanitarie di tutto il mondo. Negli ultimi anni ha acquisito notevole rilevanza clinica per la sua capacità di sviluppare e acquisire velocemente meccanismi di resistenza verso numerosi antibiotici [3]. *Acinetobacter baumannii* si presenta abitualmente con un fenotipo multidrug-resistant (MDR), cioè resistente almeno a tre o più differenti classi di antibiotici [4]. Non a caso, l'OMS lo ha inserito nel gruppo degli organismi ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii, Pseudomonas aeruginosa* e specie di *Enterobacter*), patogeni in grado di acquisire in maniera semplice resistenze agli antibiotici [5]. Inoltre nel 2017, *A. baumannii* è stato anche inserito nella lista della WHO di patogeni per cui lo sviluppo di nuovi antibiotici è una necessità di livello critico [6].

Il genere *Acinetobacter* comprende più di cinquanta specie di coccobacilli Gram-negativi, aerobi, catalasi positivi, ossidasi-negativi, non mobili e non fermentanti [8], la maggior parte delle quali non patogene e ubitariamente presenti nell'ambiente. *A. baumannii,* sebbene possa considerarsi un patogeno di basso grado, è una causa importante di infezioni opportunistiche in tutto il mondo [3].

Le infezioni da *A. Baumannii* raggiungono 1 milione di casi l'anno [9]. Ricorrono soprattutto nelle unità di terapia intensiva [10], dove la presenza di pazienti critici e immunocompromessi si associa all'impiego di meccanismi di ventilazione invasivi e cateteri, che facilitano l'ingresso del microorganismo nell'ospite, e ad un largo uso di antibiotici, che favorisce la selezione di meccanismi di resistenza. Per queste ragioni, *A. baumannii* è tipicamente associato a infezioni nosocomiali, anche se sta gradualmente aumentando la frequenza delle infezioni acquisite in comunità [8].

1.1. Trasmissione

La trasmissione di *A. baumannii* avviene soprattutto grazie alla sua capacità di permanere a lungo sulle superfici dell'ambiente e di colonizzare le mani del personale sanitario [11,12], anche se sono stati descritti casi di trasmissione via aerosol da pazienti infetti o

colonizzati [10]. La crescita batterica sembra essere favorita da un alto livello di umidità ed è stato osservato che umidificatori e raccolte d'acqua possono comportarsi da reservoir ambientali [11].
Le infezioni da *A. baumannii* si verificano prevalente in pazienti immunocompromessi. Le condizioni predisponenti l'infezione sono tutte quelle in cui si verifica un'interruzione delle barriere di difesa anatomiche dell'ospite, come l'impiego di ventilazione meccanica, la cateterizzazione venosa o urinaria, gli interventi chirurgici, le procedure invasive, e una prolungata terapia antibiotica ad ampio spettro [13,14,15,16,17,18], che determina l'alterazione della normale flora microbica dell'ospite e la selezione di ceppi resistenti.

1.2. Fattori di virulenza

A. baumannii è la specie di A*cinetobacter* più virulenta [19]. Alcune delle sue caratteristiche di virulenza sono infatti una maggiore resistenza alla fagocitosi da parte dei macrofagi e una migliore capacità di crescere a temperatura a 37°C rispetto alle altre specie [19]. Un altro aspetto di *A. baumannii*, che risulta fondamentale per la sua diffusione, è la sua resistenza alla disinfezione e all'essiccamento. *A.baumannii* può rimanere sulle superfici solide colonizzate per mesi, addirittura anni [20,21]. L'etanolo ne facilita la crescita, aumentandone anche la tolleranza al sale [22].
A.baumannii inoltre possiede numerosi fattori di virulenza, di seguito elencati.

Porine

Le porine sono proteine della membrana esterna che intervengo nella regolazione della permeabilità cellulare. Uno dei fattori di virulenza meglio caratterizzati di *A. baumannii* è la porina OmpA che induce l'apoptosi delle cellule epiteliali umane [23] e si lega al fattore H sierico [24], meccanismo che potrebbe essere implicato nella capacità del batterio di sfuggire l'uccisione mediata dal complemento [25]. OmpA lega anche la fibronectina, partecipando ai processi di aderenza ed invasione cellulare [23,26,27]. Favorendo la formazione di biofilm e la motilità di *A. baumannii*, OmpA ne aumenta la sopravvivenza e persistenza [26,28,29]. È stato inoltre ipotizzato che questa porina possa associarsi ai sistemi di efflusso della membrana interna e sia coinvolta nell'estrusione degli antibiotici attraverso la membrana esterna.

Polisaccaridi capsulari e LPS

La capsula, con la sua carica di superficie negativa, rappresenta un fattore di virulenza di primaria importanza e la prima difesa di *A. baumannii* contro la distruzione e opsonizzazione mediata dal complemento e dalla fagocitosi macrofagica [30,31-34]. Sia i polisaccaridi che LPS sono implicati nella resistenza agli antibiotici.

Fosfolipasi

Le fosfolipasi sono enzimi lipolitici che attraverso la degradazione dei lipidi di membrana alterano la stabilità delle membrane cellulari. Il gruppo di testa, risultante dal clivaggio, potrebbe alterare la risposta immunitaria dell'ospite, interferendo con il signaling cellulare [35,36].

Vescicole della membrana esterna (OMV)

Le vescicole della membrana esterna sono vescicole delle dimensioni di 2-20 nm contenenti LPS, proteine di membrana, proteine periplasmatiche, fosofolipidi e DNA o RNA, secrete dalla membrana esterna di numerosi batteri Gram-negativi [37]. Le OMVs secrete da *A. baumannii* contengono anche OmpA [38,39,40], proteasi e fosfolipasi [38]. Queste vescicole sono in grado di veicolare diversi fattori di virulenza all'interno delle cellule dell'ospite, senza che si verifichi un diretto contatto tra il batterio e queste ultime [41].

Sistemi di acquisizione del ferro

Nonostante il ferro risulti abbondantemente presente nell'ambiente e nell'organismo, la sua disponibilità risulta bassa a causa della sua bassa solubilità in ambiente aerobio a pH normale e a causa della chelazione da parte di composti a basso peso molecolare, come l'eme, o composti ferro-leganti ad alta affinità, come lattoferrina e transferrina [42,43]. Molti batteri aerobi, per superare il problema della limitata disponibilità di ferro, producono dei chelanti ad alta affinità chiamati siderofori [43]. Tra i siderofori di *A. baumannii*, il meglio caratterizzato è acinetobactin, che costituisce un rilevante fattore di virulenza, insieme a NfuA, una proteina che partecipa alla formazione di cluster Fe-S e interviene in risposta alla chelazione del ferro e allo stress ossidativo [44].

Sistemi di secrezione di proteine

I sistemi di trasporto di proteine sono complessi multiproteici che traslocano varie proteine effettrici dallo spazio periplasmico all'ambiente extracellulare. *A. baumannii* possiede il sistema di trasporto di tipo II, i cui substrati identificati finora sono lipasi (LipA, lipH e LipAn) e la metallopeptidasi CpaA [45]. *A. baumannii* è provvisto anche del sistema di trasporto di tipo VI, che è coinvolto nell'uccisione dei batteri competitivi [46], e di tipo V, che studi su modelli animali hanno dimostrato partecipare alla formazione del biofilm, all'adesione a componenti della matrice extracellulare come il collagene I, III e IV e alla virulenza [47].

Penicillin binding protein 7/8 e β lattamasi PER-1

PBP7/8 è un fattore di virulenza di *A. baumannii*. Mutazioni del gene codificante per la PBP7/8, determinano infatti una diminuita crescita nel siero umano e una ridotta sopravvivenza in modelli animali infetti [48]. β-lattamasi PER-1 sembra invece partecipare all'adesione cellulare [49].

Biofilm

A. baumannii è un forte produttore di biofilm [50], che svolge un ruolo fondamentale, permettendo al batterio di evadere la risposta immune [51] e diminuendone la sensibilità all'antibiotico.

1.3. Meccanismi di difesa immunologici

Nel primo stadio dell'infezione, la clearance di *A. baumannii* è mediata dagli effettori del sistema immunitario innato, cioè da macrofagi, neutrofili e complemento. Non sempre questa prima risposta elimina efficacemente il microrganismo. È possibile che *A. baumannii* resista all'uptake macrofagico e all'eliminazione mediata dal complemento. In questi casi in cui *A. baumanni* sopravvive e si replica, LPS va a legarsi ai Toll Like Receptors (TLR4) presenti sulle cellule dell'ospite inducendo il rilascio di citochine infiammatorie, tra cui interleukina (IL-8) e Tumor Necrosis Factor α (TNF-α), determinando una Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica (SIRS). Studi su

modelli animali hanno evidenziato come non sia la densità batterica, quanto la risposta infiammatoria che si innesca a determinare un danno nell'ospite.
Gli antibiotici accelerano la clearance dell'organismo, evitando che si inneschi una risposta settica dannosa per l'ospite. La resistenza a questi determina una maggiore persistenza del batterio nel sangue o nei tessuti, scatenando la cascata infiammatoria. L'antibiotico-resistenza è il principale determinante dell'outcome clinico dell'infezione [10].

