



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

---

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

**Attività del peptide  
antimicrobico LL-37 verso  
*Escherichia coli* multiresistente  
di isolamento nosocomiale**

Relatore: Chiar.mo  
**Prof. Andrea Giacometti**

Tesi di Laurea di:  
**Shabir Hamza**

A.A. 2021/2022



# Indice

<b>Capitolo 1- INTRODUZIONE</b> .....	1
1.....	
<i>Escherichia coli</i> .....	4
1.1 Fattori di virulenza e patogenicità.....	6
1.2 Manifestazioni cliniche .....	7
1.3 Antibiotico-resistenza.....	13
1.4 Opzioni terapeutiche .....	16
2.....	
<i>Colistina</i> .....	18
2.1 Struttura chimica .....	18
2.2 Spettro d'azione .....	19
2.3 Meccanismo d'azione.....	19
2.4 Meccanismi di resistenza.....	20
2.5 Indicazioni .....	21
2.6 Effetti collaterali e tossicità .....	21
2.7 Interazioni .....	22
3.....	
<i>Peptidi Antimicrobici</i> .....	24
3.1 Classificazione .....	25
3.2 Meccanismo d'azione.....	26
3.3 AMPs come agenti terapeutici ... ..	29
LL-37.....	31
<b>Capitolo 2- SCOPO DELLA TESI</b> .....	36
<b>Capitolo 3- MATERIALI E METODI</b> .....	37
1.....	
<i>Ceppi batterici</i> .....	37
2.....	
<i>LL-37 e antibiotici</i> .....	37
3.....	
<i>Determinazione della sensibilità (MIC)</i> .....	38
4.....	
<i>Checkerboard</i> .....	39
5.....	
<i>Test time-kill</i> .....	40

<b>Capitolo 4- RISULTATI</b> .....	42
<b>Capitolo 5- DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b> .....	48
<b>Capitolo 6- BIBLIOGRAFIA</b> .....	52

## Capitolo 1

### INTRODUZIONE

La resistenza agli antibiotici è oggi riconosciuta come una grave minaccia per la salute pubblica che mette a repentaglio la salute di migliaia di pazienti in tutto il mondo [1].

Infatti, la crescente prevalenza di infezioni nosocomiali e comunitarie, causate da batteri patogeni multiresistenti o MDR, sta limitando le opzioni per una efficace terapia antibiotica.

Solo negli Stati Uniti più di due milioni di persone si ammalano di infezioni da microrganismi MDR e di questi, 23.000 muoiono a seguito dell'infezione. In Europa ogni anno, il numero di infezioni e morti causate dalla maggior parte di batteri multiresistenti (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*) è stimata intorno ai 400.000 casi [1].

Gli effetti dell'antibiotico resistenza non sono limitati unicamente ai pazienti che sviluppano infezioni batteriche: numerosi campi della medicina dipendono dalla disponibilità e relativa efficacia di questi farmaci; la chemioterapia per la cura del cancro, i trapianti di organi, interventi chirurgici, la terapia intensiva neonatale, solo per citare alcune delle attività che non potrebbero essere eseguite senza l'ausilio di antibiotici efficaci [2].

Si prevede che con questa rapidità di diffusione ed acquisizione di meccanismi di resistenza e senza lo sviluppo di nuovi agenti terapeutici efficaci, nel 2050 le infezioni da organismi MDR causeranno 10 milioni di morti l'anno.

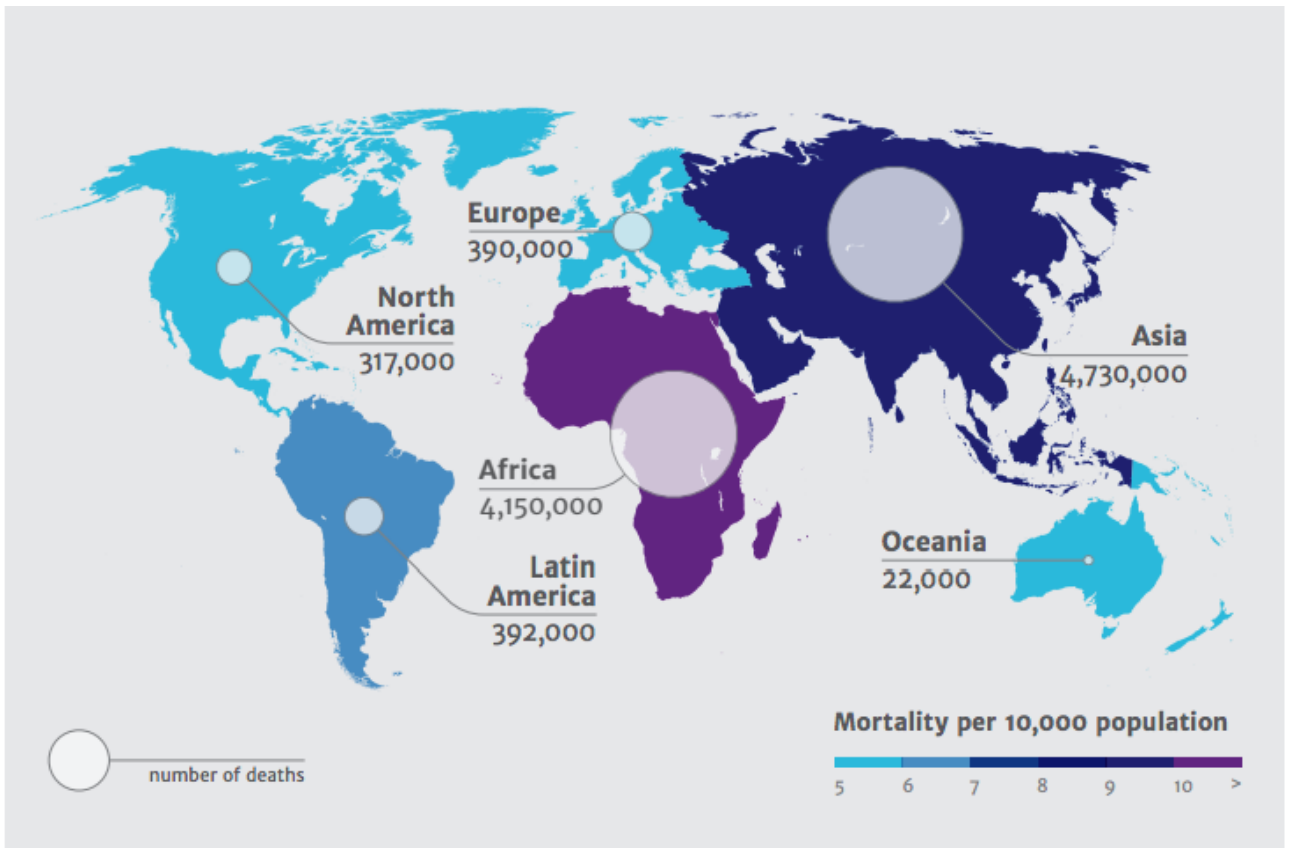


Figura 1. Numero di morti attribuite a infezioni da microrganismi multi drug resistant (MDR) nel 2050 [3]

I patogeni ESKAPE (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e specie di *Enterobacteriaceae*, pur non essendo gli unici patogeni implicati, sono stati identificati come una delle emergenze sanitarie più pressanti e che necessitano di interventi concreti dal momento che sono responsabili della maggioranza delle infezioni nosocomiali/anno e mostrano alti tassi di incidenza di antibiotico-resistenza [4].

Negli ultimi anni gli sforzi per combattere le infezioni da microrganismi MDR si sono concentrati principalmente nei confronti di batteri Gram-positivi che a causa del loro ampio repertorio genetico capace di adattarsi e sviluppare resistenze a tutti gli antibiotici attualmente disponibili, rappresentano un problema costante che necessita di nuove strategie di trattamento [5].

Per questo tipo di microrganismi, gli antibiotici attualmente disponibili sono numerosi e garantiscono nella maggior parte dei casi una terapia efficace.

Al contempo, le infezioni causate da bacilli Gram-negativi MDR stanno diventando un problema sempre più crescente [6]. I Gram-negativi presentano una struttura cellulare più complessa che aumenta la resistenza agli antibiotici e rende difficile lo sviluppo di molecole efficaci.

Contrariamente a quello che si verifica per i batteri Gram-positivi, non ci sono valide alternative terapeutiche efficaci nei confronti di bacilli Gram-negativi MDR e la ricerca scientifica non sta sperimentando nuove classi di antibiotici specifiche per questo tipo di patogeni.

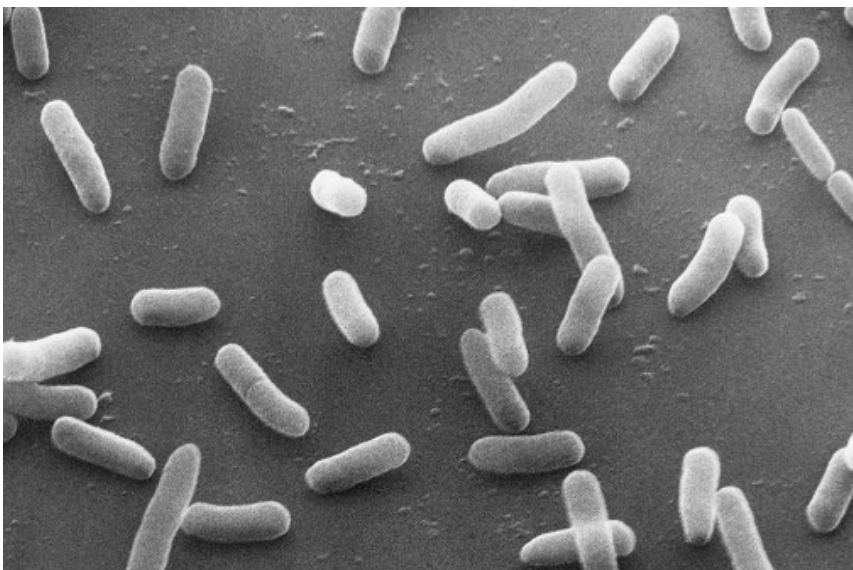
In un recente studio pubblicato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO), il batterio *Escherichia coli* è stato inserito in una lista di nove microrganismi di interesse internazionale capaci di causare le più comuni infezioni in diversi scenari: infezioni comunitarie, nosocomiali o trasmesse mediante la catena alimentare [7].

L'emergenza e l'aumento di resistenza in *E. coli* sta complicando il trattamento di severe infezioni nosocomiali e stanno emergendo specie potenzialmente resistenti a tutti gli antibiotici potenzialmente ad oggi disponibili [8].

# 1. ESCHERICHIA COLI

*Escherichia coli* è stato descritto per la prima volta nel 1885 da un pediatra tedesco, Theodor Escherich, col nome di *Bacterium coli*.

Il microrganismo è un bacillo Gram-negativo, aerobio facoltativo, non sporigeno, provvisto di flagelli e capsula, del genere *Escherichia*, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* ed è inserito nel gruppo dei coliformi. Secondo la tradizionale classificazione, la specie produce indolo in terreni al triptofano ed è lattosio-fermentante distinguendosi dai coliformi non termotolleranti per la crescita alla temperatura di 44°C [9].



*Figura 2. Bacilli di E. coli al microscopio elettronico [10]*

È un comune costituente della normale flora batterica dell'uomo e di una varietà di altri animali. È sia un comune commensale del tratto gastrointestinale che uno dei più importanti patogeni nell'uomo [9].

*E. coli* è agente eziologico frequente di comuni infezioni batteriche come le infezioni delle vie urinarie, infezioni del tratto gastro-enterico, batteriemia; inoltre è un'importante causa di meningite neonatale e di polmonite nosocomiale [11].



*E. coli* è il bacillo Gram-negativo maggiormente riscontrato nel tratto genitale delle donne, causa di colonizzazione vaginale e/o endocervicale come anche di infezioni nella donna gravida e infezioni neonatali come la sepsi neonatale [12].

L'Organizzazione mondiale della Sanità (OMS), da circa un decennio, ha riconosciuto la specie *Escherichia coli* come indicatore primario di contaminazione fecale delle acque [13].

*E. coli* comprende un'unica specie, che può essere a sua volta suddivisa in tre sottospecie principali:

1. Ceppi commensali dell'organismo. Essi colonizzano abitualmente l'intestino crasso dell'ospite sano, rappresentando la comunità batterica predominante, fanno parte cioè del normale microbiota intestinale e sono sprovvisti dei fattori di virulenza che caratterizzano i ceppi patogeni. Sono in grado di causare manifestazioni patologiche solo in presenza di condizioni particolari (come un significativo trauma addominale e conseguente colonizzazione di distretti diversi da quello intestinale e/o immunocompromissione dell'ospite).
2. Ceppi patogeni intestinali. Sono isolati che causano unicamente infezioni enteriche che variano per presentazione clinica e patogenesi in merito ai diversi fattori di virulenza caratteristici di ogni ceppo. In base al meccanismo patogenetico vengono identificati 6 distinti "patotipi" batterici:
  - *E. coli* enteroemorragico (EHEC) o produttore della tossina di Shiga (STEC);
  - *E. coli* enterotossigeno (ETEC);
  - *E. coli* enteropatogeno (EPEC);
  - *E. coli* enteroaggregante (EAEC);
  - *E. coli* enteroinvasivo (EIEC);
  - *E. coli* diffusamente enteroaderente (DAEC)
3. Ceppi di *E. coli* patogeni extra intestinali. Questi ceppi sono la principale causa di infezioni extra intestinali nell'uomo. Sebbene vengano tradizionalmente designati come ceppi di *E. coli* uropatogeni, data la loro associazione con le infezioni delle vie urinarie dove *E. coli* è in assoluto l'agente eziologico di più

frequente riscontro, in realtà questi ceppi sono gli agenti eziologici responsabili di diverse infezioni extra intestinali [14].

*E. coli*, inoltre, può essere separato in cinque principali gruppi filogenetici: A, B1, B2, D ed E [15]. La maggior parte dei ceppi patogeni extra- intestinali, inclusi i ceppi UPEC appartengono al gruppo B2 e in misura minore al gruppo D; i ceppi commensali appartengono primariamente al gruppo filogenetico A [16]. I ceppi isolati dal gruppo B2 tendono ad avere più fattori di virulenza e meno geni di resistenza, a differenza dei ceppi isolati dal gruppo A, meno virulenti ma più resistenti [17,18].

È sierologicamente differenziabile per la presenza di tre antigeni:

- Antigene O (somatico), lipopolisaccaridico e termostabile, in cui si riconosce l'attività endotossinica del microrganismo e che consente la distinzione di almeno 170 sierogruppi differenti;
- Antigene H (flagellare), incostante, termolabile e tipo-specifico (permette di riconoscere 56 sierotipi diversi);
- Antigene K (capsulare), incostante, che consente l'identificazione di oltre 100 tipi antigenici ed è differenziato in tre varianti (A, L e B), di cui la più importante dal punto di vista clinico è la B [19].

### 1.1 FATTORI DI VIRULENZA E PATOGENICITA'

*E. coli* presenta un ampio spettro di fattori di virulenza. In aggiunta ai fattori comuni posseduti da tutti i membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, in *E. coli* sono particolarmente importanti:

- le adesine;
- le esotossine;

Il batterio *E. coli* presenta numerose adesine specializzate, che gli permettono di legarsi e permanere sia nel tratto gastroenterico, che all'epitelio uretrale e renale che alla superficie dei cateteri urinari così da permettere la formazione di biofilm. Queste adesine comprendono:

- Antigeni del fattore di colonizzazione (CFA/I, CFA/II, CFA/III)
- Fimbrie di adesione aggreganti (AAF/I e AAF/II)

- Pili formanti fasci (Bfp)
- Intimina
- fimbrie tipo 1
- fimbrie tipo 3
- fimbrie F1c/s
- fimbrie P
- adesine X
- Proteine Ipa (antigene plasmatico di invasione);

*E. coli*, inoltre, produce numerose esotossine, ovvero:

- Tossine Shiga-like: Stx-1 e Stx-2
- Tossine termostabili (Stx e STb)
- Tossine termolabili (LT-I e LT-II)
- Tossina  $\alpha$ -emolisina HlyA
- Fattore citotossico necrotizzante tipo 1 (CNF1)
- SPATEs (serina proteasi autotrasportatore delle *Enterobacteriaceae*)
- Lipopolisaccaride endotossina (LPS);

Sono descritti altri fattori di virulenza quali:

- Meccanismi di acquisizione del ferro: recettori Haem e siderofori (molecole chelanti il ferro come l'enterobactina, aerobactina, salmochelina e yersiniabactina). Entrambi questi meccanismi garantiscono la disponibilità di ferro nel tratto urinario, contribuendo così alla sopravvivenza e persistenza di *E. coli* nel tratto urinario;
  - Evasione del sistema immunitario dell'ospite: soppressione della produzione di citochine e chemochine, resistenza alla fagocitosi (grazie all'antigene O del LPS e antigene K della capsula polisaccaridica)
  - Formazione di biofilm: responsabile di persistenza e ricorrenza di episodi di UTI
- [20]

## 1.2 MANIFESTAZIONI CLINICHE

I principali siti d'infezione sono:

- Tratto urinario, sia delle basse vie (uretriti), sia delle alte vie (pielonefriti), legate a *E. coli uropatogeni* (UPEC)
- Meningi: meningiti neonatali, legate a ceppi con antigeni K1;
- Infezioni nosocomiali e iatrogene;
- Tratto gastro-enterico: gastroenteriti

### E. Coli uropatogeno (UPEC)

*E. coli* è la principale causa di infezione delle vie urinarie (UTI) che si può presentare come batteriuria asintomatica, cistite, uretrite, pielonefrite, e prostatite nell'uomo. *E. coli* uropatogeno (UPEC) è l'agente eziologico principale nel 75% dei casi di UTI non complicate e nel 65% dei casi di UTI complicate [21].

