



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

XXX CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA RIPRODUZIONE E DELLO SVILUPPO

Attività dei peptidi antimicrobici Bac7(1-35) e BMAP-27 nei confronti di microrganismi Gram-negativi

Settore scientifico-disciplinare: **MED/07**

DOTTORANDA

ANNALISA MILAN

COORDINATORE

PROF. PAOLO GASPARINI

SUPERVISORE DI TESI

PROF.SSA LUCILLA DOLZANI

CO-SUPERVISORE DI TESI

PROF.SSA CRISTINA LAGATOLLA

ANNO ACCADEMICO 2016/2017

Indice

1. Introduzione	5
1.1 La resistenza batterica agli antibiotici	5
1.2 Il biofilm batterico	7
1.2.1 Le resistenze nel biofilm batterico	9
1.2.2 Le strategie anti biofilm	12
1.3 I peptidi antimicrobici	13
1.3.1 Classificazione e meccanismo d'azione degli AMPs	14
1.3.2 Il peptide proline-rich Bac7(1-35)	18
1.3.3 Il peptide BMAP-27	19
1.4 Specie batteriche oggetto dello studio	20
1.4.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	22
1.4.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
1.4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
1.5 La fibrosi cistica	24
1.6 Le infezioni polmonari nei soggetti FC	26
1.7 I fattori di virulenza e l'adattamento nelle infezioni croniche	29
1.7.1 I fattori di virulenza di <i>P. aeruginosa</i> nelle infezioni croniche	29
1.7.2 Le infezioni croniche	30
2. Scopo della tesi	34
3. Materiali e Metodi	35
3.1 Raccolta degli isolati e loro conservazione	35
3.2 Genotipizzazione mediante PFGE	38
3.3 Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA)	39
3.4 Multilocus sequence typing (MLST)	40
3.5 Valutazione della suscettibilità <i>in vitro</i>	40
3.5.1 Valutazione della minima concentrazione inibente (MIC)	41
3.5.2 Valutazione della biofilm inhibitory concentration (BIC)	41
3.6 Valutazione della sinergia <i>checkboard assay</i>	42
3.7 Cinetica di crescita	43
3.8 Quantificazione della produzione di biofilm	43
3.9 Inibizione della formazione di biofilm	44
3.10 Microscopia confocale	44
3.11 Internalizzazione del peptide	45
3.12 Integrità della membrana cellulare	46
3.13 Inibizione della motilità	46
3.14 <i>Elastin congo red assay</i>	47
3.15 Soluzioni e terreni	48
4. Risultati: <i>A. baumannii</i>	50
4.1 Individuazione di un cluster epidemico di <i>A. baumannii</i> in un ospedale triestino e caratterizzazione del ceppo responsabile	50

4.1.1	Identificazione del cluster epidemico mediante analisi di macrorestrizione	50
4.1.2	Caratterizzazione del ceppo epidemico	52
4.1.3	Correlazione con CRAB raccolti nei 5 anni precedenti l'epidemia	53
4.1.4	Discussione	54
4.2	Attività del peptide Bac7(1-35) nei confronti di <i>A. baumannii</i>	56
4.2.1	Attività antibatterica di Bac7(1-35)	57
4.2.2	Inibizione della formazione del biofilm	60
4.3	Effetto del peptide Bac7(1-35) sulla motilità di <i>A. baumannii</i>	64
4.4	Internalizzazione del peptide Bac7(1-35) nelle cellule di <i>A. baumannii</i>	67
4.5	Discussione	68
5.	Risultati: <i>Klebsiella pneumoniae</i>	72
5.1	Attività dei peptidi Bac7(1-35) e BMAP-27 su <i>K. pneumoniae</i>	72
5.1.1	Caratteristiche dei ceppi batterici utilizzati	72
5.1.2	Analisi delle MIC e delle cinetiche di crescita	73
5.1.3	Internalizzazione del peptide Bac7(1-35)	74
5.1.4	Effetto litico del peptide BMAP-27	75
5.1.5	Effetto dei peptidi sulla formazione del biofilm di KpTs101	76
5.2	Valutazione dell'effetto protettivo della crescita in biofilm e del ruolo svolto dalla matrice	77
5.2.1	Effetto dei peptidi sul biofilm preformato: valutazione delle BIC e dell'effetto dei polisaccaridi capsulari	77
5.2.2	Effetto dei peptidi sul biofilm preformato: microscopia confocale	78
5.3	Discussione	79
6.	Risultati: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	82
6.1	Tipizzazione degli isolati	83
6.2	Suscettibilità degli isolati ad antibiotici, peptidi antimicrobici e sostanze naturali	85
6.3	Valutazione dell'effetto sinergico	88
6.4	Inibizione della formazione del biofilm	89
6.5	Inibizione della produzione dell'elastasi	91
6.6	Discussione	92
7.	Conclusioni	95
8.	Bibliografia	98
9.	Ringraziamenti	113

1. Introduzione

1.1 Le resistenze batteriche agli antibiotici

L'era moderna degli antibiotici ebbe inizio nel 1928 quando Sir Alexander Fleming osservò per la prima volta l'inibizione della crescita batterica causata dalla muffa *Penicillium notatum* che contaminava una piastra di coltura. Lo stesso Fleming però notò poco dopo la potenziale resistenza alla sostanza stessa, chiamata penicillina, qualora usata in quantità troppo basse o per periodi troppo brevi (Zaman et al. 2017). L'antibiotico venne prescritto per il trattamento delle infezioni per la prima volta nel 1940. Da quel momento l'utilizzo delle molecole antibiotiche ha salvato milioni di vite e trasformato la medicina moderna; hanno trattato o evitato infezioni in pazienti immunodeficitari, con malattie croniche, renali o post-intervento chirurgico. Ad oggi, però, la resistenza agli antibiotici si è sviluppata sfortunatamente per quasi tutte le classi di antibiotici prodotte negli ultimi settant'anni (Ventola 2015) (Fig. 1).

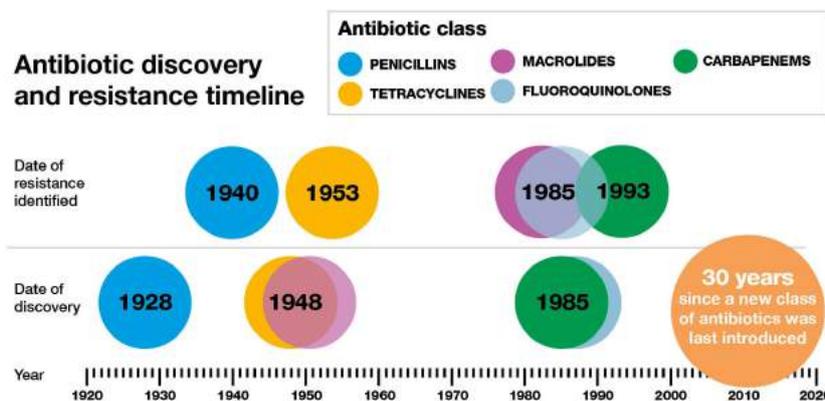


Fig. 1. Linea temporale della scoperta delle maggiori classi di antibiotici e conseguente comparsa di microrganismi resistenti (<https://publichealthmatters.blog.gov.uk>).

Le resistenze batteriche alle molecole antimicrobiche possono essere intrinseche quando un microrganismo è naturalmente insensibile ad un determinato

antibiotico, acquisite attraverso il trasferimento di elementi genici (ad esempio plasmidi e trasposoni) o a seguito di mutazioni che comportano la modifica o la sostituzione del bersaglio, e infine adattative quando condizioni ambientali stressanti inducono un momentaneo cambiamento nell'espressione genica.

Numerosi studi hanno dimostrato una minore fitness dei batteri resistenti in ambienti privi di antibiotici rispetto alle controparti sensibili. Nonostante questo non giustifichi completamente la persistenza dei batteri insensibili, si può affermare che spesso la diffusione e il mantenimento delle resistenze sono legati alla selezione operata dall'esposizione agli antibiotici stessi. Sulla diffusione pesano quindi anche i comportamenti errati dell'uomo quali:

- L'**abuso** della sostanza; studi epidemiologici hanno dimostrato la correlazione tra il forte consumo di antibiotici e la diffusione dei ceppi batterici resistenti (Ventola 2015).
- Le **prescrizioni incorrette**; come riportato in un documento del 2013 dal Centers for Disease Control and Prevention (CDC) il 30-50% delle prescrizioni mediche negli USA riportavano la scelta del farmaco o la durata del trattamento sbagliate (<https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>).
- L'**utilizzo esteso nell'agricoltura e nell'allevamento**, dove gli antibiotici vengono somministrati al bestiame per promuoverne la crescita e prevenire le infezioni e successivamente introdotti nell'uomo mediante l'ingestione della carne dell'animale.

L'uso scorretto ed esteso degli antibiotici convenzionali ha ridotto la loro efficacia verso la maggior parte dei patogeni. A questo si aggiunge la **scarsa disponibilità sul mercato di molecole nuove** da oltre trent'anni, in quanto questo settore non è più considerato un investimento vantaggioso per le industrie farmaceutiche. L'insorgenza di ceppi "multidrug-resistant" (MDR), "extensively drug-resistant" (XDR) e "pan-drug-resistant" (PDR) ha indotto gli esperti a definire questo particolare momento come l'inizio dell'era post-antibiotica, nella quale di-

verse infezioni risultano oramai intrattabili (Ruiz *et al.* 2017). Tra i diversi patogeni, il cosiddetto gruppo “ESKAPE”, acronimo delle specie *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Enterobacter* spp., desta particolare preoccupazione in tutto il mondo, soprattutto a livello ospedaliero, dove sono sempre più frequenti le epidemie causate da questi germi.

È opinione diffusa nella comunità scientifica che lo studio di strategie alternative all'uso degli antibiotici convenzionali sia un'importante via di uscita da questa pericolosa situazione instauratasi. Tra le più accreditate troviamo l'impiego dei batteriofagi nelle terapie fagiche, utilizzati per la loro elevata specificità, lo sviluppo di nuovi vaccini contro *P. aeruginosa* (Westritschnig *et al.* 2014) e *A. baumannii* (Garcia-Quintanilla, Pulido, and McConnell 2013) e l'utilizzo di strategie di inibizione dei fattori di virulenza batterici. Diverse molecole prodotte per bloccare la produzione o la secrezione delle tossine hanno già raggiunto la fase 3 dei trials clinici (Ruiz *et al.* 2017); altre ancora oggetto di studi preclinici hanno nel mirino la comunicazione cellulare (Quorum-Sensing, QS), la produzione del biofilm batterico o la disgregazione del biofilm già formato.

Principale argomento della mia tesi sarà proprio lo studio dell'interazione di molecole dell'immunità innata, i peptidi antimicrobici (AMPs), con i biofilms prodotti dalle specie *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*.

1.2 Il biofilm batterico

Alla fine degli anni '70 il microbiologo statunitense Bill Costerton notò che le infezioni croniche, sviluppatasi nei pazienti portatori di dispositivi medici impiantabili, erano causate da batteri che crescevano su questi impianti racchiusi in una matrice autoprodotta. Costerton osservò che questa modalità di crescita batterica era ampiamente diffusa anche in natura e nel 1978 introdusse formalmente il termine “biofilm” (Costerton, Geesey, and Cheng 1978).

Il biofilm è un aggregato di microorganismi associati ad una superficie e racchiusi in una sostanza polimerica extracellulare (EPS) prodotta dai batteri stessi, che conferisce loro protezione dall'ambiente esterno e dagli agenti antimicrobici. I batteri racchiusi nel biofilm presentano una maggiore resistenza sia alle sostanze antimicrobiche, chimiche e naturali, sia ai batteriofagi. L'EPS è composta da polisaccaridi, proteine e DNA extracellulare (eDNA) e rappresenta più dell'80% della struttura complessiva del biofilm; al suo interno numerosi canali permettono il passaggio e lo scambio di acqua, aria e nutrienti (Tab. 1).

Tabella 1: composizione di un biofilm generico in percentuale (Jamal et al. 2015)

Composizione in % del biofilm	
Sostanze	%
Acqua	> 97
Cellule batteriche	2-5 (più specie)
Polisaccaridi	1-2 (neutri o polianionici)
Proteine	< 1-2 (compresi gli enzimi)
DNA e RNA	< 1-2

La formazione del biofilm è un procedimento complesso e dinamico caratterizzato da diverse fasi (Fig. 2):

- L'adesione dei batteri planctonici alla superficie;
- La colonizzazione;
- La produzione di esopolimeri e la formazione del biofilm maturo;
- Il rilascio dei batteri dal biofilm.

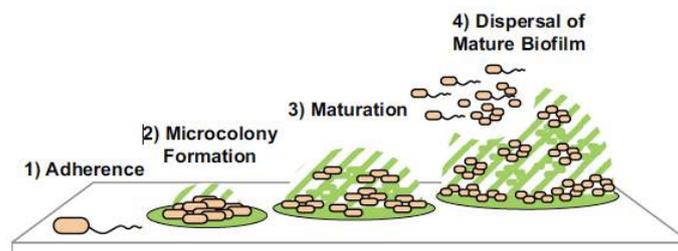


Fig. 2. Rappresentazione schematica delle fasi dello sviluppo del biofilm batterico (Taylor, Yeung, and Hancock 2014).

L'iniziale adesione e l'attacco reversibile alla superficie sono fenomeni controllati da segnali e caratteristiche ambientali, quali l'osmolarità, il pH, la temperatura e la disponibilità di nutrienti, ossigeno e ferro (Davey and O'toole 2000); le fasi successive sono invece regolate dal QS.

I vantaggi dei batteri nello scegliere uno stile di vita sessile sono molteplici. Il biofilm, in particolar modo la matrice polisaccaridica, protegge dall'ambiente esterno: può infatti fisicamente prevenire l'accesso di molecole con attività antimicrobica, ma anche sequestrare cationi, metalli e tossine. Si è visto inoltre che l'EPS è in grado di conferire protezione da diversi stress ambientali, quali le radiazioni UV, gli sbalzi del valore di pH, lo shock osmotico e l'essiccamento (Davey and O'toole 2000).

1.2.1 Le resistenze nel biofilm batterico

Caratteristica importante dei biofilm batterici è la loro resistenza alle sostanze antimicrobiche e all'azione del sistema immunitario dell'organismo ospite. Si è visto che i batteri che crescono nella forma sessile possono raggiungere livelli di resistenza alla terapia antibiotica fino a 1000 volte più alti se paragonati allo stesso microrganismo cresciuto nella forma planctonica (Davey and O'toole 2000).

La resistenza del biofilm è multifattoriale (Drenkard 2003):

- **Ridotta penetrazione delle sostanze antimicrobiche:** l'EPS ha un ruolo di barriera chimico-fisica, in grado di ridurre la penetrazione di diverse sostanze chimicamente reattive, antibiotici cationici e peptidi antimicrobici (AMPs). La limitata diffusione delle sostanze biocide può ridurre la quantità di alcuni agenti trasportati all'interno del biofilm ma non presenta un ruolo decisivo nell'esposizione di lunga durata; il limitato trasporto dipende infatti dal legame delle molecole ai siti reattivi del biofilm. Una volta che questi siti sono saturi, l'attività antimicrobica può riprendere.

- **Gradiente fisiologico all'interno del biofilm:** i batteri situati più esternamente nel biofilm hanno maggior accesso alle sostanze nutritive, all'acqua e all'ossigeno mentre quelli localizzati negli strati profondi devono adattarsi a vivere in condizioni limitanti. Questa differenza della disponibilità di nutrienti e ossigeno porta ad una diversificazione della popolazione batterica che presenta diversa attività metabolica e sensibilità agli antimicrobici. I batteri cosiddetti “*slow growing*” o in fase stazionaria risulteranno insensibili all'azione di quegli antibiotici, come i β -lattamici o le tetracicline, la cui efficacia dipende dal tasso di crescita e replicazione dei batteri.
- **Fenotipo biofilm-specifico:** in seguito all'adesione le cellule batteriche possono andar incontro a cambiamenti fisiologici, metabolici e fenotipici. Ne è un esempio *algC*, gene richiesto per la sintesi dell'alginato nel biofilm di *P. aeruginosa*, che si è visto esser up-regolato già 15 minuti dopo l'adesione superficiale. Anche la regolazione dell'espressione proteica cambia nelle cellule sessili: durante lo sviluppo del biofilm si notano modificazioni delle proteine coinvolte nella resistenza al danno ossidativo, nella produzione di esopolisaccaridi e nel metabolismo.
- **Cellule *persisters*:** diversi studi, tra i quali spicca quello di Brooun, Liu, and Lewis 2000, hanno dimostrato che aumentando anche di molto le concentrazioni di un determinato antibiotico esiste sempre una subpopolazione all'interno del biofilm, definita *persisters*, che appunto persiste all'azione biocida. Queste varianti presentano un inefficiente sistema di morte cellulare programmata (PCD), che non innesca l'apoptosi cellulare anche in seguito a danno cellulare e permette di sopravvivere anche a dosi elevate di antibiotico.
- **Pompe di efflusso:** l'aumento dell'estruzione di un antibiotico riveste un ruolo critico nella resistenza dei batteri. Le pompe di efflusso sono in grado di estrarre farmaci, ioni metallici tossici, solventi organici e altri ligandi: l'esposizione a dosi non letali di un ampio numero di antibiotici ne favorisce l'espressione.

Riassumendo, nei primi stadi dello sviluppo del biofilm si susseguono cambiamenti nell'espressione genica successivi all'adesione superficiale, che portano a fenotipo biofilm-specifico con conseguente aumento della resistenza. La successiva produzione di matrice extracellulare contribuisce alla sopravvivenza delle cellule ritardando l'entrata delle sostanze antimicrobiche. La maturazione del biofilm e l'aumento della densità cellulare creano gradienti di nutrienti e ossigeno con riduzione dell'attività metabolica e del tasso di crescita; si attivano inoltre la risposta generale allo stress e l'espressione più marcata delle pompe di efflusso. Le condizioni ambientali inducono o selezionano le varianti *persisters* resistenti alle alte concentrazioni di antibiotico (Fig. 3) (Drenkard 2003).

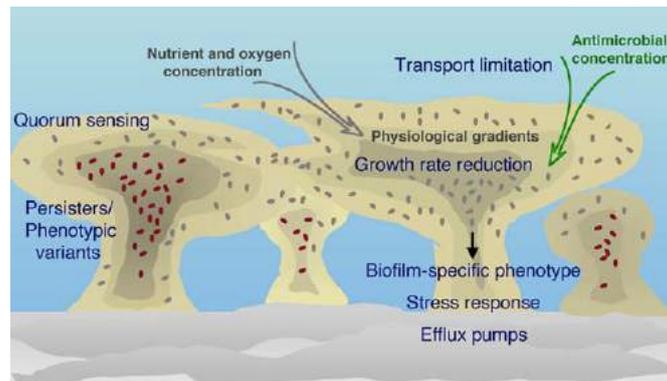


Fig. 3. Rappresentazione schematica dei meccanismi di resistenza del biofilm di *P. aeruginosa* (Drenkard 2003).

1.2.2 Le strategie anti-biofilm

Diversi sono gli approcci utilizzati per sviluppare una terapia antibiofilm efficace. Tra queste ci sono le combinazioni di antibiotici di classi differenti scelte per la sinergia dimostrata; in recenti studi è stato osservato un incremento dell'attività con il contemporaneo impiego della colistina e della tobramicina (Herrmann *et al.* 2010) come anche della tobramicina e dei macrolidi quali la claritomicina e l'azitromicina (Tré-Hardy *et al.* 2010). Mentre alcune di queste combinazioni presentano effetto sinergico agendo indistintamente su tutte le cellule del biofilm, altre devono il loro successo all'azione contemporanea su specifiche sub-popolazioni. Ne è un esempio l'associazione della ciprofloxacina, che predilige le cellule presenti esternamente nel biofilm, con la colistina, che invece penetra all'interno della struttura. È stato dimostrato che l'impiego delle due molecole contemporaneamente è di gran lunga più efficace rispetto al trattamento singolo (Herrmann *et al.* 2010).

Specifici aspetti della formazione e maturazione del biofilm possono essere l'obiettivo di nuove terapie mirate. L'inibizione dell'adesione delle cellule batteriche alla superficie mediante *coating* con particelle d'argento ha già riportato un discreto successo (Li *et al.* 2010) anche se ad oggi il miglior metodo per il trattamento delle infezioni da biofilm su dispositivi medici introdotti nel paziente rimane la loro rimozione e sostituzione. Un'altra strategia potrebbe essere la stimolazione alla dispersione delle cellule all'interno del biofilm, evitando così i meccanismi di resistenza acquisita e adattativa che le caratterizzano; ne è un esempio l'impiego dell'ossido nitrico (NO), che agisce come molecola segnale per la dispersione delle cellule, o l'introduzione nel biofilm di desossiribonucleasi (DNase), che causano la distruzione della matrice extracellulare a seguito della digestione enzimatica dell'eDNA (Allesen-Holm *et al.* 2006), (Barraud *et al.* 2009). Per prevenire il completo sviluppo del biofilm e ridurre la protezione delle cellule batteriche data dalla struttura matura è possibile agire direttamente sul QS: l'impiego degli inibitori del QS può bloccare la sintesi degli autoinduttori, ridurre la disponibilità di quelli già secreti o ancora evitarne la ricezione (Rampioni,

Leoni, and Williams 2014). Di recente interesse è anche lo sviluppo della terapia fagica come trattamento antibiofilm: i fagi, virus che infettano le cellule procariotiche ma non quelle eucariotiche, vengono utilizzati per il loro ciclo vitale che porta alla lisi cellulare del patogeno e per l'elevata specie-specificità che permette di lasciare inalterata la normale flora batterica del soggetto. I problemi che si possono riscontrare con l'uso della terapia fagica sono il possibile sviluppo di resistenze e il trasferimento di materiale genetico contenente informazioni per queste come conseguenza del meccanismo litico. Questi indesiderati effetti collaterali sono evitabili con l'impiego dei peptidi antimicrobici cationici (CAMPs), descritti in dettaglio nel capitolo successivo. Inizialmente utilizzati come antimicrobici nei confronti delle cellule planctoniche, recentemente se ne sono trovati o prodotti di sintetici che hanno attività preferenziale per le cellule all'interno del biofilm (Overhage *et al.* 2008). Overhage e colleghi per primi hanno trovato che il peptide di origine umana LL-37 è in grado di inibire la formazione del biofilm di *P. aeruginosa* e disgregare quello già formato ad una concentrazione 8 volte inferiore al suo valore di minima concentrazione inibente (MIC). Dopo questa prima osservazione, altri CAMPs hanno dimostrato di avere un'eccellente attività antibiofilm bloccandone lo sviluppo, causando la morte delle cellule all'interno o aumentandone la dispersione (Chung and Khanum 2017).