1.4. Antibioticoresistenza

A. baumannii si caratterizza per la capacità di acquisire rapidamente e facilmente geni per l'antibioticoresistenza da altre specie batteriche [52,53], e per la possibilità di svilluppare resistenza nel corso della terapia. I ceppi di *A. baumannii* MDR sono passati, infatti, da meno del 4% nel 2000 a più del 60% nel 2016 [10].
I meccanismi di resistenza implicati sono numerosi e comprendono: β lattamasi, pompe di efflusso, alterazioni di permeabilità, enzimi modificanti gli aminoglicosidi, l'alterazione dei siti target.
Le β lattamasi sono enzimi capaci di inattivare gli anitibiotici β lattamici e possono essere suddivise in quattro classi, tutte presenti in *A. baumanni*. La classe A idrolizza penicilline e cefalosporine [54], la classe B media l'idrolisi di tutti i β lattamici, compresi i carbapenemici, ad eccezione dei monobattamici [54]. La classe C conferisce resistenza a cefamicine, penicilline, cefalosporine. Infine, le β-lattamasi di classe D, chiamate anche oxacillinasi, sono coinvolte nella resistenza ai carbapenemici [25].
Le pompe di efflusso sono anch'esse divise in quattro categorie e mediano la resistenza verso diverse classi di antibiotici, tra cui aminoglicosidi, fluorochinoloni, tetracicline, fosfomicina, cloramfenicolo, carbapenemici [25]. La pompa adeABC, in particolare, ha dimostrato di svolgere un ruolo importante nella resistenza alla tigeciclina, una delle ultime risorse terapeutiche verso *A. baumannii* MDR [55]. Alcune pompe di efflusso sono associate a una minore suscettibilità a disinfettanti e detergenti.
L'antibioticoresistenza è influenzata anche da variazioni della permeabilità di membrana [25]. Le porine, che regolano gli scambi di molecole attraverso la membrana esterna, rivestono quindi un ruolo importante nei meccanismi della resistenza agli antibiotici. La resistenza ai carbapenemici è infatti collegata ad una ridotta espressione di alcune porine,

tra cui CarO, Omp22-23, Omp33-36, Omp37, Omp43, Omp44 e Omp44 [25]. Anche i componenti dell'envelope sono coinvolti. La resistenza di *A. baumannii* verso la colistina è aumentata nei ceppi in cui si è verificata la perdita o la modificazione dell'LPS [56,57]. Gli enzimi aminoglicosidi-modificanti possono essere acetiltransferasi, adeniltransferasi e fosfotransferasi, e sono il principale meccanismo di resistenza di *A. baumannii* verso gli aminoglicosidi.

L'alterazione dei siti target di antibiotici rappresenta un altro meccanismo di antibiotico-resistenza. in *A. baumannii* sono state riscontrate, ad esempio, variazioni delle PBP, con ridotta affinità all'imipenem [58], modificazioni delle subunità di DNA girasi e topoisomerasi IV, responsabili della resistenza ai chinoloni.

1.5. Manifestazioni cliniche

Le infezioni da *A. baumannii* si manifestano principalmente come infezioni di pazienti ospedalizzati, tra le quali le più frequenti sono polmoniti nosocomiali e polmoniti associate a ventilazione meccanica.

Le polmoniti da *A. baumannii* sono clinicamente simili a quelle causate da altri patogeni. Nella maggioranza dei casi i pazienti presentano febbre, tosse e produzione di espettorato. Le indagini radiografiche possono risultare negative o mostrare consolidazioni lobari polmonari e, solo in una minoranza di casi, versamento pleurico. La diagnosi si fonda sul sospetto clinico, a cui si aggiungono le indagini strumentali e i dati microbiologici [59].

A. baumannii è in grado anche di provocare batteriemie nosocomiali. Il tasso di incidenza delle batteremie causate da *A. baumannii* è abbastanza ridotto (1-2%), ma queste infezioni hanno tassi di mortalità che raggiungono il 40%. La batteriemia può derivare dall'infezione di un CVC, o dalla disseminazione del batterio da altri focolai d'infezione, solitamente a livello del polmone, delle vie urinarie o di ferite.

Altre manifestazioni cliniche dell'infezione da *A. baumannii* sono le meningiti, in seguito a procedure chirurgiche, soprattutto nei pazienti con drenaggio ventricolare esterno, e le infezioni delle vie urinarie, in portatori di catetere vescicale. Rari sono i casi documentati di endocardite su valvola protesica, endoftalmiti e cheratiti, associate all'utilizzo di lenti a contatto o a chirurgia oculare [60].

La diagnosi si basa sull'isolamento di *A. baumanni* da campioni biologici (espettorato, sangue, liquor, urine, tamponi) ai quali segue la determinazione del pattern di sensibilità agli antibiotici mediante antibiogramma.
Le infezioni da *A. baumannii* acquisite in comunità sono meno frequenti e si registrano in zone con clima caldo e umido [61,62], specialmente in Australia e Asia. I pazienti colpiti presentano spesso comorbidità, come diabete, insufficienza renale, neoplasie, BPCO, e sono forti fumatori o hanno alle spalle una storia di abuso d'alcol [14,61]. L'infezione può causare una polmonite acuta o, più raramente, con batteriemia primaria, cellulite o meningite [14]. In alcuni casi si sviluppa una polmonite fulminante che ha un tasso di letalità del 50% e che richiede il ricovero in un'unità di terapia intensiva [60].

1.6. Opzioni terapeutiche

La diffusa resistenza di *A. baumannii* ai β lattamici, mediata dalle β lattamasi, ha imposto l'impiego di altre classi di antibiotici.
In un primo momento i carbapenemici si sono dimostrati efficaci, ma ad oggi più del 50% dei ceppi di *A. baumannii* è resistente [10].
I fluorochinoloni e gli aminoglicosidi non dovrebbero essere considerati per la terapia empirica a causa dell'elevata incidenza di resistenza.
Il sulbactam, un'inibitore delle β lattamasi, ha un'affinità intrinseca per le PBP di *A. baumannii*, verso il quale mostra attività antimicrobica diretta. Per questo motivo è stato impiegato per il trattamento per le infezioni di *A. baumannii* MDR, ma si sta registrando un aumento delle resistenze anche nei confronti di questo agente [10,25].
Un'opzione terapeutica per il trattamento di infezioni da *A. baumannii* MDR è la tigeciclina, anche se da studi e metanalisi è emerso che il suo uso è associato a ospedalizzazioni più lunghe, minore eradicazione batterica, maggiore mortalità intraospedaliera [63]. Il numero di ceppi di *A. baumannii* resistenti alla tigecliclina sta però crescendo e raggiunge già il 50% in alcune regioni [10].
L'ultima risorsa terapeutica disponibile per i ceppi di *A. baumannii* MDR sembra essere la colistina, che è una polimixina. Le polimixine sono peptidi policationici, molto attivi nei confronti dei batteri Gram-negativi [64,65]. Il problema di questi farmaci è la loro elevata tossicità, che si manifesta soprattutto a livello renale e neurologico. Date le importanti controindicazioni, la colistina viene utilizzata come last resort agent nel

trattamento degli *A. baumannii* che non rispondono ad altre terapie. Anche se meno frequente rispetto a quella verso altri antibiotici, la resistenza alle polimixine è già stata documentata e sta aumentando [66,67]. Recentemente, studi di sorveglianza hanno dimostrato che negli USA il 5.3% degli *Acinebacer* isolati è resistente alla colistina [67]. Alcuni dati sembrano suggerire che terapie combinate possano ridurre l'emergenza di resistenza [68,69,70], ma al giorno d'oggi non ci sono evidenze chiare a conferma di questa tesi [71,72].
Alla luce di tutto ciò appare chiara la necessità di identificare nuovi agenti terapeutici verso *A. baumannii* MDR.

2. Peptidi antimicrobici

I peptidi antimicrobici o AMPs, anche conosciuti come "host defense peptides", sono piccoli peptidi, composti da 10 a 50 amminoacidi, anfipatici, carichi positivamente e presenti in tutte le forme di vita, dai microorgansimi agli esseri umani [73]. Gli AMPs sono importanti componenti dell'immunità innata, termine con il quale intendiamo una serie di risposte non specifiche, geneticamente determinate, che non richiedono una precedente esposizione ad agenti esterni potenzialmente patogeni, attuate al fine di proteggere l'organismo da infezioni. I peptidi antimicrobici possono considerarsi un sistema di difesa di "prima linea", presente dalla nascita (la sintesi delle *defensine enteriche* nel tessuto fetale ha inizio dalle 13 alle 17 settimane successive alla gestazione) [74]. Gli AMPs partecipano alla difesa dell'ospite da agenti patogeni, attraverso l'attività antimicrobica diretta e le proprietà immunomodulatorie [75].
Gli AMPs si trovano nelle secrezioni delle cellule epiteliali di cute e mucose e nei granuli dei neutrofili [76,77]. Nella maggior parte dei casi gli AMPs vengono prodotti come precursori inattivi, che necessitano di un taglio proteolitico per l'attivazione [78]. Alcuni peptidi sono espressi costitutivamente, vengono immagazzinati come precursori inattivi nei granuli e vengono poi rilasciati nei siti di infiammazione e infezione, mentre altri vengono sintetizzati in risposta alla presenza di citochine o di pattern molecolari associati ai patogeni (PAMPS) [79,80]. I peptidi antimicrobici hanno un ampio spettro d'azione, che comprende gram-positivi, gram-negativi, funghi, virus e parassiti [81].