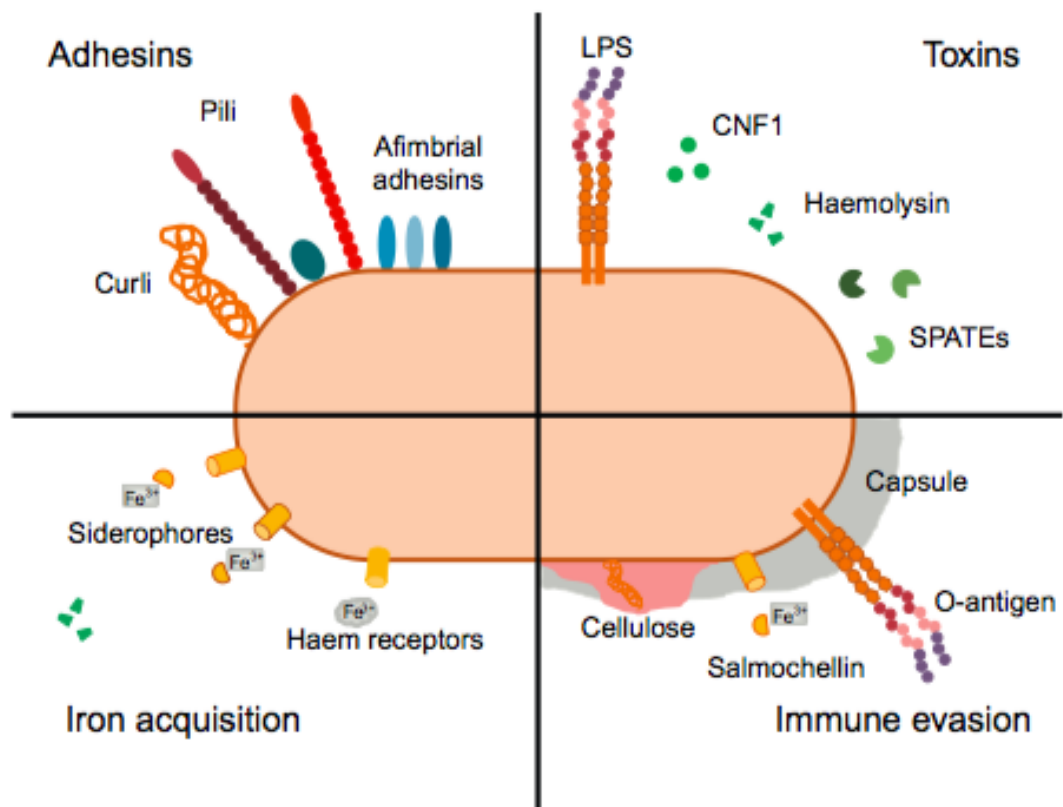


Figura 3. Fattori di virulenza di *E. coli* uropatogeno (UPEC). *E. coli* gioca diverse strategie per causare infezione delle vie urinarie e resistere alle difese immunitarie dell'ospite [20]

### E. coli enterotossigeni (ETEC)

Rappresentano la principale causa di diarrea infantile nei paesi in via di sviluppo. Sono provvisti di adesine specifiche per la mucosa intestinale, rappresentate da CFA-I e CFA-III, codificate da plasmidi. La loro azione patogena si esplica attraverso la produzione di due enterotossine: la tossina termolabile (LT) e la tossina termostabile (ST) che promuovono un incremento della concentrazione cellulare di cAMP e cGMP, rispettivamente. Questi mediatori stimolano la secrezione di sali minerali e di acqua dall'enterocita al lume intestinale: la diarrea acquosa riconosce questa patogenesi. L'infezione si manifesta dopo un periodo di incubazione di 1-7 giorni, con la comparsa di diarrea acquosa e crampi addominali. Rara è la febbre.

### E. coli enteropatogeno (EPEC)

In passato i ceppi EPEC sono stati una delle principali cause di diarrea infantile nei paesi occidentali, attualmente sono divenute sporadiche in questi paesi a differenza dei paesi in via di sviluppo. EPEC penetra attraverso lo strato di muco che riveste gli enterociti ed aderisce alla mucosa, dove provoca scomparsa dei microvilli e formazione di veri e propri agglomerati batterici. La malattia si manifesta dopo un periodo di incubazione di 24-48 ore, con la comparsa di diarrea acquosa, contenente muco ma non sangue. La malattia si risolve spontaneamente nell'arco di alcuni giorni ma può persistere per settimane nei pazienti defedati.

### E. coli enteroaggregante (EAEC) – E. coli diffusamente enteroaderente (DAEC)

I ceppi aderiscono per mezzo di pili alla mucosa intestinale e si aggregano con formazione di biofilm mucoso. Una volta aggregati, liberano una citotossina diversa, ma simile alle enterotossine ST e LT. Causano una diarrea acquosa muco-sanguinolenta, associata a vomito, disidratazione, con dolori addominali. Rara la febbre. I ceppi DAEC sono anch'essi capaci di aderire alle cellule ma non determinano la formazione di aggregati, non elaborano enterotossine e non invadono le cellule intestinali; sono ad oggi sconosciuti i meccanismi con cui determinano diarrea.

Le infezioni di questi ceppi di *E.coli* sono diffuse soprattutto nei paesi in via di sviluppo, dove colpiscono principalmente i bambini.

### E. coli enteroinvasivi (EIEC)

Si attaccano alla mucosa dell'intestino crasso ed invadono le cellule per endocitosi. Dopo aver liscio il vacuolo di endocitosi, si moltiplicano all'interno della cellula, che viene uccisa. La diffusione alle cellule adiacenti determina una notevole distruzione della mucosa intestinale e infiammazione. La loro invasività è legata ad un'isola di patogenicità a localizzazione plasmidica, che codifica per un fattore di invasività. Inizialmente la diarrea è di tipo acquoso poi diventa muco-sanguinolenta con pus, associata a febbre e dolori addominali.

#### E. coli enteroemorragico (EHEC) o produttore della tossina di Shiga (STEC)

Appartengono principalmente al sierotipo O157:H7 e sono la causa crescente di infezioni acquisite per via alimentare legate al consumo di carne bovina contaminata durante la lavorazione. Queste infezioni risultano frequenti a causa della ridotta carica batterica necessaria per determinare la malattia (anche solo 100 CFU).

I ceppi STEC producono un'enterotossina che ha le medesime caratteristiche di virulenza e lo stesso meccanismo di azione della tossina di Shiga; ne sono note due varianti:

- STx1, prodotta dai sierotipi non -O157
- STx2, prodotta dai ceppi O157

Clinicamente questa enterite si manifesta 3-4 giorni dopo l'ingestione dell'alimento contaminato con la comparsa di diarrea sanguinolenta, accompagnata nel 90% dei casi da dolore addominale e tenesmo. La malattia regredisce in genere in una settimana, ma talora si può complicare con la comparsa della sindrome emolitico-uremica (SEU), caratterizzata da anemia emolitica microangiopatica, trombocitopenia, oligo-anuria. La SEU si sviluppa generalmente dopo una settimana dell'esordio clinico dell'infezione, quando la sintomatologia intestinale è in fase di remissione [9,22].

Recenti evidenze indicano come *E. coli* possa essere coinvolto nella patogenesi delle malattie infiammatorie croniche intestinali (IBDs), quali il Morbo di Crohn e la rettocolite ulcerosa.

Sappiamo come il microbiota intestinale è uno dei fattori maggiormente coinvolti; anche se ancora oggi non è chiaro quale specie batterica sia responsabile della perdita di equilibrio nella relazione ospite-patogena in queste patologie.

Nei pazienti con morbo di Crohn, specialmente quelli con malattia attiva a localizzazione ileale, c'è una proliferazione eccessiva di *E. coli* [23,24] e l'incremento dei suoi ceppi è stato correlato con un minor tempo di recupero prima delle recidive [25]. In questi casi *E. coli* si può frequentemente riscontrare nella mucosa intestinale, nella lamina propria, nella sottomucosa, come anche nei centri germinativi dei follicoli linfonodali e nei granulomi [26]. La caratterizzazione molecolare da questi pazienti ha dimostrato che i ceppi appartengono al gruppo di *E. coli* patogeni extraintestinali (ExPEC) [23,27,28] ma studi recenti hanno rivelato come alcuni ceppi isolati avessero aspetti fenotipici patogenetici diversi, tanto che fu definito un nuovo patotipo di *E. coli* associato con la malattia di Crohn denominato *E. coli* aderente-invasivo (AIEC) [29]. Anche nei pazienti con rettocolite ulcerosa, ritroviamo incremento di ceppi appartenenti al gruppo di *E. coli* patogeno extra intestinale, che si può ritrovare nelle cellule epiteliali intestinale e nella lamina propria [26,27].

*E. coli* è la seconda causa di meningite neonatale raggiungendo alti tassi di mortalità (20-29%) e morbilità tra i neonati. L'incidenza di questa condizione si attesta intorno a 0.1/1000 neonati vivi nei paesi industrializzati [30]. Un 90% di queste infezioni si verifica nel periodo neonatale (< 28 giorni di vita) e solo un 10% avviene nei bambini di età compresa tra 1 e 3 anni [31,32].

A seguito di questa infezione, i neonati riportano gravi sequele neurologiche che sono più frequenti e importanti quando la meningite si accompagna a ventricolite o ascesso intracerebrale [33].

Lo sviluppo di meningite neonatale da *E. coli* prevede tre steps: (i) traslocazione dal lume intestinale, dalle vie urinarie o dall'utero della madre, nel sangue; (ii) moltiplicazione intravascolare; (iii) passaggio attraverso la barriera emato-encefalica e invasione dello spazio subaracnoideale [30,34]

Circa l'80% dei ceppi che sono causa di meningite appartengono al sierotipo capsulare K1, e i sierotipi O18:K1 e O7:K1 sono quelli più frequentemente coinvolti [35,36].

I fattori di virulenza associati a questi ceppi di *E. coli* sono correlati alle proteine della membrana esterna (antigene capsulare K1, proteina OmpA), siderofori, adesine (fimbrie P, fimbrie S, fimbrie tipo 1) e geni di invasività [37].

La sepsi neonatale ha un'incidenza di 1/1000 neonati a termine e di 4/1000 neonati pretermine che può arrivare a 300/1000 nei neonati con basso peso alla nascita. La sepsi da infezione batterica è una delle più importanti cause di morbidità e mortalità nei neonati sia nei paesi industrializzati che nei paesi in via di sviluppo [38].

Molti di questi patogeni batterici si ritrovano nella vagina, cervice o nel retto delle donne gravide e possono raggiungere il feto o attraversando la membrana amniotica o infettando direttamente il bambino durante l'attraversamento del canale del parto [39].

La sepsi neonatale può essere suddivisa in:

- Sepsi neonatale precoce (EONS): i microrganismi maggiormente in causa sono *E. coli* e *Streptococco del gruppo B* (GBS), seguiti da *Listeria monocytogenes* e *Haemophilus influenzae*;
- Sepsi neonatale tardiva (LONS): i microrganismi associati sono *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Candida* spp. e GBS;

I fattori di virulenza coinvolti comprendono fimbrie, tossine, LPS, e un ruolo predominante lo gioca il gene *IbeA* codificante per la proteina omonoma che permette la traslocazione del battere attraverso la membrana amniotica [40].



**Table 1** Pathogenic *Escherichia coli*

	<i>Site of infection</i>	<i>Disease</i>	<i>Phylogroup</i>	<i>Epidemiology</i>	<i>Complications</i>
<b><i>E. coli</i> causing intestinal disease</b>					
ETEC: enterotoxigenic <i>E. coli</i>	Small intestine	Watery diarrhea	B1, B2	Endemic in resource-limited countries, traveler's diarrhea, food-borne	Dehydration
EAEC: enteroaggregative <i>E. coli</i>	Small and large intestine	Watery diarrhea	B1, A	Sporadic, endemic in resource-limited countries, travelers, individuals with HIV	Persistent diarrhea, nutritional compromise
EPEC: enteropathogenic <i>E. coli</i>	Small intestine	Watery diarrhea	B1	Sporadic or endemic disease, institutional outbreaks	Dehydration, nutritional compromise
EHEC: enterohemorrhagic <i>E. coli</i>	Large intestine	Hemorrhagic colitis	B1, E	Sporadic, outbreaks, food-borne	Hemolytic uremic syndrome
EIEC: enteroinvasive <i>E. coli</i> ( <i>Shigella</i> )	Large intestine (intracellular)	Watery or bloody diarrhea	A, B1	Sporadic diarrhea	Dehydration
DAEC: diffusely adherent <i>E. coli</i>	Small intestine	Acute diarrhea, possibly plays a role in inflammatory bowel disease, pregnancy complications	B2, D	All ages	Possible contribution to ulcerative colitis pathogenesis or relapse
<b><i>E. coli</i> causing extraintestinal infections</b>					
ExPEC: Extra-intestinal <i>E. coli</i>	Blood stream	Bacteremia		All ages, particularly elderly, post-operative	Sepsis, abscess, death
UPEC: uropathogenic <i>E. coli</i>	Urinary tract	Pyelonephritis Cystitis	B2, D D, A, B1	All ages All ages	Renal scarring, sepsis Pyelonephritis, sepsis
NMEC: neonatal meningitis-associated <i>E. coli</i>	Meninges	Meningitis	B2, D	Neonates	Long-term neurological sequelae, death
AIEC: adherent invasive <i>E. coli</i>	Ileum	Thought to play a role in Crohn's disease	B2	Crohn's disease	Possible contribution to Crohn's disease pathogenesis or relapse

Figura 4. Tabella riassuntiva con tutti i ceppi patogenici di *E. coli* [22]

### 1.3 ANTIBIOTICO-RESISTENZA

*E. coli* può essere considerato un sensore della situazione attuale concernente l'antibiotico resistenza.

*E. coli* è intrinsecamente suscettibile alla maggior parte degli antibiotici in uso clinicamente, ma diversi ceppi hanno sviluppato meccanismi di antibiotico resistenza, sia di tipo mutazionale sia legati alla capacità di acquisire geni di resistenza, per la maggior parte mediante trasferimento genico orizzontale [41].