Lo sviluppo di nuove superfici trattate per ridurre al minimo l'adesione delle cellule batteriche come l'impiego di nuove sostanze con proprietà antibiofilm sono solo l'inizio per il potenziamento di nuove terapie per il trattamento delle infezioni biofilm-associate (Taylor, Yeung, and Hancock 2014).

1.3 I peptidi antimicrobici

I peptidi antimicrobici (AMPs) sono delle importantissime molecole appartenenti alla componente umorale dell'immunità innata, ampiamente diffuse tra gli organismi sia del regno animale che vegetale. Vengono definiti come polipeptidi costituiti al massimo da 100 amminoacidi, hanno carica positiva, solitamente

sono anfipatici e la maggior parte presenta come minimo il 50% dei residui amminoacidi idrofobici (Hancock and Chapple 1999). Più di 2000 AMPs sono stati ritrovati negli insetti, nei molluschi, crostacei, anfibi, pesci, uccelli, mammiferi compreso l'uomo e nei batteri e virus stessi (consultabili nel database <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Queste molecole rivestono un ruolo importante sia per la loro attività antimicrobica che per la regolazione della risposta immunitaria e la mediazione dei processi infiammatori (Bals 2000). La loro attività è specifica nei confronti delle cellule batteriche grazie alle differenze riscontrabili tra le membrane cellulari delle cellule eucariote e procariote. I batteri infatti presentano un'elevata densità di cariche negative sulla superficie cellulare, le quali invece vengono principalmente esposte verso il lato citoplasmatico nelle cellule eucariote; inoltre, il colesterolo, che stabilizza le membrane di quest'ultime, è assente nei batteri indirizzando l'azione antimicrobica di queste sostanze (Epanand Vogel 1999). Infine la compartimentalizzazione e la necessità dell'attivazione mediante taglio proteolitico limitano la tossicità verso le cellule.

1.3.1 Classificazione e meccanismo d'azione degli AMPs

I peptidi antimicrobici possono venire classificati in base a differenti caratteristiche, come la composizione amminoacidica, il meccanismo d'azione, la presenza di ponti disolfuro e la biosintesi, per citarne alcune. Inizialmente i peptidi vengono suddivisi in due grandi gruppi: i) quelli prodotti con sintesi non ribosomiale, prodotti su larga scala dai batteri e spesso fortemente modificati, e ii) quelli sintetizzati per via ribosomiale, detti anche "naturali", che sono appunto i maggiori componenti dell'immunità innata di tutte le specie, compresi i batteri (Hancock and Chapple 1999). I peptidi ribosomiali sono *gene-encoded*, ovvero un gene codifica per un peptide; nei vertebrati il prodotto di un gene codificante un AMP è un cosiddetto pre-pro-peptide, che viene conservato nei granuli delle cellule leucocitarie come precursore inattivo (Fig. 4). All'N-terminale si trova la sequenza segnale per l'indirizzamento al reticolo endoplasmatico, centralmente il segmento -pro, mentre al C-terminale il peptide cationico vero e proprio, che mo-

stra attività antimicrobica a seguito del taglio proteolitico. Il frammento centrale ha spesso carica negativa e presenta diverse funzioni biologiche, come il corretto ripiegamento del C-terminale, l'indirizzamento intracellulare o l'inibizione dell'attività del peptide maturo (Bals 2000).

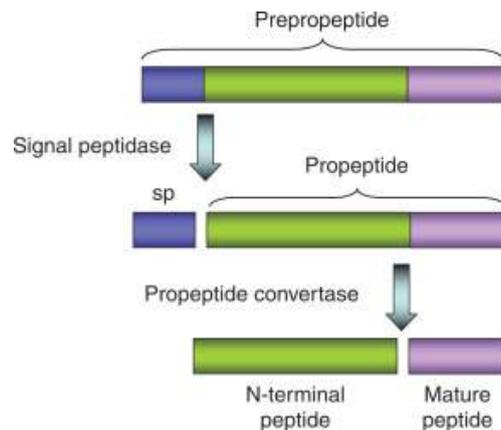


Fig. 4. Rappresentazione schematica di un pre-pro-peptide e successive modificazioni (Wu et al. 2009).

Un altro modo per classificare i peptidi tiene conto della loro struttura. Seguendo questo criterio possiamo suddividere gli AMPs ad α -elica anfipatica, conformazione adottata dopo interazione con le membrane batteriche, a β -foglietto e quelli con una conformazione estesa che presentano un'alta proporzione di specifici amminoacidi nella loro sequenza (ad esempio prolina-arginina o triptofano).

Nei mammiferi i peptidi antimicrobici sono contenuti all'interno dei granuli dei neutrofili o delle secrezioni della pelle. Quando la risposta immunitaria viene attivata, sono rilasciati al sito d'infezione in modo da contrastare l'intrusione dell'ospite indesiderato. Due sono le possibili strategie utilizzate per eliminarlo: la permeabilizzazione diretta della membrana o l'internalizzazione e l'azione su specifici meccanismi intracellulari. L'attività iniziale del peptide dipende dalla sua interazione con la membrana batterica; questo legame è soggetto a forze elettrostatiche tra le cariche positive dell'AMP e quelle negative della super-

ficie batterica. I peptidi che agiscono mediante azione litica sfruttano la loro natura anfipatica per aumentare la permeabilità della membrana. Sono stati descritti quattro meccanismi mediante i quali riescono a destabilizzare la struttura esterna (Fig. 5-A, B, C, D): A) l'“aggregato micellare”, B) il “foro toroidale” dove gli AMPs si inseriscono perpendicolarmente rispetto al doppio strato lipidico facendo ripiegare anche la membrana stessa, C) la “conformazione a botte” dove i peptidi si orientano perpendicolarmente creando dei fori e D) il “modello a tappeto” dove l'allineamento è parallelo al doppio strato lipidico rivestendo l'area di interesse.

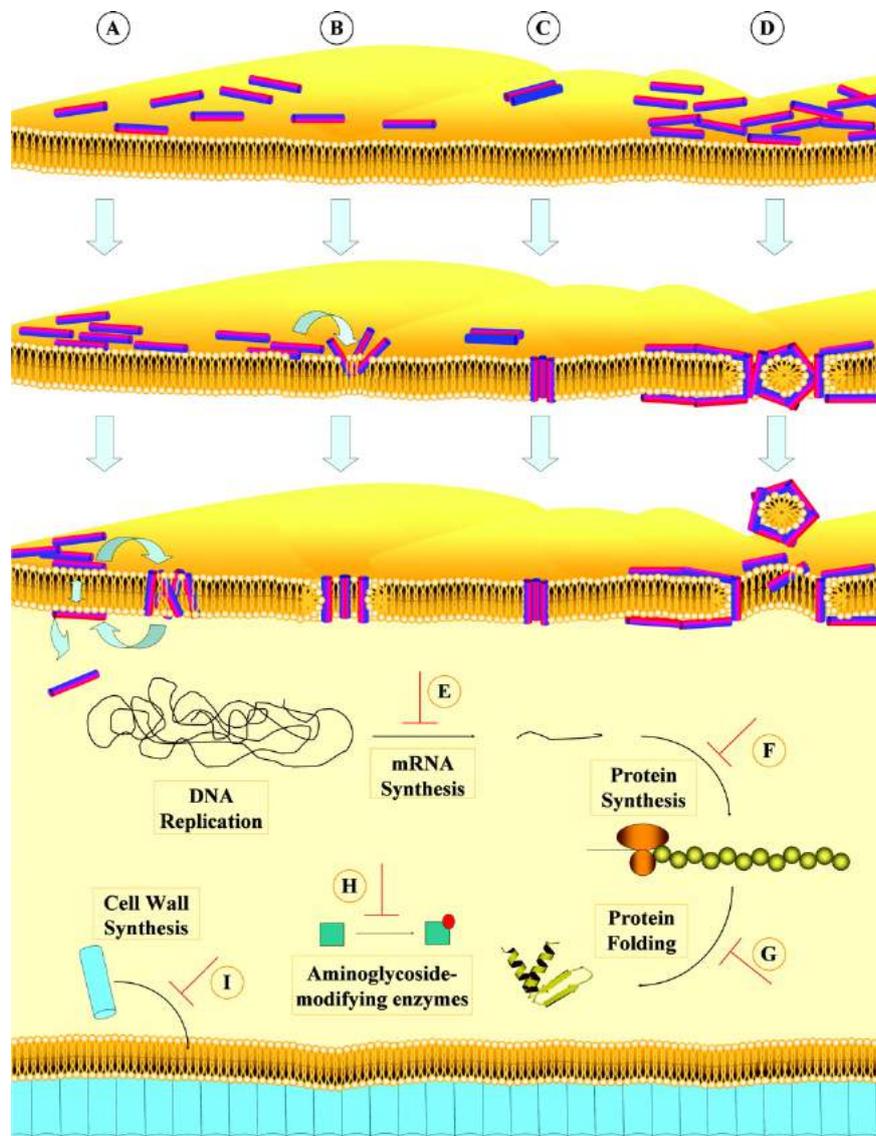


Fig. 5. I diversi meccanismi d'azione dei peptidi antimicrobici. Nella parte superiore dell'immagine modelli per descrivere la permeabilizzazione della membrana: A) "aggregati", B) "foro toroidale", C) "conformazione a botte" e D) "modello a tappeto". In basso i diversi target citoplasmatici dei peptidi che agiscono intracellularmente: E) inibizione della sintesi dell'mRNA, F) inibizione della sintesi proteica e G) del corretto ripiegamento delle proteine, H) inibizione degli enzimi coinvolti nella modificazione degli aminoglicosidi e I) inibizione della formazione di componenti strutturali della cellula.

I peptidi che invece agiscono con meccanismo non litico possono attraversare la membrana e agire a livello di specifici processi cellulari (Fig. 5-E, F, G, H, I); i targets sono l'inibizione della sintesi degli acidi nucleici, degli enzimi coinvolti nella modificazione degli aminoglicosidi e di diversi componenti strutturali della cellula come anche il blocco della sintesi e del corretto *folding* proteico. Ne è un esempio il peptide *proline-rich* Bac7, descritto nel dettaglio successivamente, che è in grado di raggiungere il citoplasma di diversi Gram-negativi con l'ausilio del trasportatore SbmA e inibirne la sintesi proteica (Runti *et al.* 2017).

1.3.2 Il peptide *proline-rich* Bac7(1-35)

I peptidi appartenenti alla famiglia dei *proline-rich* (PR-AMPs) derivano dalla proteolisi di proteine complete appartenenti alla famiglia delle catelicidine. Presentano sequenze abbastanza diverse tra un peptide e l'altro ma condividono alcune caratteristiche comuni: i) l'alto contenuto di residui di prolina, ii) la carica netta cationica data principalmente dai residui di arginina, iii) l'azione antimicrobica prevalentemente non-litica e iv) l'inefficacia di tutti i corrispondenti D-enantiomeri. I primi PR-AMPs identificati furono Bac5 e Bac7, isolati da neutrofili di origine bovina; la loro attività antimicrobica è diretta soprattutto contro batteri Gram-negativi, in particolar modo *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*. Inoltre, alcuni PR-AMPs hanno mostrato di esplicare importanti funzioni per il sistema immunitario dell'organismo ospite, come aumentare l'espressione a livello della superficie cellulare di proteoglicani nei fibroblasti, indurre la chemiotassi dei

neutrofili, promuovere l'angiogenesi e inibire l'apoptosi dei macrofagi per aumentare la biodisponibilità (Scocchi, Tossi, and Gennaro 2011).

Bac7 presenta una regione all'N-terminale fortemente cationica per la presenza di 8 arginine nei primi 16 residui, seguita da una sequenza di 14 residui ripetuti in tandem per 3 volte (Tab. 2). Nel lavoro presentato da Benincasa M. e colleghi si è trovato come, dei 60 residui amminoacidici totali, i primi 16 della regione N-terminale fossero fondamentali per l'attività antimicrobica (Tab. 2) (Benincasa *et al.* 2004). Il frammento Bac7(1-35), che comprende i primi 35 amminoacidi della sequenza completa, presenta la stessa e, a volte, anche superiore attività antibatterica del Bac7 completo (Tab. 2).

Tabella 2: sequenza amminoacidica del peptide Bac7 e dei suoi frammenti (tratto da: Benincasa *et al.* 2004).

Peptide	Sequenza
Bac7	RRIRPRPPRLPRPR (PRPLPFPRPGPRPI) ₃ PRPL
Bac7(1-16)	RRIRPRPPRLPRPR PR
Bac7(1-35)	RRIRPRPPRLPRPR (PRPLPFPRPGPRPI) ₁ PRPLPFP

Il meccanismo d'azione prevede l'internalizzazione del peptide mediante il trasportatore di membrana SbmA (Runti *et al.* 2013) o YijL (Krizsan, Knappe, and Hoffmann 2015) nella cellula procariotica, dove poi agisce inibendo la sintesi proteica a concentrazioni micromolari legandosi alla subunità 50 S del ribosoma (Fig. 6) (Mardirossian *et al.* 2014).

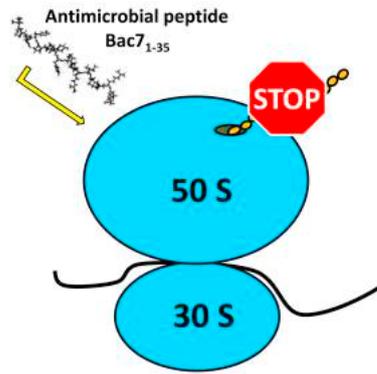


Fig. 6. Meccanismo d'azione di Bac7(1-35) con legame alla subunità 50 S del ribosoma batterico e conseguente inibizione della sintesi proteica (Mardirossian *et al.* 2014).

1.3.3 Il peptide BMAP-27

Il *Bovine Myeloid Antimicrobial Peptide of 27* (BMAP-27) è una catelicidina di origine bovina formata da 27 amminoacidi (GRFKR-FRKKFKKLFKKLSPVIPLLHL-am). Studi di dicroismo circolare (CD) hanno evidenziato il cambiamento di struttura di questo AMP lineare che, da una conformazione a spirale disorganizzata, vira ad α -elica attiva a contatto con la membrana biologica (Benincasa *et al.* 2016). BMAP-27, come il suo analogo BMAP-28, induce una rapida permeabilizzazione della membrana citoplasmatica dei batteri, a concentrazioni che solitamente si aggirano tra 0,25 μ M e 1 μ M. Oltre a questa attività *in vitro* molto potente nei confronti di batteri e funghi, si è visto che BMAP-27 possiede anche un certo livello di citotossicità per gli eritrociti e i neutrofilo umani, anche se a concentrazioni ben più alte rispetto all'attività antimicrobica, che ne sta rallentando il proseguimento degli studi nelle fasi cliniche dei trials (Skerlavaj *et al.* 1996).

Alcuni gruppi di ricerca hanno iniziato di recente a valutare il potenziale antimicrobico di diversi AMPs appartenenti della famiglia delle catelicidine nei confronti dei patogeni coinvolti nelle infezioni da FC (Zhang *et al.* 2005). Tra questi BMAP-27, BMAP-28 e il peptide artificiale P19(9/B) hanno dimostrato di possedere una rapida attività battericida e una potente attività antibiofilm nei confronti di ceppi MDR di *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. maltophilia*, anche quando

testati in condizioni chimico-fisiche paragonabili a quelle del polmone di un paziente FC, che fanno ben sperare per un loro futuro impiego come terapia per questa malattia (Pompilio *et al.* 2011).

1.4 Specie batteriche oggetto dello studio

Le specie batteriche oggetto di questo studio sono *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, che appartengono al già citato gruppo ESKAPE. Esso comprende organismi che causano infezioni nosocomiali e sono fonte di grande preoccupazione in tutto il mondo per l'elevata frequenza d'isolamento di ceppi multiresistenti.

1.4.1 *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii è un cocco-bacillo Gram-negativo, non fermentante, patogeno opportunisto dell'uomo. Esso, infatti, solo raramente causa infezioni a individui sani e in comunità, mentre è emerso negli ultimi anni come una frequente causa d'infezioni ospedaliere. Importanti caratteristiche di questo batterio sono la sua capacità di sopravvivenza anche in ambienti ostili, come le superfici asciutte dei dispositivi medici, e di sviluppare resistenze alla maggior parte (e a volte anche a tutte) le sostanze antibiotiche utilizzate in terapia. Per questo motivo spesso nelle Unità di Terapia Intensiva *A. baumannii* causa gravi problemi nei pazienti critici a seguito di procedure invasive come la ventilazione assistita o l'inserimento di cateteri. Le infezioni tra le più comuni sono quelle delle ferite aperte, del sistema circolatorio, del tratto urinario e dei polmoni.

A. baumannii è intrinsecamente resistente a diversi antibiotici di uso comune tra i quali troviamo le aminopenicilline, cefalosporine di prima e seconda

generazione e il cloramfenicolo; esso è in grado inoltre di sviluppare resistenze nei confronti delle β -lattamasi ad ampio spettro, degli aminoglicosidici, dei fluoroquinoloni, delle tetracicline e recentemente anche dei carbapenemici. Infine sono stati descritti anche ceppi di *A. baumannii* resistenti alle polimixine rendendo questo microrganismo potenzialmente refrattario a tutte le molecole antimicrobiche disponibili sul mercato (Ko *et al.* 2007).

I meccanismi di resistenza di *A. baumannii* sono diversi e includono la produzione di enzimi idrolitici, pompe di efflusso, perdita o modificazione di proteine della membrana esterna e alterazioni nelle proteine leganti la penicillina. Ciò che li rende resistenti ai farmaci carbapenemici è la produzione di β -lattamasi con attività carbapenemasica; questi enzimi vengono classificati in base al grado di omologia delle loro catene polipeptidiche. Secondo lo schema introdotto da Ambler si riconoscono 4 classi: A, C e D presentano un residuo di serina nel sito attivo (cosiddette serina- β -lattamasi) mentre la classe B richiede la presenza di zinco nel sito attivo come co-fattore (cosiddette metallo- β -lattamasi) (Ambler 1980). In *A. baumannii* le carbapenemasi acquisite più diffuse appartengono alla classe D ed includono gli enzimi OXA-23-, OXA-24- e OXA-58-like. L'enzima OXA-51, con bassa attività idrolitica nei confronti dei carbapenemi, è intrinseco della specie (Woodford *et al.* 2006)

La tipizzazione mediante diverse tecniche ha permesso di evidenziare la diversità genotipica all'interno della specie *A. baumannii*; da queste analisi quello che risulta evidente è che solo un limitato numero di cloni diffusi in tutto il mondo sono causa di epidemie ospedaliere (Diancourt *et al.* 2010). Analisi di *ribotyping* e di *fingerprinting* genomico di ceppi di *A. baumannii* provenienti da diversi ospedali europei hanno delineato inizialmente due gruppi principali, definiti Cloni europei I e II (Dijkshoorn *et al.* 1996) e successivamente un terzo gruppo, denominato Clone III (van Dessel *et al.* 2004). In seguito, è stato riconosciuto che questi gruppi sono diffusi in tutto il mondo, perciò essi sono stati rinominati Cloni Internazionali I, II e III (IC-I-III) (Diancourt *et al.* 2010). I ceppi appartenenti agli IC I-III sono tipicamente multiresistenti.

Nonostante l'importanza di *A. baumannii* come patogeno ospedaliero sia riconosciuta ormai da diversi anni, i suoi fattori di virulenza sono poco noti. Tra questi si possono ricordare la proteina della membrana esterna OmpA, che provoca apoptosi nella cellula ospite, i polisaccaridi capsulari, il lipopolisaccaride e la capacità di formare biofilm (McConnell, Actis, and Pachón 2013). Quest'ultima probabilmente gioca un ruolo importante anche in relazione alla spiccata capacità di persistere nell'ambiente ospedaliero manifestata da questi batteri. Interessante anche notare che, a dispetto del nome, *A. baumannii* esibisce diversi tipi di movimento. Questi non riguardano lo *swimming*, in quanto non sono presenti flagelli (Hartzell *et al.* 2007, Howard *et al.* 2012), ma sono piuttosto dovuti alla presenza di pili di tipo IV o ad altri meccanismi. Sono stati descritti una forma di *twitching* all'interfase, cioè tra lo strato di terreno agarizzato e il fondo della piastra Petri, e almeno due forme di movimento superficiale, definite come *sliding*, anche se non è stato possibile rilevare la presenza di surfattanti, e *ditching* (Harshey 2003). Nell'ultimo caso, l'avanzamento dei batteri è accompagnato dalla formazione di solchi nell'agar (Skiebe *et al.* 2012). Nonostante non sia stato dimostrato che la motilità sia un fattore di virulenza di *A. baumannii*, per altre specie batteriche, tra cui *P. aeruginosa*, la motilità è considerata un fattore di virulenza importante (Josenhans and Suerbaum 2002) e che richiede coordinamento tra i componenti della popolazione batterica (Alarcon, Evans, and Fleiszig 2009).

1.4.2 *Klebsiella pneumoniae*

I batteri del genere *Klebsiella* appartengono alla famiglia delle Enterobacteriaceae e sono normali costituenti della flora intestinale e delle mucose respiratorie dell'uomo. La specie più importante è *Klebsiella pneumoniae*: la sua efficiente capacità di colonizzazione unita alla continua acquisizione di determinanti di resistenza agli antibiotici ha permesso a questo microrganismo di diffondersi rapidamente negli ambienti ospedalieri (Paczosa and Meccas 2016). È un patogeno opportunisto, responsabile d'infezioni a livello polmonare, epatico, delle me-

ningi ed associate all'introduzione di dispositivi medici come il catetere, sul quale è capace di produrre biofilm.

Negli ultimi 15 anni si è assistito ad una diffusione globale di ceppi di *K. pneumoniae* MDR: in particolare in Europa si è osservato un aumento delle percentuali di questi batteri resistenti ai fluorochinoloni, agli aminoglicosidici e a quasi tutti i β -lattamici (Vuotto *et al.* 2014). Originariamente *K. pneumoniae* possiede solo poche penicillinasi genomiche, ma è in grado di collezionare plasmidi contenenti una varietà di geni che la rendono resistente a differenti classi di antibiotici. Nel 1996 è stata osservato il primo caso di *K. pneumoniae* che esprimeva una carbapenemasi: questo enzima venne definito con l'acronimo KPC, ovvero *K. pneumoniae* carbapenemasi (Yigit *et al.* 2001).

Ancora oggi le infezioni nosocomiali di *K. pneumoniae* MDR continuano ad essere un grave problema per l'aspettativa di vita dei pazienti immunodepressi e richiedono ulteriori miglioramenti nella prevenzione della diffusione a livello ospedaliero.