2.1. Storia

La prima proteina antimicrobica umana scoperta è stata il lisozima, identificato da Fleming nel 1922. Questa scoperta fu oscurata da quella successiva della penicillina. Con l'introduzione degli antibiotici nella pratica clinica, l'attenzione verso altri potenziali agenti antimicrobici è diminuita, fino a quando, nel 1960, sono comparse le prime resistenze agli antibiotici. I primi AMPs identificati furono le *tionine*, presenti nelle piante. A questa scoperta seguì l'isolamento, negli anni Sessanta, della bromocrina nelle rane e della lattoferrina nel latte. Nel 1981, uno studio di Bosman dimostrò che l'iniezione di batteri in *Hyalophora cecropia* causava la produzione di un potente AMP, di 37 amminoacidi, poi denominato 'cecropina' [82]. I peptidi così indotti dimostrarono una potente attività antibatterica nei confronti di molti Gram-negativi, fra cui *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Un altro importante gruppo di AMPs chiamati 'megainine' venne indivuato e caratterizzato nel 1987, da Zasloff e i suoi colleghi, dalle rane *Xenopus Iaevis.* Negli anni 90 il gruppo di ricerca di Hoffmann mostrò che l'ablazione dei geni codificanti per gli AMPs nel moscerino della frutta si associava a gravi infezioni fungine, fornendo la prima evidenza dell'importanza dei peptidi nei meccanismi di difesa degli insetti. Nel 1994 sono stati isolati AMPs dalla cute dei mammiferi e prove su topi knock-out per i geni AMPs hanno dimostrato la partecipazione di questi alla risposta immunitaria. Ad oggi sono stati isolati più di 2500 AMPs, depositati nell' Antimicrobial Peptides Database (http://aps.unmc.edu/AP/main.php) [82].

2.2. Classificazione

In base alla struttura secondaria possiamo suddividere gli AMPs in 4 gruppi:

- peptidi a α elica: hanno struttura random in soluzioni acquose ma a contatto con membrane biologiche assumono una struttura anfipatica [83,84]. I due peptidi maggiormente studiati di questo gruppo sono LL-37 e la lattoferricina umana;
- Peptidi a foglietto β: sono anfipatici [83] e sono stabilizzanti da ponti disolfuro [85,86]. A questo gruppo appartengono le defensine, presenti in neutrofili, macrofagi e cellule epiteliali [80,84];

- Peptidi con struttura estesa ricchi in glicina, prolina, triptofano e/o istidina: assumono una struttura anfipatica quando vengono a contatto con le membrane [87]. Il peptide di meglio studiato è l'indolicina;
- peptidi loop con un ponte disolfuro: il maggiore esponente di questo gruppo è la bactenecina.

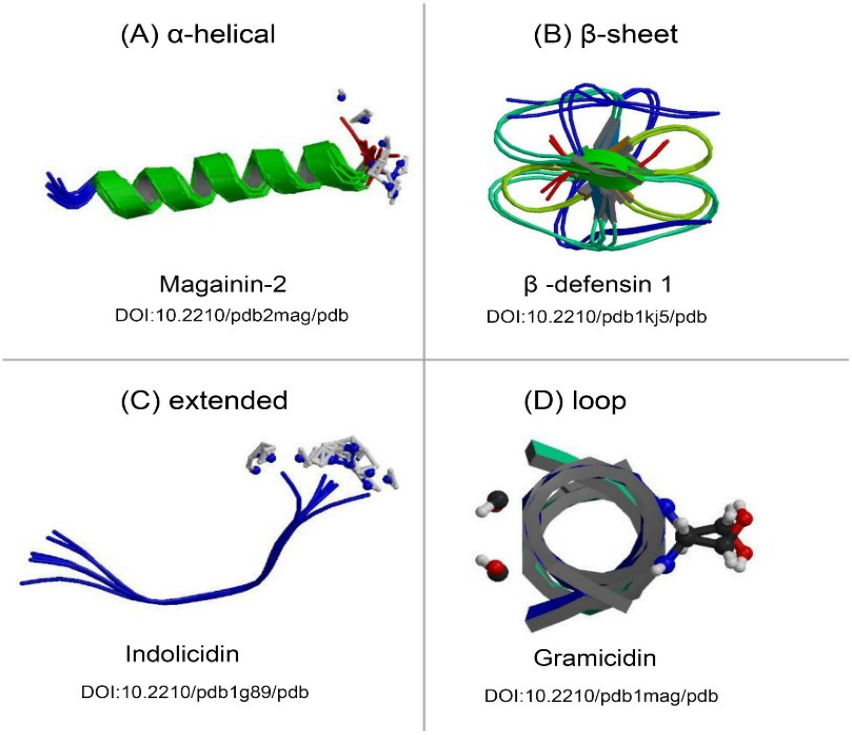


Figura 1. *Modelli proteici che rappresentano le differenze strutturali tra le quattro classi di peptidi antimicrobici. [88]*

2.3. Meccanismo d'azione

L'attività antimicrobica diretta degli AMPs si manifesta attraverso un'interazione mediata da forze elettrostatiche tra le membrane batteriche, cariche negativamente, e i peptidi antimicrobici, carichi positivamente [83,89,90,91]. I batteri, sia Gram-positivi che Gram-negativi, hanno una membrana citoplasmatica ricca di fosfatidilglicerolo, cardiolipina e fosfatidilserina, i cui gruppi carichi negativamente attraggono fortemente gli AMPs [83,91]. Esternamente alla membrana citoplasmatica, inoltre, i Gram-positivi possiedono uno spesso strato di peptidoglicano, mentre i gram-negativi presentano un sottile strato di peptidoglicano e una membrana esterna. La presenza degli acidi teicoici nella parete dei Gram-positivi e dei lipopolisaccaridi nella membrana esterna dei

Gram-negativi aumenta la carica negativa della superficie e favorisce il legame degli AMPs [80,91]. Una volta a contatto con la membrana citoplasmatica, i domini carichi dei peptidi interagiscono con i gruppi idrofilici dei fosfolipidi, mentre i domini idrofobici interagiscono con la porzione idrofobica del doppio strato lipidico [91].

Questo legame può determinare la rottura della membrana microbica: sono stati proposti 3 differenti modelli di interazione. Nel modello "barrel-stave" i peptidi si inseriscono perpendicolarmente nella membrana e l'interazione di più peptidi determina la formazione di un poro transmembrana, in cui le teste idrofiliche sono rivolte verso il centro del canale e i residui idrofobici sono a contatto con il core lipidico della membrana. Nel modello "toroidal-pore" l'interazione dei peptidi con la membrana causa il ripiegamento dei fosfolipidi, con il risultato di un poro formato dagli AMPs e dai gruppi di testa dei fosfolipidi. Il modello "carpet -like" prevede l'accumulo dei peptidi antimicrobici sulla membrana, il quale causa tensione nel doppio foglietto lipidico e infine determina la rottura della membrana e la formazione di micelle [73]. L'interruzione dell'integrità fisica della membrana causa la perdita di ioni e metaboliti, la depolarizzazione del potenziale transmembrana, l'alterazione delle funzioni cellulari e infine, la rottura della stessa e la lisi delle cellule microbiche [83,92,93].

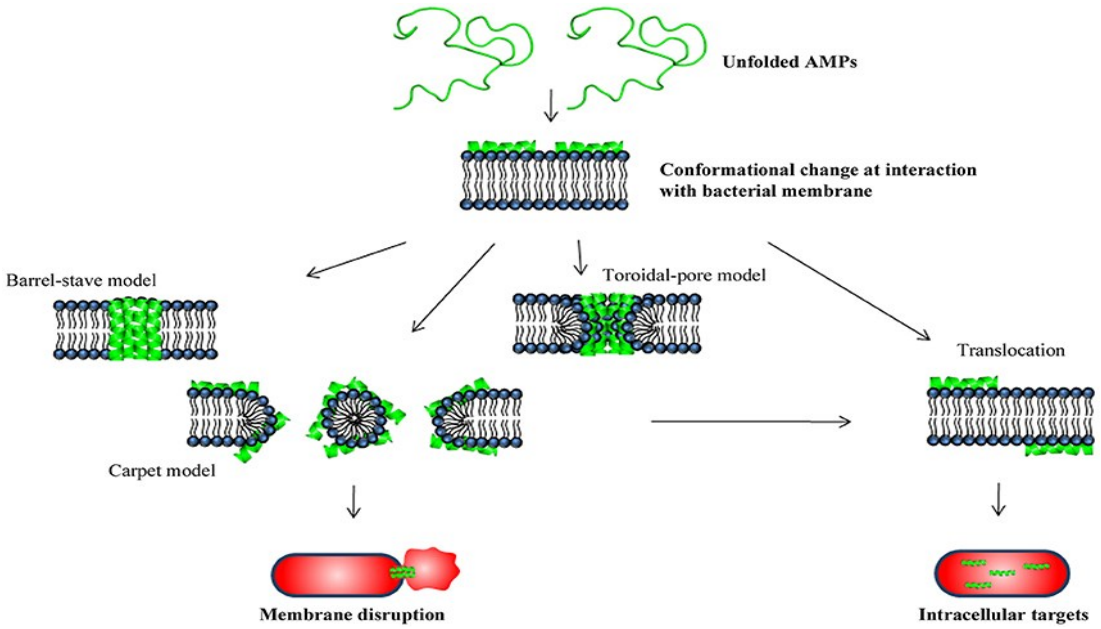


Figura 2. *Illustrazione schematica dei meccanismi di uccisione batterica degli AMPs. [73]*

Oltre alla capacità di interagire con la membrana provocandone la rottura, gli AMPs sono in grado di effettuare un "self-promoted uptake", traslocando all'interno della cellula e agendo su target intra-citoplasmatici [81].