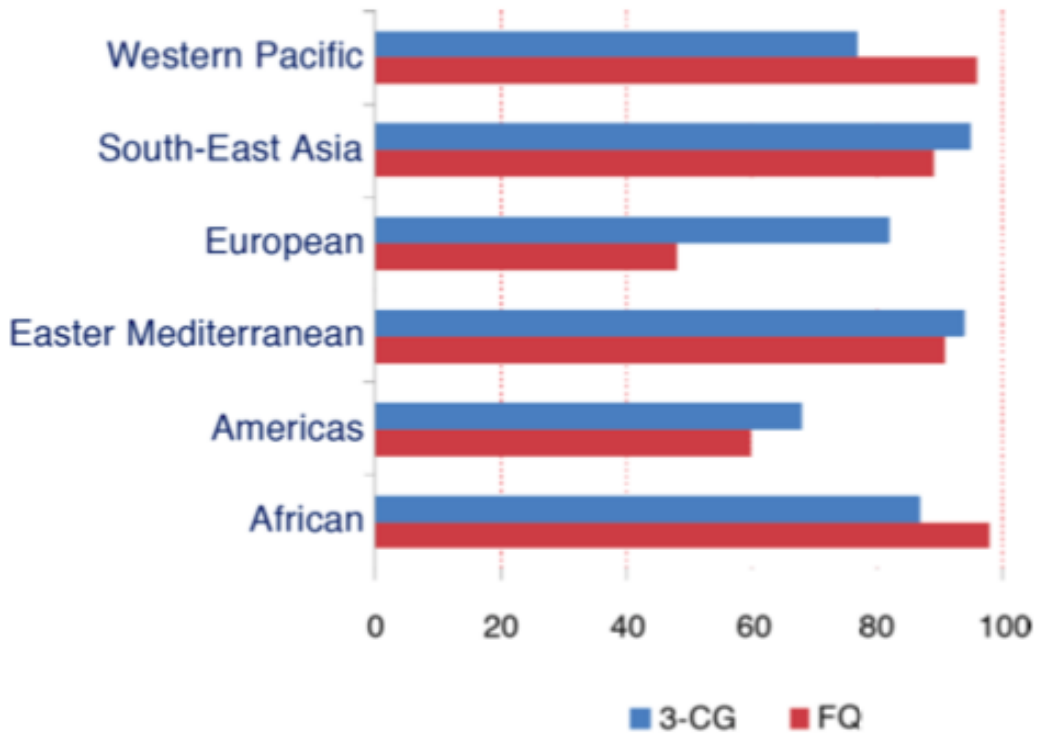


Figura 5. Tassi di resistenza per *E. coli* fino all'aprile 2013 in differenti aree geografiche. 3-CG: cefalosporine di III generazione; FQ, fluorochinoloni [41].

I meccanismi più rilevanti e studiati sono l'acquisizione di geni codificanti per  $\beta$ -lattamasi ad ampio spettro (la quale conferisce resistenza alle cefalosporine ad ampio spettro), carbapenemasi (conferisce resistenza ai carbapenemi), metilasi 16S rRNA (conferisce resistenza globale agli aminoglicosidi), acquisizione di geni di resistenza veicolati da plasmidi (PMQR) che conferiscono resistenza ai (fluoro)chinoloni e geni *mcr* che conferiscono resistenza alle polimixine [42]. Oltre ai meccanismi di resistenza acquisiti, le mutazioni spontanee in geni bersaglio degli antibiotici rappresentano una componente importante nella resistenza ai chemioterapici. Le principali mutazioni che conferiscono resistenza riguardano le topoisomerasi (resistenza ai chinolonici) e gli LPS (resistenza alla colistina).

La resistenza ai chinolonici sta rapidamente incrementando negli ultimi anni. I bersagli molecolari dell'azione dei chinolonici sono rappresentati da due topoisomerasi batteriche: la DNA girasi (topoisomerasi II) e la DNA topoisomerasi IV, entrambi questi enzimi essenziali per la replicazione del DNA batterico. La DNA girasi, responsabile

della super spiralizzazione negativa del DNA è un tetramero composto da due unità monomeriche, GyrA e GyrB codificate da due diversi geni, *gyrA* e *gyrB* rispettivamente. Anche la topoisomerasi IV è un enzima composto da quattro subunità monomeriche omologhe: due subunità ParC e due subunità ParE, codificate dai geni *parC* e *parE* rispettivamente. Essa è responsabile della separazione delle due molecole di DNA che derivano dal processo di replicazione del cromosoma batterico.

Attualmente i meccanismi di resistenza che possiamo ritrovare in *E. coli* sono tre. Il primo meccanismo riguarda le mutazioni dei geni *gyrA* e *parC* mappate in una regione chiamata regione determinante la resistenza ai chinolonici (QRDR). Giocano un ruolo, sebbene minore, le mutazioni dei geni *gyrB* e *parE* nell'acquisizione di resistenza ai chinolonici. [43,44].

Un altro meccanismo di resistenza ai chinolonici è la riduzione dell'accumulo intracellulare del farmaco stesso, che può essere correlato sia a un decremento di permeabilità della membrana esterna, sia ad un aumentato efflusso del farmaco fuori dalla cellula tramite pompe di efflusso, a seguito di una aumentata espressione di AcrAb, YdhE, MdfA, tre costituenti delle pompe di efflusso [45].

Inoltre, sono stati descritti meccanismi di resistenza mediati da plasmidi; di questi il più importante è l'acquisizione di un gene *qnr* che codifica per un peptide in grado di proteggere i complessi della DNA girasi e della DNA topoisomerasi IV [46].

I carbapenemi sono i farmaci di scelta per trattare infezioni causate da *Enterobacteriaceae* produttori di  $\beta$ -lattamasi ad ampio spettro (ESBL). Ad oggi il loro utilizzo viene fortemente contrastato dalla proliferazione di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi. I meccanismi descritti sono: (i) la presenza di ESBLs o enzimi AmpC in combinazione con mutazioni delle porine, e (ii) la produzione di carbapenemasi [47,48].

Ceppi di *E. coli* produttori di carbapenemasi rappresentano una minaccia crescente per la popolazione generale in questo risultano resistenti alle maggiori classi di antibiotici presenti in commercio [48,49].

In Europa (European Centre for Disease Prevention and Control 2015) la prevalenza di *E. coli* resistente alle aminopenicilline (ampicillina o amoxicillina) è del 57.1%, ai

fluorochinoloni è del 22.4%, alle cefalosporine di III generazione è del 12.0% e agli aminoglicosidi (gentamicina o tobramicina) è del 9.0%. Inoltre, il 4.8% dei ceppi sono co-resistenti contemporaneamente alle cefalosporine di III generazione, fluorochinoloni e aminoglicosidi [41].

#### 1.4 OPZIONI TERAPEUTICHE

Ci sono varie opzioni per il trattamento di infezioni causate da *E. coli* sensibile, incluse le penicilline, le cefalosporine, associazione  $\beta$ -lattamici + inibitori delle  $\beta$ -lattamasi (BLBLI), monobattami, carbapenemi, fluorochinoloni, aminoglicosidi e trimetoprim/sulfametoxazolo (TMP-SMX).

Ad oggi, l'incremento di resistenza agli antibiotici in *E. coli* limita significativamente le opzioni terapeutiche più appropriate.

Nelle ultime decadi il numero di ceppi produttori di  $\beta$ -lattamasi ad ampio spettro (ESBL) o di Ampc mediata da plasmidi (pAmpc) è incrementato drammaticamente [41].

I carbapenemi sono considerati i farmaci di scelta per il trattamento di infezioni severe causate da ceppi produttori di ESBLs [50] in quanto la loro attività antibatterica non viene compromessa da questi enzimi. Inoltre, i risultati di alcuni studi osservazionali hanno mostrato come i carbapenemi siano associati con un miglior outcome clinico rispetto alle cefalosporine o ai fluorochinoloni [51]. I maggiori risultati sono stati ottenuti con imipenem e meropenem, e più recentemente con ertapenem [52].

L'incremento nella prescrizione e nel consumo di carbapenemi è però allarmante data l'emergenza di ceppi produttori di carbapenemasi. Per questo motivo, è necessaria la ricerca di alternative ai carbapenemi per quanto riguarda i ceppi ESBL e produttori di carbapenemasi.

ESBL (ma non Ampc) sono inibiti dagli inibitori delle  $\beta$ -lattamasi per cui possono essere attive sia la combinazione amoxicillina-acido clavulanico che piperacillina-tazobactam. La combinazione piperacillina-tazobactam ma non amoxicillina-acido clavulanico ha mostrato ridotta attività quando testata contro un elevato inoculo di *E. coli* (produttore o non produttore ESBL) sia in vivo [53] che in vitro [54]. È ancora controverso se i BLBLI siano più efficaci dei carbapenemi.

La temocillina, un  $\beta$ -lattamico attivo sia contro ESBL che pAmpc, è un interessante agente antimicrobico che ha mostrato ottimi risultati in studi non controllati, ma è commercializzato ancora in pochi paesi [55].

Alcune cefalosporine, in particolare ceftazidime e cefepime, risultano attive contro i produttori ESBL secondo gli attuali breakpoints EUCAST ma mancano dati clinici per infezioni severe [56].

La produzione di carbapenemasi riduce drammaticamente le opzioni terapeutiche. Gli enzimi carbapenemasi si ritrovano frequentemente in *K. pneumoniae* ma possono essere riscontrati anche in *E. coli*. In questo caso l'opzione terapeutica dipende dal tipo di carbapenemasi prodotta; in genere aztreonam è attiva contro le metallo- $\beta$ -lattamasi (MBL); le cefalosporine contro i produttori OXA-48 a meno che non ci sia una co-produzione ESBL o AmpC, condizione che in genere è molto frequente.

In definitiva, gli antibiotici maggiormente utilizzati nel caso di ceppi produttori di carbapenemasi sono la colistina, la tigeciclina, la fosfomicina e, in determinati casi, gli aminoglicosidi [57].

## 2. COLISTINA

La colistina è un antibiotico polipeptidico appartenente alla classe delle polimixine, noto anche come polimixina E.

Le polimixine sono antibiotici polipeptidici che comprendono 5 diversi composti chimici (polimixina A-E) prodotti da alcuni ceppi di *Bacillus Polimixia* [58]. Solo la polimixina B e la polimixina E vengono usate nella pratica clinica. Le polimixine sono attive in maniera selettiva contro i batteri Gram-negativi, incluse le specie di *A. Baumannii*, *P. Aeruginosa*, *Klebsiella* e *Enterobacter* [59].

### 2.1 STRUTTURA CHIMICA

Le polimixine sono dei polipeptidi basici ciclici con una lunga coda e che possiedono proprietà di essere detergenti cationici.

La colistina è un decapeptide cationico ciclico legato ad una catena di acido grasso mediante legame ad  $\alpha$ -amido [60]. Il suo peso molecolare è di 1750 Da.

Ci sono due forme di colistina disponibili in commercio: la **colistina solfato** e il **colistimetato sodico** (anche chiamata colistina sodio metansolfonato). La colistina solfato è un catione, mentre il colistimetato sodico è un anione, prodotto dalla reazione della colistina con formaldeide e bisolfito di sodio [61,62].

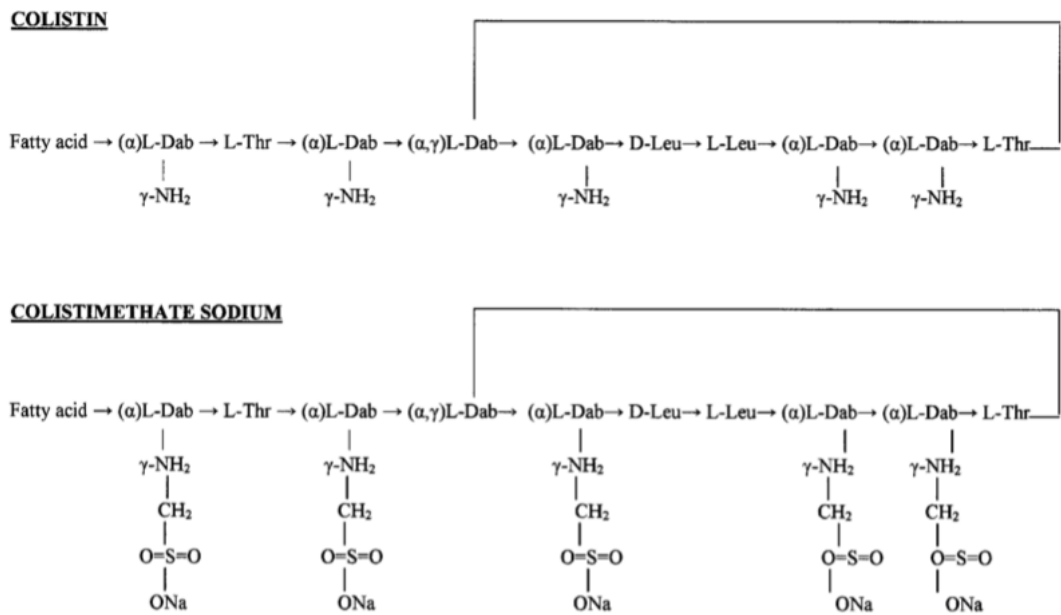


Figura 6. Struttura chimica di colistina e di colistimetato sodico [59]

## 2.2 SPETTRO D'AZIONE

La colistina e la polimixina B hanno una eccellente e selettiva attività battericida nei confronti della maggior parte di bacilli aerobi Gram-negativi. In particolare risultano sensibili all'azione dell'antibiotico, *E. coli*, *A. Baumannii*, *Shigella*, *Salmonella*, *Pasteurella*, *Enterobater aerogenes*, *K. Pneumoniae* e *P. aeruginosa* [63,64].

La colistina ha inoltre dimostrato di possedere una considerevole attività in vitro contro *Stenotrophomonas maltophilia* e contro diverse specie di Micobatteri, incluso *Mycobacterium tuberculosis* [65,66].

Specie di *Proteus*, *Neisseria* e *Brucella* risultano invece intrinsecamente resistenti [58,67].

## 2.3 MECCANISMO D'AZIONE

Il bersaglio dell'attività antimicrobica della colistina è la parete batterica. L'iniziale interazione della colistina con la membrana esterna batterica avviene mediante

interazioni elettrostatiche tra il polipeptide cationico (la colistina) e il lipopolisaccaride (LPS) situato nel versante esterno della membrana dei batteri Gram-negativi [59]. La molecola del lipopolisaccaride gioca un ruolo determinante nel mantenimento della funzione di barriera della membrana esterna e partecipa estensivamente nel processo di interazione ospite-patogeno. Il LPS è costituito da una molecola di lipide A, un core oligosaccaridico e una molecola di antigene O [68].

La colistina agisce sostituendo magnesio ( $Mg^{2+}$ ) e calcio ( $Ca^{2+}$ ) che sono i costituenti normali del LPS, portando così uno squilibrio nella struttura della membrana esterna. Il risultato di questo processo causa un incremento di permeabilità di membrana, perdita di materiale cellulare e infine morte della cellula [69,70].

In aggiunta a questa attività diretta antibatterica, la colistina mostra anche una potente attività anti-endotossina. Nei batteri Gram-negativi l'endotossina è costituita dalla molecola di lipide A che costituisce il LPS.

#### 2.4 MECCANISMI DI RESISTENZA

Essendo molecole tensioattive, le polimixine interagiscono con i fosfolipidi della membrana cellulare alterandone la permeabilità e risultando battericide, ed è proprio il contenuto in fosfolipidi del complesso parete – membrana cellulare batterica a determinare la sensibilità alle polimixine; la struttura di parete carente in fosfolipidi di alcuni batteri li rende resistenti a questi antibiotici [71].

La resistenza può svilupparsi in alcuni batteri attraverso modificazioni della struttura dei lipopolisaccaridi della parete che inibiscono il binding delle polimixine alla parete batterica. Studi di ceppi di *P. aeruginosa* resistenti alle polimixine hanno dimostrato come un'alterazione nel contenuto della membrana cellulare esterna (diminuzione strato LPS, ridotti livelli di proteine situate negli strati più esterni, riduzione nel contenuto di  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  e alterazioni lipidiche) è correlata con lo sviluppo di resistenze [72,73,74].

Alcuni ceppi batterici, come il *Bacillus polymixia* sottospecie *colistinus*, sono in grado di produrre l'enzima colistinasi che inattiva la colistina [75].

Recentemente, è stato individuato in *E. coli* il primo meccanismo di resistenza acquisita alla colistina che è codificato dal gene *mcr* (mobilized colistin resistance).



Questo gene codifica per una fosfoetanolamminotrasferasi, che permette il legame di una fosfoetanolamina al lipide A del LPS. In questo modo la carica netta del LPS si riduce, così come l'affinità per la colistina che non riesce più a legarsi efficacemente [76]. La pericolosità di questo gene è dovuta a due caratteristiche: (i) capacità di trasferimento elevata in quanto *mcr* è frequentemente localizzato su elementi genetici mobili ed è stato rilevato in moltissime specie Gram-; (ii) sono state caratterizzate fino ad oggi 9 diversi tipi di *mcr*, ognuno dei quali mostra una grande variabilità (ad esempio le varianti di *mcr-1* caratterizzate fino ad oggi sono 12).