1.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa è un bacillo Gram-negativo non fermentante, ubiquitario, aerobio, patogeno opportunista in soggetti immunocompromessi o ospedalizzati. Proprio a livello ospedaliero questo batterio trova un habitat favorevole a causa della sua capacità di crescere nei disinfettanti, rubinetti e dispositivi medici, provocando la formazione di serbatoi d'infezione; il 18-20% delle infezioni polmonari nosocomiali sono dovute a questo patogeno (Rada 2017). Il suo genoma molto esteso (6.3 Mb) gli permette di adattarsi molto rapidamente alle condizioni ambientali e di produrre una vasta gamma di fattori di virulenza che favoriscono la colonizzazione dell'ospite.

Tra le malattie o condizioni che maggiormente favoriscono lo sviluppo di infezioni da *P. aeruginosa* si possono ricordare le ustioni e la fibrosi cistica.

In particolare, nei pazienti con FC, le infezioni da *P. aeruginosa* costituiscono un'importante causa di deterioramento delle funzioni polmonari e di morte.

L'attenzione di questo studio è focalizzata su ceppi di *P. aeruginosa* provenienti da questi pazienti: di seguito verranno quindi illustrate alcune caratteristiche della FC e delle infezioni ad essa correlate.

1.5 La fibrosi cistica

La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica di tipo autosomico recessivo molto diffusa tra la popolazione caucasica; l'epidemiologia riporta un'incidenza media di 1:2500 nati vivi in Italia. È causata dalle mutazioni che coinvolgono il gene *cftr* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), localizzato nella regione 31.2 del braccio lungo del cromosoma 7. Questo gene codifica una glicoproteina costituita da 1480 amminoacidi, importante per il trasporto dello ione cloruro (Fig. 7).

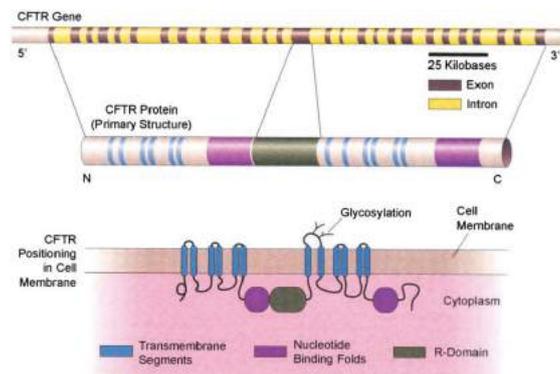


Fig. 7. Struttura del gene *cftr* e del canale ionico codificato (Gibson, Burns, and Ramsey 2003).

Dalla sua identificazione nel 1989 sono state ritrovate più di 1500 mutazioni che interessano questo gene, la maggior parte delle quali causano sostituzioni amminoacidiche, *frame-shift* e mutazioni *nonsense* (Gibson, Burns, and Ramsey 2003). Tra queste la più comune tra la popolazione caucasica è una delezione in posizione 508 che porta all'introduzione di un'isoleucina alternativa e alla perdita di una fenilalanina ($\Delta F508$).

Il tipo di mutazione conduce la proteina CFTR verso destini diversi: si va dall'assenza di espressione, a prematura degradazione come nel caso della $\Delta F508$

ma anche a ridotta attività o minor numero di canali funzionanti correttamente (Fig. 8).

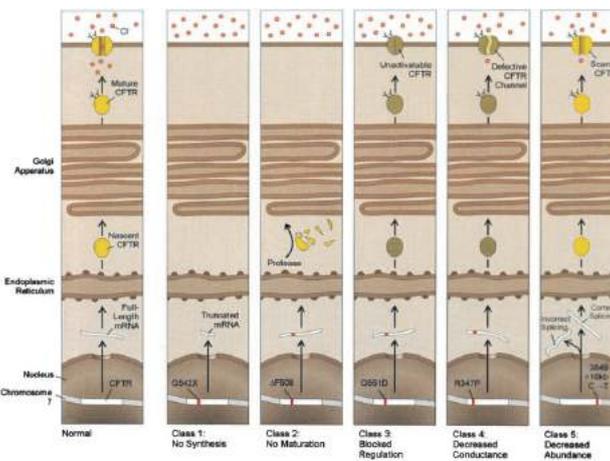


Fig. 8. Effetti delle diverse mutazioni del gene *cftr*. Il gene wild-type viene trascritto in mRNA e tradotto nella proteina che, dopo corretto ripiegamento e glicosilazione, raggiunge la membrana apicale dove espleta il compito di canale ionico. Le mutazioni di *Classe 1* presentano prematuri codoni di stop; quelle di *classe 2*, come $\Delta F508$, portano ad un errato ripiegamento della proteina con conseguente ubiquitinazione e degradazione. I canali derivanti dalle mutazioni di *Classe 3* raggiungono la membrana ma non sono correttamente attivati, mentre quelli di *Classe 4* hanno una limitata conduttanza per lo ione Cl^- . Infine le mutazioni di *Classe 5* producono la proteina corretta ma in quantità ridotta (Gibson, Burns, and Ramsey 2003).

I soggetti affetti da questa malattia multisistemica presentano un muco secreto a livello polmonare molto denso, che impedisce la normale clearance mucociliare e facilita l'instaurarsi d'infezioni batteriche; i dotti pancreatici si ostruiscono causando la formazione di cisti mentre l'intestino è deficitario di enzimi specifici provocando uno stato di denutrizione e steatorrea. I sali eliminati mediante traspirazione non vengono riassorbiti determinando un aumento della loro concentrazione nel sudore, principio sfruttato dallo "Sweat test". Altre analisi possono essere eseguite per l'identificazione o conferma della malattia sia prima della nascita, come il test del liquido amniotico, che a pochi giorni dal parto, come il test genetico o lo screening neonatale per la determinazione di tripsina immuno-reattiva.

Al momento non esistono cure definitive alla malattia ma diverse terapie sono in grado di rallentarne il decorso controllando le infezioni polmonari, fornendo un'alimentazione adeguata ed evitando l'ostruzione intestinale. Fisioterapia

e riabilitazione respiratoria, aerosolterapia, antibioticoterapia e nutrizione controllata permettono oggi giorno alla maggior parte dei malati FC di raggiungere l'età adulta. Quando il danno polmonare raggiunge livelli critici e causa insufficienza respiratoria, l'unica soluzione possibile è data dal trapianto polmonare bilaterale.

1.6 Le infezioni polmonari nei soggetti FC

La causa principale del declino delle funzioni polmonari e di mortalità nei pazienti FC è la loro suscettibilità alle infezioni batteriche. Fin dagli esordi della malattia le manifestazioni cliniche più evidenti sono tosse, bronchiti e polmoniti ricorrenti; più dell'80% dei soggetti alla fine muore per insufficienza respiratoria causata dalla fibrosi polmonare derivante dalla cronicizzazione delle infezioni polmonari.

L'epitelio delle vie aeree di un soggetto sano è di tipo pseudo-stratificato: è ricoperto da uno strato sottile detto *airway surface liquid* (ASL) che consta di uno strato acquoso periciliare nel quale sono immerse le ciglia e di uno strato mucoso sovrastante (Fig. 9A). La clearance mucociliare data dal movimento costante e sincrono delle ciglia e la presenza di molecole antimicrobiche del sistema immunitario permettono la continua eliminazione di particelle estranee presenti nelle vie respiratorie. Nei polmoni dei pazienti FC si ritrova sia un aumento della viscosità sia di densità del muco secreto dalle ghiandole mucipare e dalle cellule a calice che ne limita lo spostamento in direzione nasofaringea e, contemporaneamente, aumenta la colonizzazione batterica (Fig. 9B). L'assenza dello spostamento dello strato mucoso ne causa un ispessimento fino a $\geq 100 \mu\text{m}$ e una drastica riduzione di O_2 al suo interno (Fig. 9C). I batteri presenti provvisti di flagelli, come *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*, possono penetrare nelle zone iposiche del muco dove sviluppano meccanismi di difesa, come la formazione di biofilm, e limitano l'azione del sistema immunitario dell'ospite dando luogo a infezioni persistenti, dette croniche (Fig. 9D-E-F) (Boucher 2004).

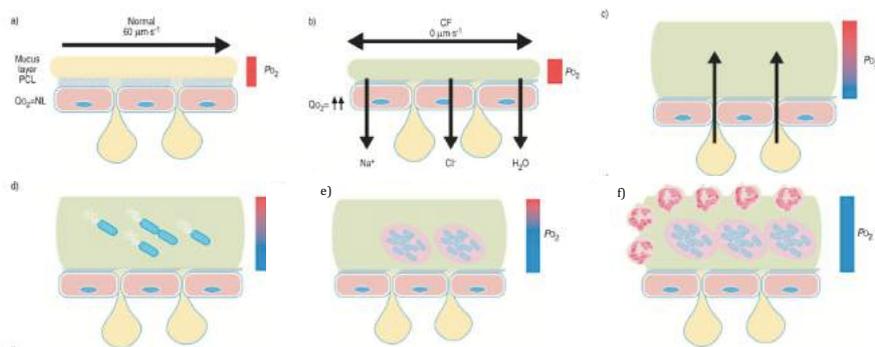


Fig. 9. (A) Nell'epitelio polmonare la corretta viscosità e densità dello strato periciliare e mucoso permette la costante clearance mucociliare. (B) Nei polmoni FC, l'inibizione del flusso in direzione naso-faringea aumenta lo spessore dello strato di muco e ne riduce l'O₂ (C), favorendo la penetrazione di batteri flagello-dotati (D) e l'insorgenza di infezioni a carattere cronico (E-F) (Boucher 2004).

Le infezioni batteriche seguono solitamente un ordine caratteristico di comparsa (Fig. 10). I primi microrganismi che si ritrovano nel tratto respiratorio dei bambini FC sono lo *Staphylococcus aureus* e l'*Haemophilus influenzae* che, inducendo una prima elevata risposta infiammatoria, provocano la distruzione del tessuto polmonare e facilitano la successiva colonizzazione da parte di *P. aeruginosa*. Questo patogeno è il più significativo opportunisto nella FC presente nei bambini all'incirca dal secondo anno di vita, in grado inizialmente di dar luogo a infezioni transienti seguite dalla colonizzazione permanente del polmone fino a causare la morte del paziente. Altri microrganismi identificati più tardi nel polmone del soggetto FC sono *B. cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, micobatteri non tubercolari assieme ad alcune specie fungine quali *Aspergillus* spp. e *Scedosporium apiospermum* (Gibson, Burns, and Ramsey 2003).

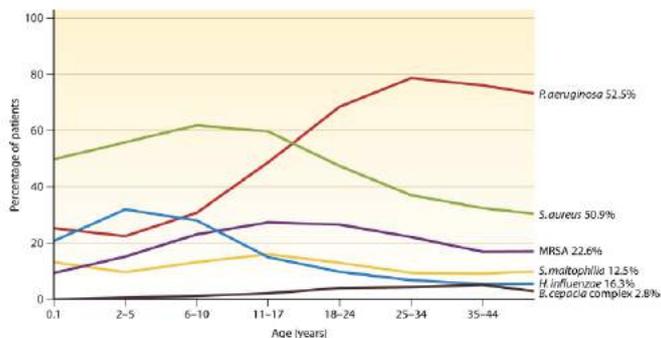


Fig. 10. Prevalenza di specifici patogeni polmonari nella FC in base all'età (Boucher 2004).

Le terapie attuali vertono nell'individuazione rapida dei microrganismi nelle secrezioni bronchiali ottenute mediante tosse o aspirato faringeo ogni 2/3 mesi con seguente antibiogramma. Segue somministrazione di agenti mucolitici via aerosol come rhDNase e terapia antibiotica: sono prescritte solitamente almeno due molecole antimicrobiche di classe differente contemporaneamente con somministrazione intravenosa od orale per due settimane ad alto dosaggio. Per controllare le infezioni croniche, l'assunzione del farmaco può avvenire anche per inalazione, permettendo di raggiungere elevate concentrazioni nel sito d'interesse. Grazie alle continue ricerche e sviluppo di nuovi farmaci, si è verificato un netto miglioramento della prognosi, con un'aspettativa media di vita che si è spostata dai 25 anni negli anni '80 ai 40 nel 2017.

1.7 I fattori di virulenza e l'adattamento nelle infezioni croniche

Nel 2006, Smith *et al.* hanno visto, mediante sequenziamento del genoma, numerose mutazioni puntiformi accumulate nel DNA di *P. aeruginosa* da infezione cronica; alcune funzioni perse dal batterio riguardano la sua capacità di invadere l'ospite o di danneggiarne i tessuti altre, come la produzione di alginato nel fenotipo mucoide, dimostrano la sua adattabilità all'ambiente polmonare e al massiccio impiego di antibiotici utilizzati nel corso della malattia.

1.7.1 I fattori di virulenza di *P. aeruginosa* nelle infezioni acute

La capacità di questo patogeno di provocare infezioni nei polmoni dell'uomo è dovuta sia all'attività di elementi presenti sulla cellula batterica, sia alle numerose sostanze prodotte e rilasciate dal microrganismo stesso. Tra i diversi fattori di virulenza vanno citati (Fig. 11):

- Il **flagello** e i **pili** sono importanti sia per l'adesione ma anche nella motilità di tipo twitching e swarming;
- Il **sistema di secrezione di tipo III (T3SS)** è il maggiore fattore di virulenza utilizzato dal batterio per iniettare direttamente nella cellula ospite le molecole effettrici;
- Il **QS** controlla la sopravvivenza cellulare, la formazione di biofilm e la virulenza stessa;
- Le **proteasi** (la **proteasi alcalina**, l'**elastasi** e la **proteasi IV**) sono in grado di degradare le immunoglobuline e fibrine dell'ospite e distruggerne le giunzioni occludenti. Nella FC riveste un ruolo molto importante soprattutto l'enzima elastasi, che presenta un'attività diretta sulle giunzioni strette permettendo l'invasività tissutale di *P. aeruginosa*;
- Il **lipopolisaccaride (LPS)**, o **endotossina**, è un complesso glicolipidico della membrana esterna del batterio con funzione antigenica, di esclusione di molecole esterne e d'interazione con alcuni antibiotici;
- L'**esotossina A (ETA)** agisce ADP-ribosilando l'elongating factor 2 (EF 2) e di conseguenza inibendo la sintesi proteica con conseguente morte cellulare;
- La **piocianina** causa stress ossidativi alle cellule dell'ospite distruggendo la catalasi e inibendo il trasporto mitocondriale degli elettroni;
- La **pioverdina** è un sideroforo in grado sia di sottrarre ioni Fe^{3+} sia di agire come molecola segnale.

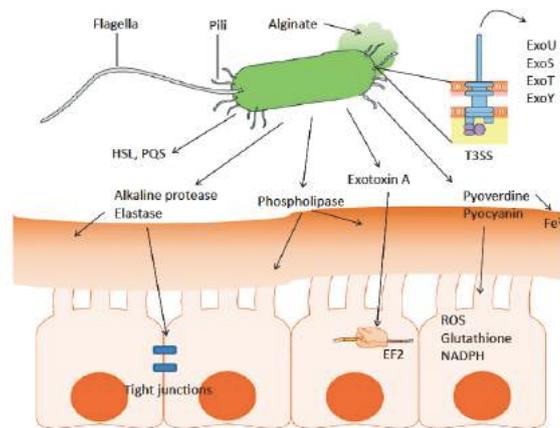


Fig. 11. Fattori di virulenza prodotti da *P. aeruginosa* nelle infezioni acute (Gellatly and Hancock 2013).

1.7.2 Le infezioni croniche

Una volta stabilita nel tratto respiratorio, *P. aeruginosa* è in grado di resistere ai continui attacchi del sistema immunitario dell'ospite e alle terapie antibiotiche, causando infezioni persistenti che portano al progressivo deterioramento della funzionalità respiratoria. L'instaurarsi di queste infezioni croniche sono la conseguenza della spiccata abilità di questo patogeno opportunisto di adattarsi all'ambiente circostante (Hauser *et al.* 2011) (Fig. 12).

Nelle vie respiratorie dei soggetti FC *P. aeruginosa* va incontro a diversi cambiamenti genotipici e fenotipici risultanti dalla selezione di continue mutazioni spontanee; queste sono solitamente comuni nella FC ma differiscono in base alla porzione polmonare interessata. Di conseguenza, nel tratto respiratorio vi è un'eterogeneità di popolazione batterica, originatasi da un comune progenitore ma differenziatasi in base alle mutazioni geniche acquisite.

Alcune caratteristiche comuni presenti negli isolati di *P. aeruginosa* provenienti da infezioni croniche sono il fenotipo mucoide, la resistenza agli antibiotici, le modificazioni del LPS, la perdita del T3SS, del flagello e dei pili, la comparsa del fenotipo *Small Colony Variants* (SCVs), la modificazione della comunicazione cellulare mediata dal QS e l'ipermutabilità (Hauser *et al.* 2011).

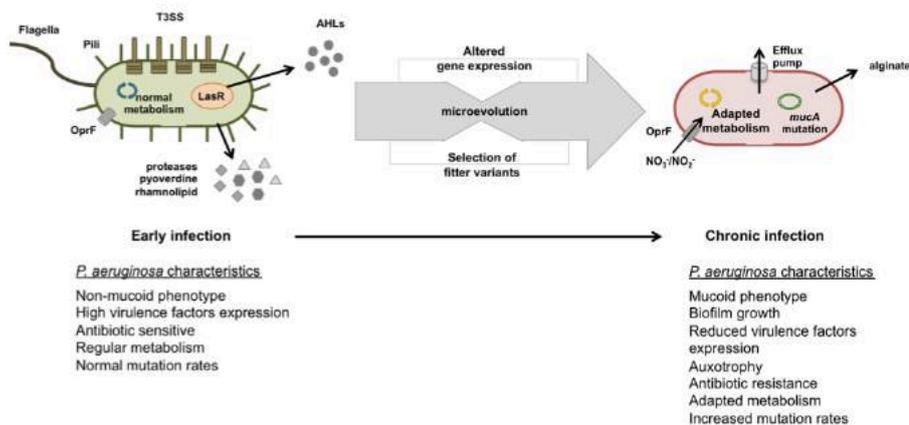


Fig. 12. Modificazioni di *P. aeruginosa* nella transizione da infezione acuta a cronica (Sousa and Pereira 2014).

Di seguito alcune nel dettaglio:

1. **Fenotipo mucoide:** *P. aeruginosa* è capace di produrre un esopolisaccaride costituito da alginato, disaccaride formato da acido D-mannuronico e acido L-guluronico (Fig. 13 A-B). Le condizioni chimico-fisiche dei polmoni FC, caratterizzati dall'elevata concentrazione degli ioni Cl^- , Na^+ e K^+ , attivano il promotore del gene *algD* che controlla la sintesi di alginato; il fenotipo mucoide che ne deriva permette alle cellule incapsulate di evitare l'attività fagocitaria dei polimorfonucleati (PMNs), macrofagi e l'azione di diversi antibiotici (Antonelli *et al.* 2012).

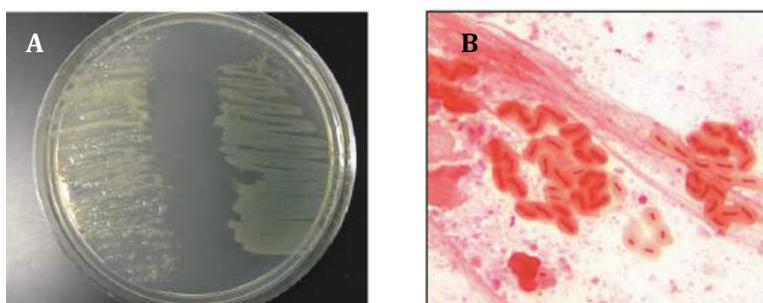


Fig. 13. (A) *P. aeruginosa* con fenotipo mucoide a sinistra e variante non mucoide prelevate dallo stesso paziente a destra (Hauser *et al.* 2011). (B) Colorazione di Gram di espettorato proveniente da paziente FC infettato da *P. aeruginosa* mucoide: l'alone arancione attorno ai batteri sono molecole di alginato (Pritt, O'Brien, and Winn 2007).

2. **Resistenza agli antibiotici:** la permanenza nel tratto respiratorio soggetto a continua terapia antibiotica facilita la selezione di ceppi resistenti. Le principali mutazioni solitamente coinvolgono meccanismi della resistenza intrinseca, quali la regolazione della produzione di pompe di efflusso e di enzimi β -lattamasi. La crescita a stretto contatto delle cellule batteriche però, come nel caso del biofilm, può portare al trasferimento di elementi di DNA come plasmidi o trasposoni che codificano per elementi che introducono nuove resistenze o potenziano quelle intrinseche: la resistenza acquisita può, ad esempio, coinvolgere la produzione di una seconda β -lattamasi incrementando la refrattarietà a specifici antibiotici β -lattamici (Gellatly and Hancock 2013). Inoltre le condizioni ambientali del polmone FC possono portare anche a fenomeni di resistenza adattativa; un caso ben noto sono i meccanismi che coinvolgono la tolleranza ai peptidi antimicrobici cationici (CAMPs). L'abbassamento della carica negativa del LPS riduce l'interazione dei CAMPs con la membrana esterna del batterio, limitando così l'azione antimicrobica della molecola (Gellatly and Hancock 2013).

3. **Modificazioni del LPS:** il lipopolisaccaride dei batteri Gram negativi è suddivisibile in tre parti distinte, il lipide A fortemente acilato, il core oligosaccaridico e l'antigene O. Nei soggetti FC si riscontrano spesso isolati di *P. aeruginosa* senza l'antigene O, condizione che porta ad una riduzione della risposta anticorpale dell'ospite. Inoltre, con il progredire dell'infezione, al lipide A possono venir aggiunti gruppi acilici e zuccheri (amminoarabinosio) che riducono la suscettibilità ai peptidi antimicrobici e il riconoscimento da parte del recettore Toll-like 4 (TLR4).

4. **Alterazione del QS:** il QS permette la comunicazione tra le cellule batteriche con l'obiettivo di modificare, in modo coordinato e densità cellulare-dipendente, l'espressione genica mediante la secrezione di specifiche molecole definite autoinduttori. In *P. aeruginosa* quasi il 10% dell'espressione genica è sotto il controllo dei sistemi LasI/LasR e RhII/RhlR; questa regolazione ri-

guarda principalmente la produzione di diversi fattori di virulenza e la formazione del biofilm. È stato visto che mutazioni dei geni *lasR* e *rhlR* si riscontrano in circa l'80% degli isolati prelevati dalle infezioni croniche (Bjarnsholt *et al.* 2010).