Gli AMPs non agiscono sulle membrane cellulari dell'ospite. Queste ultime non hanno carica negativa, ma neutra, essendo ricche in fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e sfingomielina [83,91]. Le interazioni, di natura idrofobica, che si hanno tra AMPs e le cellule dell'ospite, sono molto più deboli rispetto alle interazioni elettrostatiche che si instaurano tra i peptidi e le cellule batteriche. Inoltre, l'alto contenuto di colesterolo delle membrane cellulari dei mammiferi riduce l'attività degli AMPs, stabilizzando la membrana. Il potenziale transmembrana, meno negativo di quello batterico contribuisce, alla selettività degli AMPs [83].

I peptidi antimicrobici possiedono anche proprietà immunomodulatorie. Contribuiscono alla clearance batterica stimolando la chemiotassi, modulando la differenziazione delle cellule del sistema immunitario e avviano la risposta immunitaria adattativa [73]. Gli AMPs sono anche coinvolti nella prevenzione di una risposta infiammatoria eccessiva e dannosa. Sono, infatti, in grado di sopprimere l'espressione dei toll-like receptors, la produzione di citochine proinfiammatorie indotta da LPS [94,95] e lo shock settico in modelli animali.

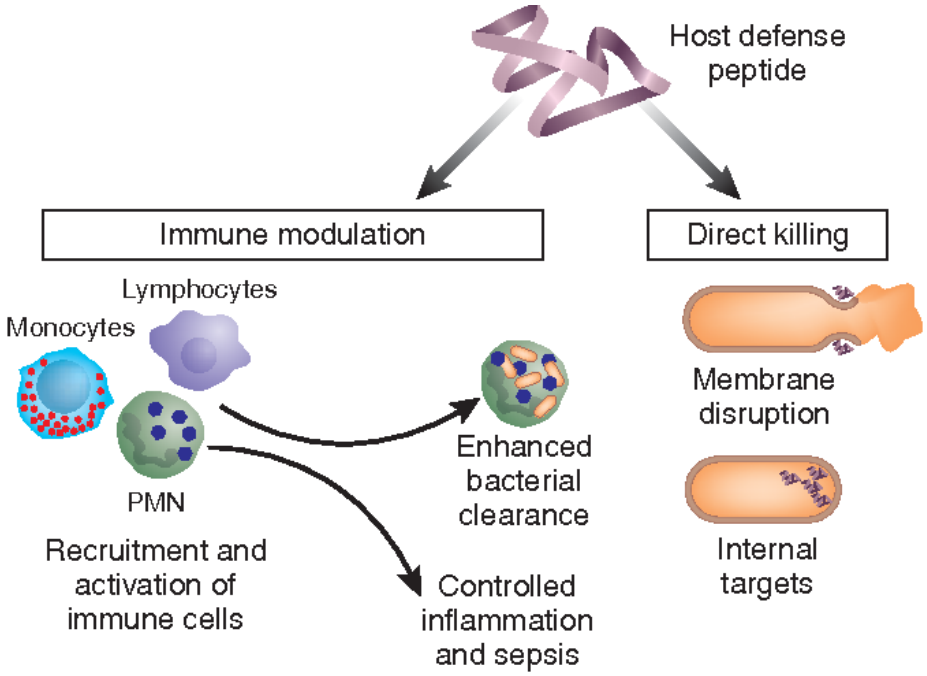


Figura 3. *Illustrazione schematica dei ruoli biologici degli AMPs.[81]*

2.4. AMPs come agenti terapeutici

Dato il rapido incremento delle resistenze nei confronti degli antibiotici tradizionali, gli AMPs hanno suscitato interesse come potenziali nuovi agenti antibiotici ad ampio spettro. Sono attivi contro numerosi microorganismi e, a differenza degli antibiotici utilizzati fino ad ora, non riconoscono un unico target con alta affinità ma agiscono alterando varie funzioni biologiche. Questa capacità di agire attraverso vari meccanismi e riconoscere diversi target a bassa affinità, rende meno probabile lo sviluppo di resistenze da parte dei batteri.

Al giorno d'oggi, sono molti gli AMPs oggetto di studi. Diversi peptidi hanno raggiunto la fase clinica della sperimentazione. Pexiganan, omiganan e LTX-109 sono quelli che si trovano in una fase di sviluppo clinico più avanzata.

Pexiganan è un peptide di 22 amminoacidi, analogo al peptide magainina isolato da *Xenopus.* Utilizzato come crema topica per il trattamento delle infezioni batteriche delle ulcere del piede diabetico, ha già raggiunto la fase III in due studi clinici [96,97].

Omiganan è un derivato dell'indolicina, isolata per la prima volta dai neutrofili dei bovini. È studiata come gel topico per le infezioni associate a cateteri e per la rosacea. Anche Omiganan è oggetto di diversi test clinici nei quali ha raggiunto la fase II/III [73].

LTX-109 è un peptidomimetico sintetico valutato come agente antimicrobico topico per le infezioni cutanee da Gram-positivi non compllicate, per l'impetigine e in soggetti colonizzati da *Stafilococcus Aureus* a livello nasale [98].

Sono studiati anche AMPs che agiscano per via sistemica. In particolare, hLF1-11, AMP derivato dalla lattoferricina umana, è in via di sviluppo per il trattamento di infezioni batteriche e fungine in pazienti immunocompromessi, destinati a ricevere un trapianto di cellule staminali [99].

3. Protegrin-1 (PG-1)

Le protegrine sono peptidi antimicrobici a foglietto β che appartengono alla famiglia delle catelicidine. Possiedono attività antimicrobica nei confronti di un ampio spettro di microorganismi (Gram-positivi, Gram-negativi, funghi). Oggi sono state identificate cinque protegrine (da PG-1 a PG-5), che differiscono per sequenza. Tra queste, la protegrina 1 (PG-1) è la più abbondante e meglio studiata.

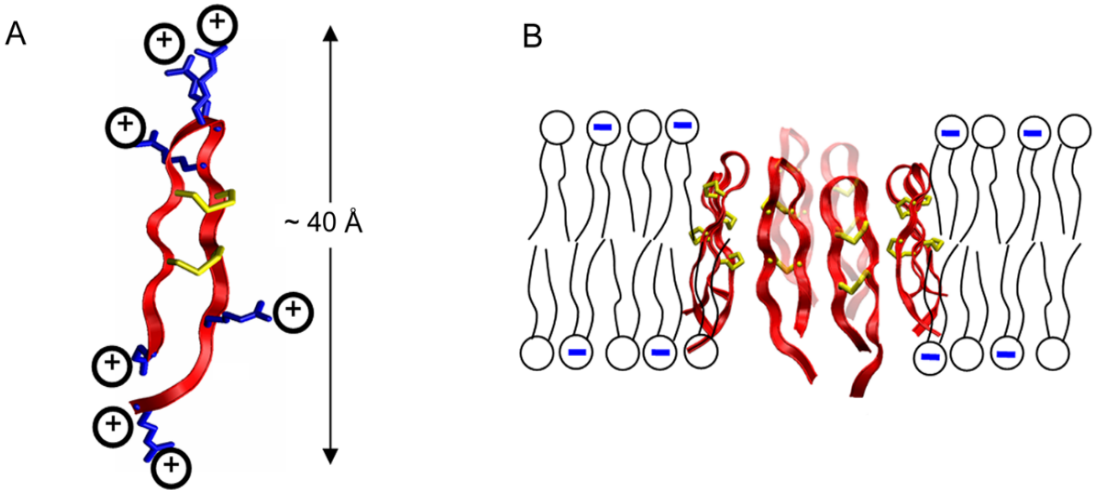


Figura 4. *A: un singolo peptide Protegrin-1; ponti disolfuro sono indicati in giallo, in blu le catene laterali di arginina cariche positivamente. B: otto protegrine aggregate a formare un poro transmembrana. [100]*

PG-1 è un peptide composto da 18 amminoacidi (RGGRLCYRRRFCVCVGR), isolato dai leucociti suini, ricco in cisteina e con struttura a β foglietto stabilizzata da due ponti disolfuro. L'attività antimicrobica di PG-1 è stata oggetto di studi. Uno studio in particolare ha dimostrato che PG-1 possiede un'attività battericida rapida nei confronti di *Stafilococcus Aureus* (MSSA e MRSA), *Enterococcus Faecalis* (vancomicina-sensibile e vancomicina-resistente, VREF), *Escherichia Coli* e *Pseudomonas Aeruginosa*. È stato anche osservato che questi stessi batteri, esposti a concentrazioni di PG-1 inferiori alla MIC, non sviluppavano resistenza, come invece accadeva per gli antibiotici convenzionali. Lo studio in vivo ha dimostrato che PG-1, somministrata endovena, proteggeva i topi infettati da *S.Aureus* o VREF dallo sviluppo di un'infezione letale [101]. Sebbene sia già stata dimostrata la sua attività nei confronti dei patogeni, sia Gram-positivi che Gram-negativi, non sono presenti ad oggi studi che dimostrino la sua efficacia nei confronti di patogeni MDR.

SCOPO DELLA TESI

La sempre maggiore resistenza dei microrganismi agli antibiotici rappresenta un'emergenza per i sistemi sanitari di tutto il mondo, per la quale è importante trovare velocemente una soluzione. In questo panorama, alcuni microorganismi in particolare, causano maggiore preoccupazione. Uno tra questi è *A. baumannii*, che oltre a essere una causa importante di infezioni nosocomiali, è in grado di sviluppare velocemente resistenza verso diverse classi antibiotiche. In molti casi, l'unica opzione terapeutica disponibile al giorno d'oggi è la colistina, ma anche verso quest'ultima si stanno documentando resistenze. La necessità di nuovi agenti terapeutici e le caratteristiche degli AMPs fanno pensare ad un loro possibile utilizzo in futuro come agenti antimicrobici.
L'obiettivo di questa tesi è studiare l'attività antimicrobica di PG-1 verso ceppi di *A. baumannii* MDR isolati da campioni clinici, e valutare la possibile sinergia tra questo peptide antimicrobico e gli altri antibiotici, comunemente utilizzati nella pratica clinica.