## 2.5 INDICAZIONI

- Il colistimetato sodico viene utilizzato per trattare le infezioni da parte di *P. aeruginosa* specialmente in pazienti affetti da fibrosi cistica e da ceppi di *Acinetobacter* resistenti ad altri tipi di antibiotici, tuttavia, sono stati individuati ceppi resistenti anche alla colistina. In alcuni casi il colistimetato sodico è stato anche somministrato per via intratecale e intraventricolare in pazienti affetti da meningite o ventricolite sostenute da *A. baumannii* e *P. aeruginosa* [77]. Alcuni studi hanno indicato che la colistina può essere utile per il trattamento di infezioni causate da ceppi resistenti ai carbapenemi di *A. baumannii*. Il colistimetato sodico è una forma proattiva del farmaco e viene prontamente idrolizzata in soluzione acquosa in una varietà di derivati attivi metansolfonati [78].
- La colistina solfato è molto stabile, è somministrata oralmente e può essere usata per il trattamento di infezioni intestinali sostenute da batteri Gram-negativi [79].

## 2.6 EFFETTI COLLATERALI E TOSSICITA'

La somministrazione parenterale di colistina può provocare danno renale tubulare, con aumento dell'azotemia, albuminuria ed ematuria. La funzione renale va quindi attentamente monitorata [71].

Fenomeni neurotossici quali parestesia periorale, atassia, convulsioni possono verificarsi con un'incidenza piuttosto bassa. L'incidenza di neurotossicità correlata alla

colistina riportata in letteratura si attesta intorno al 7% con le parestesie come evento principale [71]. Sono stati anche descritti fenomeni di debolezza muscolare legati ad un blocco neuromuscolare simile a quello che si verifica con gli aminoglicosidi. Tale blocco muscolare può progredire fino all'apnea in caso di concentrazioni plasmatiche elevate. Particolarmente a rischio sono i pazienti affetti da fibrosi cistica (29% dei pazienti trattati con colistina ha avuto parestesie, atassia o entrambe le condizioni) [80,81]. Sia la nefrotossicità che la neurotossicità sono dose-dipendenti e in genere sono condizioni reversibili dopo cessazione della somministrazione della terapia. La somministrazione per via orale può causare nausea, vomito, e diarrea. Lo sviluppo di colite pseudomembranosa rappresenta un raro ma potenziale effetto collaterale. L'applicazione topica cutanea può causare raramente reazioni di ipersensibilità, rash cutaneo, prurito generalizzato, febbre. L'incidenza di reazioni allergiche è stimata intorno al 2% [82].

La somministrazione di colistina per aerosol potrebbe complicarsi con broncocostrizione e senso di costrizione toracica. Viene indicato pre-trattamento con farmaci  $\beta$ 2-agonisti inalatori che potrebbe ridurre il manifestarsi di broncocostrizione [83].

La somministrazione intraventricolare di colistina, specialmente ad alte dosi, può dare convulsioni.

## 2.7 INTERAZIONI

L'impiego contemporaneo di bloccanti neuromuscolari o di antibiotici aminoglicosidici è controindicato per la sommazione degli effetti a livello della placca neuromuscolare [71].

Ci sono diversi studi clinici in letteratura riguardo l'attività sinergica della colistina con altri agenti antimicrobici contro batteri Gram-negativi multi-resistenti (MDR).

Un trial clinico sull'efficacia della colistina in 53 pazienti con fibrosi cistica con esacerbazioni di infezione polmonare cronica a causa di *P. aeruginosa* MDR ha evidenziato come la combinazione della colistina con un agente anti-Pseudomonas (piperacillina, aztreonam, ceftazidime, imipenem o ciprofloxacina) fosse più efficace rispetto alla monoterapia con la sola colistina [84].

La combinazione di colistina, rifampicina e amikacina mostra sinergia in vitro e risulta efficace nel trattamento di ascessi multipli da *P. aeruginosa* MDR in pazienti immunocompromessi [85]. Inoltre, in un recente studio è stata documentata sinergia in vitro della colistina con la rifampicina, e in misura minore della colistina con l'associazione trimetoprim-sulfametoxazolo, nei confronti di ceppi di *S. maltophilia* [86].

### 3. 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 microrganismi agli esseri umani [87]. 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 [88].

Gli AMPs hanno mostrato una forte attività antimicrobica contro un ampio spettro di microrganismi, inclusi batteri Gram-negativi e Gram-positivi, funghi e virus e protozoi unicellulari [89]. Inoltre, sono efficaci anche contro microrganismi patogeni resistenti agli antibiotici convenzionali [90]. La maggior parte degli AMPs uccidono i batteri direttamente, mentre altri agiscono indirettamente incrementando le proprietà immunomodulanti dell’ospite [87].

Gli AMPs si trovano nelle secrezioni delle cellule epiteliali di cute e mucose e nei granuli dei neutrofili [91,92]. Nella maggior parte dei casi gli AMPs vengono prodotti come precursori inattivi, che necessitano di un taglio proteolitico per l’attivazione [93]. 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) [94,95].

### 3.1 CLASSIFICAZIONE

Gli AMPs vengono comunemente classificati sulla base della loro struttura secondaria in peptidi  $\alpha$ -elica, peptidi a  $\beta$ -foglietto e peptidi non  $\alpha\beta$  con struttura a spirale estesa.

- I peptidi ad  $\alpha$ -elica hanno struttura random in soluzione acquosa ma acquisiscono una struttura anfipatica ad  $\alpha$ -elica in contatto con le membrane biologiche [96]. Due dei più importanti peptidi in questo gruppo sono: LL-37 e la lattoferrina umana.
- I peptidi a  $\beta$ -foglietto sono stabilizzati da ponti disolfato e si organizzano per costituire una molecola anfipatica. In virtù della loro struttura rigida, i peptidi a  $\beta$ -filamento sono ordinati in soluzione acquosa [96]. Il gruppo più studiato dei peptidi a  $\beta$ -filamento sono le defensine – un vasto gruppo di AMPs che sono prodotte come precursori inattivi nei neutrofili, macrofagi e sono principalmente espresse nelle cellule epiteliali di vari organi e tessuti come la cute, cavità orale, tratto gastro intestinale e tratto respiratorio- [95,97].
- Un piccolo gruppo di AMPs appartiene alla terza classe di peptidi che sono privi della struttura secondaria e possiedono un alto contenuto di arginina, prolina, triptofano e/o residui di istidina [98]. Similarmente agli altri AMPs, molti di questi peptidi appartenenti a questo gruppo si organizzano a formare strutture anfipatiche dopo contatto con le membrane. Uno dei più studiati peptidi in questo gruppo è l'indolicidina, prodotta dai leucociti bovini [99].

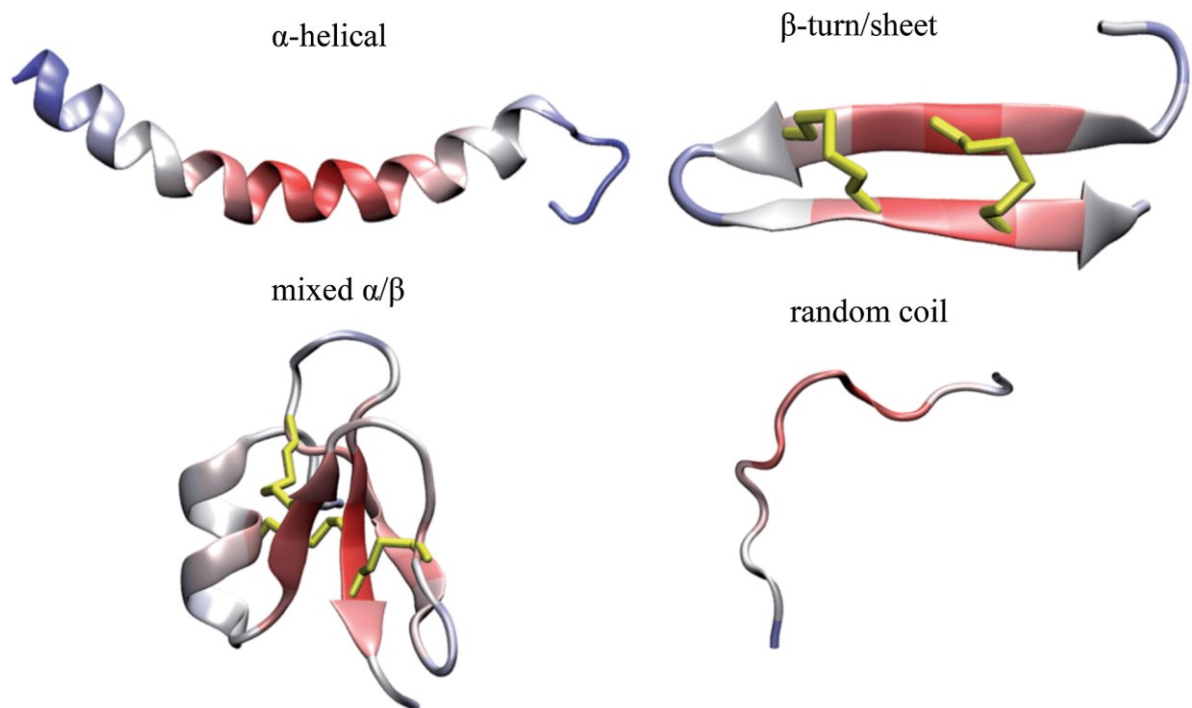


Figura 7. Rappresentazione delle differenze strutturali tra le diverse classi di AMPs [99]

### 3.2 MECCANISMO D'AZIONE

Molti AMPs hanno un'attività antimicrobica diretta, causando la distruzione dell'integrità della membrana batterica e/o traslocando attraverso la membrana stessa nel citoplasma per interagire con un target intracellulare [100].

E' ampiamente riconosciuto che l'interazione con la membrana batterica è un elemento chiave per l'attività antimicrobica diretta, sia quando funge essa stessa da bersaglio, sia quando deve essere attraversata per raggiungere il bersaglio intracellulare [101].

Per quanto riguarda l'interazione tra i peptidi e la membrana microbica sono determinanti le forze elettrostatiche che si instaurano tra i peptidi, carichi positivamente, e la superficie batterica carica negativamente [96].

La membrana citoplasmatica sia dei batteri Gram-positivi che Gram-negativi è ricca di fosfatidilglicerolo, cardiolipina e fosfatidilserina che possiedono teste cariche negativamente, altamente attratte dagli AMPs carichi positivamente [96].

La presenza di acido teicoico nella parete esterna dei Gram-positivi e del lipopolisaccaride nella membrana esterna dei batteri Gram-negativi fornisce un'ulteriore carica negativa alla superficie batterica e favorisce il legame degli AMPs [95,102].

Una volta in contatto con la membrana citoplasmatica, gli AMPs formano una struttura anfipatica secondaria, essenziale per l'interazione con le membrane cellulari [102]. Ovvero, il dominio carico del peptide interagisce con la testa idrofilica del fosfolipide, mentre il dominio idrofobico del peptide interagisce con il core idrofobico del doppio strato lipidico, portando in questo modo gli AMPs sempre più all'interno della membrana [102].

Sono stati proposti diversi modelli per spiegare la sequenza di eventi dall'interazione con la membrana citoplasmatica batterica fino all'evento di distruzione della membrana [103].

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 [96].

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 direttamente su target intracellulari, come il DNA e RNA; oppure possono inibire altri target intracellulari come gli enzimi [96].

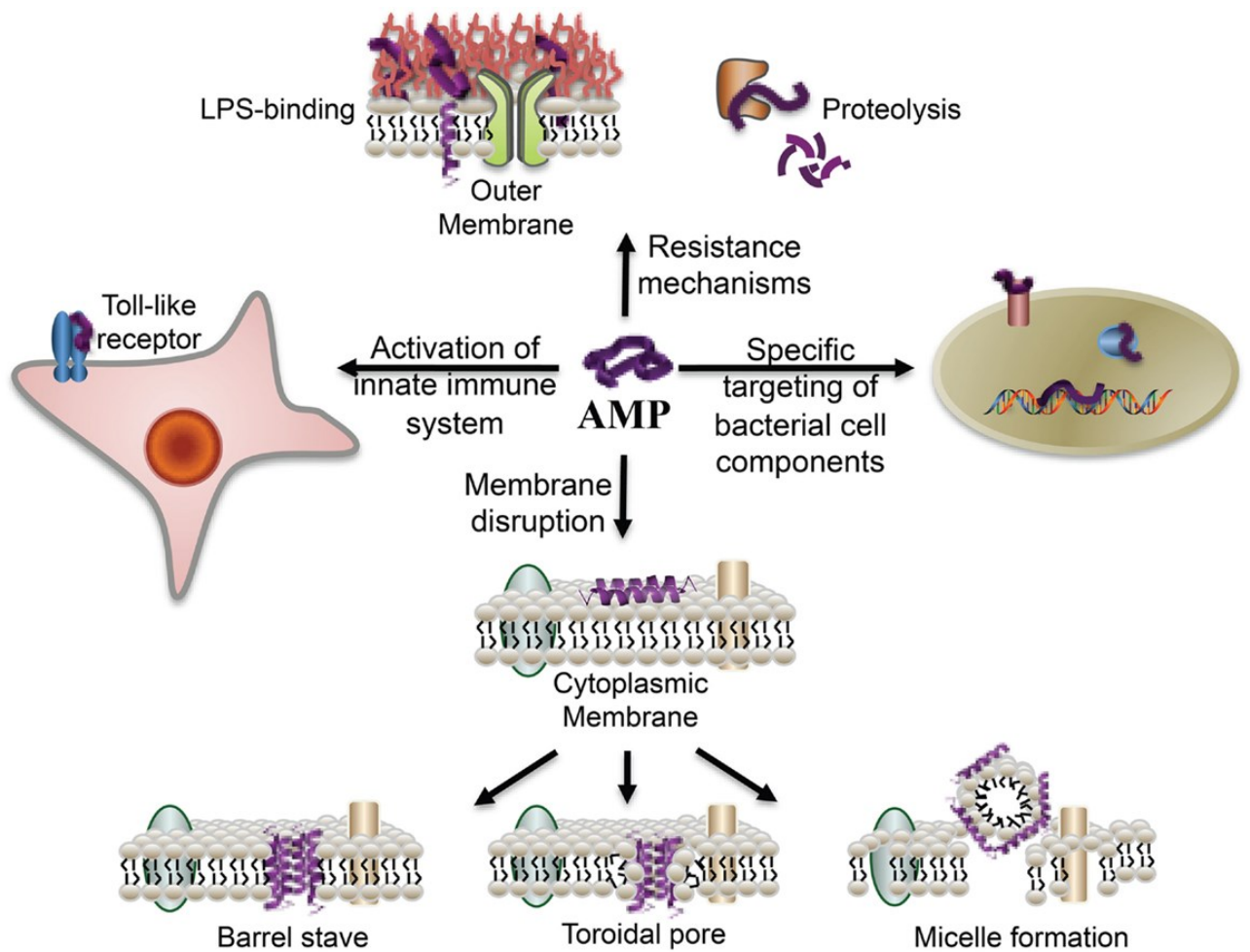


Figura 8. Overview dell'interazioni cellulari dei AMPs [104]

In definitiva la morte della cellula batterica è il risultato di multiple azioni complementari. Questa strategia aiuta ad incrementare l'efficienza degli AMPs e ad eludere lo sviluppo di meccanismi di resistenza [105].

Gli AMPs non sono particolarmente attivi sulle membrane cellulari dei mammiferi. Queste ultime non hanno carica negativa, ma neutra, essendo ricche in fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e sfingomieline [96,102]. 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 [96].

La maggior parte dei AMPs funge anche da potente modulatore dell'infiammazione e ha proprietà immunomodulatorie [106]. L'ampio range di attività immunomodulanti include stimolazione della chemiotassi, modulazione della differenziazione del sistema immunitario, e avviano la risposta immunitaria adattativa. Inoltre, sono in grado di effettuare la soppressione dei TLR (toll like receptors) e/o la produzione di citochine pro-infiammatorie indotta da LPS, al fine di prevenire eccessive risposte infiammatorie eccessive e dannose come la sepsi [107].

### 3.3 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 microrganismi e, a differenza degli antibiotici utilizzati fino ad ora, non riconoscono un unico target ad alta affinità ma agiscono alterando diverse 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 aminoacidi, analogo al peptide magainina isolato da *Xenopus*. Utilizzato come crema topica per il trattamento di ulcere da piede diabetico, ha già raggiunto la fase III in due studi clinici [108,109]

Omiganan è un derivato dell'indolicina, isolata per la prima volta dai neutrofili dei bovini. E' 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.

LTX-109 è un peptidomimetico sintetico valutato come agente antimicrobico topico per le infezioni cutanee da Gram-positivi non complicate, per l'impetigine e in soggetti colonizzati da *S. aureus* a livello nasale [110].