L'infezione cronica da *P. aeruginosa* può persistere nel polmone anche per decenni. Tipicamente, i batteri isolati da infezioni croniche ben stabilite sono meno infiammatori e citotossici di quelli isolati dagli stessi pazienti in anni precedenti durante la fase acuta iniziale, ma la continua stimolazione della risposta immunitaria causa il progressivo deterioramento della funzione polmonare fino alla morte (Gellatly and Hancock 2013).

2. Scopo della tesi

Come precedentemente anticipato, lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'attività dei peptidi antimicrobici Bac7(1-35) e BMAP-27 nei confronti di batteri Gram-negativi, in particolare *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, appartenenti al gruppo ESKAPE. Lo studio non si è focalizzato solo sull'inibizione della crescita, che per alcune specie era già stata descritta in precedenza (Benincasa *et al.* 2004, Skerlavaj *et al.* 1996) ma anche sugli effetti dei due peptidi nei confronti di alcune caratteristiche fisiologiche collegabili alla virulenza, prima tra queste la formazione di biofilm. La caratterizzazione degli isolati clinici, molti dei quali sono stati raccolti in funzione di questo lavoro, viene riportata come parte integrante di questa tesi.

I risultati sono stati suddivisi in tre capitoli, corrispondenti alle tre specie studiate. In ciascuno di essi verranno brevemente esposti gli obiettivi specifici e i dati sperimentali, che verranno poi discussi in funzione delle problematiche relative alla specie coinvolta. Nell'ultimo capitolo verranno infine riportate le conclusioni dell'intero lavoro.

3. Materiali & Metodi

NOTA: per la composizione di tutte le soluzioni contrassegnate con il simbolo asterisco “”, si rimanda all’ultimo paragrafo del capitolo, dal titolo **Soluzioni e terreni**

3.1 Raccolta degli isolati e loro conservazione

Acinetobacter baumannii

Tutti gli isolati sono stati raccolti tra il 2006 e il 2011 da diversi reparti dell’ospedale locale di Trieste, identificati inizialmente con metodi di routine (Vitek 2 – bioMérieux) e successivamente confermati con analisi di restrizione della regione intergenica dell’rRNA 16S-23S (Dolzani *et al.* 1995). Per ulteriori dettagli fare riferimento a Milan *et al.* 2016.

Klebsiella pneumoniae

I due ceppi di *K. pneumoniae* oggetto dello studio (KpTs101 e KpTs113) sono stati raccolti da campioni clinici di urina presso l’Ospedale di Cattinara (Trieste) nel 2014. Sono stati scelti dopo aver valutato la capacità di formare biofilm di 30 isolati non clinicamente correlati (dati non mostrati). KpTs101 sviluppa un abbondante biofilm che rimane saldamente adeso alle superfici, mentre KpTs113 produce un’abbondante matrice extracellulare con scarsa capacità di adesione alle superfici (vedi paragrafo 5.1.1). Per ulteriori dettagli fare riferimento a Benincasa *et al.* 2016.

Pseudomonas aeruginosa

Gli 81 isolati di *P. aeruginosa* oggetto dello studio sono stati raccolti nei primi 6 mesi del 2015 presso il laboratorio di batteriologia dell’IRCCS Burlo Garofolo di Trieste da 26 pazienti afferenti al Centro Regionale per la Diagnosi e la Cura della Fibrosi Cistica (Tab. 3).

Per questo studio sono state prese in esame almeno 2-3 colonie con diversa morfologia da ogni espettorato (Fig. 14) e, da alcuni pazienti, sono stati raccolti più campioni di espettorato in tempi successivi.

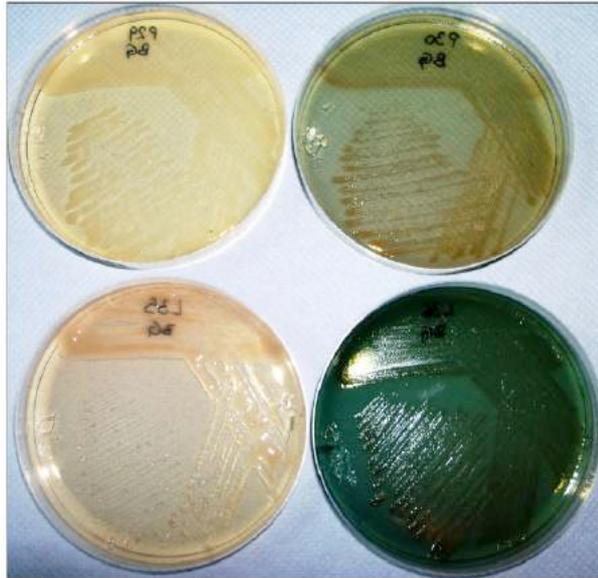


Fig. 14. Esempio delle differenze morfologiche e di quantità di muco prodotto di isolati di *P. aeruginosa* coesistenti nel polmone di un soggetto FC.

Tab. 3. Numero di isolati di *P. aeruginosa* e fenotipo ottenuti dai pazienti dopo crescita su terreno LB*.

No. paziente	No. isolato	Fenotipo	No. paziente	No. isolato	Fenotipo	
21	201	Mucoso verde	32	233	Sfrangiato, grande marrone	
	202	Mucoso verde		234a	Puntiforme	
	203	Piccolo, puntiforme verde		234b	Puntiforme	
	204	Rugoso verde		246	Sfrangiato verde	
	205	Mucoso bianco		281	Puntiforme chiaro	
	273	Piccolo, puntiforme verde		282	Puntiforme chiaro	
	274	Mucoso		235	Puntiforme chiaro	
22	206	<i>Staphylococcus aureus</i>	33	236	Grande, concentrico	
	207	Sfrangiato, grande bianco		238	Mucoso	
	208	Sfrangiato, medio bianco		260	Rugoso chiaro	
	212	Sfrangiato, medio	34	261	Concentrico grande	
	286	<i>Staphylococcus aureus</i>		239	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	287	Sfrangiato, medio bianco		240	Mucoso	
	288	Mucoso		35	241	<i>Staphylococcus aureus</i>
289	Mucoso	242	Puntiforme chiaro			
23	209	Bianco	36	247	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	210	Mucoso		248	Sfrangiato chiaro	
	211	Mucoso		249	Sfrangiato chiaro	
24	213	Piccolo, puntiforme chiaro		37	250	Puntiforme, medio chiaro
	214	Piccolo, puntiforme chiaro			252	Sfrangiato, medio
	215	Mucoso + piccolo puntiformi		253	Puntiforme chiaro	
26	216	Mucoso	38	254	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	217	Mucoso + grande chiaro		255	<i>Burkholderia cepacia</i>	
	218	Mucoso	39	256	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	259	Mucoso marrone		257	Puntiforme verde	
	275	Piccolo, puntiforme chiaro		258	<i>Strenotrophomonas maltophilia</i>	
	276	Mucoso marrone		263	Mucoso	
27	219	Sfrangiato, grande bianco	40	264	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	
	220	Sfrangiato, grande bianco		41	265	<i>Staphylococcus aureus</i>
	221	Sfrangiato, grande bianco	266		Mucoso	
222	Sfrangiato, grande	267	Mucoso			
223	Grande, concentrico	268	Mucoso			
28	243	Mucoso	42		269	Rugoso chiaro
	244	Sfrangiato, grande			270	Rugoso, grande chiaro
	245	Medio, concentrico			271a	Mucoso
	277	Mucoso		271b1	Puntiforme chiaro	
	278	Sfrangiato chiaro	271b2	Puntiforme chiaro		
	279	Mucoso	43	272	<i>Strenotrophomonas maltophilia</i>	
	280	Sfrangiato chiaro		283	Mucoso	
	290	Mucoso	44	284	Medio marrone	
291	Piccolo, puntiforme chiaro	285		<i>Achromobacter xylosoxidans</i>		
29	224	Medio, puntiforme chiaro	45	292	Mucoso + piccolo puntiforme	
	225	Medio, puntiforme chiaro		293	Puntiforme chiaro	
30	226	<i>Staphylococcus aureus</i>	46	294	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	227	Sfrangiato chiaro		295	Sfrangiato chiaro	
31	228	Puntiforme chiaro + piccolo sfrangiato		47	296	Puntiforme chiaro
	229	Puntiforme chiaro + piccolo sfrangiato	297		Mucoso	
	230	Mucoso	298		Puntiforme verde	
	231	<i>Mycobacterium chelonae</i>	299		Marrone	

In nero il fenotipo degli isolati di *P. aeruginosa*.

In rosso ceppi di batteri Gram positivi e in blu di batteri Gram negativi coesistenti nel polmone del soggetto.

Dove non indicato diversamente, gli isolati sono stati fatti crescere in terreno LB*.

Per la conservazione a lungo termine, gli isolati sono stati fatti crescere a 37°C *overnight* in brodo LB* e congelati a -80°C in presenza di dimetilsolfossido (DMSO) (C₂H₆OS) al 10%.

3.2 Genotipizzazione mediante PFGE

L'elettroforesi in campo pulsato (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE) è una variante dell'elettroforesi in gel d'agarosio messa a punto nel 1984 da D. C. Schwartz e C. Cantor (Columbia University) per riuscire a separare frammenti di DNA di grandezza superiore alle 15 kb. La PFGE è una un'elettroforesi multidirezionale nella quale la direzione dell'impulso elettrico cambia periodicamente (Fig. 15); la variazione costringe le molecole di DNA a riorientarsi e, poiché le molecole più piccole impiegano meno tempo a farlo di quelle più lunghe, è possibile separare i frammenti di DNA in base alla loro lunghezza.

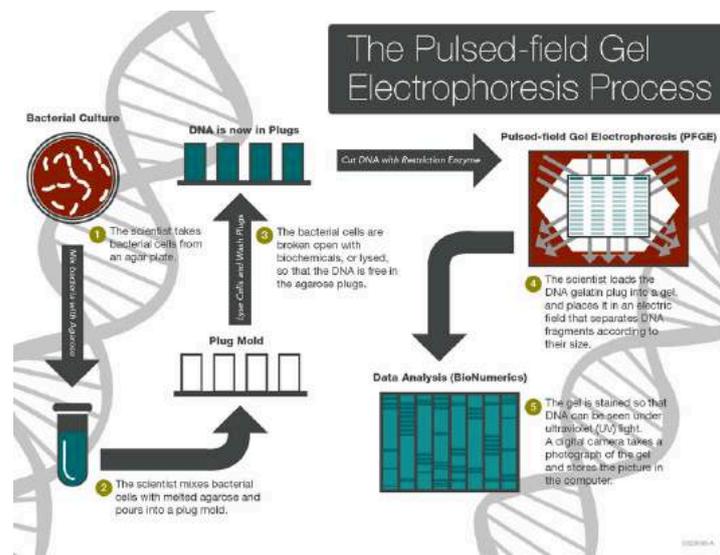


Fig. 15. Rappresentazione schematica del processo di separazione del DNA con la metodica PFGE (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>).

Acinetobacter baumannii

Il DNA genomico è stato digerito con l'enzima di restrizione *ApaI* (New England Biolabs) e i frammenti ottenuti sono stati fatti migrare per 19 h a 14°C, con *switch* iniziale di 5" e *switch* finale di 20". Gli isolati di *A. baumannii* RUH875 e RUH134, rappresentanti dei Cloni Internazionali I e II, sono stati utilizzati come riferimento (Seifert *et al.* 2005).

Pseudomonas aeruginosa

La preparazione del DNA è stata effettuata seguendo il protocollo riportato da Grundmann *et al.* 1995. I campioni sono stati fatti migrare per 25 h a 12°C con *switch* iniziale di 1" e *switch* finale di 25".

Il voltaggio della migrazione per tutti i campioni è stata di 6 V/cm, angolo di 120°; come standard di riferimento è stato utilizzato il marker λ ladder PFG (New England Biolabs). È stato utilizzato lo strumento CHEF DR III (Bio Rad GenePath System); al termine della separazione elettroforetica il gel è stato colorato per 1 ora con l'intercalante Gel Red (Biotium) 1:10000 in H₂O e poi fotografato.

I profili di restrizione ottenuti sono stati analizzati e confrontati con il programma GelCompar II (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgio); la somiglianza è stata valutata con l'indice di Dice (Dice 1945) mentre l'analisi dei clusters è stata eseguita mediante "Unweighted pair-group method with mathematical averaging" (UPGMA).

3.3 Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA)

Acinetobacter baumannii

Alcuni isolati selezionati sono stati analizzati con l'analisi MLVA. Questa tecnica sfrutta la presenza di polimorfismi di sequenze di DNA ripetute in tandem; il numero di ripetizioni di ciascun locus genera uno specifico codice caratteristico per ogni isolato. In questo lavoro si è utilizzato lo schema di amplificazio-

ne MLVA-10_{Orsay} proposto da Hauck *et al.* 2012 con la sola differenza che sono state utilizzate tecniche di amplificazione mediante PCR e l'elettroforesi su gel d'agarosio al posto dei processi automatizzati descritti nel lavoro.

3.4 Multilocus sequence typing (MLST)

Acinetobacter baumannii

L'analisi MLST è stata condotta sequenziando DNA di regioni interne di 7 geni *housekeeping*, *cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB* e *rpoB6* come descritto da Diancourt *et al.* 2010. I criteri di assegnazione degli alleli e i profili MLST in accordo con lo schema Pasteur sono stati consultati sul sito MLST (<http://pubmlst.org/abaumannii/>) dell'Università di Oxford.

3.5 Valutazione della suscettibilità *in vitro*

Sostanze saggiate

Gli antibiotici (Tobramicina, Ceftazidime, Ciprofloxacina, Imipenem, Meropenem e Azitromicina) e le sostanze naturali (Zingerone e Mentolo) testati sono stati ottenuti da fonti commerciali (rispettivamente Nebicina – Teofarma, Cefsulodin – Sigma, Ciprofloxacina – Sigma, Imipenem – United States Pharmacopeia Reference Standard, Meropenem – United States Pharmacopeia Reference Standard, Azitromicina – Sigma, Vanillylacetone – Sigma W312401, Mentolo – Sigma M2772), mentre i peptidi antimicrobici (Bac7(1-35) e BMAP-27) sono stati sintetizzati e quantificati nel laboratorio del prof. A. Tossi del Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università degli Studi di Trieste secondo i metodi pubblicati (Donati *et al.* 2007).

3.5.1 Valutazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC)

I test di suscettibilità all'attività antimicrobica degli antibiotici, dei peptidi antimicrobici e delle sostanze naturali sono stati eseguiti con il metodo della microdiluzione in liquido seguendo le linee guida CLSI (CLSI 2016).

Gli esperimenti sono stati condotti in microtiter da 96 pozzetti con fondo rotondo; le sospensioni contenenti $1-5 \times 10^5$ cellule batteriche/mL e diluzioni seriali 1:1 della sostanza in esame in MH (Difco BD™ 275730) sono state incubate a 37°C per 24 e 48h. Il valore della MIC è stato attribuito alla più bassa concentrazione della sostanza antimicrobica in grado di inibire completamente la crescita batterica. Almeno tre esperimenti indipendenti sono stati condotti per ogni sostanza antimicrobica presa in esame.

Per l'interpretazione dei risultati con gli antibiotici sono stati consultati i *breakpoints* EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; Version 6.0) e in ogni test è stato incluso un ceppo di riferimento (*P. aeruginosa* ATCC 27853 o *E. coli* ATCC 25922, come indicato dalle linee guida) come controllo di qualità.

3.5.2 Valutazione della *biofilm inhibitory concentration* (BIC)

La valutazione dell'attività antibiofilm è stata effettuata seguendo il protocollo descritto da Moskowitz *et al.* 2004. L'efficacia del trattamento è stata determinata mediante calcolo della BIC (*biofilm inhibitory concentration*), corrispondente alla più bassa concentrazione di antimicrobico che causa una differenza di assorbanza [$OD_{590}(6h) - OD_{590}(0h)$] minore o uguale al 10% della media di 2 controlli positivi.

3.6 Valutazione della sinergia mediante *checkerboard assay*

Secondo questa metodica, tutte le concentrazioni testate della sostanza X vengono saggiate assieme alle concentrazioni della sostanza Y, come riportato in Fig. 16.

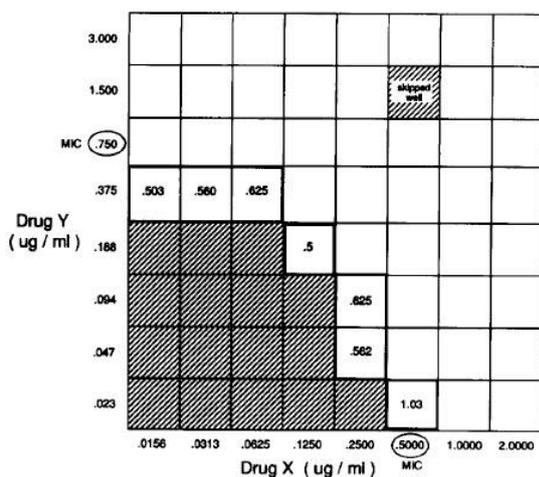


Fig. 16. Rappresentazione schematica della combinazione della sostanza X (MIC = 0,5 µg/mL) con la sostanza Y (MIC = 0,75 µg/mL); i quadrati bianchi indicano assenza di crescita batterica mentre quelli grigi indicano crescita batterica (Hsieh et al. 1993).

Il calcolo del *Fractional Inhibitory Complex Index* (FICI) determinerà la sinergia, l'indifferenza o l'antagonismo delle due sostanze. Il FICI è la somma del FIC della sostanza X, dato dal rapporto della MIC ottenuta in associazione sulla MIC della sostanza singola, con il FIC della sostanza Y, allo stesso modo dato dal rapporto della MIC in associazione sulla MIC della sostanza testata da sola (Fig. 17).

$$\text{FIC index} = \text{FIC}_X + \text{FIC}_Y = \frac{(X)}{(\text{MIC}_X)} + \frac{(Y)}{(\text{MIC}_Y)}$$

Fig. 17. Formula del calcolo del *Fractional Inhibitory Complex Index*. X = MIC della sostanza X ottenuta in associazione, MIC_X = MIC della sostanza X da sola, Y = M della sostanza Y ottenuta in associazione, MIC_Y = MIC della sostanza Y da sola.

La sinergia è definita da un valore di FICI $\leq 0,5$, l'indifferenza da FICI che va da $> 0,5$ fino a ≤ 4 e l'antagonismo delle due sostanze da un valore di FICI > 4 .

3.7 Cinetica di crescita

Gli esperimenti d'inibizione della crescita batterica sono stati condotti utilizzando batteri in fase logaritmica diluiti in brodo MH* fino a raggiungere una concentrazione di 1×10^6 CFU/mL con e senza la sostanza antimicrobica. La crescita è stata condotta a 37°C con agitazione intermittente per 4 h misurando l'assorbanza a 620 nm ogni 10 minuti con un lettore di micro-piastre Tecan Trading AG (Svizzera).

3.8 Quantificazione della produzione di biofilm

Esistono diverse metodiche per quantificare la produzione di biofilm; in questo lavoro si è utilizzato il metodo basato sulla colorazione con il cristalvioletto (Stepanović *et al.* 2007). I batteri cresciuti *overnight* vengono diluiti 1:100 in brodo MH ed inoculati in triplicato in una microtiter di polistirene da 96 pozzetti con volume finale di 200 μL per ogni pozzetto. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C in condizioni statiche, si esegue una lettura spettrofotometrica a 590 nm per valutare la crescita, i batteri planctonici vengono poi rimossi e ogni pozzetto lavato delicatamente con 200 μL di soluzione fisiologica* sterile. Il biofilm formatosi viene fissato mediante incubazione di 1 ora a 60°C e colorato per 15 minuti con 200 μL di cristalvioletto 2% (Sigma, Saint Louis, MO, USA); successivamente i pozzetti vengono lavati con acqua e lasciati asciugare all'aria. La quantità di biofilm formatasi viene valutata mediante solubilizzazione del cristalvioletto con 200 μL di acido acetico al 33% in H_2O per 30' e seguente lettura spettrofotometrica a 570 nm.

3.9 Inibizione della formazione di biofilm

L'inibizione della formazione del biofilm è stata valutata con il metodo del cristavioletto sopra descritto. Le sostanze testate (Bac7(1-35), BMAP-27, zingerone, tobramicina, l'azitromicina - sia singolarmente che in sinergia) sono state aggiunte al momento dell'inoculo dei batteri, in modo che il biofilm si è formato in loro presenza. Le concentrazioni utilizzate sono tutte sub-inibenti e corrispondenti, nella maggior parte dei casi, a $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ il valore di MIC. Come sopra, la microtiter è stata incubata a 37°C per 24 ore, quindi è stata eseguita una lettura spettrofotometrica a 590 nm, sono state tolte le cellule planctoniche con lavaggi delicati e il biofilm è stato fissato a 60°C per 1 ora. Segue la colorazione con cristavioletto al 2%, lavaggio con acqua e asciugatura all'aria; dopo solubilizzazione con acido acetico al 33% viene eseguito la lettura a 570 nm e conseguente calcolo del BI (Fig. 18).

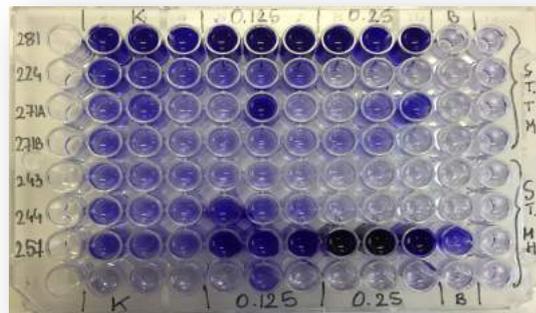


Fig. 18. Esempio di quantificazione dell'inibizione della formazione del biofilm mediante colorazione con cristavioletto 2%.

3.10 Microscopia confocale

La microscopia confocale (*Confocal Scanning Laser Microscopy*, CSLM) è una tecnica ottica mediante la quale è possibile studiare la tridimensionalità di campioni biologici. I biofilm prodotti dai diversi isolati sono stati infatti

analizzati mediante la raccolta di una serie di immagini di piani paralleli che hanno permesso poi la ricostruzione tridimensionale dell'intera struttura.

Per le analisi è stato utilizzato un microscopio Nikon C1-SI, dotazione del Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università degli Studi di Trieste - Centro di Microscopia ottica (responsabile: prof. E. Tongiorgi; manager: dott. G. Baj), con obiettivo 20x-dry. Il biofilm è stato fatto crescere su un vetrino a 12 camerette (Ibidi GmbH, Planegg, Germania) per 24 ore con o senza la sostanza antimicrobica da testare, lavato delicatamente con soluzione fisiologica sterile e fissato 1 ora a 60°C. Subito prima dell'analisi microscopica è stata eseguita la colorazione con la sonda fluorescente intercalante arancio di acridina allo 0,1% w/v in H₂O per 1 minuto e due rapidi lavaggi con acqua per togliere il colorante in eccesso. Le impostazioni del fotomoltiplicatore sono state determinate con precedenti esperimenti *ad hoc* e riutilizzate ad ogni esperimento. Le immagini acquisite mediante CSLM sono state analizzate mediante i software EZ-C1 Free Viewer (Nikon Corporation, Tokyo, Giappone) e Image J 1.47 (Wayne Resband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Per l'elaborazione numerica della struttura del biofilm è stato utilizzato il software COMSTAT come descritto da Heydorn *et al.* 2000.