MATERIALI E METODI

1. Ceppi batterici

Per questo studio sono stati scelti 20 ceppi di *A. baumannii* MDR, isolati da campioni clinici (n=12 da broncoaspirato, n=2 da urinocoltura, n=2 da emocoltura, n=2 da tampone rettale, n=1 da tampone di ferita, n=1 da espettorato). L'identificazione di specie e i test di suscettibilità sono stati svolti tramite sistema VITEK II (bioMe´rieux, Marcy-l'E´toile, France). La suscettibilità dei ceppi di *A. baumannii* presi in esame nei confronti dei vari antibiotici è riportata nella tabella 1. Per gli esperimenti successivi sono stati scelti casualmente tre ceppi: 361823, 379385 e 378648. Per le determinazioni della minima concentrazione inibente (MIC) e della minima concentrazione battericida (MBC) è stato utilizzato anche *A. baumannii* ATCC 19606.

Tabella 1. Suscettibilità dei ceppi di *A. baumannii*.

Strain	MIC (mg/L)											
	AMC	CTX	ETP	IMP	MEM	CN	CIP	COL	SXT	TGC	FOS	F/M
108679	>32	>64	>8	>16	>16	>16	>4	<0.5	>320	2	>256	512
111806	>32	>64	>8	>16	>16	>16	>4	0.5	>320	<0.5	>256	>512
238719	>32	>64	>8	>16	>16	>16	>4	<0.5	>320	2	>256	>512
355521	>32	>64	>8	8	>16	>16	>4	<0.5	>320	4	>256	>512
361823	>32	>64	>8	>16	>16	<1	>4	0.5	>320	1	256	>512
371484	>32	>64	>8	>16	>16	>16	>4	<0.5	>320	0.5	>256	>512
371981	>32	>64	>8	>16	>16	4	>4	<0.5	>320	2	>256	>512
374792	>32	>64	>8	>16	>16	>16	>4	<0.5	>320	1	>256	>512
378177	>32	>64	>8	>16	>16	<1	>4	<0.5	>320	1	>256	>512
378648	>32	>64	>8	>16	>16	>16	>4	0.5	>320	1	128	256
379385	>32	>64	>8	>16	>16	>16	>4	0.5	>320	2	128	>512
379622	>32	>64	>8	>16	>16	>16	>4	<0.5	>320	2	>256	>512
380023	>32	>64	>8	>16	>16	>16	>4	<0.5	>320	1	>256	>512
380667	>32	>64	>8	>16	>16	2	>4	0.5	>320	4	>256	256
381476	>32	>64	>8	>16	>16	>16	>4	<0.5	>320	2	>256	256
381577	>32	>64	>8	>16	>16	<1	>4	<0.5	>320	2	>256	>512
382933	>32	>64	>8	>16	>16	>16	>4	<0.5	160	2	>256	>512
383074	>32	>64	>8	>16	>16	>16	>4	<0.5	160	2	>256	>512
383290	>32	>64	>8	>16	>16	>16	>4	<0.5	>320	<0.5	128	>512
386052	>32	>64	>8	>16	>16	>16	>4	<0.5	>320	2	128	>512

AMC, amoxicillina/acido clavulanico; CTX, cefotaxime; ETP, ertapenem; IMP, imipenem; MEM, meropenem; CN, gentamicina; CIP, ciprofloxacina; COL, colistina; SXT, sulfametossazolo/trimethoprim; TGC, tigeciclina; FOS, fosfomicina; F/M, nitrofurantoina;

2. PG-1 e antibiotici

PG-1 (RGGRLCYCRRRFCVCVGR-NH_2 con due ponti disolfuro, Cys6-Cys15 and Cys8-Cys13) è stata sintetizzata tramite "solid-phase chemistry" dal 9-fluorenilmetossicarbonil e purificata tramite cromatografia liquida ad alta pressione [102]. Gli antibiotici utilizzati, da soli o in combinazione con PG-1, sono stati: Colistina, Fosfomicina, Levofloxacina (Bioindustria, Novi Ligure, Italia), Meropenem (Hikma Pharmaceuticals, Londra, Gran Bretagna), Tigeciclina (Pfizer, New York, USA), Rifampicina (Sanofi, Parigi, Francia) e Sulfametossazolo/trimethoprim (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

3. Determinazione della sensibilità a PG-1

La sensibilità dei ceppi agli antibiotici e a PG-1 è stata valutata mediante la determinazione delle MIC e delle MBC eseguendo il test delle microdiluizioni in brodo. La procedura utilizzata è quella indicata dal Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) [102]. Utilizzando una piastra microtitre 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 (nel nostro caso la concentrazione più elevata da saggiare era 256 mg/L quindi è stata preparata una soluzione madre da 512 mg/L). 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 bordo MH II. In questo modo è stata eseguita una diluzione 1:2 dell'antibiotico/peptide nella seconda colonna. Il contenuto di quest'ultima è stato mescolato tramite micropipetta e altri 50µL 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/peptide. I 50 µL prelevati dalla penultima colonna sono stati buttati, poichè 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 $5x10^6$ CFU/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 a $1x10^8$ UFC/ml. Una volta impostato il "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. In ogni riga della piastra è stato inoculato un ceppo batterico differente. Sono stati aggiunti ai pozzetti con il composto in esame 50 µL di sospensione batterica standardizzata. La concentrazione batterica finale così ottenuta è stata di 1x10^5CFU/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/peptide alla quale non si osservava crescita visibile, quindi torbidità.

La MBC, cioè la quantità minima di antibiotica che va ad eliminare il 99,9% dei ceppi, è stata valutata inoculando 10 µL di brodocoltura dai pozzetti contenti PG-1 o l'antibiotico utilizzati per la determinazione della MIC e ponendoli su terreno solido Mueller-Hinton agar (MHA). Dopo un periodo di incubazione di 24 ore si è determinata la MBC, corrispondente alla concentrazione di composto più bassa alla quale si osservava un numero di unità formanti colonia o UFC minore di 5.

4. Test time-kill

Il test di time-kill è stato utilizzato per valutare l'attività antimicrobica in vitro di PG-1 in relazione al tempo. Nello studio sono state utilizzate due concentrazioni di PG-1 corrispondenti a 1X e 2X della MIC. Brodocolture dei ceppi in esame sono state diluite in MH II ad una concentrazione finale di $1x10^7$ UFC/ml e inserite a contatto con PG-1 in un volume finale di 5 ml. Le provette sono state incubate a 37°C e ad intervalli di tempo regolari di 10 minuti, sono stati prelevati 10 µL di brodocoltura che sono stati diluiti in fattori di 1:10 e inoculati su piastre di MHA. Per valutare l'attività antimicrobica è stato preso in considerazione il numero di UFC/ml. In generale, una riduzione di almeno 3 log_{10} nel numero di colonie indica che il composto ha attività battericida nei confronti del ceppo in esame.

5. Test checkerboard

L'interazione di PG-1 con gli altri antibotici è stata studiata con il metodo "checkerboard titration" utilizzando piastre microtitre in polipropilene 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 primo antibiotico a una concentrazione 4X rispetto a quella massima da saggiare, ad eccezione dell'ultimo pozzetto in cui la concentrazione dell'antibiotico inserita era 8X. È stata poi eseguita una diluizione scalare dalla prima riga alla penultima, lasciando l'ultima riga come controllo. Il secondo antibiotico 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 i pozzetti 50µl di inoculo batterico standardizzato ad una concentrazione di $1x10^6$ UFC/ml. La piastra è stata poi incubata a 37°C per 18-24 ore. Dopo l'incubazione, all'osservazione si è potuto valutare nella prima colonna la MIC del primo antibiotico, nell'ultima riga la MIC del secondo antibiotico, e nel primo pozzetto dell'ultima riga il controllo di crescita positivo del ceppo. Dal rapporto tra la MIC in combinazione e la MIC del solo antibiotico abbiamo ottenuto la concentrazione di inibizione frazionaria (FIC). La FIC del primo antibiotico sommata alla FIC del secondo 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.

6. Biofilm

L'azione di PG-1 sul biofilm è stata studiata mediante la colorazione con cristallo violetto. 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 OD_{625} di 0.1. Le piastre utilizzate erano quelle 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 PG-1 alla concentrazione di 1/2MIC, e la piastra è stata incubata a 37°C per 24 ore. Dopo l'incubazione, è stato 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 cristallo violetto per 10 minuti a temperatura ambiente. L'eccesso di colorante è stato eliminato lavando per tre volte i pozzetti con soluzione salina. Infine, il cristallo violetto è stato solubilizzato con etanolo assoluto (EtOH 95%, 100 µL/pozzetto), lasciato agire per 10 minuti a temperatura ambiente, in agitazione. L'assorbanza è 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.

7. Determinazione della sensibilità a PG-1

Per valutare l'insorgenza di ceppi resistenti, *A. baumannii* ATCC19606 è stato fatto crescere in 5 ml di BHIB con l'aggiunta di PG-1 a concentrazione sub-inibitoria (0.5 mg/L). Tutti i giorni 50 µL della coltura della notte precedente sono stati prelevati e inoculati in BHIB fresco con PG-1. Dopo 7 e 14 passaggi i ceppi sono stati isolati in MacConckey Agar (Liofilchem) e MIC/MBC sono state valutate come prima descritto.