Pur se la maggior parte dei peptidi viene sviluppata per l'utilizzo esterno, alcuni studi si sono focalizzati anche su AMPs che agiscono per via sistemica. In particolare hLF-11, AMP derivato dalla lattoferrina umana, è in via di sviluppo per trattamento di infezioni batteriche e fungine in pazienti immunocompromessi, destinati a ricevere un trapianto di cellule staminali [111].

Inoltre, ci sono attualmente diversi AMPs in sperimentazione come agenti antimicrobici e antifungini; di questi il più studiato e meglio conosciuto è LL-37.

## LL- 37

Nell'uomo sono state identificate due famiglie di host defence peptides (HDPs), le catelicidine e le defensine.

Le catelicidine sono sintetizzate e immagazzinate come pro-forma inattiva nei granuli perossidasi-negativi dei neutrofili. Solo dopo clivaggio proteolitico della pro-proteina, viene rilasciata la forma attiva, che è un peptide lineare che assume una conformazione ad  $\alpha$ -elica.

hCAP18 è l'unica catelicidina umana.

La catelicidina è espressa dalle cellule in diretto contatto con l'ambiente esterno: è stata documentata l'espressione di questo peptide nelle cellule epiteliali di intestino, vie aeree, genitali, cute, ghiandole endocrine, occhio [112].

Alte concentrazioni di catelicidina sono tipicamente riscontrate nei siti di infiammazione dove agiscono come un meccanismo di difesa primario contro batteri e altri patogeni.

Topi knock out per il gene codificante per mCRAMP, l'omologo murino di LL-37, mostrano incrementata suscettibilità a infezioni batteriche e virali [113,114]. Inoltre, è stato riportato un aumento di sviluppo di infiammazione cronica allergica e aterosclerosi [115,116].

LL-37 è un peptide cationico di 37 aminoacidi generato dal clivaggio del tratto C-terminale di hCAP18, che a seguito di stimolazione da segnali pro-infiammatori viene rilasciata nell'ambiente extracellulare, da una serina proteasi della famiglia delle callicreine nei cheratinociti e dalla proteinasi 3 nei neutrofili [117,118,119]. I 37 aminoacidi N-terminali formano il peptide LL-37 a struttura ad  $\alpha$ -elica a contatto con le membrane o in soluzioni con concentrazioni millimolari di sale. A differenza di altri peptidi antimicrobici è protetto dalla degradazione proteolitica [120] e la sua carica positiva permette di associarsi ai fosfolipidi di membrana carichi negativamente. Inoltre, assume una struttura ad  $\alpha$ -elica durante l'interazione con la membrana il cui

esito è il distacco dei suoi residui idrofobici. Questo permette la penetrazione della membrana, la formazione di pori transmembrana e la lisi batterica [121,122].

Molti degli effetti di LL-37, compresi la sua azione antimicrobica o il suo effetto sul sistema immunitario possono essere attribuiti alla sua natura cationica e idrofobica.

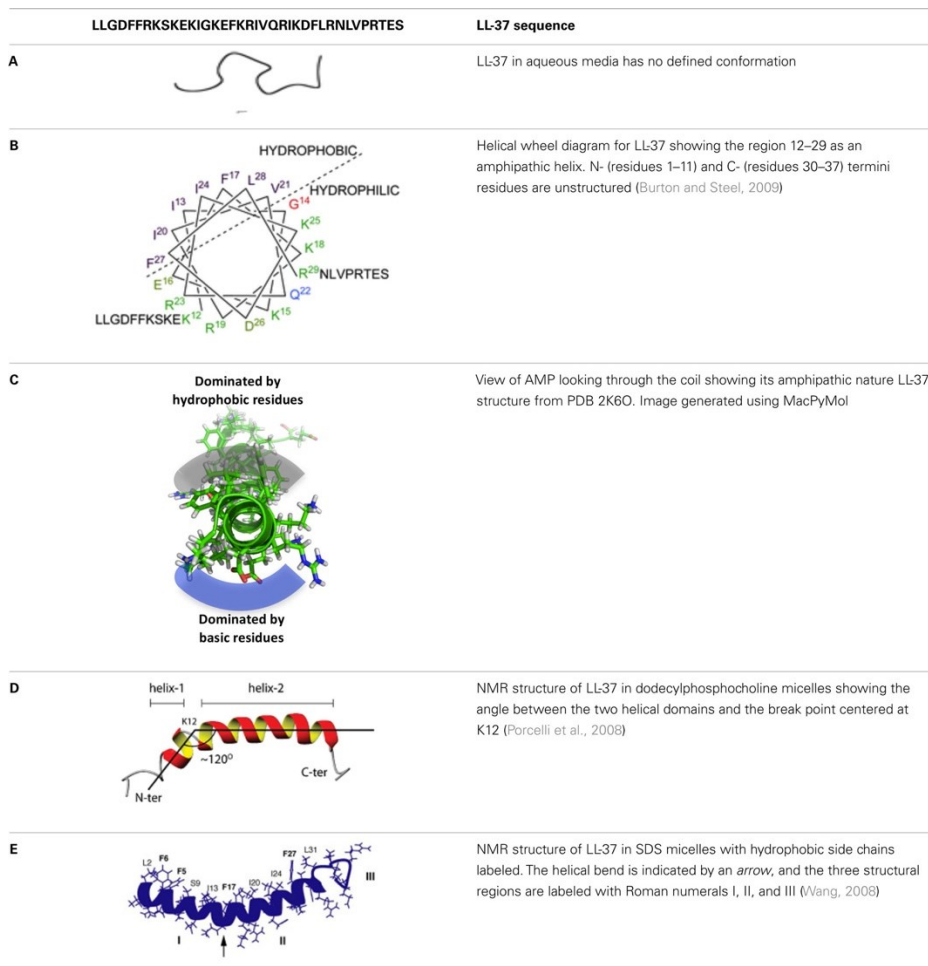


Figura 9. Struttura di LL-37 [123]

LL-37 è costitutivamente espresso e immagazzinato nei granuli secondari dei neutrofili ed è inoltre prodotto da molti tipi di cellule, inclusi i macrofagi, linfociti natural killer (NK) e cellule epiteliali di cute, vie respiratorie, superficie oculare e intestino [112].

Attivazione dei TLRs e /o alterazione del pattern citochinico, causate da infezione o danno tissutale e cellulare, fungono da trigger che attivano la degranolazione cellulare. Questo conduce al rilascio del precursore inattivo hCAP18 nell'ambiente extracellulare, dove può essere processato nella forma attiva di peptide LL-37 [124].

Attività antibatterica

L'attività antibatterica dei peptidi appartenenti alla famiglia delle catelicidine fu determinata due anni dopo la loro scoperta. LL-37 ha un ampio spettro di attività antibatterica contro sia batteri Gram-negativi che Gram-positivi, inclusi ceppi multi-drug resistant o MDR [125,126].

Diversi studi hanno riportato come LL-37 agisca tramite meccanismi, usati comunemente da altre tipologie di peptidi antimicrobici.

LL-37 raggiunge la membrana esterna dei batteri, si lega parallelamente alla superficie, con gli aminoacidi carichi positivamente in contatto con le teste dei fosfolipidi. Dopo il raggiungimento di un certo grado di concentrazione, l'accumulo del peptide comincia a causare una tensione, una curvatura che viene rilasciata dalla traslocazione del peptide dalla membrana esterna nello spazio periplasmatico e a livello della membrana interna [127].

Dopo l'associazione con la membrana sono stati proposti diversi modelli di come LL-37 induce la morte batterica. In definitiva, LL-37 conduce alla distruzione dell'omeostasi della membrana batterica.

LL-37 mostra anche un'attività antifungina, causata dall'interazione con la parete cellulare, risultando nella formazione di pori e inducendo così la disintegrazione della cellula, e induzione di attività da parte dei ROS nelle cellule fungine [128].

Inoltre, gioca anche un ruolo come antivirale, inibendo i virus mediante interazione diretta con l'envelope e il capsid proteico [129].

Questo peptide ha suscitato l'interesse della comunità scientifica non solo in virtù delle sue azioni antimicrobiche, ma anche per via della sua attività nei confronti del sistema immunitario.

La pleora degli effetti esercitati da LL-37 è quantomeno affascinante.

LL-37 induce la produzione e la secrezione di citochine in diversi tipi cellulari. Nei mastociti, il peptide causa degranolazione e rilascio di istamina, ma anche il rilascio di IL-2, IL-4 e IL-6. Stimola i monociti a rilasciare IL-1  $\beta$ , una citochina infiammatoria chiave, ma anche IL-10, antiinfiammatoria [130]. I macrofagi producono e rilasciano TNF- $\alpha$ , citochina infiammatoria, dopo stimolazione da parte di LL-37.

TLRs sono recettori che rispondono a pattern molecolari associati a patogeni (PAMPs). La disregolazione del signaling di TLRs è stato riportato come elemento fondamentale nello sviluppo di malattie autoimmuni. L'attivazione dei TLRs viene modulata da LL-37 e può essere considerata come un effetto antiinfiammatorio [131].

Alte concentrazioni di LL-37 nel sito di infezione possono ridurre la possibilità di sviluppo di shock settico [132].

Inoltre, LL-37 dirige la differenziazione dei macrofagi nel fenotipo M1, suggerendo ancora una volta la sua forte influenza sullo sviluppo dei macrofagi e sulla produzione citochinica [132].

Durante un'infezione, LL-37 regola l'apoptosi della maggior parte delle cellule coinvolte. La morte delle cellule avviene mediante l'interazione di LL-37 con recettori FPR2 e P2X7; questo porta all'attivazione della via ERK1/2 che conduce alla riduzione dell'espressione della caspasi-3 e all'incremento della proteina anti apoptotica bcl-xl [112].

Una incontrollata regolazione dell'apoptosi è causa della sclerosi sistemica: è stato visto che pazienti affetti da sclerosi sistemica hanno un'aumentata espressione di LL-37, risultante in un aumento di bcl-2 e ridotta concentrazione della proteina BAX [133]. Un ruolo principale svolto da LL-37 è quello di attrarre cellule dell'immunità innata nel sito di infezione, inducendo la secrezione di IL-8 da macrofagi, fibroblasti e cellule epiteliali, che funge da chemochina per neutrofili, linfociti T e cellule dendritiche [134,135,136].

Il peptide gioca inoltre un ruolo nella riparazione delle ferite, reclutando progenitori delle cellule endoteliali nel sito di ferita, ed inducendo angiogenesi, mediante rispettivamente attivazione del pathway di EGFR e di NFkB [137,138]. È stato recentemente approvato in fase I/II di un trial clinico come trattamento per ulcere venose degli arti inferiori [139]

Nonostante sia un importante modulatore del sistema immunitario, è molto importante il mantenimento di un giusto equilibrio fra fattori pro e antiinfiammatori. La perdita di questo equilibrio conduce ad un aumentato rischio di infezioni, incapacità di riparo delle ferite o in malattie autoimmuni e infiammazione cronica.

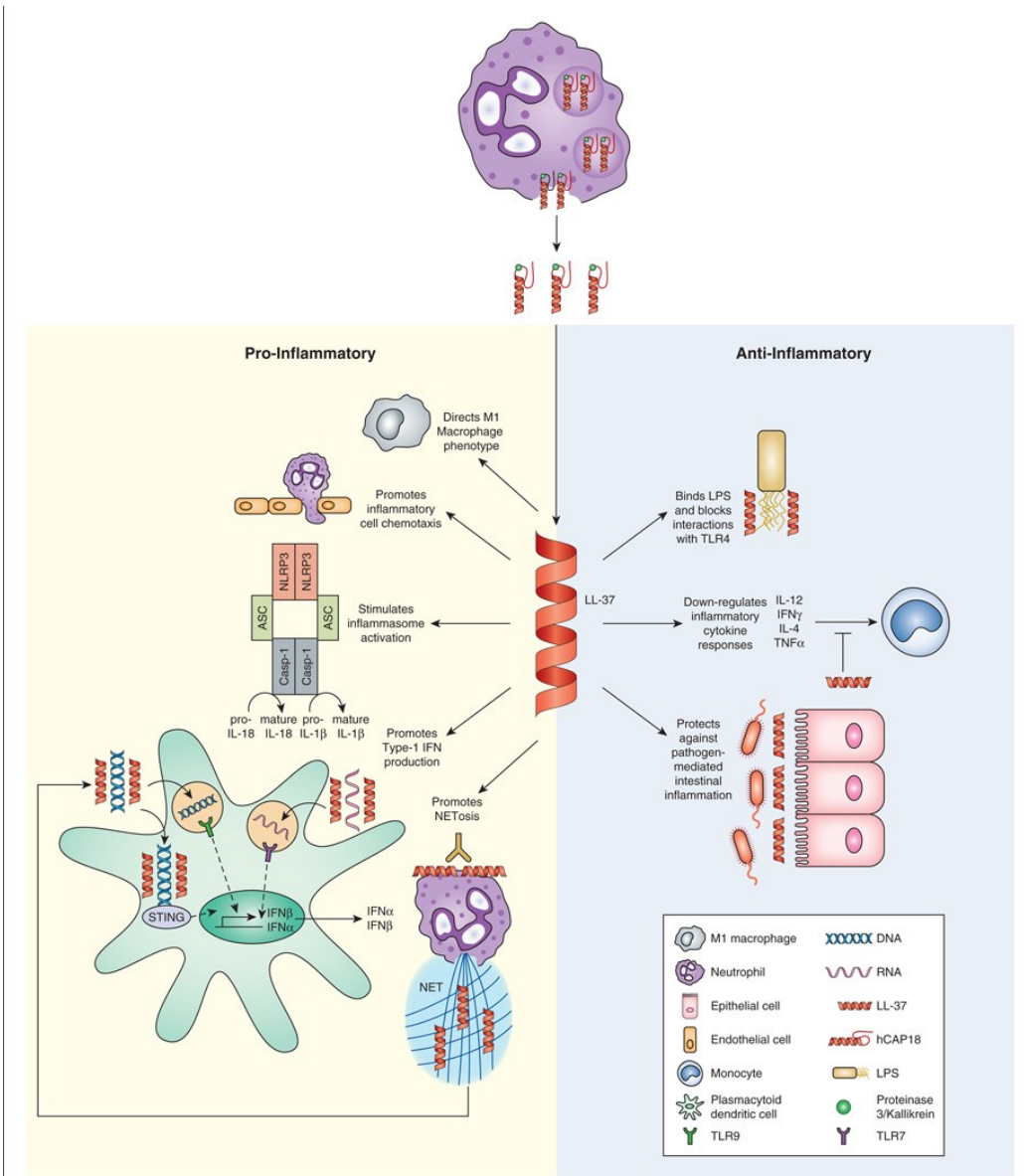


Figura 10. Rappresentazione grafica delle funzioni immunomodulanti di LL-37 [132]

## Capitolo 2

### 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 microrganismi in particolare, causano maggiore preoccupazione. Uno tra questi è *E. coli*, che oltre ad essere una causa importante di infezioni nosocomiali, si è dimostrato in grado di sviluppare velocemente resistenza verso diverse classi antibiotiche. In molti casi, l'unica opzione terapeutica disponibile al momento è la colistina, ma anche verso quest'ultima sono state documentate resistenze. La necessità di nuovi agenti terapeutici e le caratteristiche degli AMPs fanno pensare ad un loro possibile utilizzo in futuro come agenti antimicrobici.

Lo scopo di questa tesi è studiare l'attività antimicrobica di LL-37 verso ceppi di *E. coli* isolati da campioni clinici, e valutare la possibile sinergia di questo peptide antimicrobico e gli altri antibiotici, comunemente utilizzati nella pratica clinica.



## Capitolo 3

### MATERIALI E METODI

#### 1. CEPPI BATTERICI

Nel nostro studio sono stati scelti 21 ceppi di *E. coli* MDR, isolati da pazienti ricoverati presso la Clinica Malattie Infettive degli Ospedali Riuniti di Ancona in un periodo compreso tra gennaio 2019 a dicembre 2022.

L'identificazione delle specie è stata svolta tramite sistema VITEK II (bioMe 'rieux, Marcy-l'Etoile, France).

La collezione di ceppi analizzata comprende 5 ceppi che esprimono geni di resistenza a *last resort antibiotics* (carbapenemici e colistina) (2 ceppi KPC+, 1 ceppo mcr+, 1 ceppo Oxa48 +, 1 ceppo NDM +).

Come ceppo di controllo è stato utilizzato *E. coli* ATCC 25922.