3.11 Internalizzazione del peptide

L'analisi di citofluorimetria a flusso è stata condotta con lo strumento Cytomics FC 500 (Beckman-Coulter, Inc., Fullerton, CA). Per la valutazione del livello di internalizzazione del peptide, i batteri in fase logaritmica, diluiti fino a raggiungere la concentrazione finale di 1×10^6 CFU/mL in MHB sono stati incubati per 30' a 37°C con il peptide Bac7(1-35)-BY, lavati ripetutamente con una soluzione ad alti sali* ed analizzati in presenza ed assenza della molecola quencher Trypan Blue (TB).

I risultati sono stati analizzati con il software FCS Express3 (De Novo Software, Los Angeles, CA).

3.12 Integrità della membrana cellulare

L'integrità della membrana cellulare è stata controllata misurata l'internalizzazione del Propidio Ioduro (PI) mediante citofluorimetria a flusso. I batteri in fase logaritmica diluiti ad una concentrazione di 10^6 CFU/mL in MHB sono stati incubati a 37°C per tempi differenti con diverse concentrazioni del peptide BMAP-27. Il PI è stato aggiunto a tutti i campioni ad una concentrazione finale di $10\ \mu\text{g/mL}$ e, dopo incubazione, i batteri sono stati analizzati mediante citofluorimetria. I risultati sono stati analizzati con il software FCS Express3 (De Novo Software, Los Angeles, CA), come sopra.

3.13 Inibizione della motilità

La motilità batterica è stata analizzata in superficie e all'interfase tra lo strato semi-solido del terreno (0,5 g agarosio SeaKem LE, 0,5 g triptone, 0,25 g NaCl) e il polistirene della piastra Petri (Skiebe *et al.* 2012). Le piastre sono state preparate lo stesso giorno degli esperimenti per evitare l'essiccamento. Gli inoculi per visualizzare la motilità in superficie sono stati eseguiti depositando $1\ \mu\text{l}$ di sospensione batterica sulle piastre, mentre per la motilità all'interfase depositando $1\ \mu\text{l}$ di sospensione batterica in un foro nell'agarosio prodotto dal puntale di una pipetta automatica. Le piastre sono state sigillate con il parafilm per conservare l'umidità e incubate *overnight* a 37°C . Per la misurazione dell'area di diffusione batterica, le piastre sono state incubate un'ora a 60°C e colorate con il Blu di Coomassie dopo aver rimosso l'agarosio. Le aree di diffusione sono state poi fotografate e misurate con il software ImageJ. Per valutare l'inibizione della motilità, i batteri in fase logaritmica, ad una concentrazione finale di 10^6 CFU/mL, sono stati trattati per 30' a 37°C con le diverse concentrazioni di Bac7(1-35), concentrati mediante centrifugazione, lavati con la soluzione ad alta concentrazione di sali* per rimuovere il peptide non internalizzato e risospesi nella soluzione salina* diluendoli 1:100. I risultati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

3.14 Elastin Congo red assay

Per valutare la produzione di elastasi è stata utilizzata una rielaborazione dell'*elastin Congo red assay* descritto da Xu *et al.* 2015. I batteri, dopo crescita *overnight* a 37°C, vengono diluiti 1:1000 in brodo MH e messi a incubare per 18 ore in leggera agitazione (150 rpm) a 37°C dopo l'aggiunta della sostanza antimicrobica alla concentrazione desiderata. I batteri sono stati quindi centrifugati a 11.000 rpm per 3' e il surnatante ottenuto filtrato (filtri con pori da 0,45 µm, Corning Surfactant-Free Cellulose Acetate, Corning NY, USA); dopo aver eseguito una diluizione 1:10 surnatante filtrato/buffer A*, vengono aggiunti 5 mg/mL di Elastin-Congo red (ECR) (Sigma, E0502-5G) e il tutto incubato per 3 ore a 37°C in agitazione spinta (600 rpm). Terminata l'incubazione, il campione viene centrifugato a 6000 rpm per 3' in modo tale da togliere l'ECR non digerito e il surnatante trasferito in una piastra microtiter da 96 pozzetti per permettere la lettura spettrofotometrica a 405 nm (Fig. 19). In ogni esperimento, il ceppo di riferimento *P. aeruginosa* PAO1, noto produttore di elastasi, è stato utilizzato come controllo interno.

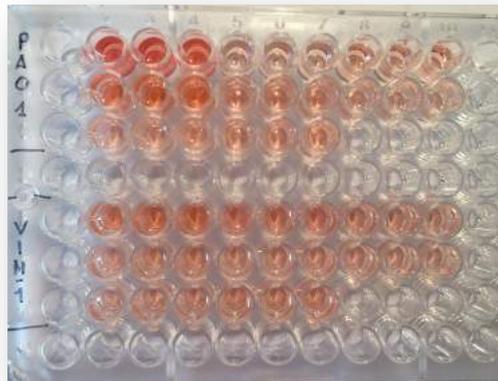


Fig. 19. . Esempio di quantificazione dell'inibizione della produzione di elastasi mediante elastin Congo red assay.

3.15 Soluzioni e terreni

- **terreno LB (Luria Bertani)**
 - 10 g/L NaCl
 - 10 g/L Triptone
 - 5 g/L Estratto di lievito
 - 1 mL NaOH 1M
 - A volume con H₂O deionizzata
 - (+1,5 % agar per terreno solido)

- **Soluzione fisiologica tamponata (pH = 7,2)**
 - 1,2 g/L Na₂HPO₄ anidro
 - 0,22 g/L NaH₂PO₄ anidro
 - 8,5 g/L NaCl
 - A volume con H₂O deionizzata

- **Buffer A (Elastin Congo red)**
 - 100 mM Tris-HCl pH 7.0
 - 1 mM CaCl₂
 - A volume con H₂O deionizzata

- **Soluzione ad alta concentrazione di sali**
 - 10 mM Na-fosfato
 - 400 mM NaCl
 - 10 mM MgCl₂
 - pH 7.2

4. Risultati: *Acinetobacter baumannii*

4.1 Individuazione di un cluster epidemico di *A. baumannii* in un ospedale triestino e caratterizzazione del ceppo responsabile

A partire dal gennaio 2011, in un Ospedale Triestino si è assistito ad un rapido aumento degli isolamenti di *A. baumannii* da pazienti ricoverati in reparti diversi. Poiché si trattava in maggioranza d'isolati resistenti ai carbapenemi (Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB), che fino a quel momento erano stati rinvenuti solo molto raramente nell'ospedale, è stata sospettata la presenza di un cluster epidemico. I paragrafi successivi riportano l'identificazione e la caratterizzazione del ceppo epidemico. Per meglio comprendere l'origine di quest'ultimo, sono anche state condotte delle analisi retrospettive su tutti i CRAB raccolti nei 5 anni precedenti nello stesso ospedale. La tabella 4 riassume le caratteristiche degli isolati inclusi nell'analisi.

Tabella 4. Caratteristiche principali degli isolati presi in considerazione nello studio.

Tipo d'isolati	Periodo	Numero totale d'isolati	Note
Isolati del periodo epidemico	Gennaio-agosto 2011	54	Isolati consecutivi da pazienti diversi, non selezionati
Isolati dei 5 anni precedenti il periodo epidemico	2006-2010	11	Tutti i CRAB registrati nel periodo

4.1.1 Identificazione del cluster epidemico mediante analisi di macrorestrizione

L'analisi mediante macrorestrizione dei 54 isolati di *A. baumannii* raccolti nel 2011 durante l'epidemia ha permesso di riconoscere 6 differenti profili PFGE (A-F) (Fig. 20 e 21). Il cluster E include 48 isolati (89%), tutti resistenti all'Imipenem ed è quindi considerato corrispondente al ceppo epidemico. Tutti i CRAB raccolti in questo periodo appartengono infatti a questo gruppo, con l'eccezione del 406, assegnato al gruppo F. I gruppi A-D ed F sono tutti formati da uno o due isolati.

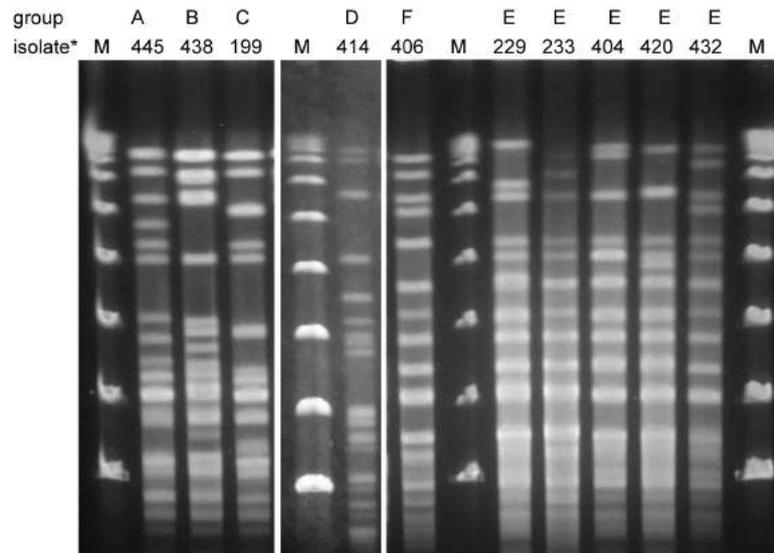


Fig. 20. Profili di restrizione ottenuti mediante PFGE dei 6 isolati rappresentativi di *A. baumannii*. I frammenti di DNA sono stati ottenuti con digestione del DNA genomico mediante l'enzima *Apal* e separati mediante PFGE. Il numero identificativo di ciascun isolato e il relativo gruppo PFGE sono riportati sopra l'immagine. *M: marker del peso molecolare (*lambda ladder*).

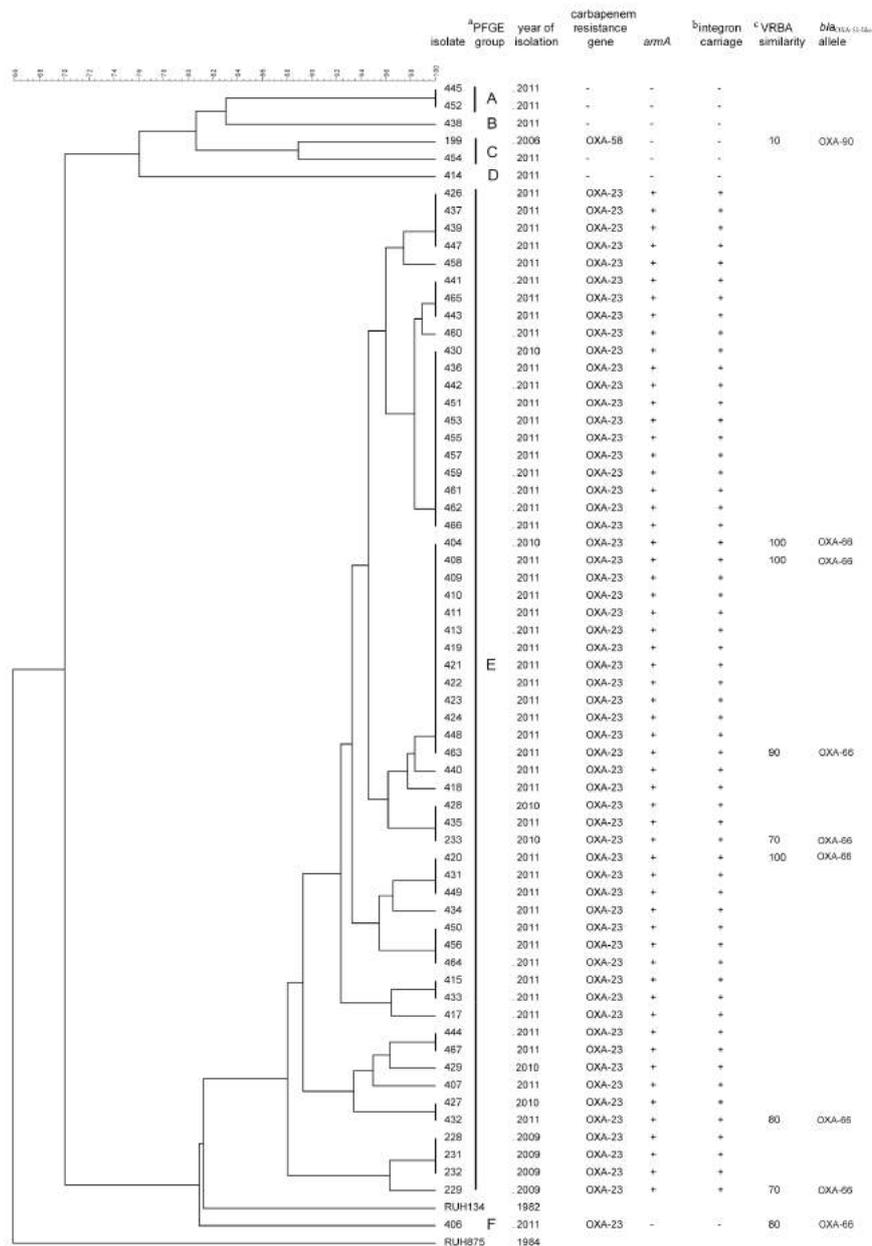


Fig. 21. Dendrogramma basato sulla somiglianza dei profili generati dalla digestione del DNA genomico con *Apal*. Sono stati inclusi sia i 54 isolati raccolti nel 2011 che i CRAB raccolti precedentemente. RUH845 e RUH134, rappresentanti, rispettivamente, degli ICs I e II, sono stati aggiunti come confronto. I profili di DNA sono stati analizzati con l'ausilio del software GelCompare II v. 4.0 (Applied Maths). I livelli di similarità, osservabili nella scala in alto, sono stati calcolati con il coefficiente di Dice. a: assegnazione al gruppo PFGE ottenuto mediante macrorestrizione con *Apal*; b: portatori dell'integrone classe 1 contenente le cassette *aacA4*, *catB8* e *aadA1*; c: percentuale di somiglianza con il pattern VRBA di riferimento (vedi Tab. 6).

4.1.2 Caratterizzazione del ceppo epidemico

Lignaggio e antibiotico resistenza

L'analisi MLST (Milan *et al.* 2016) degli isolati ha dimostrato che il ceppo epidemico appartiene al *Sequence Type* (ST) 2, che rientra nel Clone Internazionale II (Diancourt *et al.* 2010); presenta un fenotipo di resistenza ai farmaci di tipo esteso (Magiorakos *et al.* 2012) e resistenza ad alto livello nei confronti degli aminoglicosidici (Tab. 5).

Tabella 5. Profili di suscettibilità agli antibiotici dei diversi gruppi PFGE di *A. baumannii*

PFGE group (no. of isolates in the group)	A (2 ^a)	B (1)	C (2 ^a)	D (1)	F (1)	E (58)	
	MIC ^b					MIC ₅₀ ^b	MIC ₉₀ ^b
Antimicrobial agent							
Gentamicin	128	>512	>512	>512	4	>512	>512
Tobramycin	512	64	>512	256	1	>512	>512
Amikacin	64	4	128	128	4	>512	>512
Imipenem	1	2	16, 2 ^c	2	16	16	16
Ciprofloxacin	128	256	256	256	128	256	>256
Levofloxacin	32	64	32	32	16	64	64
Ticarcillin/clavulanic acid	64/2	32/2	256/2	32/2	>256/2	>256/2	>256/2
Ceftazidime	64	64	64	64	128	64	128
Cefotaxime	256	256	256	256	>256	>256	>256
Cefepime	16	64	16	64	128	64	128
Trimethoprim/sulfamethoxazole	>16/304	2/38	>16/304	>16/304	2/38	>16/304	>16/304
Ampicillin/sulbactam	ND	ND	ND	ND	ND	16/8	32/16
Colistin	1	2	1	0,5	2	1	1
Tetracycline	8	8	4	8	>128	>128	>128

a- i due isolati del gruppo hanno stessa MIC con eccezione per l'Imipenem nel gruppo C;

b- i valori di MIC sono espressi in mg/L;

c- i valori della MIC dei due isolati erano diversi ma sono riportati entrambi;

ND non fatto, PFGE elettroforesi in campo pulsato, MIC minima concentrazione inibente

Determinanti di resistenza

La ricerca delle principali carbapenemasi di *A. baumannii* mediante PCR Multiplex (Woodford *et al.* 2006) negli isolati del gruppo E ha evidenziato la presenza del gene *bla*_{OXA-23-like}, che è stato confermato come allele OXA-23 mediante sequenziamento del DNA. Tutti gli isolati inoltre possiedono il gene *bla*_{oxa-51-like} tipico di *A. baumannii*. L'amplificazione mediante PCR (Doi and Arakawa 2007) ha inoltre dimostrato la presenza del gene *armA* in tutti i componenti del gruppo E, come le resistenze agli aminoglicosidici suggerivano. Infine, tutti gli isolati

epidemici possiedono un integrone di classe 1, la cui regione variabile presenta una lunghezza di circa 2300 pb e contiene le cassette *aacA4*, *catB8* e *aadA1*. Questa sequenza di cassette geniche è stata già osservata in altre specie batteriche, tra le quali *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Karah *et al.* 2011).

4.1.3 Correlazione con CRAB raccolti nei 5 anni precedenti l'epidemia.

Per chiarire la provenienza del ceppo epidemico, sono stati analizzati tutti i CRAB isolati nello stesso ospedale nei 5 anni precedenti l'epidemia. L'analisi di macrorestrizione di questi ceppi indica che i CRAB isolati nel 2009-2010 appartengono allo stesso cluster del ceppo epidemico (cluster E) e possono quindi essere ritenuti ad esso correlati (Fig. 21). Al contrario, l'unico isolato del 2006 ha un pattern completamente diverso. La correlazione tra gli isolati del 2009-2010 e quelli del 2011 è supportata anche dalla presenza dei geni *blaOXA-23* e *armA* e dello stesso integrone.

Infine, tre isolati "storici" e quattro isolati del periodo epidemico sono stati confrontati mediante analisi MLVA (Hauck *et al.* 2012). Come si può osservare nella Tab. 6 l'isolato 404, raccolto 4 mesi prima dello scoppio dell'epidemia, e gli isolati 408 e 420 presentano un profilo MLVA identico, che è stato preso come rappresentativo del gruppo epidemico. Gli isolati 432 e 463 presentano un livello di similitudine compreso tra il 70% e il 90% con gli isolati 229 e 233 raccolti rispettivamente nel febbraio 2009 e gennaio 2010. Complessivamente questi risultati dimostrano che il ceppo epidemico era già presente nell'ospedale due anni prima dello scoppio dell'epidemia. Il ceppo 199, unico CRAB isolato nel periodo 2006-2008, risulta invece estraneo.

Tabella 6. MLVA di isolati selezionati.

MLVA pattern											
Isolato	<i>Ab_3530</i>	<i>Ab_3002</i>	<i>Ab_2240</i>	<i>Ab_1988</i>	<i>Ab_3406</i>	<i>Ab_0826</i>	<i>Ab_0845</i>	<i>Ab_2396</i>	<i>Ab_3468</i>	<i>Ab_0017</i>	% similitudine con referenza
199	6	8	1	8	10	10	16	20	12	11	10
229	7	7	4	9	10	8	12	17	12	11	70
233	7	7	4	9	8	8	12	17	12	9	70
404	7	7	4	9	8	8	12	16	12	13	100
406	7	7	4	9	8	8	12	20	12	20	80
408	7	7	4	9	8	8	12	16	12	13	100
420	7	7	4	9	8	8	12	16	12	13	100
432	7	7	4	9	8	8	12	20	12	9	80
463	7	7	4	9	8	8	12	16	12	12	90

Gli isolati nel riquadro blu sono stati raccolti durante il periodo epidemico. Tutti gli isolati appartengono al ST 2 e possiedono la β -lattamasi OXA-23-like con l'eccezione dell'isolato 199 del 2006 che appartiene al ST 676 e presenta una β -lattamasi OXA-58-like. Gli isolati 404, 408 e 420 hanno un profilo identico che viene considerato come quello di riferimento del ceppo epidemico per la comparazione degli altri. MLVA, multiple-locus variable number of tandem repeat analysis.

4.1.4 Discussione

La tipizzazione degli isolati raccolti nell'Ospedale di Cattinara, Trieste, ha dimostrato l'ampia prevalenza (89%) di un unico profilo di macrorestrizione, individuato quindi come appartenente ad un cluster epidemico. Il ceppo responsabile apparteneva all'IC-2, presentava resistenza di tipo esteso agli antimicrobici ed era caratterizzato, in particolare, da resistenza ai carbapenemi e a diversi aminoglicosidici (quest'ultima ad alto livello), mentre era sensibile al colistin. La ricerca dei determinanti genici di resistenza ha dimostrato la presenza dei geni *bla*_{OXA-23}, e *armA*. Quest'ultimo codifica una 16S rRNA metilasi, la cui presenza giustifica le alte MIC (>512) di amikacina, gentamicina e tobramicina (Doi and Arakawa 2007). La carbapenemasi *bla*_{OXA-23} è probabilmente responsabile della resistenza ai carbapenemi, dal momento che la ricerca di altri determinanti (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GIM} e *bla*_{OXA143-like}, dati non mostrati) in due isolati presi a campione, ha dato esito negativo.