RISULTATI

La MIC di PG-1 per tutti i ceppi di *A. baumannii* studiati era compresa tra 2 e 8mg/L. La MBC era simile nella maggior parte dei casi, o più alta di una diluizione (Tabella 2). MIC_{50} e MIC_{90} erano, rispettivamente, di 4 e 8 mg/L.

Tabella 2. MICs e MBCs dei ceppi di *A. baumannii* testati per PG-1.

Ceppi	MIC (mg/L)	MBC (mg/L)
108679	4	4
111806	4	4
238719	4	4
355521	4	4
361823	4	4
371484	2	2
371981	4	4
374792	4	4
378177	4	4
378648	8	8
379385	8	8
379622	4	4
380023	8	8
380667	4	8
381476	8	16
381577	4	8
382933	4	4
383074	4	4
383290	8	8
386052	4	4
ATCC 19606	8	8

Nei test di time-kill, il trattamento di *A. baumannii* con concentrazioni di PG-1 due volte la MIC ha determinato un azzeramento delle UFC vitali già dopo 50 minuti di esposizione. L'esposizione a una concentrazione di PG-1 pari alla MIC per un'ora riduce il numero di CFU a 10^2-10^3, non portando ad una completa eliminazione della crescita batterica.

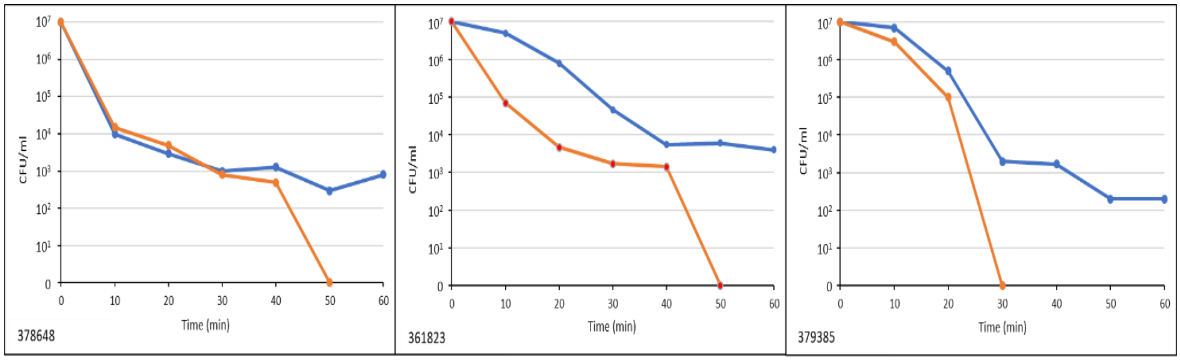


Figura 5. *Curve di time-kill di PG-1 verso i ceppi di A. baumannii. Le linee blu rappresentano la concentrazione di PG-1 pari a 1X MIC, quelle arancioni rappresentano una concentrazione 2X MIC di PG-1.*

Gli studi sulla sinergia tra PG-1 e altri antibiotici hanno avuto risultati differenti. Quando combinato con colistina e fosfomicina, PG-1 si è dimostrato sinergico, in tutti i ceppi di *A. baumannii* presi in esame, con FICI comprese tra 0,302 e 0,375 per la colistina e 0,094 e 0,254 per la fosfomicina. Nella combinazione con gli altri antibiotici invece i risultati non sono univoci. PG-1 e meropenem sono risultati singergici soltanto in uno dei ceppi isolati (379385) mentre la combinazione era indifferenti negli altri (378648 e 361823). La sinergia tra PG-1 e tigeclina è stata dimostrata solo in *A. baumannii* 379385. Tutte le altre combinazioni si sono dimostrate indifferenti, mentre in nessun caso si è evidenziato antagonismo. I risultati sono riportati nella tabella 3.

Tabella 3. *MICs di PG-1 e antibiotici, da soli e in combinazione. Tutti i risultati sono espressi in mg/L, eccetto FICI.*

CEPPO	MIC delle molecole testate singolarmente						
	PG-1	COL	FOS	LEV	TGC	MEM	RIF
361823	4	0.5	256	16	1	64	4
378648	8	0.5	128	8	1	16	2048
379385	8	0.5	128	16	2	16	4

CEPPO	MIC delle molecole testate in combinazione e FICI						
	PG-1/COL	PG-1/FOS	PG-1/LEV	PG-1/TGC	PG-1/MEM	PG1/RIF	PG-1/COL
361823	0.5/0.125 (0.375)	0.125/8 (0.094)	2/8 (0.500)	0.007/0.5 (0.501)	1/16 (0.500)	0.007/1 (0.502)	0.5/0.125 (0.375)
378648	0.5/0.125 (0.302)	0.015/16 (0.252)	4/8 (1.500)	0.007/0.5 (0.501)	0.015/8 (0.502)	0.007/2048 (1.001)	0.5/0.125 (0.302)
379385	0.5/0.125 (0.302)	0.03/32 (0.254)	4/16 (1.500)	0.015/0.5 (0.252)	0.015/4 (0.252)	0.007/1 (0.501)	0.5/0.125 (0.302)

PG-1 sia usato singolarmente sia in combinazione non ha mostrato nessuna efficacia nell'inibire la formazione di biofilm. Tutti i ceppi di *A. baumannii* esaminati hanno formato biofilm anche in presenza di PG-1 con una quantità di biomassa formata che è comparabile con quella dei controlli.

Le prove per l'induzione di resistenza hanno evidenziato l'incapacità dei ceppi in studio di sviluppare resistenza nei confronti di PG-1. Infatti, dopo 7 e 14 giorni di passaggi seriali in BHIB con l'aggiunta di PG-1 a concentrazione sub-inibitoria, le MIC e le MBC sono rimaste invariate rispetto a quelle del ceppo di partenza.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza non è un fenomeno recente, ma è comparso di pari passo con la diffusione degli antibiotici. Fin dalla scoperta della penicillina nel 1927, i batteri hanno sempre sviluppato meccanismi che hanno permesso di sopravvivere all'azione degli antibiotici. Fino agli anni 80 l'antibiotico-resistenza non costituiva un fenomeno preoccupante: lo sviluppo di nuove classi di antibiotici e il perfezionamento di molecole già conosciute era molto rapido e assicurava un'ampia scelta terapeutica ai clinici, anche in caso di ceppi resistenti. Dalla fine degli anni 80 la ricerca di nuovi antibiotici ha subito un declino costante che ha portato al fenomeno denominato "discovery void", cioè la mancanza della scoperta di nuove molecole ad azione antibiotica. Unitamente a questa lacuna, il consumo di antibiotici sia a livello animale che a livello umano è aumentando, incrementando di conseguenza la pressione selettiva nei confronti dei batteri. Negli ultimi anni abbiamo perciò assistito ad un aumento del tasso di resistenze e alla comparsa dei ceppi MDR.

La rapida diffusione della multi-resistenza agli antibiotici suggerisce che, senza un'azione urgente, ci stiamo dirigendo verso un'era "post-antibiotica", nella quale gli agenti terapeutici, una volta efficaci, non saranno più utili. In questo quadro *A. baumanni* si è confermato uno dei batteri più problematici, data la grande facilità con cui è in grado di acquisire resistenza verso gli antibiotici e la capacità di causare infezioni gravi in pazienti immunocompromessi. L'isolamento di ceppi MDR è ormai un fenomeno comune e non è più raro nemmeno l'isolamento di ceppi di *A. baumannii* extensively drug-resistant, che sono anche responsabili di outbreak nosocomiali come recentemente descritto negli USA da Hujer [103].

L'elevata diffusione di *A. baumannii* MDR coinvolge anche la nostra struttura ospedaliera, dove tutti i ceppi di *A. baumannii* clinicamente isolati hanno mostrato un fenotipo MDR. Ad oggi, le strategie per il trattamento di questi ceppi coinvolgono l'utilizzo di vecchie molecole antibiotiche poco sfruttate per la loro tossicità come la colistina, l'uso degli antibiotici più recenti come la tigeciclina o la somministrazione di combinazioni di antibiotici [104]. Queste strategie si sono dimostrate efficaci, ma la

comparsa di ceppi resistenti anche a questi ultimi farmaci ancora attivi (tigeciclina e colistina) costituisce un motivo di preoccupazione [105,67,106,55].

Appare quindi evidente la necessità di individuare nuovi agenti terapeutici, in grado di agire tramite vie diverse da quelle già colpite dagli antibiotici convenzionali. Gli AMPs presentano alcune caratteristiche che potrebbero far pensare ad un loro possibile futuro ruolo come agenti antimicrobici. Oltre ad essere un gruppo di molecole estremamente variegato, la loro azione antimicrobica è esercitata tramite meccanismi aspecifici di legame della membrana, che potrebbe ostacolare lo sviluppo di meccanismi di resistenza efficaci [81]. Per questo motivo, sono molti gli studi avviati al fine di comprenderne meglio i meccanismi di azione e studiarne l'efficacia, sia *in vitro* che *in vivo*.

Moltissime molecole hanno dimostrato di avere un'ottima attività nei confronti di batteri sia Gram-positivi che Gram-negativi [73], ma sono pochi gli studi che coinvolgono peptidi attivi nei confronti di A. baumannii.

Alcuni AMPs hanno dimostrato una buona attività verso *Acinetobacter* MDR. Ad esempio, il peptide antimicrobico AM-CATH36, isolato da *Alligator mississippiensis* e appartenente alla famiglia delle catelicidine, ha mostrato una buona attività antimicrobica verso *A. baumannii* (MIC tra 5 e 6 µg/ml contro *A. baumannii* ATCC 9955), e una ridotta citotossicità [107].