Nelle prove checkerboard sono stati utilizzati i seguenti ceppi: ATCC 25922, 410480, 410271, 401201, 411781, DH5alfa mcr1.2, DH5alfa, 431751 oxa48, 416408 KPC, 463054 NDM.

#### 2. LL-37 e ANTIBIOTICI

LL-37 è stato fornito dalla Facoltà di Farmacia dell'Università medica di Gdansk (Polonia). La soluzione madre è stata preparata in acqua, diluita a 10.000 µg/mL, ed in seguito mantenuta ad una temperatura di 4°C.

Gli antibiotici utilizzati, da soli o in combinazione con LL-37, sono stati: Colistina, Tigeciclina, Rifampicina, Meropenem, Levofloxacin, Ceftobiprolo, Amikacina, Ceftozolano/tazobactam, Ceftazidime/avibactam.

#### 3. DETERMINAZIONE DELLA SENSIBILITA' (MIC)

La sensibilità dei ceppi agli antibiotici è stata valutata mediante la determinazione delle MIC eseguendo il test delle microdiluizioni in brodo. La procedura utilizzata è quella indicata dal Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).

Dopo aver versato sterilmente del brodo cation-adjusted Mueller Hinton (MH II, Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italia) in una piastra Petri sterile, utilizzando la pipetta multicanale sono stati prelevati 50 µL di brodo MH II e sono stati inoculati in tutti i pozzetti di una piastra microtitre da 96 pozzetti con fondo a U, ad eccezione della prima colonna.

È stata preparata una soluzione dell'antibiotico in esame ad una concentrazione doppia rispetto a quella più elevata che si vuole 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) tenendo conto della relazione:  $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \rightarrow V_1$  (volume da prelevare in ml) = conc.finale (µg/ml) \* volume finale (ml) / conc.soluzione madre (µg/ml).

Sono stati prelevati 50 µL della soluzione di antibiotico con la micropipetta e sono stati aggiunti nella prima e nella seconda colonna, dove in quest'ultima erano già presenti 50 µL di brodo MH II. In questo modo è stata eseguita una diluizione 1:2 dell'antibiotico/peptide 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/peptide. 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  $5 \times 10^5$  CFU/ml: per raggiungere questo valore la brodocoltura è stata diluita ed è stata determinata la densità ottica a 625 nm ( $OD_{625}$ ), tenendo presente la relazione: un valore di  $OD_{625}$  di 0,100 corrisponde a  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Una volta impostato il "bianco" misurando l'assorbanza del brodo MH II da solo, sono state misurate tutte le altre brodoculture: se l'assorbanza del campione superava 0,120, 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  $5 \times 10^5$  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/peptide alla quale non si osservava crescita visibile, quindi torbidità.

#### 4. CHECKERBOARD TITRATION

Il metodo “checkerboard titration” viene usato per determinare l’impatto della combinazione di due antibiotici comparato alla loro attività individuale. Questo confronto è rappresentato dall’indice di concentrazione di inibizione frazionaria (FICI). Dopo aver versato sterilmente del brodo MH II in una piastra Petri sterile, utilizzando la pipetta multicanale sono stati prelevati 50 µL di brodo MH II e sono stati inoculati in tutti i pozzetti di una piastra microtitre in polipropilene da 96 pozzetti. Sono state preparate due diluizioni del primo antibiotico, una a 8x la concentrazione massima e una 4x la concentrazione massima tenendo sempre conto della relazione:  $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2 \rightarrow V1$  (volume da prelevare in ml) =  $\text{conc. finale } (\mu\text{g/ml}) \cdot \text{volume finale (ml)} / \text{conc. soluzione madre } (\mu\text{g/ml})$ . Sono stati prelevati 50 µL del primo antibiotico concentrato 8x e sono stati inseriti nell’ultimo pozzetto della prima riga mentre in ognuno dei restanti pozzetti della prima riga sono stati aggiunti 50 µL di antibiotico concentrato 4x. Con la pipetta multicanale abbiamo fatto la diluizione scalare lungo le righe partendo dalla prima riga fino alla penultima riga della piastra, escludendo in questo modo l’ultima. Per il secondo antibiotico, è stata preparata una sola diluizione, 4x la concentrazione massima da saggiare. Sono stati aggiunti 50 µL della diluizione così ottenuta del secondo antibiotico nell’ultima colonna della piastra, e con la pipetta multicanale è stata fatta la diluizione scalare del secondo antibiotico lungo le colonne, eccetto la prima colonna. In questo modo in ogni pozzetto è presente una combinazione di concentrazioni differenti di antibiotici. Infine, sono stati distribuiti in tutti i pozzetti 50 µL di inoculo batterico standardizzato ad una concentrazione di

$1 \times 10^6$  CFU/ml. Dopo aver riempito tutti i pozzetti, la piastra è stata infine incubata a  $37^\circ\text{C}$  per circa 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).

Il valore FICI viene usato per classificare l'interazione dei due antibiotici testati.

Tipo di interazione	FICI
Sinergia	$\leq 0.5$
Antagonismo	$> 4$
Indifferenza	0.5-4

**Sinergia:** per essere sinergica, la combinazione dei due antibiotici aumenta l'attività inibitoria e ciò si deve tradurre nella riduzione della MIC di almeno due volte di entrambi i composti in esame;

**Antagonismo:** la combinazione dei due antibiotici aumenta la MIC e quindi si riduce l'attività inibitoria dei due composti;

**Indifferenza:** la combinazione dei due antibiotici non determina nessun effetto additivo rispetto all'utilizzo dei due farmaci singolarmente.

## 5. TEST TIME-KILL

Il test di time-kill è stato utilizzato per valutare l'attività antimicrobica in vitro di LL-37 in relazione al tempo. Nello studio sono state utilizzate tre concentrazioni di LL-37 corrispondenti a 1X, 2X e 4X della MIC. Brodocolture di ceppi in esame (in questo caso *E. coli* ATCC25922) sono state diluite in MH II ad una concentrazione finale di  $1 \times 10^7$  UFC/ml e inserite a contatto con LL-37 in un volume finale di 5 ml. Le provette sono state incubate a  $37^\circ\text{C}$  e ad intervalli di tempo regolari di 30 minuti, un'ora, due ore,

quattro ore e otto ore, sono stati prelevati 10  $\mu$ L di brodocoltura che sono stati diluiti in fattori di 1:10 e inoculati su piastre di Mueller Hinton Agar. Per valutare l'attività antimicrobica è stato preso in considerazione il numero di UFC/ml.

Il test di time-kill è stato utilizzato anche per confermare le relazioni sinergiche identificate tramite checkerboard tra antibiotico e peptide. La procedura utilizzata è identica a quella descritta precedentemente con l'eccezione dei composti utilizzati. In questo caso il ceppo *E. coli* ATCC25922 è stato inoculato in provette contenenti l'antibiotico, il peptide LL-37 e la combinazione dei due a concentrazione equivalente a 1X MIC.

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.

## Capitolo 4

### RISULTATI

La MIC di LL-37 per i ceppi di *E. coli* studiati risulta compresa tra 16 e 128 mg/L.

MIC<sub>50</sub> e MIC<sub>90</sub> erano, rispettivamente, di 32 mg/L e di 128 mg/L.

Ceppo	MIC (mg/L)
ATCC 25922	32
401201 KPC	32
409689	16
409980	32
410106	>128
410281	64
410937	32
411125	128
411781	128
411885	32
412435	32
431751 oxa48	32
416408 KPC	64
463054 NDM	32
423066	32
423278	32
424890	32
424198	16
425160	64

Tabella 1. MICs dei ceppi di *E. coli* testati per LL-37

Gli studi sulla sinergia tra LL-37 e altri antibiotici hanno avuto risultati differenti. Prendendo come riferimento il ceppo ATCC 25922, quando combinato con la colistina, LL-37 si è dimostrato sinergico con una FICI di 0,0925 (tabella 2).

	C+	0.007	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
64												
32												
16												
8												
4												
2												
1												
C+												

Tabella 2. Checkerboard LL-37+ Colistina *E. coli* ATCC 25922. Migliore combinazione Colistina, 0,015 mg/L – LL-3, 4 mg/L; FICI 0,0925

La combinazione con altri antibiotici si è dimostrata invece indifferente con FICI comprese tra 0.530 e 1.125 e in nessun caso si è evidenziato antagonismo (tabella 3).

Combinazione di antibiotici	FICI
LL-37/RIF	1
LL-37/MEM	1
LL-37/LEV	1,125
LL-37/CFB	0,750
LL-37/AMK	0,530
LL-37/CZT	1
LL-37/CTA	1
LL-37/TGC	1

Tabella 3. FICI delle combinazioni di LL-37 con gli antibiotici testati. RIF: Rifampicina; MEM: Meropenem; LEV: Levofloxacin; CFB: Ceftobiprololo; AMK: Amikacina; CZT: Ceftozolano/Tazobactam; CTA: Ceftazidime/Azobactam; TGC: Tigeciclina.

Prendendo in considerazione anche altri ceppi di *E. coli* abbiamo notato che LL-37 quando combinato con la colistina, mostrava sinergia anche in tutti gli altri ceppi

esaminati (410480, 401201, 411781, *E. coli* DH5alfa mcr1.2, *E. coli* DH5alfa, 431751 oxa48, 416408 KPC, 463054 NDM).

	C+	0.007	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
64												
32												
16												
8												
4												
2												
1												
C+												

Tabella 4. Checkerboard LL-37 + Colistina *E. coli* 410480. Migliore combinazione Colistina, 0,015 mg/L – LL-37, 16 mg/L; FICI 0,310

	C+	0.007	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
64												
32												
16												
8												
4												
2												
1												
C+												

Tabella 5. Checkerboard LL-37 + Colistina *E. coli* 401201. Migliore combinazione Colistina, 0,03 mg/L – LL-37, 16 mg/L; FICI 0,280

	C+	0.007	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
64												
32												
16												
8												
4												
2												
1												
C+												

Tabella 6. Checkerboard LL-37 + Colistina *E. coli* 411781. Migliore combinazione Colistina, 0,015 mg/L – LL-37, 4; FICI 0,500



	C+	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
32												
16												
8												
4												
2												
1												
0.5												
C+												

Tabella 7. Checkerboard LL-37 + Colistina *E. coli* DH5 $\alpha$  mcr1.2. Migliore combinazione Colistina, 0,25 mg/L – LL-37, 8 mg/L; FICI 0,312

	C+	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8
32												
16												
8												
4												
2												
1												
0.5												
C+												

Tabella 8. Checkerboard LL-37 + Colistina *E. coli* DH5 $\alpha$ . Migliore combinazione Colistina, 0,008 mg/L – LL-3,7 2 mg/L; FICI 0,066

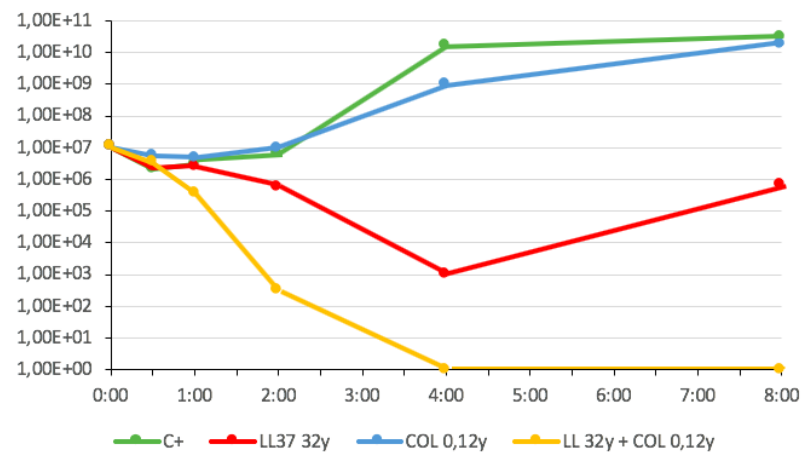
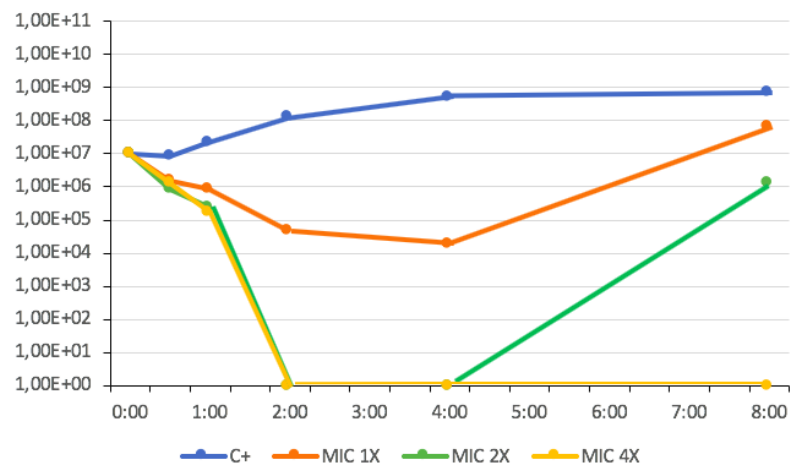


Figura 11. Curve di time-kill di LL-37 verso *E. coli* ATCC 25922

Nei test di time-kill, il trattamento di *E. coli* ATCC 25922 con concentrazioni di LL-37 quattro volte la MIC ha determinato un azzeramento delle UFC vitali dopo 120 minuti di esposizione. L'esposizione ad una concentrazione di LL-37 pari alla MIC per 120 minuti riduce il numero di CFU a  $10^5$ - $10^4$ , non portando ad una completa eliminazione della crescita batterica (Figura 11).

Si rileva inoltre che quando combiniamo LL-37 con la colistina si evidenzia un azzeramento delle UFC dopo quattro ore di esposizione mentre l'uso singolo dell'antibiotico e del peptide non conduce a completa eliminazione della crescita batterica (Figura 11).

## Capitolo 5

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La prima catelicidina, scoperta nei granulociti di coniglio, come precursore proteico da 18kDa, era in grado di legarsi al LPS batterico. Questa proprietà ha favorito ulteriori ricerche, attribuendo al tratto C-terminale la capacità di LPS-binding. Nel 1995, la catelicidina umana è stata identificata e nominata hCAP18 [117]. Le catelicidine sono sintetizzate e immagazzinate come pro-forma inattiva nei granuli perossidasi-negativi dei neutrofili. Solo dopo clivaggio proteolitico della pro-proteina, viene rilasciata la forma attiva, che è un peptide lineare che assume una conformazione ad  $\alpha$ -elica. Il tratto C-terminale contiene a sua volta un peptide di 37 amminoacidi dotato di un ampio spettro di attività antibatteriche [112,117]. In seguito, questo peptide fu chiamato LL-37 dal momento che gli amminoacidi iniziali erano due leucine.

La scoperta di LL-37 segnò l'inizio di più di una decade di ricerche su questa entusiasmante famiglia di peptidi antimicrobici.

Agendo sia su Gram-negativi che Gram-positivi, questi peptidi fungono da modello per lo sviluppo di nuove molecole antibiotiche, soprattutto alla luce delle recenti evidenze che sempre più batteri stanno diventando resistenti agli antibiotici, usati nella pratica clinica. L'attività antibatterica di LL-37 è stata già evidenziata in diversi lavori [140,141,142,160].

Oltre alla capacità di legare ed inattivare l'endotossina batterica rappresentata dal LPS, LL-37 esercita la sua azione antimicrobica tramite meccanismi aspecifici di legame alla membrana batterica. L'attività antibatterica deriva dalla sua struttura secondaria.

Cambiamenti nella carica, elicità e idrofobicità hanno un grosso impatto sull'attività di LL-37 e di altri peptidi antimicrobici cationici.

In questo studio LL-37 ha dimostrato una buona attività contro i ceppi clinici di *E. coli*. L'attività contro *E. coli* era già nota ed evidenziata in lavori precedenti [142].

I nostri risultati hanno evidenziato una MIC<sub>50</sub> di 32 mg/L e una MIC<sub>90</sub> di 128 mg/L di LL-37 nei confronti di *E. coli*; differenti peptidi sono stati testati nei confronti di questo patogeno. Ad esempio, Capparelli et al. hanno evidenziato una MIC della temporina A

nei confronti di *E. coli* di 125 mg/L [143] mentre Rodziewicz-Motowidlo et al. hanno evidenziato una MIC di quattro peptidi differenti (PG-1, IB-367, BM-1, BM-2) rispettivamente di 8, 16, 32 e 256 mg/L [144]. I valori di MICs da noi determinati confermano la buona attività antimicrobica di LL-37 che è comparabile a quella di altri peptidi antimicrobici.