Uno studio svoltosi in Italia nel 2014 ha dimostrato che nel nostro paese circolano principalmente due cloni di *A. baumannii*, appartenenti ai *Sequence Type* 2 e 78 (Principe *et al.* 2014). Il ST2 è correlato all'IC-2 ed è quello prevalente, mentre il secondo è tipicamente diffuso in Italia ("*Italian clone*"). Inoltre, le carbapenemasi di tipo OXA-23 sono largamente quelle più diffuse. Il ceppo isolato a Trieste rientra quindi bene in questo quadro, ma presenta in più la metilasi ArmA. Prima del caso di Trieste, questa era stata descritta solo una volta in ceppi isolati in Italia, e non è stata più riportata successivamente. E' però interessante notare che nel 2009 in Norvegia è stato descritto un ceppo con le stesse caratteristiche di quello di Trieste (presenza di *bla*_{OXA-23}, *armA* e perfino lo stesso integrone) in un paziente proveniente dall'Italia. E' quindi possibile che la diffusione di questo ceppo nel nostro Paese sia stata sottostimata. L'analisi retrospettiva degli isolati raccolti nell'ospedale di Cattinara negli anni precedenti l'epidemia ha dimostrato, peraltro, che il ceppo epidemico è stato isolato per la prima volta nell'ospedale proprio nel 2009. In quell'anno, il numero d'isolamenti di *A. baumannii* resistente ai carbapenemi è rimasto estremamente limitato (4 isolati in tutto), e di conseguenza il fatto non ha causato particolari allarmi. Tuttavia, le misure di controllo applicate routinariamente non si sono dimostrate efficaci e, a distanza di un paio d'anni, negli otto mesi del 2011 a cui si riferisce lo studio, lo stesso ceppo è stato isolato da 54 pazienti in 14 reparti diversi. Poiché all'inizio sono stati coinvolti pazienti anziani, affetti da malattie croniche, che si sono spostati più volte tra i tre reparti medici dove si è verificata la maggior parte dei casi, è probabile che siano stati proprio questi pazienti a veicolare la disseminazione del ceppo. E' anche degno di nota il fatto che, contrariamente a quanto succede nelle epidemie causate da *A. baumannii*, nel caso di Trieste le ICU sono state interessate solo molto marginalmente.

Questo studio sottolinea quindi la necessità di adottare misure di controllo molto stringenti per il controllo delle infezioni da CRAB, anche in presenza di pochi casi, apparentemente isolati.

4.2 Attività del peptide Bac7(1-35) nei confronti di *A. baumannii*

La maggior parte delle infezioni causate da *A. baumannii* si verifica in pazienti critici, ricoverati in unità di terapia intensiva. Si calcola che *A. baumannii* possa causare fino al 20 % delle infezioni che si manifestano in questi pazienti (Lee *et al.* 2017). Gran parte del successo di questa specie è probabilmente dovuto alla sua straordinaria capacità di acquisire antibiotico-resistenze, capacità che è particolarmente evidente nei ceppi appartenenti ai cloni internazionali 1 e 2, che sono quasi sempre MDR. L'opzione terapeutica di scelta per questi ceppi è costituita dai carbapenemi, ma negli ultimi anni sono stati sempre più frequentemente isolati ceppi resistenti anche a questa classe di antibiotici, tanto che in un report pubblicato nel 2017 l'Organizzazione Mondiale della sanità ha classificato *A. baumannii* tra le specie per le quali lo sviluppo di nuovi antibiotici è di assoluta priorità ("WHO | Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics" 2017). In attesa di nuove molecole attive, la diffusione di ceppi XDR ha forzato la reintroduzione di un farmaco degli anni '60, il colistin, al quale *A. baumannii* è generalmente ancora sensibile, anche se ceppi colistin-resistenti sono già stati riportati (Da Silva and Domingues 2017).

Questa drammatica situazione sollecita la ricerca di nuove alternative terapeutiche, sia di tipo antibiotico, che di tipo diverso. Tra queste ricordiamo ad esempio i fagi, le sostanze di origine vegetale ed i peptidi antimicrobici (Lee *et al.* 2017). Diversi peptidi in grado di inibire la moltiplicazione di *A. baumannii* sono già stati descritti (Benincasa *et al.* 2004; Pires *et al.* 2015; Peng *et al.* 2017). In questa tesi è stata studiata l'attività di Bac7(1-35) verso la formazione di biofilm e la motilità. A questo scopo è stato scelto un pannello di 7 isolati clinici, le cui caratteristiche principali sono riportate in Tab. 7. Il pannello comprende isolati non geneticamente correlati, provenienti da materiali diversi. Sono stati inclusi sia rappresentanti dei due principali cloni internazionali (uno dei quali appartenente al clone epidemico descritto nei paragrafi precedenti) che ceppi al di fuori di que-

sti. Il ceppo tipo della specie *A. baumannii* (ATCC 19606) è stato inserito per confronto.

Tabella 7. Caratteristiche dei ceppi di *A. baumannii* utilizzati

Ceppo	Luogo e anno di isolamento	Origine	Clone	Profilo di resistenza	Biofilm [§]	Referenze*
56A	PD, 1990	Catetere vascolare	S		0,548±0,093	A
215B	TS, 2007	Sangue	S	MDR	0,91±0,121	B
39A	PD, 1990	Sangue	S		0,592±0,105	A
7B	TS, 1996	Aspirato bronchiale	1	MDR	0,271±0,032	A
420	TS, 2011	Urine	2	XDR	0,25±0,043	B
105B	Aviano, 1997	Catetere vascolare	S		0,569±0,085	A
3B	TS, 1996	Aspirato bronchiale	S		0,814±0,087	A

*A: Gombac *et al.* 2002; B: Milan *et al.* 2016

[§]La produzione di biofilm è stata valutata con il metodo del cristalvioletto (Stepanović *et al.* 2007). Viene riportata la media delle letture della DO₅₇₀ basata su almeno 3 esperimenti ±SEM.

4.2.1 Attività antibatterica di Bac7(1-35)

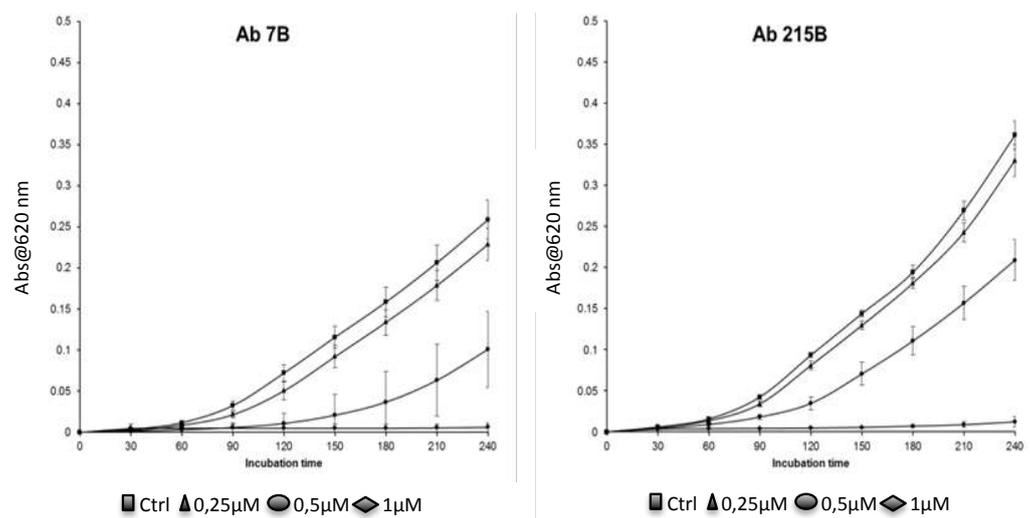
L'attività antimicrobica del peptide Bac7(1-35) è stata analizzata con il metodo della microdiluizione in brodo. Il peptide ha mostrato di inibire la crescita di tutti gli isolati a basse concentrazioni, con valori di MIC compresi tra 2 e 4 µM (corrispondenti a 8,4 e 16,8 µg/mL) (Tab. 8).

Tabella 8. Attività antimicrobica di Bac7(1-35) nei confronti di *A. baumannii*

Ceppo	MIC ^a (μ M)	Ceppo	MIC ^a (μ M)
420	4	39A	2
7B	4	3B	4
56A	4	215B	2
105B	2	ATCC 19606	4

^aI valori di MIC derivano da 3 esperimenti indipendenti con risultati comparabili.

La sensibilità di 7 ceppi al peptide Bac7(1-35) è stata controllata anche mediante lo studio della curva di crescita (Fig. 22). Con questa tecnica è possibile osservare gli effetti sulla crescita batterica nelle prime 4 ore dopo l'aggiunta della sostanza antibatterica. Dall'immagine si osserva che l'effetto del peptide utilizzato ad una concentrazione sub-inibente è diverso negli isolati testati, nonostante il valore di MIC sia comparabile per tutti. La cinetica di crescita dei ceppi 7B, 215B e 420 viene rallentata ad una concentrazione di 0,5 μ M (2,1 μ g/mL) e completamente inibita a 1 μ M (4,2 μ g/mL). Quest'ultima concentrazione causa un effetto molto meno evidente nei ceppi 3B, 39A e 105B e risulta essere completamente inefficace nei confronti del ceppo 56A.



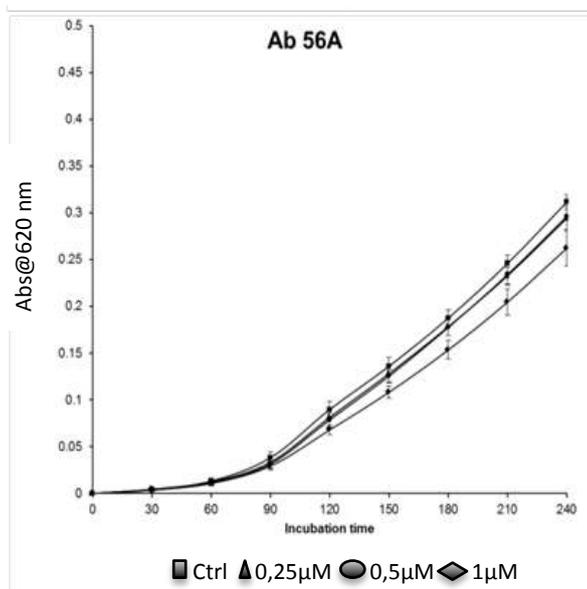
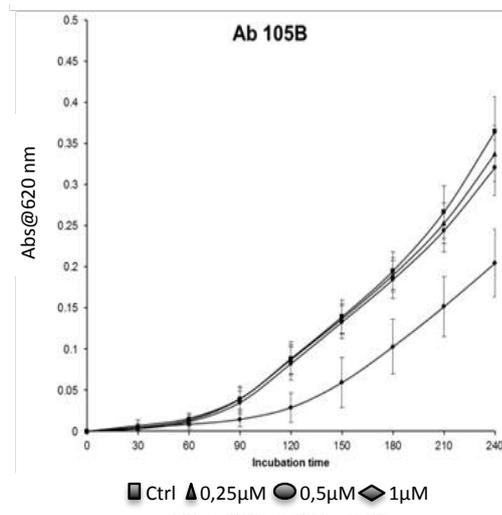
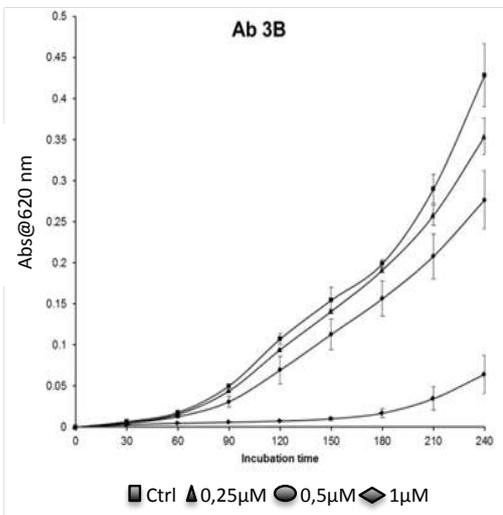
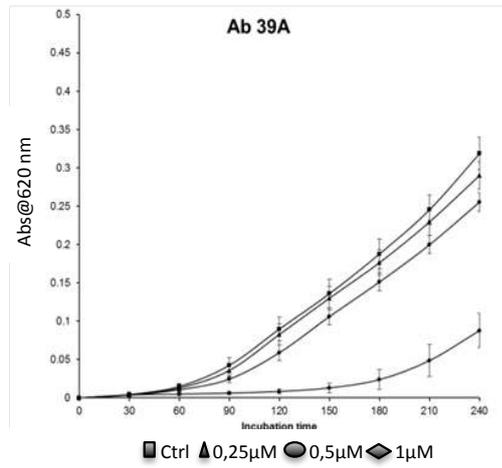
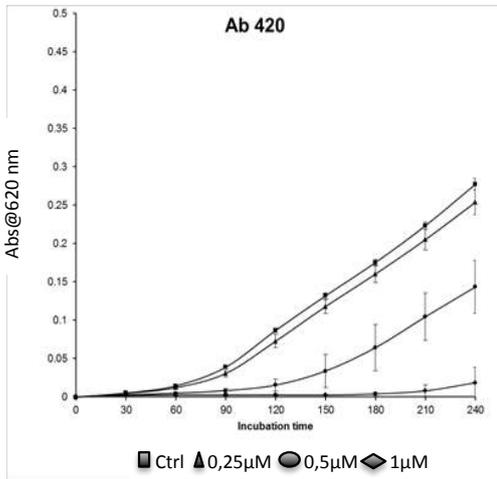


Fig. 22. Cinetica di crescita di *A. baumannii* in presenza di Bac7(1-35) a concentrazioni sub-inibenti. I risultati sono la media \pm la deviazione standard di 3 analisi indipendenti.

4.2.2 Inibizione della formazione del biofilm

L'attività di inibizione della formazione del biofilm di *A. baumannii* del peptide Bac7(1-35) è stata valutata sia con il metodo del cristal violetto (CV) (Stepanović *et al.* 2007) che mediante esperimenti di microscopia confocale.

Con la tecnica del CV si è osservato che il peptide, utilizzato ad una concentrazione di 1 μ M (4,2 μ g/mL), causa un'inibizione della formazione del biofilm che varia dal 15 all'84%; a concentrazioni più basse invece 3 ceppi (7B, 215B e 39A) presentano un apparente incremento della produzione del biofilm (fino al 32%), probabilmente dovuto ad un meccanismo di difesa attivato dai batteri in condizioni di stress (Fig. 23).

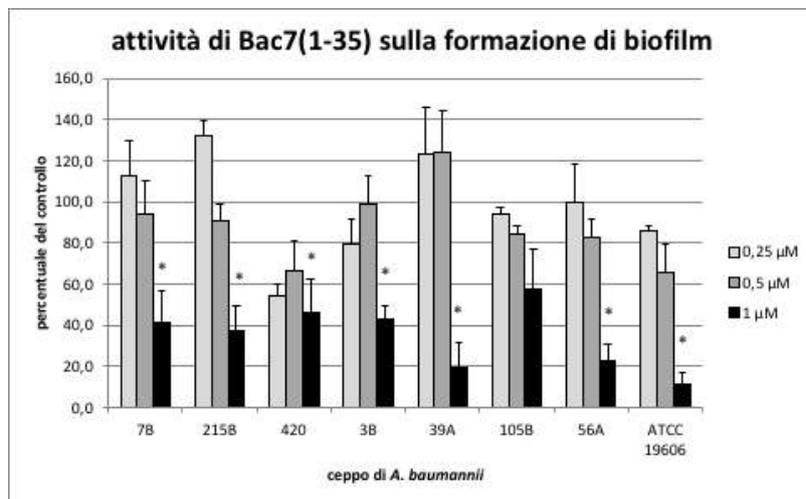


Fig. 23. Attività del peptide Bac7(1-35) sulla formazione del biofilm. I dati sono espressi come percentuale sul controllo \pm SEM e sono la medie di tre esperimenti eseguiti in triplicato. * $p < 0,01$, test Anova.

Per capire nel dettaglio l'azione del peptide sono stati condotti esperimenti di microscopia confocale. Il biofilm in questo caso è stato fatto crescere, per esigenze tecniche, su vetrino per 24 ore, fissato e colorato con la sonda fluore-

scente Acridine Orange. Nel confrontare la produzione del biofilm prodotto negli esperimenti condotti con il CV e in microscopia confocale è da tenere conto che il differente substrato utilizzato potrebbe alterarne lo sviluppo.

Le immagini mostrano delle differenze notevoli nella produzione di biofilm da parte dei ceppi studiati (Fig. 24) sia per quanto riguarda la quantità che la struttura.

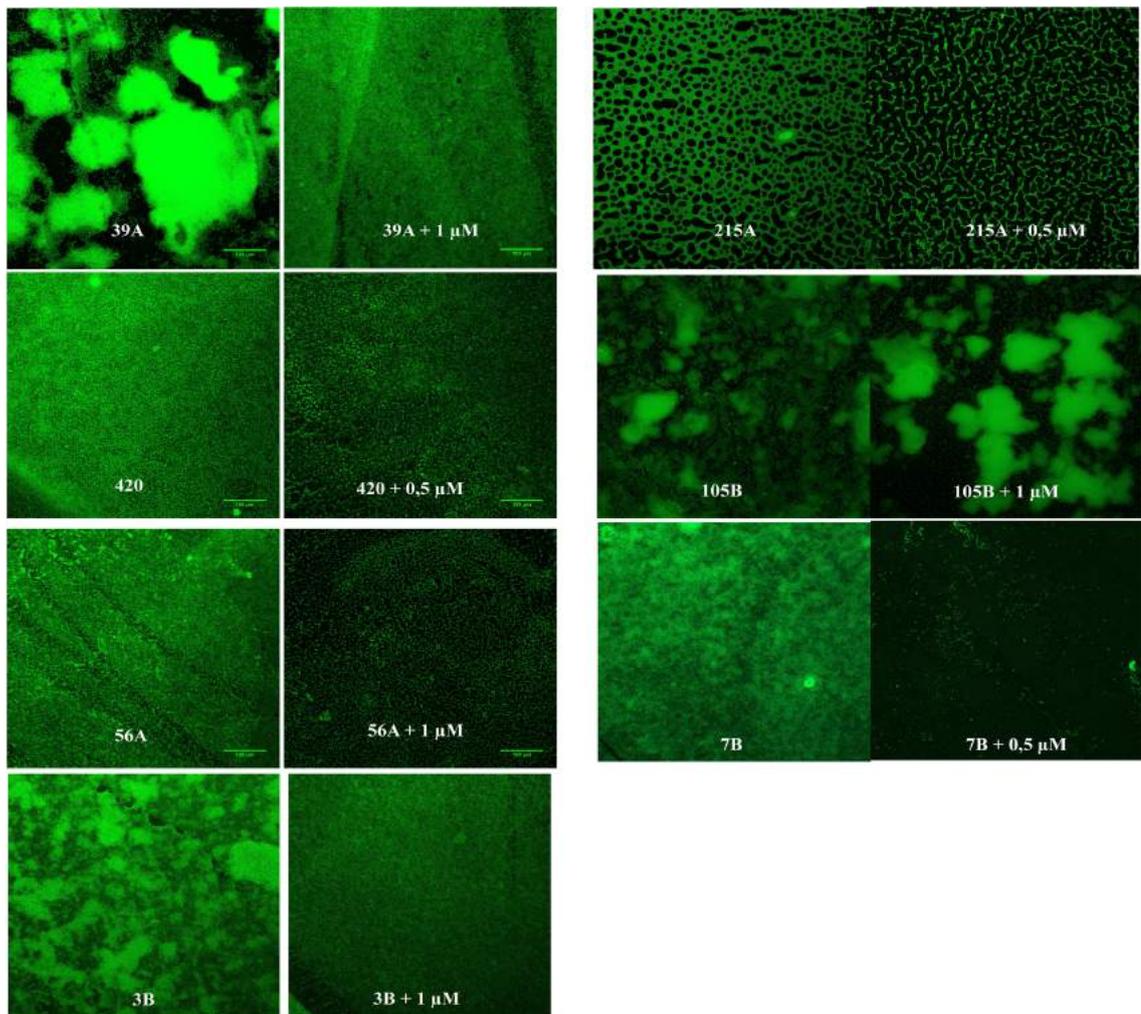


Fig. 24. Microscopia confocale del biofilm dei ceppi di *A. baumannii* senza e con Bac7(1-35) 1 μ M (4,2 μ g/mL); obj 20x-dry.

I ceppi 39A, 105B e 3B formano dei grandi aggregati, il ceppo 215B forma una specie di reticolo e gli altri ceppi danno origine a un biofilm piuttosto omogeneo. Le immagini mostrano anche il risultato del trattamento con Bac7(1-

35). La concentrazione di Bac7(1-35) riportata in figura per i diversi ceppi (0,5 o 1 μM) è la più alta concentrazione che permette di apprezzare la struttura del biofilm residuo. Bac7(1-35) inibisce completamente la formazione dei macro-aggregati nei ceppi 3B e 39A, mentre non ha nessun effetto sul ceppo 105B. La struttura del biofilm formato dagli altri ceppi risulta diradata in seguito al trattamento. Questo effetto, che è dose dipendente, si può apprezzare meglio osservando l'elaborazione tridimensionale del biofilm, come mostrato, a titolo di esempio, per il ceppo 3B (Fig. 25).

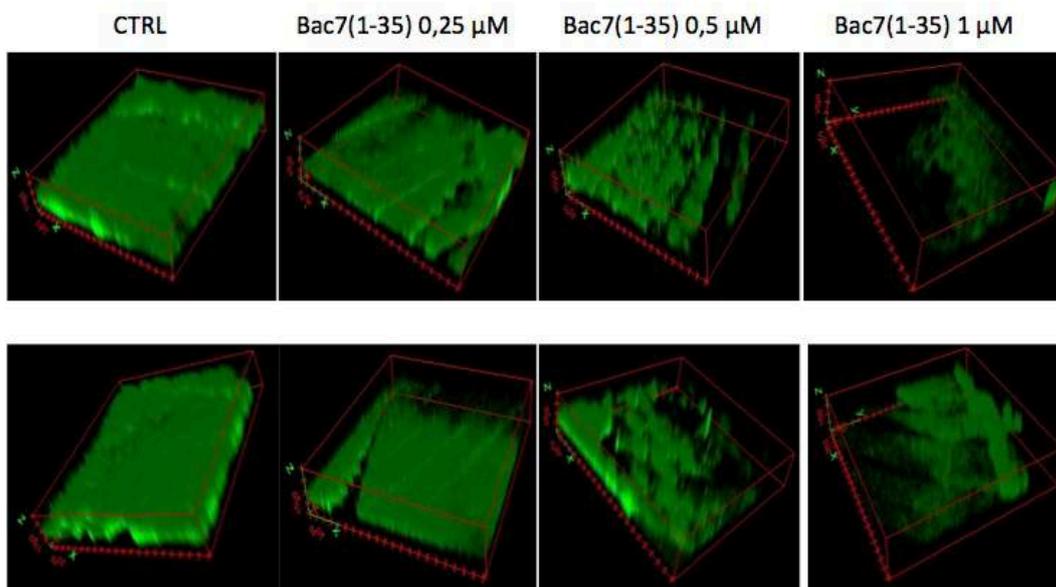


Fig. 25. Immagine tridimensionale della struttura del biofilm con l'aggiunta del peptide Bac7(1-35) a diverse concentrazioni.