In questo studio PG-1 ha dimostrato una buona attività contro i ceppi di *A. baumanni* MDR isolati clinicamente: anche PG-1 appartiene alla famiglia di catelicidine e dati i risultati presenti in letteratura, potrebbe essere ragionevole pensare che questa classe di molecole sia particolarmente attiva nei confronti di *A. baumannii*.

È interessante notare che le MIC di PG-1 nei confronti dei ceppi MDR sono equiparabili alla MIC di *A. baumannii* ATCC 19606, ceppo di controllo di questa specie che non presenta particolari meccanismi di antibiotico resistenza. Questi risultati suggeriscono che PG-1 sia attiva nei confronti dei ceppi resistenti a diverse classi antibiotiche e che il suo meccanismo di azione è differente da quello dei comuni antibiotici. Probabilmente la sua attività causa una rottura della membrana batterica dovuta alle interazioni elettrostatiche che si stabiliscono tra il peptide e la membrana batterica, in un meccanismo simile a quello con cui agisce la colistina, una delle ultime risorse terapeutiche disponibili per il trattamento degli A. baumannii MDR. Considerato questa possibile convergenza di meccanismo di azione sarebbe utile valutare l'attività di PG-1 nei confronti di ceppi

resistenti anche alla colistina. Un dato interessante è anche il sinergismo che PG-1 ha mostrato verso alcuni antibiotici, colistina e fosfomicina. Gli indici FICI migliori sono stati ottenuti dalle combinazioni con colistina, fosfomicina e meropenem. Questi dati suggeriscono che PG-1 è sinergico con quei composti che vanno ad agire sullo stesso bersaglio, ossia le membrane delle cellule batteriche. Questa considerazione è supportata anche dalla già documentata sinergia di PG-1 con altri AMPs, mediata dall'interazione cooperativa verso le membrane lipidiche [108]. Di notevole importanza è l'assenza di reazioni di antagonismo di PG-1 quando combinato con gli altri antibiotici utilizzati in questo studio: questa particolare caratteristica potrebbe essere utile nel caso di applicazione clinica, perché permetterebbe di combinare il PG-1 con qualsiasi antibiotico, aumentando l'efficacia delle terapie e diminuendo il rischio di comparsa di resistenze.

Alcuni AMPs hanno la capacità di interferire con la formazione di biofilm e per questo vengono definiti peptidi antibiofilm [109]. Dal nostro studio è però emerso che PG-1 non presenta questa caratteristica quando utilizzato in dosi equiparabili al valore di MIC. Potrebbe essere interessante valutare se dosi sopra MIC hanno invece effetto sulla matrice prodotta da *A. baumannii*.

Un dato incoraggiante è quello ottenuto dal test per la valutazione dell'induzione di resistenza. Infatti, dopo 7 e 14 giorni di passaggi seriali di *A. baumannii* in coltura con una concentrazione sub-inibitoria di PG-1, i batteri non sono stati in grado di sviluppare resistenza a questo peptide. Sebbene alcuni casi di resistenza agli AMPs siano già stati descritti [110,111] e non si possa escludere la possibilità che in futuro si sviluppino meccanismi di tollerabilità, possiamo affermare che PG-1 non induce resistenza.

In conclusione, abbiamo dimostrato che PG-1 è un AMP attivo contro ceppi di *A. baumannii MDR*. Mostra una buona attività in vitro e sinergia quando combinato con colistina e fosfomicina. Non induce resistenza e presenta una tossicità limitata nei confronti delle cellule umane. Alla luce dei dati raccolti e considerata la rapida insorgenza di resistenze nei confronti degli antibiotici convenzionali, PG-1 potrebbe rappresentare una nuova opportunità terapeutica, ma sono necessari ulteriori studi per capire se potrà essere utilizzata in futuro come agente antimicrobico.

BIBLIOGRAFIA

1 WHO (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva: World Health Organization

2 O'Neill (2016). Tuckling drug-resistant infections globally: final report and raccomandations. Rev. Antimicrobiol. Res.

3 Peleg AY, Seifert H and Paterson DL (2008). *Acnetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol. Rev.* 21, 538-582.

4 Magiorakos et al. (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18(3),268-81

5 Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS et al. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Disease Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 48, 1-12.

6 http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/

7 Public Health Image Library.

8 Lin, Lan et al. (2014). Role of the BaeSR two-component system in the regulation of *Acinetobacter baumannii adeAB* genes and its correlation with tigecycline susceptibility. *BMC Microbiol*., 14:119.

9 Spellberg B, Rex JH (2013). The value of single-pathogen antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Disc*. 12:963

10 Wong et al. (2016). Clinical and pathophysiological Overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin. Microbiol. Rev.*

11 McDonald LC, Banerjee SN, Jarvis WR (1999). Seasonal variation of *Acinetobacter* infections: 1987-1996. Nosocomial Infections Surveillance System. *Clin. Infect. Dis*. 29:1133-1137.

12 Spellberg B, Bonomo RA (2013). "airborne assault": a new dimension in *Acinetobacter baumannii* transmission. *Crit. Care Med*. 41:2042-2044.

13 Maragakis LL, Perl TM (2008). *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin. Infect. Dis*. 46:1254-1263.

14 Joly-Guillou ML (2005). Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin. Microbiol. Infect.* 11:868-873.

15 Chung et al. (2011). High prevalence of multidrug resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia. *Am. J. Resp. Crit. Care Med*. 184:1409-1417.

16 Freire MP et al. (2016). Bloodstream infection caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in cancer patients: high mortality associated with delayed treatment rather than with the degree of neutrophenia. *Clin. Microbiol. Infect.* 22:352-358.

17 Chopra T et al. (2014). Risk factors and outcomes for patients with bloodstream infection due to *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:4630-4635.

18 Chopra et al. (2013). Epidemiology of bloodstream infection due to *Acinetobacter baumannii* and the impact of drug resistance to both carbapenems and ampicillin-sulbactam on clinical outcomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:6270-6275.

19 Tayabali AF et al. (2012). Comparison of the virulence potential of *Acinetobacter* strains from clinical and environmental sources. *PLoS ONE* 7:e37024.

20 Fournier PE et al. (2006). The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin. Infect. Dis*. 42:692-699.

21 Houang et al. (1998). Effect of desiccation on the ultrastructural appearances of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter iwoffi*. *J. Clin. Pathol*. 51:786-788.

22 Smith et al. (2004). Microbial synergy via an ethanol-triggered pathway. *Mol. Cell. Biol*. 24:3874-3884.

23 Choi et al. (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 7:1127-1138.

24 Kim et al. (2009). Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 301:224-231.

25 Lee et al. (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front. Cell. Infect. MIcrobiol*.

26 Gaddy et al. (2009). The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm ormation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect. Immun*. 77:3150-3160.

27 Smani et al. (2012). Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. *PLoS ONE* 7:e33073.
28 Clemmer et al. (2011). Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology* 157:2534-2544.
29 McConnell MJ, Actis L and Pachon J (2013). *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol. Rev*. 37:130-155.
30 Russo et al. (2010). The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 3070294 is a major virulence factor. *Infect. Immun*. 78:3993-4000.
31 Luke et al. (2010). Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infect. Immun*. 78:2017-2023.
32 Lees-Miller et al. (2013). A common pathway for O-linked protein-glycosylation and synthesis of capsule in *Acinetobacter baumannii*. *Mol. Microbiol*. 89:816-830.
33 Weber BS, Harding CM, Feldman MF (2015). Pathogenic *Acinetobacter*: from the cell surface to infinity and beyond. *J. Bacteriol.* 198:880-887.
34 Geisinger E, Isberg RR (2015). Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog*. 11:e1004691.
35 Songer JG (1997). Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol*. 5:156-161.
36 Flores-Diaz et al. (2016). Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80:597-628.
37 Ellis and Kuehn (2010). Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vescicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 74:81-94.
38 Kwon SO, Gho YS, Lee JC and Kim SI (2009). Proteome analysis of outer membrane vescicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol. Lett*. 297:150-156.
39 Jin et al (2011). *Acinetobacter baumannii* secrets cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vescicles. *PLoS ONE* 6:e17027.
40 Moon et al. (2012). *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vescicles. *J. Microbiol*. 50:155-150.
41 Jun et al. (2013). *Acinetobacter baumannii* outer membrane vescicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins. *PLoS ONE* 8:e71751.
42 Rakin A, Schneider L and Podladchikova O (2012). Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia*. *Front. Cell. Infect. Microb*. 2:151.
43 Saha R, Saha N, Donofrio RS and Bestervelt LL (2013). Microbial siderophores: a mini review. *J. Basic Microbiol*. 53:3029-3034.
44 Zimbler et al. (2012). Stress response and virulence functions of the *Acinetobacter baumannii* NfuA Fe-S scaffold protein. *J. Bacteriol*. 194:2884-2893.
45 Elhosseiny NM, El-Tayeb OM, Yassin AS, Lory S and Attia AS (2016). The secretome of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 type II secretion system reveals a novel plasmid encoded phospholipase that could be implicated in lung colonization. *Int. J. Med. Microbiol*. 306:633-641.
46 Carruthers MD, Nicholson PA, Tracy EN and Munson RSJ (2013). *Acinetobacter baumannii* utilizes a type VI secretion system for bacterial competition. *PLoS ONE* 8:e59388.
47 Bentacor LV, Camacho-Peiro A, Bozkurt-Guzel C, Pier GB and Maira-Litran T (2012). Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* 194:3950-3960.
48 Russo et al. (2009). Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii in vitro* and *in vivo*. *J. Infect. Dis*. 199:513-521.
49 Sechi et al. (2004). PER-1 type β-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. *Med. Sci. Monit*. 10:BR180-BR184.
50 Rodriguez-Bano et al. (2008). Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin. MIcrobiol. Infect*. 14:276-278.
51 de Breij et al. (2010). Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*? *PLoS ONE* 5:e10732.
52 Adams et al. (2008). Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii. J. Bacteriol*. 190:8053-8064.
53 Blackwell GA, Hamidian M and Hall RM (2016). IncM plasmid R1215 is the source of chromosomally located regions containing multiple antibiotic resistance genes in the globally disseminated *Acinetobacter baumannii* GC1 and GC2 clones. *mSphere* 1:e00117-16.
54 Jeon et al. (2015). Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. Int. J. Mol. Sci. 16:9654-9692.