La particolarità dei risultati ottenuti è dovuta al particolare pattern di resistenti *E. coli* testati. Infatti, quasi tutti i ceppi testati si dimostravano ESBL +. I ceppi ESBL destano motivo di preoccupazione in quanto resistenti ai più comuni antibiotici utilizzati ed ampiamente diffusi in ambiente ospedaliero. In Italia, la % di *E. coli* resistenti alla terza generazione di cefalosporine raggiunge il 29,8% [145].

Molto interessante è la persistenza dell'attività di LL-37 anche nei confronti del ceppo *E. coli* che esprime il gene *mcr1*. Il gene *mcr1* codifica per una fosfoetanolamminotransferasi che media il cambiamento di polarità del lipide A del LPS batterico [76].

È stato ipotizzato che, data la natura cationica dei peptidi, il loro meccanismo d'azione potrebbe essere sovrapponibile a quello mediato dalla colistina, la cui struttura è formata da un decapeptide ciclico. In realtà, i nostri dati confermano che i bersagli di colistina e LL-37 sono differenti, come già evidenziato in lavori precedenti [146].

Questo risultato non correla con precedenti osservazioni ottenute con specie *A. baumannii* [147], dal momento che i meccanismi di resistenza alla colistina coinvolti sono differenti fra le due specie.

Hashemi et al. hanno studiato l'attività di LL-37 nei confronti di ceppi colistino-resistenti di *K. pneumoniae* evidenziando che l'efficacia del peptide si mantiene anche nei confronti di ceppi colistino-resistenti [148].

Pur se l'attività antibiotica di diverse molecole è sufficiente nell'eradicare le infezioni batteriche, negli ultimi anni le terapie di combinazione hanno acquisito maggiore considerazione. Le terapie di combinazione sono in grado di ridurre le dosi dei singoli antibiotici (e quindi ridurre gli effetti collaterali legati alla somministrazione) ma al contempo di aumentare l'efficacia della terapia se la combinazione ha relazione di tipo sinergico.

In letteratura non vi sono studi che indagano le combinazioni di LL-37 con altri antibiotici nei confronti di *E. coli*. Sono presenti lavori che hanno documentato

l'attività sinergica di LL-37 con la teicoplanina e la vancomicina nei confronti di *S. aureus* [141,149].

In quest'ottica abbiamo testato la combinazione di LL-37 con diversi antibiotici comuni nella pratica clinica. Nessuna delle combinazioni testate è risultata antagonistica mentre si è evidenziata una relazione di tipo sinergico combinando LL-37 con la colistina. Questo risultato è stato confermato dalla metodica checkerboard, dalla curva di crescita time-kill e dal mantenimento della sinergia anche nei confronti del ceppo mcr+.

La colistina è un vecchio antibiotico che recentemente a causa dell'aumentato numero di resistenze, è tornato disponibile in pratica clinica. Noti i suoi effetti collaterali, la colistina viene sempre accostata ad altri antibiotici sia per ridurre la tossicità che per aumentarne l'efficacia terapeutica. Proprio per questo, in letteratura, sono noti diversi esempi di utilizzo della colistina in combinazione con altri antibiotici.

È nota la relazione sinergica della colistina con diversi tipi di molecole antibiotiche. Ad esempio, sono state descritte combinazioni sinergiche nei confronti di *A. baumannii* di colistina con rifampicina e carbapenemici [150], colistina con meropenem [151], colistina con vancomicina [152]. Anche con i farmaci di ultima generazione, come l'eravaciclina, la colistina mostra un rapporto di tipo sinergico [153].

La capacità della colistina di sinergizzare con diversi antibiotici viene mantenuta anche nei confronti dei peptidi. Diversi autori hanno dimostrato sinergia combinando la colistina con IB-367 [154], con Pexiganan [155], con la mellitina [156] e con PG-1 [157]. Oltre all'emergenza dell'antibiotico resistenza, il biofilm rappresenta una sfida estremamente complicata nel trattamento delle infezioni batteriche. Circa un 65-80% delle infezioni cliniche è associata alla formazione di biofilm. Ad oggi, non sono disponibili antibiotici con i quali è possibile trattare questo tipo di strutture. Recenti sviluppi hanno evidenziato che alcuni tipi di peptidi possono inibire lo sviluppo del biofilm e perfino uccidere le specie batteriche inglobate nel biofilm [158,161]. Dati gli eccellenti risultati ottenuti con LL-37 negli esperimenti precedenti, il prossimo passo dovrebbe essere la valutazione della capacità anti-biofilm di LL-37, allargando lo studio non solo agli *E. coli* produttori di biofilm ma anche verso altre specie.

Alcuni dei lavori che dimostrano la sinergia tra peptidi ed antibiotici validano i risultati ottenuti attraverso la sperimentazione in vivo [154,155,159,162]. Per confermare

pienamente i risultati ottenuti da questo studio la sperimentazione animale rappresenta un passaggio obbligato e il primo step per una futura sperimentazione clinica.

In definitiva, gli AMPs, ed in particolare LL-37, rappresentano una nuova classe di molecole molto promettenti che potrebbero rappresentare una nuova opportunità terapeutica dal momento che la diffusione dell'antibiotico-resistenza è diventata una sfida mondiale con un impatto elevato sulla salute pubblica che richiede al più presto strategie di successo.

## Capitolo 6

### BIBLIOGRAFIA

- 1 Francesca Prestinaci, Patrizio Pezzotti e Annalisa Pantosti (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*. 109 (7): 309-318
- 2 Mark Laws et al (2019). Antibiotic resistance breakers: current approaches and future direction. *FEMS Microbiology Reviews*. 1-27
- 3 Jim O'Neill et al (2014). Review on Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations.
- 4 Rice LB (2008) Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis*; 197:1079–81
- 5 Christian G.Giske et al (2008). Clinical and economic impact of common multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52 (3): 813-21.
- 6 Thomson JM et al (2005). The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria *Curr Opin Microbiology*. 8 (5): 518-24.
- 7 World Health Organization (2014). *Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance*. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
- 8 David Paterson (2006). Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *American Journal of Medicine*. 119: 20-28
- 9 Steven L. Percival, David W. Williams (2014). *Escherichia coli*. *Microbiology of Waterborne Diseases (second edition)*. 89-117
- 10 [www.microbiologiaitalia.it](http://www.microbiologiaitalia.it) Immagini *Escherichia coli* al microscopio elettronico
- 11 John Coia, Heather Cubia (1995). *Escherichia coli*. The immunoassay Kit Directory, vol 2/1/3 757-761.
- 12 Guiral E, Bosch J, Vila J et al (2011). Prevalence of *Escherichia coli* among samples collected from the genital tract in pregnant and non-pregnant women: relationship with virulence. *FEMS Microbiol Lett*; 314:170–3
- 13 J.Jang et al (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications: a review. *Journal of applied microbiology*. Volum 123, issue 3



- 14 Russo TA, Johnson JR (2000). A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Di*; 181:1753–4
- 15 Herzer, P. J., S. Inouye, M. Inouye, and T. S. Whittam (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*172:6175–61
- 16 Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., et al. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity*, 67(2), 546–553.
- 17 Johnson, Kuskowski, Owens, Gajewski, and Winokur, (2003). Phylogenetic origin and virulence genotype in relation to resistance to fluoroquinolones and/or extended-spectrum cephalosporins and cephamycins among *Escherichia coli* isolates from animals and humans. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(5), 759–768.
- 18 Moreno, Prats, Sabate, Perez, Johnson, and Andreu (2006). Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(2), 204–211.
- 19 Claudio Rugarli et al. (2015). *Manuale di Medicina Interna sistematica*. Volume 2. Parte 15, Capitolo 92; pag 1929.
- 20 Petra Lüthje, Annelie Brauner (2014). Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli* and Their Interaction with the Host. *Advances in Microbial Physiology*. 337-372
- 21 Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M *et al* (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol*; 13:269–84
- 22 Jan T Poolman (2017). *Escherichia coli*. Bacterial Vaccine Discovery & Early Development. International Encyclopedica of Public health (second edition). 585-593.
- 23 Baumgart M, Dogan B, Rishniw M *et al* (2007). Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn’s disease involving the ileum. *ISME J*; 1:403–18.
- 24 Willing B, Halfvarson J, Dicksved J *et al* (2009). Twin studies reveal imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn’s disease. *In amm Bowel Dis* ;15:653–60.
- 25 Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, Busquets D *et a* (2014)l. Mucosa- associated *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli* co- abundance can distinguish Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes. *Int J Med Microbiol* ;304:464–75.

- 26 Mylonaki M, Rayment NB, Rampton DS *et al* (2005). Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* ;11: 481–7.
- 27 Schippa S, Conte MP, Borrelli O *et al* (2009). Dominant genotypes in mucosa-associated *Escherichia coli* strains from pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* ;15:661–72.
- 28 Vejborg R, Hancock V, Petersen A *et al* (2011). Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from patients with inflammatory bowel disease. *BMC Genomics* ;12:316.
- 29 Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P *et al* (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* ;127: 412–21
- 30 Bonacorsi S, Bingen E (2005). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. *Int J Med Microbiol*; 295:373–81.
- 31 Unhanand M, Mustafa MM, McCracken GH, Jr *et al* (1993). Gram-negative enteric bacillary meningitis: a twenty-one-year experience. *J Pediatr*; 122:15–21.
- 32 Okikel O, Johnson AP, Henderson KL *et al* (2014). Incidence, etiology, and outcome of bacterial meningitis in infants aged <90 days in the United Kingdom and Republic of Ireland: prospective, enhanced, national population-based surveillance. *Clin Infect Dis* ;59: e150–7.
- 33 Dellagrammaticas HD, Christodoulou C, Megaloyanni E *et al* (2000). Treatment of gram-negative bacterial meningitis in term neonates with third generation cephalosporins plus amikacin. *Biol Neonate*; 77:139–46.
- 34 Kim KS (2012). Current concepts on the pathogenesis of *Escherichia coli* meningitis: implications for therapy and prevention. *Curr Opin Infect Dis*; 25:273–8.
- 35 Achtman M, Mercer A, Kusecek B *et al* (1983). Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infect Immun*; 39:315–35.
- 36 Moulin-Schouleur M, Schouler C, Tailliez P *et al* (2006). Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *J Clin Microbiol*; 44:3484–92.
- 37 Xie Y, Kim KJ, Kim KS (2004). Current concepts on *Escherichia coli* K1 translocation of the blood-brain barrier. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 42:271–9
- 38 Stoll BJ, Hansen NI, Sanchez PJ *et al* (2011). Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues. *Pediatrics*; 127:817–26.

- 39 Romero R, Roslansky P, Oyarzun E et al (1988). Labor and infection. II. Bacterial endotoxin in amniotic fluid and its relationship to the onset of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*; 158: 1044–9
- 40 Soto SM, Bosch J, Jimenez de Anta MT et al (2008). Comparative study of virulence traits of *Escherichia coli* clinical isolates causing early and late neonatal sepsis. *J Clin Microbiol*; 46:1123–5
- 41 J. Vila et al (2016) *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*. 437-463
- 42 Laurent Poirel et al (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *American Society for Microbiology Press*.
- 43 Vila J, Ruiz J, Marco F et al (1994). Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and minimal inhibitory concentration. *Antimicrob Agents Ch*; 38:2477–9
- 44 Ruiz J, Casellas S, Jimenez de Anta MT et al (1997). The region of the *parE* gene, homologous to the quinolone-resistant determining region of the *gyrB* gene, is not linked with the acquisition of quinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *J Antimicrob Chemoth* ;39:839–40.
- 45 Vila J, Fabrega A, Roca I et al (2011). Efflux pumps as an important mechanisms of quinolone resistance. *Adv Enz Rel Areas Mol Biol*; 77:165–233
- 46 Fabrega A, Madurga S, Giralt E et al (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol*; 2:40–61.
- 47 Cuzon G, Naas T, Guibert M et al (2010). *In vivo* selection of imipenem- resistant *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and plasmid-encoded DHA-1 cephalosporinase. *Int J Antimicrob Ag*; 35:265–8
- 48 Nordmann P, Naas T, Poirel L (2011). Global spread of carbapenemase- producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* ;17: 1791–8
- 49 Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE et al (2014). Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in-fectious. *Emerg Infect Dis*; 20:1170–5
- 50 Rodriguez-Bano J, Pascual A (2008). Clinical significance of extended- spectrum beta-lactamases. *Expert Rev Anti Infect Ther*; 6:671–83.
- 51 Vardakas KZ, Tansarli GS, Rafailidis PI et al (2012). Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ - lactamases: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemoth*; 67:2793–803

52 Wu UI, Chen WC, Yang CS *et al* (2012). Ertapenem in the treatment of bacteremia caused by extended-spectrum beta-lactamase- producing *Escherichia coli*: a propensity score analysis. *Int J Infect Dis*; 16: 47–52

53 Lopez-Cerero L, Picon E, Morillo C *et al* (2010). Comparative assessment of inoculum effects on the antimicrobial activity of amoxicillin-clavulanate and piperacillin- tazobactam with extended-spectrum beta-lactamase- producing and extended-spectrum beta-lactamase-non- producing *Escherichia coli* isolates. *Clin Microbiol Infec* ;16: 132–6.

54 Docobo-Perez F, Lopez-Cerero L, Lopez-Rojas R *et al* (2013). Inoculum effect on the efficacies of amoxicillin-clavulanate, piperacillin- tazobactam, and imipenem against extended-spectrum  $\beta$  -lactamase (ESBL)-producing and non-ESBL-producing *Escherichia coli* in an experimental murine sepsis model. *Antimicrob Agents Ch*; 57:2109–13.

55 Balakrishnan I, Awad-El-Kariem FM, Kumari P *et al* (2011). Temocillin use in England: clinical and microbiological efficacies in infections caused by extended-spectrum and/or derepressed AmpC  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemoth*; 66:2628–31.

56 Leclercq R, Cantó n R, Brown DF *et al* (2013). EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infec*; 19:141–60.

57 Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M *et al* (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*; 25:682–707.

58 Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE (1977). Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu Rev Biochem*; 46:723–63.

59 Matthew E. Falagas and Sofia K. Kasiakou (2005). Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*; 40:1333–41.

60 Katz E, Demain AL (1977). The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol Rev*; 41:449–74

61 Barnett M, Bushby SR, Wilkinson S (1964). Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. *Br J Pharmacol*; 23:552–74.

62 Beveridge EG, Martin AJ (1967). Sodium sulphomethyl derivatives of polymyxins. *Br J Pharmacol*; 29:125–35.

63 Gales AC, Reis AO, Jones RN (2001). Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. *J Clin Microbiol* ; 39:183–90

- 64 Hogardt M, Schmoldt S, Gotzfried M, Adler K, Heesemann J (2004). Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother* ; 54:1057–61.
- 65 Rastogi N, Potar MC, David HL (1986). Antimycobacterial spectrum of colistin (polymyxin E). *Ann Inst Pasteur Microbiol*; 137A:45–53.
- 66 Rastogi N, Potar MC, Henrotte JG, Franck G, David HL (1988). Further studies on colistin (polymyxin E)–induced cell leakage in mycobacteria: Mg<sup>++</sup> efflux in *Mycobacterium avium* and its effects on drug-susceptibility. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg*; 268:251–8.
- 67 Catchpole CR, Andrews JM, Brenwald N, Wise R (1997). A reassessment of the in-vitro activity of colistin sulphomethate sodium. *J Antimicrob Chemother*; 39:255–60.
- 68 Chris Whitfield, Stephen Trent (2014). Biosynthesis and Export of Bacterial Lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochemistry*. Vol 83:99-128.
- 69 Davis SD, Iannetta A, Wedgwood RJ (1971). Activity of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*: inhibition by calcium. *J Infect Dis*; 124:610–2.
- 70 Schindler M, Osborn MJ (1979). Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide. *Biochemistry*; 18:4425–30.
- 71 L. Annunziato, G.E. Di Renzo (2016). Trattato di Farmacologia. Seconda edizione. Idelson Gnocchi.
- 72 Moore RA, Chan L, Hancock RE (1984). Evidence for two distinct mechanisms of resistance to polymyxin B in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; 26:539–45.
- 73 Denton M, Kerr K, Mooney L, et al (2002). Transmission of colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* between patients attending a pediatric cystic fibrosis center. *Pediatr Pulmonol*; 34:257–61.
- 74 Gunn JS, Lim KB, Krueger J, et al (1998). PmrA-PmrB–regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol Microbiol*; 27:1171–82
- 75 Ito-Kagawa M, Koyama Y (1980). Selective cleavage of a peptide antibiotic, colistin by colistinase. *J Antibiot (Tokyo)*; 33:1551–5.
- 76 Liu, Yang Wang, Prof Timothy R Walsh et al (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet infectious Disease*.