L'analisi semi-quantitativa effettuata mediante il software COMSTAT (Heydorn *et al.* 2000) ha evidenziato come la maggior parte dei ceppi risponda alla presenza di Bac7(1-35) con un calo della biomassa totale rispetto ai controlli, anche se in misura diversa. Ad esempio, il ceppo 7B sembra essere molto sensibile all'effetto inibente di Bac7(1-35), mentre il ceppo 105B lo è molto meno. In presenza di Bac7(1-35) 1 μM i ceppi subiscono un calo di biomassa compreso tra il 15 e il 98%. Fa eccezione il ceppo 39A, per il quale il campione contenente Bac7(1-35) 1 μM non differisce significativamente dal controllo. In molti casi si osserva un effetto d'inibizione anche a concentrazioni inferiori di Bac7(1-35), so-

lo il ceppo 56A sembra aumentare la quantità di biofilm prodotto alla concentrazione sub-inibente dello 0,25 μM (1 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 26).

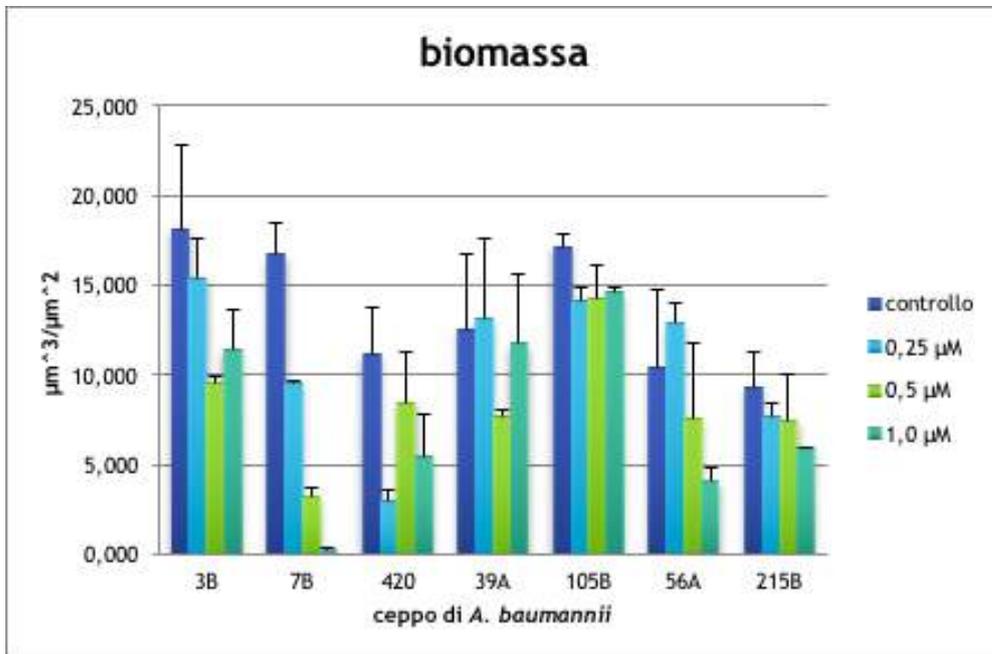


Fig. 26. Analisi semi-quantitativa della biomassa del biofilm prodotto da *A. baumannii* in assenza (controllo) o in presenza di Bac7(1-35) a concentrazioni sub-inibenti. Media di due esperimenti con due letture ciascuno \pm SEM.

Risulta inoltre evidente che il peptide altera la struttura del biofilm di tutti i ceppi, aumentando l'eterogeneità dell'organizzazione tridimensionale. Questo dato è indicato dall'aumento del coefficiente di rugosità (Fig. 27), che si verifica nei campioni trattati con Bac7(1-35) di tutti i ceppi. La cosiddetta rugosità fornisce una misura di quanto lo spessore del biofilm cambi sulla superficie, indicando di conseguenza l'eterogeneità della struttura (Heydorn *et al.* 2000).

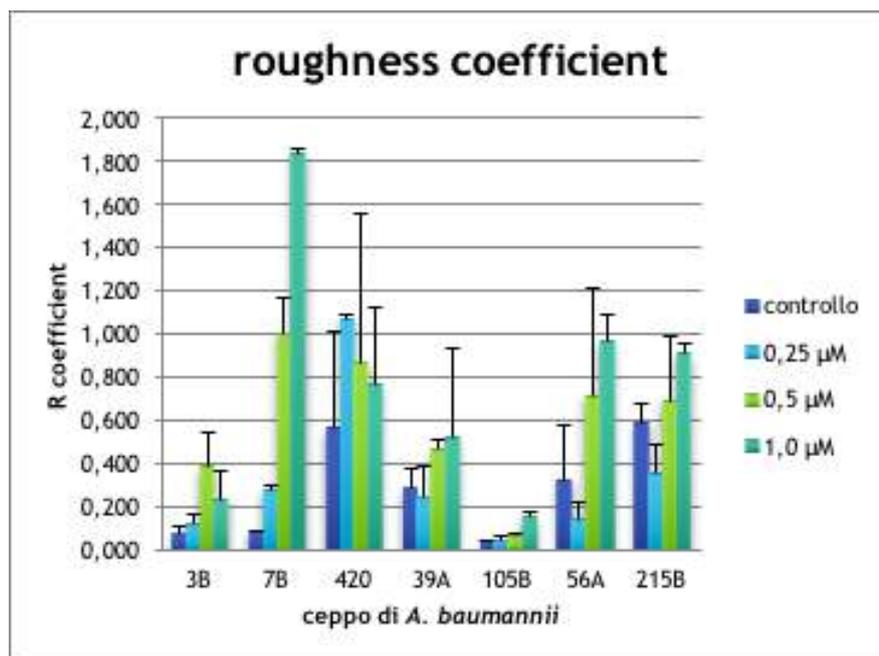


Fig. 27. Coefficiente di rugosità calcolato mediante software COMSTAT del biofilm prodotto da *A. baumannii* in assenza (controllo) o in presenza di Bac7(1-35) a concentrazioni sub-inibenti. Media di due esperimenti con due letture ciascuno \pm SEM.

4.3 Effetto del peptide Bac7(1-35) sulla motilità di *A. baumannii*

La motilità di *A. baumannii* risulta essere ancora oggetto di controversie tra i microbiologi; diversi articoli, anche di recente pubblicazione, continuano a descrivere questo microrganismo come immobile, ma in realtà esso può presentare diversi tipi di movimento, che includono *twitching*, *sliding* e *ditching*. Questi movimenti non sono però presenti in tutti gli isolati (Skiebe *et al.* 2012).

I sette isolati di questo studio sono stati analizzati per controllare la presenza di motilità superficiale (*sliding* o *ditching*) e all'interfase (*twitching*). Tutti gli isolati hanno dimostrato di avere motilità superficiale, che solo nel caso del ceppo 3B assumeva forma di *ditching* (Fig. 28A). Tuttavia, il movimento era molto irregolare e si prestava male ad un'analisi quantitativa. Cinque ceppi mostravano motilità di tipo *twitching* all'interfase. In questo caso, venivano formate delle

aree di diffusione circolari facilmente misurabili (Fig. 28B), per cui è stato deciso di valutare l'effetto di Bac7(1-35) su questo tipo di motilità.

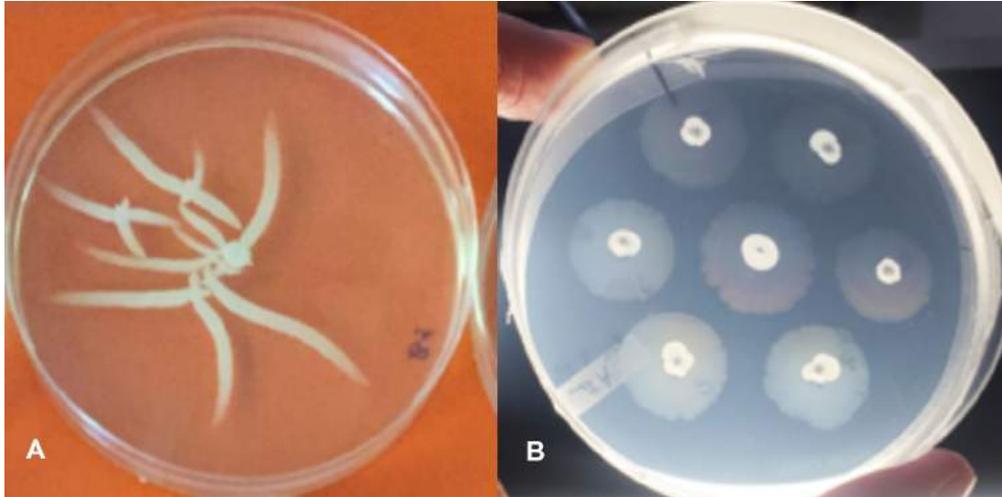


Fig. 28. Diversi tipi di motilità di *A. baumannii*. A: motilità *ditching* del ceppo 3B. B: motilità di tipo *twitching* all'interfase del ceppo 7B.

A questo scopo, i batteri in fase logaritmica di crescita sono stati esposti a concentrazioni sub-letali del peptide per 30 minuti, trascorsi i quali esso è stato allontanato e i batteri sono stati inoculati nel terreno. L'esposizione a Bac7(1-35) riduce le aree di diffusione di 4 ceppi su 5 già alla concentrazione più bassa tra quelle utilizzate, ovvero $0,25 \mu\text{M}$ ($1 \mu\text{g/mL}$) (Fig. 29). L'inibizione della motilità è dose dipendente. Il ceppo 105B fa eccezione, in quanto non risente dell'attività del peptide neanche alla concentrazione più alta testata ($1 \mu\text{M}$ - $4,2 \mu\text{g/mL}$) (Fig. 29).

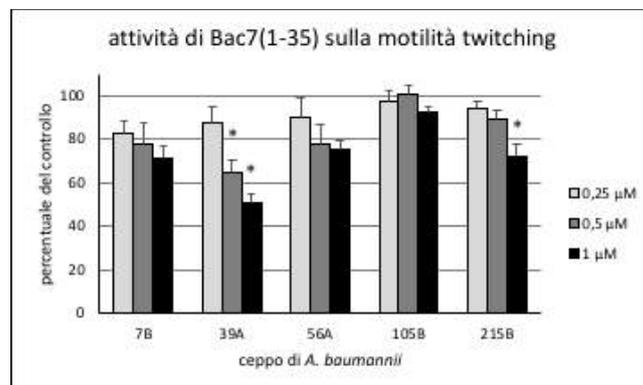


Fig. 29. I valori sono espressi come percentuali sul controllo basate sui diametri delle aree di diffusione. Media di tre esperimenti eseguiti in triplicato \pm SEM. * $p < 0,01$, test di Anova.

Per controllare che l'inibizione non dipendesse dall'effetto battericida del peptide, è stata verificata la vitalità delle cellule batteriche a seguito di un trattamento identico a quello effettuato per lo studio della motilità, utilizzando Bac7(1-35) 0,5 μM (2,1 $\mu\text{g/mL}$). Dopo 30' di esposizione non si osserva una diminuzione del numero di CFU/mL in alcun ceppo rispetto all'inoculo iniziale (Fig. 30). Inoltre è possibile osservare un effetto batteriostatico del peptide su tutti i ceppi tranne il 56A, come del resto gli esperimenti di cinetica di crescita facevano supporre.

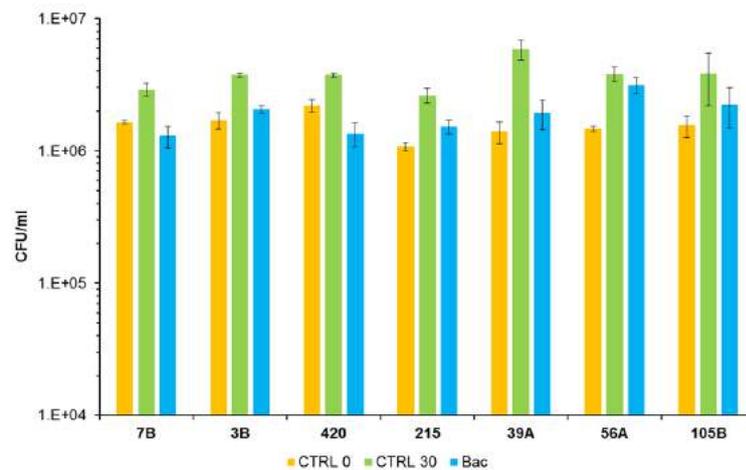


Fig. 30. Conte vitali di *A. baumannii* dopo trattamento di 30' con Bac7(1-35) 0,5 μM . CTRL 0 = controllo al tempo 0; CTRL 30 = controllo dopo 30 minuti a 37°C, senza peptide; Bac = Batterii trattati con Bac7(1-35) per 30 minuti. Media di tre esperimenti \pm SEM

Tuttavia, per l'effetto combinato della crescita batterica nei controlli e dell'attività batteriostatica del Bac7(1-35) nei trattati, dopo 30 minuti d'incubazione il numero dei batteri trattati è un po' più basso di quello dei controlli (Fig. 30). È stato perciò effettuato un ulteriore esperimento, mirato a verificare l'influenza di un calo di CFU sulla motilità. A questo scopo, sono state confrontate le aree di diffusione ottenute dopo trattamento con Bac7(1-35) e dopo diluizione 1:10 o 1:30 del controllo. Un esempio di risultati è mostrato in figura 31: come si può vedere, è necessario diluire il ceppo 39A di ben 30 volte per ottenere un effetto sulla motilità comparabile a quello di 30 minuti di trattamento con Bac7(1-35) 0,5 μM (2,1 $\mu\text{g/mL}$). L'inibizione della motilità non sembra quindi essere dovuta ad un calo di vitalità.

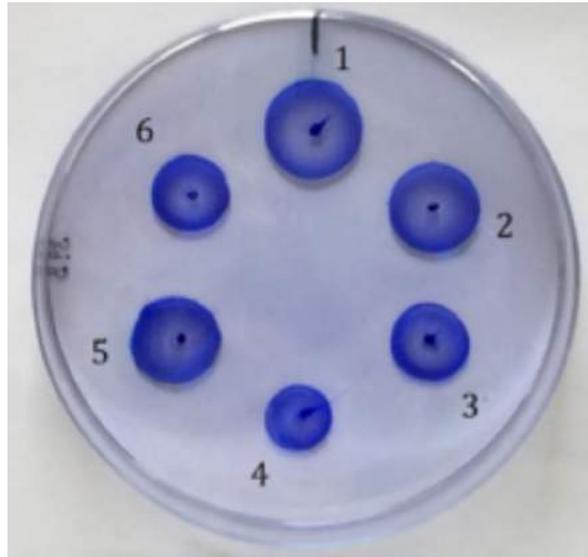


Figura 31. Aloni di diffusione del ceppo 39A. 1: controllo; 2: trattato con 0,25 μM Bac7(1-35); 3: trattato con 0,5 μM Bac7(1-35); 4: trattato con 1 μM Bac7(1-35); 5: diluizione 1:10 del controllo; 6: diluizione 1:30 del controllo.

4.4 Internalizzazione del peptide Bac7(1-35) nelle cellule di *A. baumannii*

Per valutare se il peptide Bac7(1-35) fosse in grado di entrare nelle cellule di *A. baumannii* e se ci fossero delle differenze nel livello di internalizzazione dei diversi ceppi sono stati effettuati degli esperimenti di citofluorimetria con Bac7(1-35)-BY, in collaborazione con le proff. Benincasa e Pacor, dell'Università di Trieste. Dopo 30' di trattamento delle cellule con il peptide ad una concentrazione pari allo 0,5 μM (2,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), i batteri sono stati analizzati con e senza la molecola *quencher* Trypan Blue. I dati ottenuti indicano una buona entrata del peptide anche se a livelli diversi in base al batterio analizzato (Fig. 32); infatti i ceppi 7B, 3B, 420 e 215B mostrano una buona fluorescenza intracellulare, che risulta invece inferiore nei batteri 39A, 56A e 105B.

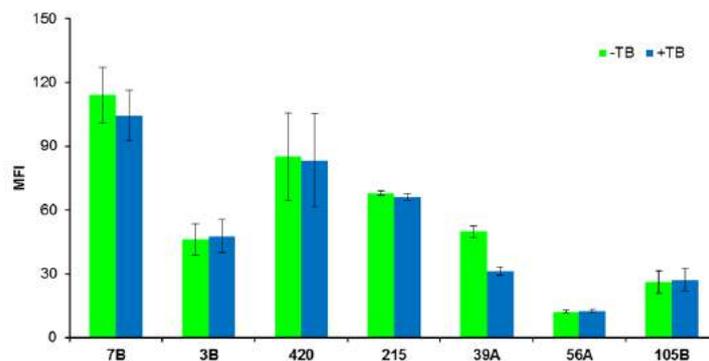


Fig. 32. Valutazione del livello d'internalizzazione del peptide Bac7(1-35) all'interno di *A. baumannii*. MFI: Intensità Media della Fluorescenza. Media di tre esperimenti \pm SEM

4.5 Discussione

Lo scopo del lavoro svolto è stato quello di valutare gli effetti del peptide Bac7(1-35) su due caratteristiche di *A. baumannii* correlate alla virulenza, ovvero la capacità di formare biofilm e la motilità.

Lo studio è stato condotto su un pannello di sette ceppi, scelti per la loro diversità di lignaggio e di capacità di produrre biofilm (Tab. 7).

Il peptide ha dimostrato di avere MIC comparabili verso le forme planctoniche dei ceppi, con valori compresi tra 2 e 4 μ M (8,4 e 16,8 μ g/mL) (Tab. 8). Tuttavia, lo studio delle curve di crescita in presenza di quantità sub-inibenti di Bac7(1-35) ha permesso di dividere i ceppi in tre gruppi: il primo (7B, 215B e 420) costituito da ceppi molto sensibili, che presentano un calo di crescita già con Bac7(1-35) 0,5 μ M (2,1 μ g/mL); un secondo gruppo (39A e 3B) di suscettibilità intermedia, che viene inibito da Bac7(1-35) 1 μ M (4,2 μ g/mL); ed infine un terzo gruppo (105B e 56B), poco sensibile, la cui crescita viene inibita poco o nulla anche da quest'ultima concentrazione del peptide (Fig. 22). Lo studio delle curve di crescita si è rivelato utile per valutare l'effetto del peptide sulla crescita delle cellule in forma planctonica e ha permesso di evidenziare delle differenze di suscettibilità che con le MIC non erano state colte.

Per studiare l'effetto del peptide sulla formazione di biofilm è stata dapprima usata la quantificazione mediante colorazione con cristal violetto. In questo

saggio il comportamento dei vari ceppi è risultato piuttosto diversificato: alla concentrazione più alta (1 μM (4,2 $\mu\text{g/mL}$), pari a $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{4}$ della MIC) tutti i ceppi mostravano una riduzione della quantità di biofilm prodotto. Alle concentrazioni inferiori, però, alcuni ceppi risultavano inibiti, mentre altri sembravano produrre più biofilm (Fig. 23). Anche se il cristal violetto lega il DNA, presente soprattutto nel nucleotide delle cellule, non è facile stabilire se le variazioni riscontrate siano dovute ad una diminuzione delle cellule attaccate al substrato o ad una variazione di produzione della matrice. Un aumento di produzione di quest'ultima potrebbe avere il significato di una reazione di difesa da parte dei batteri in seguito all'esposizione alla sostanza tossica.

Per studiare più approfonditamente l'effetto del Bac7(1-35), le immagini del biofilm sviluppatosi per 24 ore con e senza peptide sono state acquisite al microscopio confocale (Fig. 24). Queste hanno prima di tutto evidenziato delle differenze notevoli nella struttura del biofilm formato dai diversi ceppi. I ceppi 39A, 105B e 3B formano dei grandi aggregati, il ceppo 215B forma una specie di reticolo e gli altri ceppi danno origine ad un biofilm omogeneo. Non sempre il dato quantitativo ottenuto con il cristal violetto correla con le immagini acquisite al microscopio confocale. Tuttavia, i ceppi che formano i macro-aggregati risultano produttori medio-forti anche con il primo metodo, mentre i ceppi 420 e 7B, che risultano scarsi produttori con il cristal violetto (Tab. 7), al confocale mostrano una struttura piatta e piuttosto omogenea (Fig. 24).

L'effetto più evidente della presenza di Bac7(1-35) nel terreno di crescita durante la formazione del biofilm è l'inibizione della formazione dei grandi aggregati prodotti dai ceppi 39A e 3B. Entrambi sono produttori medio-forti (Tab. 7) e mostrano una suscettibilità intermedia per quanto riguarda la cinetica di crescita (Fig. 22). Il ceppo 105B, che forma macro aggregati simili a quelli dei primi due ceppi, risulta invece completamente insensibile all'azione del peptide: infatti gli aggregati vengono formati anche in presenza di Bac7(1-35) 1 μM (4,2 $\mu\text{g/mL}$) (Fig.24). Interessante notare che questo ceppo è poco sensibile anche nei saggi di crescita (Fig. 22).

Elaborando le immagini con il software COMSTAT, si è visto che il peptide provoca un calo nella biomassa del biofilm in tutti i ceppi, anche se in quantità diverse. In particolare, il ceppo 105B mostra un calo molto esiguo, in accordo con quanto rilevato visivamente (Fig. 26). Infine, l'esposizione al peptide provoca in tutti i ceppi un aumento del coefficiente di rugosità, che testimonia un'aumentata eterogeneità della struttura, probabilmente legata al diradamento.

I saggi di motilità *twitching* hanno dimostrato che l'esposizione delle cellule batteriche a concentrazioni sub-inibenti di peptide per 30 minuti è in grado di inibire la motilità di 4 ceppi di *A. baumannii* dei 5 testati. Il ceppo non sensibile è ancora una volta il 105B. Tutti gli altri mostrano un'inibizione dose-dipendente, che è già evidente, anche se non molto pronunciata, alla concentrazione 0,25 μM (1 $\mu\text{g/mL}$) di peptide, che è 8-16 volte inferiore alla MIC. I controlli effettuati inoltre dimostrano che le condizioni in cui sono stati effettuati gli esperimenti non sono tali da provocare un calo di vitalità dei batteri. L'effetto anti motilità, quindi, sembra essere diverso dall'uccisione delle cellule e basarsi su un meccanismo alternativo, al momento non conosciuto.

E' noto che Bac7(1-35) penetra nelle cellule di *E. coli* ed interagisce con delle proteine ribosomiali (Mardirossian *et al.* 2014). Gli esperimenti di *uptake* condotti con il peptide bodipilato hanno dimostrato che anche *A. baumannii* è in grado d'internalizzare il peptide, anche se non tutti i ceppi lo fanno con la stessa efficienza (Fig. 32). E' possibile notare una certa correlazione tra la suscettibilità/resistenza di un ceppo e la quantità di peptide internalizzato: ad esempio, i ceppi 7B, 420 e 215B, inseriti nel gruppo dei più sensibili per quanto riguarda le curve di crescita e che mostrano un calo di produzione di biomassa in presenza di Bac7(1-35), sembrano avere un sistema di *uptake* molto efficiente. Al contrario, il ceppo 105B, risultato poco o per nulla sensibile al peptide in tutti i saggi effettuati, ha una capacità molto bassa d'internalizzare il peptide. Tuttavia, l'internalizzazione non spiega completamente le osservazioni fatte: il ceppo 56A, apparentemente quello con *uptake* meno efficiente, sembra essere sensibile all'inibizione della formazione di biofilm.