55 Deng et al. (2014). Molecular epidemiology and mechanisms of tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a chinese university hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9(3):4.
56 Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S et al. (2009). Resistance to colistin *in Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob. Agents Chemoter*. 53:3628-3634.
57 Moffat JH, Harper M, Harrison P et al. (2010). Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob. Agents Chemother*. 544971-4977.
58 Gehrlein M, Leying H, Cullmann W, Wendt S and Opferkuch W (1991). Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy* 37:405-412.
59 Hartzell JD, Kim SA, Kortepeter MG e Moran AK (2007). *Acinetobacter* pneumonia: a review. *Med. Gen. Med.*
60 Harrison, *Principi di medicina interna*, 18ª ed., Milano, CEA Casa Editrice Ambrosiana, 2012.
61 Falagas ME, Karveli EA, Kelesidis I and Kelesidis T (2007). Community acquired *Acinetobacter* infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26:857-868.
62 Peng C, Zong Z and Fan H (2012). *Acinetobacter baumannii* isolates associated with community-acquired pneumonia in West China. *Clin. Microbiol. Infect*. 18:E491-E492.
63 NI W, Han Y, Zhao J, Wei C, Cui J, Wang R and Liu Y (2016). Tigecycline treatment experience against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 47:107-116.
64 Liu Q, Li W, Feng Y and Tao C (2014). Efficacy and safety of polymyxins for the treatment of *Acinetobacter baumannii* infection: a Systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 9:e98091. lee
65 Lee JH, Park KS, Karim AM, Lee CR and Lee SH (2016). How to minimize antibiotic resistance. *Lancet Infect. Dis.* 16:17-18.
66 Zilberberg MD, Kollef MH and Shorr AF (2016). Secular trends in *Acinetobacter baumannii* resistance in respiratory and blood stream specimens in the United States, 2003 to 2012: a survey study. *J. Hosp. Med*. 11:21-26.
67 Qureshi ZA, Hittle LE, O'Hara JA et al. (2015). Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. *Clin. Infect. Dis.* 60(9):1295–303.
68 Tamma PD, Cosgrove SE and Magarakis LL (2012). Combination therapy for treatment of infections with Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev*. 25:450-470.
69 Bliziotis IA, Samonis G, Vardakas KZ, Chrysanthopoulou S and Falagas ME (2005). Effect of aminoglycoside and beta-lactam combination therapy versus beta-lactam monotherapy on the emergence of antimicrobial resistance: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Clin. Infect. Dis*. 41:149-158.
70 Paul M, Lador A, Grozinsky-Glasberg S and Leibovic L (2014). Beta lactam antibiotic monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis. *Cochrane Database Syst. Rev*. 2014:CD003344.
71 Poulikakos P, Tansarli GS and Falagas ME (2014). Combination antibiotic treatment versus monotherapy for multidrug-resistant and pandrug-resistant *Acinetobacter* infections: a systematic review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 33:1675-1685.
72 Tuon FF, Rocha JL and Merlini AB (2015). Comined therapy for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection- is there evidence outside the laboratory? *J. Med. MIcrobiol*. 64:951-959.
73 Mahlapuu M, Hakansson J, Ringstad L and Bjorn C (2016). Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic Agents. *Cell. Infect. Microbiol.* 6:194
74 Mallow EB, Harris A, Salzman N, Russell JP, DeBerardinis RJ, Ruchelli E, Bevins CL (1996). Human Enteric Defensins. *The journal of biological chemistry* vol 271; 8: 4038-4045.
75 Fjell CD, Hiss JA, Hancock RE and Schneider G (2012). Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat. Rev. Drug Discov*. 11:37-51.
76 Boman HG (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13:61-92.
77 Hancock RE and Chapple DS (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1317-1323.
78 Bals R (2000). Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infections. *Resp. Res*. 1:141-150.
79 Hancock REW and Diamond G (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol*. 8:402-410.

80 Lai Y and Gallo RL (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30:131-141.
81 Hancock RE and Sahl HG (2006). Antimicrobial and host defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.*
82 Gallo RL and Zhang L (2016). Antimicrobial peptides. Curr. Biol. 26, R1-R21.
83 Yeaman MR and Yount NY (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55:27-55.
84 Pasupuleti M, Schmidtchen A and Malmsten M (2012). Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32:143-171.
85 Powers JP and Hancock RE (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24:1681-1691.
86 Yount NY, Bayer AS, Xiong YQ and Yeaman MR (2006). Advances in antimicrobial peptide immunology. *Biopolymers* 84:435-458.
87 Nguyen LT, Haney EF and Vogel HJ (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 29:464-472.
88 Peters BM, Shirtliff ME and Jabra-Rizk MA(2010). Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog.* 6(10):e1001067.
89 Giuliani A, Pirri G and Nicoletto S (2007). Antimicrobial peptides:an overview of a promising class of therapeutics. *Cent. Eyr. J. Biol*. 2:1-33.
90 Yeung AT, Gellatly SL and Hancock RE (2011). Multifunctional cationic host defense peptides and their clinical applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 68:2161-2716.
91 Ebenhan T, Gheysens O, Kruger HG, Zeevaart JR and Sathekge MM (2014). Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. *BioMed Res. Int.* 2014:867381. Mahl
92 Brogden KA (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3:238-250.
93 Eckert R (2011). Road to clinical efficacy: challenges and novel strategies for antimicrobial peptide development. *Fut. Microbiol*. 6:635-651.
94 Bowdish DME, Davison DJ and Hancock REW (2005). A re-evaluation of the role of host defense peptides in mammalian immunity. *Curr Protein Pept. Sci.* 6:35-51.
95 Bowdish DME et al. (2005). Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J. Leukoc. Biol.* 77, 451-459.
96 Lamb HM and Wiseman LR (1998). Pexiganan acetate. *Drugs* 56, 1047-1052.
97 Lipsky BA, Holroyd KJ and Zasloff M (2008). Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. *Clin Infect. Dis.* 47, 1537-1545.
98 Nilsson AC, Janson H, Wold H et al. (2015). LTX-109 is a novel agent for nasal decolonization of methicillin-resistant and sensitive Staphylococcus Aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 145-151.
99 Velden WJ, van Iersel TM, Blijlevens NM and Donnelly JP (2009). Safety and tolerability of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11). *BMC Med*. 7:44.
100 Bolintineanu DS, Sayyed-Ahmad A, Davis HT and Kaznessis YN (2009). Poisson-Nernst-Planck models of nonequilibrium ion electrodiffusion through a Protegrin transmembrane pore. *PLoS Comput. Biol*. 5(1): e1000277.
101 Steinberg et al. (1997). Protegrin-1: a broad spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8,1738-1742
102 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), (2010). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. M100-S20-U.
103 Hujer AM et al. (2017). A Nosocomial Outbreak of Extensively Drug Resistant (XDR) Acinetobacter baumannii 2 Isolates Containing blaOXA-237 Encoded on a Plasmid. *Antimicrob. Agents Chemot.* 61(11).
104 Kengkla K et al. (2018). Comparative efficacy and safety of treatment options for MDR and XDR Acinetobacter baumannii infections: a systematic review and network meta-analysis. *J. Antimicrob. Ther*. 73,22-32.
105 Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B and Bai N (2012). Colistin resistance of Acinetobacter baumannii: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *J. Antimicrob. Chemoter*. 67,1607-15.
106 Navon-Venezia S, Leavitt A and Carmeli Y (2007). Comparative efficacy and safety of treatment options for MDR and XDR Acinetobacter baumannii infections: a systematic review and network meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemoter.* 59,772-4.

107 Barksdale SM, Hrifko EJ and van Hoek ML (2017). Cathelicidin antimicrobial peptide from *Alligator mississippiensis* has antibacterial activity against multi-drug resistant *Acinetobacter baumanii* and *Klebsiella pneumoniae. Dev. Comp.Immun.* 2794.
108 Yan H and Hancock REW (2001). Synergistic Interactions between Mammalian Antimicrobial Defense Peptides. *Antimicrob. Agents Chemoter*. 45,1558-1560.
109 Pletzer D, Coleman SR and Hancock RE (2016). Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr. Op. Microbiol*. 33,35-40.
110 Pränting M, Negrea A, Rhen M and Andersson DI (2008). Mechanism and fitness cost of PR-39 resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Antimicrob. Agents Chemoter*. 52, 2734-2741.
111 Lofton H, Pränting M, Thulin E and Andersson DI (2013). Mechanisms and fitness cost of resistance to antimicrobial peptides LL-37, CNY100HL and wheat germ histones. *PLoS ONE* 8:e68875.
112 Edwards IA, Elliot AG, Kavanagh AM, *et al*. Contribution of amphipathicity and hydrophobicity to the antimicrobial activity and cytotoxicity of β-hairpin peptides. *ACS Infect. Dis.* 2, 442-50.