- 77 Kasiakou SK, Rafailidis PI, Liaropoulos K, Falagas ME. Cure of post-traumatic recurrent multiresistant gram-negative rod meningitis with intraventricular colistin. *J Infect* (in press).
- 78 Michalopoulos A, Kasiakou SK, Mastora Z, Rellos K, Kapaskelis AM, Falagas ME (2005). Aerosolized colistin for the treatment of nosocomial pneumonia due to multidrug-resistant gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. *Crit Care*.
- 79 McMillan FH, Pattison IC (1969). Sodium colistimethate. I. Dissociations of aminomethanesulfonates in aqueous solution. *J Pharm Sci*; 58: 730–7.
- 80 Reed MD, Stern RC, O’Riordan MA, Blumer JL (2001). The pharmacokinetics of colistin in patients with cystic fibrosis. *J Clin Pharmacol*; 41: 645–54
- 81 Bosso JA, Liptak CA, Seilheimer DK, Harrison GM (1991). Toxicity of colistin in cystic fibrosis patients. *DICP*; 25:1168–70
- 82 Koch-Weser J, Sidel VW, Federman EB, Kanarek P, Finer DC, Eaton AE (1970). Adverse effects of sodium colistimethate: manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Ann Intern Med*; 72:857–68.
- 83 Cunningham S, Prasad A, Collyer L, Carr S, Lynn IB, Wallis C (2001). Bronchoconstriction following nebulised colistin in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*; 84:432–3.
- 84 Conway SP, Pond MN, Watson A, Etherington C, Robey HL, Goldman MH (1997). Intravenous colistin sulphomethate in acute respiratory exacerbations in adult patients with cystic fibrosis. *Thorax*; 52:987–93.
- 85 Tascini C, Ferranti S, Messina F, Menichetti F (2000). In vitro and in vivo synergistic activity of colistin, rifampin, and amikacin against a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate. *Clin Microbiol Infect*; 6:690–1.
- 86 Giamarellos-Bourboulis EJ, Karnesis L, Giamarellou H (2002). Synergy of colistin with rifampin and trimethoprim/sulfamethoxazole on multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 44:259–63.
- 87 Margit Mahlapuu, Joakim Håkansson, Lovisa Ringstad and Camilla Björn (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in cellular and infections microbiology*; 6:194.
- 88 Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. *Garland Science*.
- 89 Wakabayashi, Hiratani, Uchida, Yamaguchi (1996). Antifungal spectrum and fungicidal mechanism of an N-terminal peptide of bovine lactoferrin. *J. Infect. Chemother*. 1:185–189

- 90 Mygind, Fischer, Schnorr, Hansen, Sonksen, *et al* (2005). Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*. 437: 975–980.
- 91 Boman (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 61–92
- 92 Hancock R. E., and Chapple, D. S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1317–1323.
- 93 Bals R. (2000). Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir. Res.* 1: 141–150.
- 94 Hancock, R. E. W., and Diamond, G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 8: 402–410.
- 95 Lai Y., and Gallo R. L. (2009). AMPs end up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30: 131–141.
- 96 Yeaman M. R., and Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55: 27–55.
- 97 Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., and Malmsten, M. (2012). Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32: 143–171.
- 98 Takahashi, D., Shukla, S. K., Prakash, O., and Zhang, G. (2010). Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity. *Biochimic* 92: 1236–1241.
- 99 Powers, J. P., and Hancock, R. E. (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24: 1681–1691.
- 100 Hancock, R. E., and Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24: 1551–1557.
- 101 Jenssen, H., Hamill, P., and Hancock, R. E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19: 491–511.
- 102 Ebenhan, T., Gheysens, O., Kruger, H. G., Zeevaart, J. R., and Sathekge, M. M. (2014). Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. *BioMed Res. Int.*
- 103 Epand R. M., and Vogel, H. J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 11–28.
- 104 Marsh, E. N., Buer, B. C., and Ramamoorthy, A. (2009). Fluorine – a new element in the design of membrane-active peptides. *Mol. Biosyst.* 5: 1143–1147.

- 105 Zhang, L., Dhillon, P., Yan, H., Farmer, S., and Hancock, R. E. W. (2000). Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3317–3321.
- 106 Kosikowska, P., and Lesner, A. (2016). Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003-2015). *Expert Opin. Ther. Pat.* 26: 689–702.
- 107 Håversen, L., Ohlsson, B. G., Hahn-Zoric, M., Hanson, L. Å., and Mattsby-Baltzer, I. (2002). Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF- $\kappa$ B. *Cell. Immunol.* 220: 83–95.
- 108 Lamb, H. M., and Wiseman, L. R. (1998). Pexiganan acetate. *Drugs* 56: 1047–1052.
- 109 Lipsky, B. A., Holroyd, K. J., 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.
- 110 Nilsson, A. C., Janson, H., Wold, H., Fugelli, A., Andersson, K., Håkangård, C., 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.
- 111 Velden, W. J., van Iersel, T. M., Blijlevens, N. M., and Donnelly, J. P. (2009). Safety and tolerability of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11). *BMC Med.* 7:44.
- 112 Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L (2012). A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol*; 280(1):22-35.
- 113 M. Chromek, Z. Slamova, P. Bergman, L. Kovacs, L. Podracka, I. Ehren, T. Hokfelt, G.H. Gudmundsson, R.L. Gallo, B. Agerberth, A. Brauner (2006). The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat. Med.* 636–641.
- 114 M.D. Howell, A. Wollenberg, R.L. Gallo, M. Flaig, J.E. Streib, C. Wong, T. Pavicic, M. Boguniewicz, D.Y. Leung (2006). Cathelicidin deficiency predisposes to eczema herpeticum. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117: 836–841.
- 115 Morioka Y, Yamasaki K, Leung D, Gallo R.L (2008). Cathelicidin antimicrobial peptides inhibit hyaluronan-induced cytokine release and modulate chronic allergic dermatitis. *J. Immunol.* 181: 3915–3922.
- 116 Doring, Drechsler, Wantha, Kemmerich, Lievens, Vijayan, Gallo, Weber, Soehnlein (2012). Lack of neutrophil-derived CRAMP reduces atherosclerosis in mice. *Circ. Res.* 110: 1052–1056.



- 117 Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC (1995). Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun.* Apr; 63(4):1291-7.
- 118 Sørensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, Borregaard N (2015). Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood.* 2001; 97(12):3951-9.
- 119 Yamasaki K, Schaubert J, Coda A, Lin H, Dorschner RA, Schechter NM, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Gallo RL (2006). Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB*; 20(12):2068-80.
- 120 Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y (1999). Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J.*
- 121 Bucki R, Janmey PA (2006). Interaction of the gelsolin-derived antibacterial PBP 10 peptide with lipid bilayers and cell membranes. *Antimicrob Agents Chemother.*; 50(9):2932-40.
- 122 Lee CC, Sun Y, Qian S, Huang HW (2011). Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide LL-37. *Biophys J.*; 100(7):1688-96.
- 123 Allen Doploutier, Monique van Hoek (2013). The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potential treatment for polymicrobial infected wounds. *Frontiers in Immunology.*
- 124 Sigurdardottir, A.M. Guzman, G.H. Gudmundsson, H. Valdimarsson, A. Johnston (2012). The anti-microbial peptide LL-37 modulates immune responses in the palatine tonsils where it is exclusively expressed by neutrophils and a subset of dendritic cells. *Clin. Immunol.* 142: 139– 149.
- 125 Saiman, L., Tabibi, S., Starner, T. D., San Gabriel, P., Winokur, P. L., Jia, H. P., et al. (2001). Cathelicidin peptides inhibit multiply antibiotic-resistant pathogens from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2838–2844.
- 126 Zaiou, M., Nizet, V., and Gallo, R. L. (2003). Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J. Invest. Dermatol.* 120, 810–816.
- 127 J. Krahulec, M. Hyrsova, S. Pepeliaev, J. Jilkova, Z. Cerny, J. Machalkova (2010). High level expression and purification of antimicrobial human cathelicidin LL-37 in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88: 167–175.
- 128 J.H. Wong, T.B. Ng, A. Legowska, K. Rolka, M. Hui, C.H. Cho (2011). Antifungal action of human cathelicidin fragment (LL13-37) on *Candida albicans*. *Peptides.* 1996–2002.

- 129 P.G. Barlow, P. Svoboda, A. Mackellar, A.A. Nash, I.A. York, J. Pohl, D.J. Davidson, R.O. Donis (2011). Antiviral activity and increased host defense against influenza infection elicited by the human cathelicidin LL-37. *Plos One* 6.
- 130 Yu J, Mookherjee N, Wee K, Bowdish DM, Pistolic J, Li Y, Rehaume L, Hancock RE (2007). Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways. *J Immunol.* 179(11):7684-91.
- 131 Lee YH, Lee HS, Choi SJ, Ji JD, Song GG (2012). Associations between TLR polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol.* 30(2):262-5.
- 132 Kahlenberg M, Kaplan M (2013). Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease. *Journal of Immunology.*
- 133 H.J. Kim, D.H. Cho, K.J. Lee, C.S. Cho, S.I. Bang, B.K. Cho, H.J. Park (2011). LL-37 suppresses sodium nitroprusside-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Exp. Dermatol.* 20 :843–845.
- 134 G.S. Tjabringa, J. Aarbiou, D.K. Ninaber et al (2003). The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J. Immunol.* 171 6690–6696.
- 135 D.M. Bowdish, D.J. Davidson, D.P. Speert, R.E. Hancock (2004). The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *J. Immunol.* 172: 3758–3765.
- 136 W.K. Wu, C.C. Wong, Z.J. Li, L. Zhang, S.X. Ren, C.H. Cho (2010). Cathelicidins in inflammation and tissue repair: potential therapeutic applications for gastrointestinal disorders. *Acta Pharmacol. Sin.* 31 1118–1122.
- 137 L. Tomasinsig, C. Pizzirani, B. Skerlavaj, P. Pellegatti, S. Gulinelli, A. Tossi, V.F. Di, M. Zanetti (2008). The human cathelicidin LL-37 modulates the activities of the P2X7 receptor in a structure-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 283:30471–30481.
- 138 A. Pfosser, M. Dietz, F. Globisch, G. Stachel, et al. (2010). NF-kB activation in embryonic endothelial progenitor cells enhances neovascularization via PSGL-1 mediated recruitment: novel role for LL-37. *Stem Cells* 28: 376–385.
- 139 Gronberg, A., Zettergren, L., and Agren, M. S. (2011). Stability of the cathelicidin peptide LL-37 in a non-healing wound environment. *Acta Derm. Venereol.* 91: 511–515.
- 140 Garcia-Quintanilla, Marina R. Pulido, Patricia Moreno-Martínez, et al. (2014). Activity of Host Antimicrobials against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Acquiring Colistin Resistance through Loss of Lipopolysaccharide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*

141 Koppen, Mulder, de Boer L, Riool M et al. (2018). Synergistic microbicidal effect of cationic antimicrobial peptides and teicoplanin against planktonic and biofilm-encased *Staphylococcus aureus*. *Int Journal Antimicrobial Agents*. 53 (2): 143:151.

142 Aghazadeh, Memariani H, Ranjbar R et al (2019). The activity and action mechanism of novel short selective LL-37-derived anticancer peptides against clinical isolates of *Escherichia coli*. *Chem Biol Drug Dise*. 93 (1): 75-83.

143 Capparelli R, Romanelli A, Iannaccone M, Nocerino N, Ripa R, Pensato S, et al. (2009). *Synergistic Antibacterial and Anti-Inflammatory Activity of Temporin A and Modified Temporin B In Vivo*. PLoS ONE.

144 Rodziewicz-Motowidlo, Mickiewicz, Greber, Sikorska et al (2010). Antimicrobial and conformational studies of the active and inactive analogues of the protegrin-1 peptide. *FEBS J*.

145 Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network EARS-Net 2016

146 Dobias J, Poirel L, Nordmann P.(2017). Cross-resistance to human cationic antimicrobial peptides and to polymyxins mediated by the plasmid-encoded MCR-1? *Clin Microbiol Infect*.

147 Napier BA, Burd EM, Satola SW, Cagle SM et al. (2013). Clinical use of colistin induces cross-resistance to host antimicrobials in *Acinetobacter baumannii*. *Mbio*.

148 Hashemi MM, Rovig J, Weber S, Hilton B, Forouzan MM, Savage PB (2017). Susceptibility of Colistin-Resistant, Gram-Negative Bacteria to Antimicrobial Peptides and Ceragenins. *Antimicrob Agents Chemother*. 25;61 (8)

149 Shurko, Galega, Lee (2018). Evaluation of LL-37 antimicrobial peptide derivatives alone and in combination with vancomycin against *S. aureus*. *Journal of Antibiotics*. 71(11);971-974.

150 Yu Jin Park M.D., Duck Jin Hong, M.D., Eun-Jeong Yoon, Ph.D (2018). Differences in Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Between Patients with and without Prior Colistin Treatment. *Ann Lab Med*.

151 Alex van Belkum, Diane Halimi, Eve-Julie Bonetti, Gesuele Renzi et al (2014). Meropenem/colistin synergy testing for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains by a two-dimensional gradient technique applicable in routine microbiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Pag 167-172.

152 Claeys, Anna D.Fiorvento, Michael J.Rybak. (2014). A Review of Novel Combinations of Colistin and Lipopeptide or Glycopeptide Antibiotics for the Treatment of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Infectious Diseases and Therapy*. Pp 69-81.

- 153 Ozger, Cuhadar, Yildiz et al (2019). In vitro activity of eravacycline in combination with colistin against carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates. *The Journal of Antibiotics*. 600-604.
- 154 Simonetti O, Cirioni O, Ghiselli R, Silvestri R, Mazzocato S, Kamysz W, Provinciali M, Giacometti A, Guerrieri M, Offidani A (2014). In vitro activity and in vivo animal model efficacy of IB-367 alone and in combination with imipenem and colistin against Gram-negative bacteria. *Scientific IRCSS Network*.
- 155 Cirioni O, Simonetti O, Pierpaoli E, Barucca A, Ghiselli R, Orlando F, Pelloni M, Minardi D, Trombettoni MM, Guerrieri M, Offidani A, Giacometti A, Provinciali M.(2016). Enhanced Efficacy of Combinations of Pexiganan with Colistin Versus *Acinetobacter Baumannii* in Experimental Sepsis. *Wolters Kluwers*.
- 156 Bardbari M, Arabestani M et al. (2018). Highly synergistic activity of melittin with imipenem and colistin in biofilm inhibition against multidrug-resistant strong biofilm producer strains of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*.
- 157 Morroni G, Simonetti O, Brenciani A, Brescini L, Caffarini M, Orciani M, Offidani A, Giacometti A, Cirioni O (2019). In vitro activity of Protegrin-1, alone and in combination with clinically useful antibiotics, against *Acinetobacter baumannii* strains isolated from surgical wounds. *Medical Microbiology and Immunology*.
- 158 Pletzer D, Coleman SR, Hancock RE. (2016). Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr Opin Microbiol*. 33; 35-40.
- 159 Ghiselli R, Giacometti A, Cirioni O, Moccheggiani F et al (2009). Potential Therapeutic Role of Cationic Peptides in Three Experimental Models of Septic Shock. *American Society of Microbiology*.
- 160 Zarei-Mehrvarz E, Fahimirad S, Ghaznavi-Rad E, Abbasian SS, Abtahi H. The LL-37 antimicrobial peptide as a treatment for systematic infection of *Acinetobacter baumannii* in a mouse model. *Protein Pept Lett*. 2022 Sep 29. doi: 10.2174/0929866529666220929160704. Epub ahead of print. PMID: 36177621.
- 161 Alba MLS, Durán-Rodríguez AT, Pulido LMS, Escobar-Pérez J, Gutiérrez SA, Ospina JN, Bermúdez GP, Molina LCM. Peptides DLL37-1 and LL37-1, an alternative to inhibit biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *An Acad Bras Cienc*. 2022 Nov 4;94(3):e20210848. doi: 10.1590/0001-3765202220210848. PMID: 36350889.
- 162 Xu Y, Wang Q, Dong M, Song H, Hang B, Sun Y, Zhang H, Hu J. Evaluation of the efficacy of the antimicrobial peptide HJH-3 in chickens infected with *Salmonella Pullorum*. *Front Microbiol*. 2023 Jan 24;14:1102789. doi: 10.3389/fmicb.2023.1102789. PMID: 36760504; PMCID: PMC9904387.