In conclusione, il peptide Bac7(1-35) agisce anche in *A. baumannii* penetrando nelle cellule, che sono quindi dotate di un trasportatore analogo a SbmA (Runti *et al.* 2013), ed interferisce con il metabolismo cellulare. Gli effetti osservati sulla formazione del biofilm e sulla motilità, che si manifestano a concentrazioni molto più basse di quelle battericide, potrebbero essere dovuti a meccanismi diversi da quelli che portano alla morte dei batteri. I possibili bersagli, che potrebbero includere, ad esempio, la regolazione della crescita in biofilm e la produzione di adesine o di pili di tipo IV, saranno oggetto di studi successivi.

5. Risultati: *Klebsiella pneumoniae* (Benincasa *et al.* 2016)

Diversi studi hanno evidenziato che il legame di antimicrobici di natura peptidica a EPS prodotti da patogeni può comportare la perdita della loro attività (Campos *et al.* 2004; Herasimenka *et al.* 2005; Llobet, Tomás, and Bengoechea 2008). Lo studio di seguito riportato ha voluto investigare il possibile ruolo di protezione svolto dalla matrice di *K. pneumoniae* nei confronti di BMAP-27 e Bac7(1-35). Lo studio, che ha voluto anche verificare che le modalità di azione dei due peptidi in *K. pneumoniae* fossero le stesse che in altri batteri Gram-negativi, è stato condotto su due ceppi, entrambi produttori di abbondante materiale extracellulare, ma con caratteristiche diverse.

5.1 Attività dei peptidi Bac7(1-35) e BMAP-27 su *K. pneumoniae*.

5.1.1 Caratteristiche dei ceppi batterici utilizzati

Sono stati selezionati ed analizzati due ceppi di *K. pneumoniae*, entrambi isolati da campioni di urine: KpTs101, in grado di creare un abbondante biofilm che rimane saldamente adeso alle superfici e KpTs113, produttore di un'abbondante matrice extracellulare con scarsa capacità di adesione alle superfici. Le immagini al microscopio confocale mostrano infatti una evidente differenza nella quantità di matrice adesa alla superficie di un vetrino dopo 24 di crescita (Fig. 33).

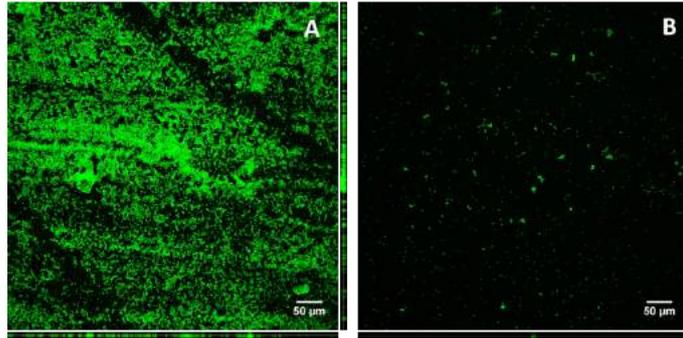


Figura 33. Biofilm prodotto da KpTs101 (A) e da KpTs113 (B) su vetrini osservati al microscopio confocale dopo colorazione con Acridine Orange. Acquisizioni delle Z-stacks con ingrandimento 20x ogni μm .

5.1.2 Analisi delle MIC e delle cinetiche di crescita

Le analisi preliminari di suscettibilità dei due ceppi nei confronti dei peptidi antimicrobici Bac7(1-35) e BMAP-27 sono state condotte con il metodo della microdiluzione in brodo; entrambi i ceppi nella forma planctonica sono sensibili all'azione dei peptidi con un valore di MIC pari a $2 \mu\text{M}$ per KpTs101 e $1 \mu\text{M}$ per KpTs113.

L'effetto di Bac7(1-35) e BMAP-27 sulla crescita di *K. pneumoniae* è stato valutato anche mediante l'esecuzione di cinetica di crescita, che permettono di ottenere informazioni più dinamiche rispetto alla MIC su quella che è l'azione dei peptidi. A questo scopo, i batteri sono stati fatti crescere in presenza di concentrazioni sub-inibenti dei peptidi ed è stata registrata la densità ottica della sospensione per le prime 4 ore. Come è possibile osservare dai grafici, l'aggiunta del peptide Bac7(1-35) causa un'inibizione della crescita già percepibile alla concentrazione $0,25 \mu\text{M}$ ($1 \mu\text{g/mL}$) e che diventa più significativa a $0,5-1 \mu\text{M}$ ($2,1-4,2 \mu\text{g/mL}$) (Fig. 34 A e C). Il ceppo KpTs113 sembra essere di poco più suscettibile di KpTs101. Analogamente, la crescita dei batteri viene rallentata dall'aggiunta di BMAP-27 a $0,25$ ($0,8 \mu\text{g/mL}$) e $0,5 \mu\text{M}$ ($1,6 \mu\text{g/mL}$), significativamente ridotta a $1 \mu\text{M}$ ($3,3 \mu\text{g/mL}$) e completamente inibita a $2 \mu\text{M}$ ($6,6 \mu\text{g/mL}$)

(Fig. 34 B e D). In questo caso non sembrano esserci differenze significative tra i due ceppi.

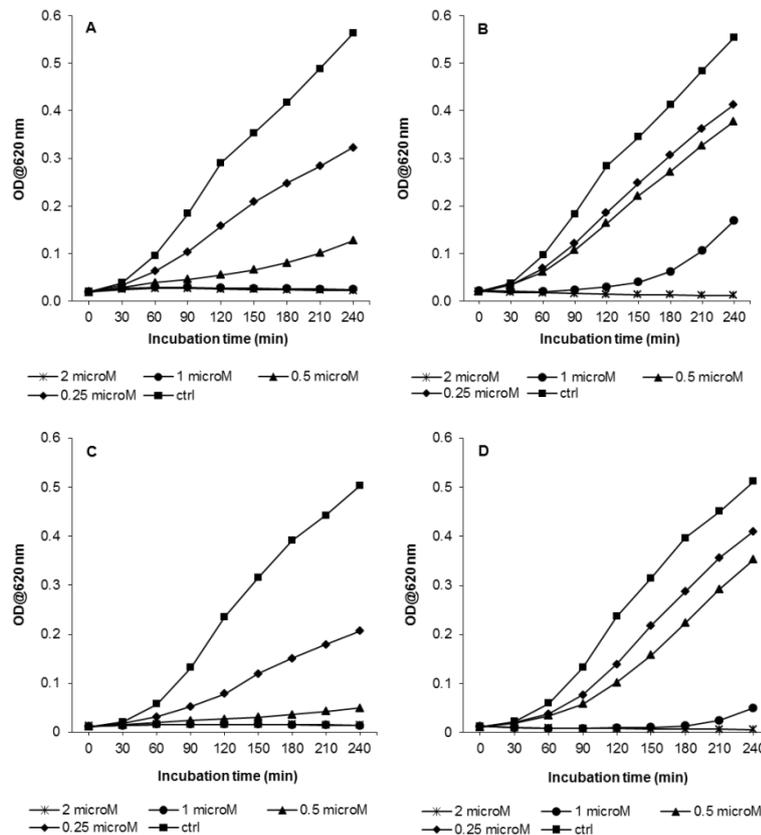


Figura 34. Cinetica di crescita dei ceppi KpTs101 (A e B) e KpTs113 (C e D) in presenza di Bac7(1-35) (A e C) e BMAP-27 (B e D). L'OD₆₂₀ è stata misurata ogni 10' e il risultato è la media di tre esperimenti indipendenti.

5.1.3 Internalizzazione del peptide Bac7(1-35)

Nei batteri provvisti di specifici trasportatori proteici il peptide Bac7(1-35) viene internalizzato nella cellula batterica, dove esplica la sua azione antibiotica. Per capire se ciò avvenga anche in *K. pneumoniae* sono stati condotti esperimenti di internalizzazione del peptide associato alla molecola fluorescente BODIPY. I batteri trattati con Bac7(1-35)-BY sono stati inoltre incubati con la molecola *quencher* Trypan Blue (TB) che, non penetrando all'interno della cellula integra, permette di distinguere la fluorescenza derivante solo dal peptide realmente pre-

sente nel batterio. Dopo un trattamento di 10' a concentrazioni sub-inibenti e non permeabilizzanti di Bac7(1-35), l'intensità della fluorescenza non viene ridotta dall'azione del TB, indicando una totale e rapida internalizzazione del peptide in entrambi i ceppi (Fig. 35). Il valore dell'Intensità Media di Fluorescenza (MFI) risulta essere maggiore per il ceppo KpTs113, in accordo con i risultati ottenuti dagli esperimenti di MIC e di cinetica di crescita, che indicano una maggiore sensibilità di questo ceppo al peptide.

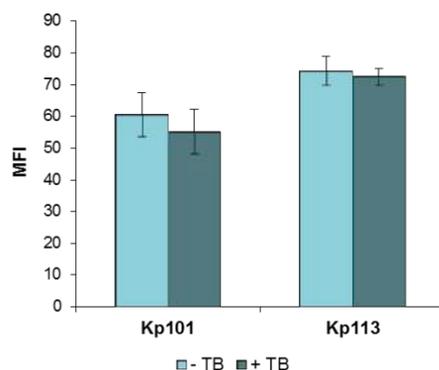


Figura 35. Internalizzazione del peptide Bac7(1-35)-BY nelle cellule di *K. pneumoniae* KpTs101 e KpTs113.

5.1.4 Effetto litico del peptide BMAP-27

L'effetto permeabilizzante del peptide BMAP-27 è stato osservato con la tecnica dell'internalizzazione dello Ioduro di Propidio (PI) nelle cellule planc- toniche. Degli istogrammi della figura 36 risulta che il danno a livello della mem- brana per il ceppo KpTs101 si verifica dopo 30' già a concentrazioni sub-MIC: a 0,25 μ M (0,8 μ g/mL) il 30-40% delle cellule risultano rotte e l'effetto aumenta in modo dose-dipendente. L'azione litica risulta meno evidente in KpTs113 ma sempre con un andamento dipendente dalla concentrazione. Alla concentrazione di 1 μ M (3,3 μ g/mL) entrambi i ceppi risultano avere il 70-80% delle cellule posi- tive al PI, indicando che l'effetto di questo peptide è principalmente dovuto alla sua azione litica.

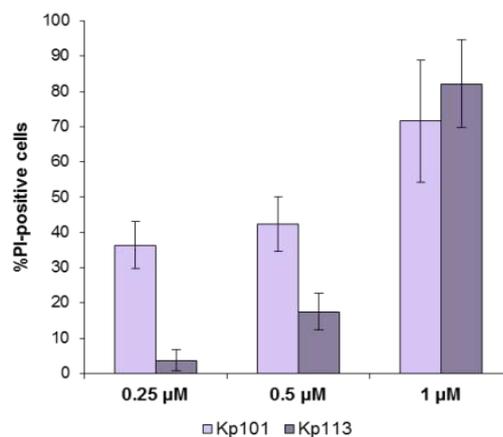


Figura 36. Valutazione del danno indotto da BMAP-27 a livello della membrana dei ceppi KpTs101 e KpTs113.

5.1.5 Effetto dei peptidi sulla formazione del biofilm di KpTs101

Per valutare se la presenza dei due peptidi antimicrobici potesse inibire la formazione del biofilm prodotto da *K. pneumoniae*, KpTs101 è stato fatto crescere per 24 ore insieme a Bac7(1-35) e BMAP-27 utilizzati a concentrazioni sub-inibenti. La produzione del biofilm è stata valutata con il metodo del CV (Stepanović *et al.* 2007) ed espressa come biofilm index (BI), ovvero come il rapporto della quantità di biofilm prodotto in base alla crescita cellulare di quel pozzetto (OD_{570}/OD_{590}), per normalizzare il risultato ottenuto con la crescita batterica (Fig. 37).

Bac7(1-35) riduce parzialmente lo sviluppo del biofilm causando una riduzione all'incirca del 40% a tutte e tre le concentrazioni utilizzate. BMAP-27 causa effetti diversi: a 0,25 μM (0,8 μg/mL) inibisce la formazione del biofilm del 40%, ma a concentrazioni più elevate si osserva un graduale incremento della sua produzione.

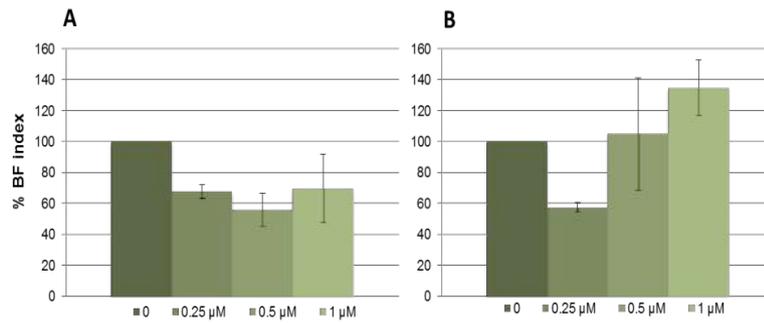


Figura 37. Quantificazione della produzione di biofilm di KpTs101 in presenza di concentrazioni sub-inibenti di Bac7(1-35) (A) e BMAP-27 (B).

5.2 Valutazione dell'effetto protettivo della crescita in biofilm e del ruolo svolto dalla matrice

5.2.1 Effetto dei peptidi su biofilm preformato: valutazione delle BIC e dell'effetto dei polisaccaridi capsulari

La suscettibilità dei due ceppi di *K. pneumoniae* cresciuti in biofilm è stata valutata mediante il saggio delle BIC proposto da Moskowitz *et al.* 2004. I risultati hanno dimostrato che le cellule in forma sessile sono molto meno suscettibili all'azione dei peptidi rispetto a quelle planctoniche, esibendo valori di BIC maggiori di almeno 16 volte rispetto a quelli delle MIC (Tab. 9), anche nel caso di KpTs101, che ha scarse proprietà adesive. Per valutare se questo effetto potesse essere attribuibile ai polisaccaridi della matrice, sono state ripetute le MIC dei due ceppi in presenza dei polisaccaridi purificati dalla matrice dei due ceppi. I risultati indicano che i polisaccaridi danno un forte contributo all'azione protettiva svolta dalla matrice, poiché la loro presenza fa aumentare i valori delle MIC fino a raggiungere quasi le concentrazioni delle BIC.

Tabella 9. Attività antimicrobica di Bac7(1-35) e BMAP-27 nei confronti di cellule planctoniche (MIC), di cellule in biofilm (BIC) e di cellule planctoniche in presenza di polisaccaride (Ps)

Strain	Bac-7(1-35)			BMAP-27		
	MIC ¹	BIC ¹	Ps ²	MIC ¹	BIC ¹	Ps ²
KpTs101	2	64	32	2	>64	64
KpTs113	1	64	32	2	>64	64

¹MIC e BIC sono espresse in μM .

²Ps: MIC in presenza di 1 mg/ml di polisaccaride purificato dalla matrice

5.2.2 Effetto dei peptidi su biofilm preformato: microscopia confocale

L'effetto dei peptidi ad elevate concentrazioni (64 μM) sul biofilm di KpTs101 già formato è stato osservato con tecniche di microscopia confocale. La struttura tridimensionale è stata colorata con le sonde fluorescenti Syto9 e PI, che permettono di differenziare le cellule vive dalle morte (Fig. 38).

Le immagini ottenute indicano che il trattamento con BMAP-27 causa una forte distruzione della struttura (Fig. 38 C): il biofilm trattato mostra infatti diverse zone prive di fluorescenza, una prevalenza di cellule colorate di rosso, considerabili non vitali, e uno spessore molto ridotto. L'analisi semi-quantitativa delle immagini con il software Comstat ha messo in evidenza una riduzione del 41% dello spessore medio e una riduzione della biomassa totale del 75%.

Il trattamento con Bac7(1-35) modifica il biofilm solo in modo lieve (Fig. 38 B) comportando una riduzione dell'11% dello spessore rispetto al controllo (Fig. 38 A), e nessuna modificazione nella biomassa. Anche la percentuale di cellule non vitali non sembra aumentare in modo significativo.

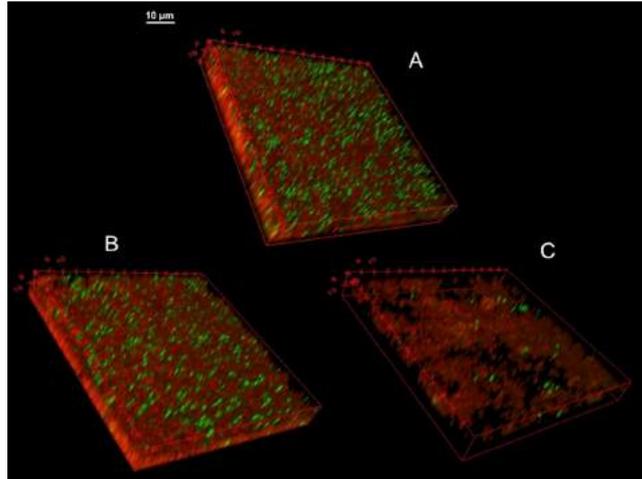


Figura 38. Immagini 3D della struttura del biofilm di KpTs101 senza trattamento (A), con Bac7(1-35) 64 μ M (B) e BMAP-27 64 μ M (C).

5.3 Discussione

I due ceppi scelti per questo studio, entrambi ottimi produttori di materiale extracellulare, dimostrano capacità di adesione molto diverse: KpTs101 produce un biofilm che aderisce molto bene al substrato, mentre KpTs113 forma degli aggregati in fiocchi. Il motivo di questa differenza non è noto e potrebbe essere correlato sia alla diversità delle adesine presenti sulla superficie cellulare, quali fimbrie o LPS, sia alla diversa composizione chimica dei polisaccaridi che compongono la matrice. Gli studi condotti dai proff. Rizzo e Cescutti dell'Università di Trieste hanno infatti dimostrato che i polisaccaridi prodotti dai due ceppi sono chimicamente molto diversi (Benincasa *et al.* 2016). Il polisaccaride prodotto da KpTs101 è neutro ed è composto solo da residui di galattosio. Al contrario, KpTs113 produce un polisaccaride ramificato composto da residui di mannosio e glucosio, insieme ad acido glucuronico. La carica negativa che presenta potrebbe contribuire alle scarse capacità adesive della matrice (Benincasa *et al.* 2016).

Entrambi i peptidi inibiscono la crescita dei due ceppi di *K. pneumoniae* a concentrazioni comprese tra 1 e 2 μ M. Le cinetiche di crescita hanno dimostrato che i peptidi sono attivi già a concentrazioni di molto inferiori, fino a 0,25 μ M, e che il ceppo KpTs113 è lievemente più suscettibile al Bac7(1-35) di KpTs101

(Fig. 34). Poiché il meccanismo d'azione di questo peptide è generalmente basato sull'ingresso nella cellula batterica e sulla successiva interazione con i ribosomi (Mardirossian *et al.* 2014), abbiamo voluto verificare che esso venga internalizzato anche in *K. pneumoniae*. I saggi di *uptake* con Bac7(1-35)-BY hanno confermato che entrambi i ceppi sono in grado di internalizzare efficacemente il peptide nei primi 10 minuti di esposizione (Fig. 35). La maggior efficienza di *uptake* di KpTs113 rispetto KpTs101 correla con la sua maggiore suscettibilità.

A differenza di Bac7(1-35), BMAP-27 agisce solitamente permeabilizzando la membrana citoplasmatica dei batteri. Gli esperimenti di citofluorimetria a flusso hanno confermato lo stesso meccanismo d'azione anche per i due ceppi di *K. pneumoniae* (Fig. 36). Nel caso di questo peptide, è il ceppo KpTs101 quello che dimostra maggiore suscettibilità, in quanto il 36% delle cellule sono positive al propidio ioduro già in presenza di Bac7(1-35) 0,25 μ M (1 μ g/mL). Per KpTs113, invece, l'effetto è evidente solo alla concentrazione 1 μ M (4,2 μ g/mL).

Gli effetti dei due peptidi sulla formazione di biofilm sono stati studiati solamente su KpTs101, perché KpTs113, non aderendo alle superfici, pone difficoltà tecniche. Concentrazioni sub-inibenti di entrambi i peptidi sono in grado di interferire con la produzione di biofilm, ma con modalità diverse (Fig. 37). Bac7(1-35) causa una riduzione dose-dipendente della quantità di biofilm prodotta. Questo peptide inibisce il metabolismo batterico ed è possibile ipotizzare che l'azione si traduca in una riduzione dell'esopolisaccaride prodotto e quindi della quantità totale di biofilm. L'effetto di BMAP-27 è più complesso: a concentrazioni basse la produzione di biofilm cala, ma a concentrazioni che si avvicinano alla MIC la produzione aumenta. Poiché i risultati sono espressi come *biofilm index*, quindi normalizzati per la crescita batterica, si può ipotizzare che l'aumento sia dovuto ad una maggiore produzione di matrice e che quindi le cellule batteriche rimaste vitali adottino questa strategia per proteggersi dall'ambiente ostile. E' però necessario sottolineare che gli esperimenti qui riportati, ideati per altri scopi, sono stati condotti su un solo ceppo batterico e che quindi possono dare solo delle indicazioni preliminari.

Il primo approccio per verificare l'influenza della crescita in biofilm sulla suscettibilità ai due peptidi è stata la valutazione delle BIC. Questa ha dimostrato che le cellule adese e immerse nella matrice mostrano BIC superiori di 16-64 volte rispetto alle MIC (Tab. 9). Il fatto che l'aggiunta di polisaccaride capsulare purificato al terreno aumenti le MIC fino a valori di grandezza comparabile alle BIC suggerisce che una parte significativa della diminuzione di suscettibilità dimostrata da *K. pneumoniae* cresciuta in biofilm sia dovuta alla produzione di esopolisaccaride. Questo fatto risulta ancora più interessante se si considera la diversità della struttura chimica dei polisaccaridi dei due ceppi considerati.

L'effetto protettivo dimostrato dai polisaccaridi capsulari purificati suggerisce un'interazione diretta tra questi ed i peptidi antimicrobici. Questa ipotesi è stata successivamente indagata attraverso studi di dicroismo circolare eseguiti con BMAP-27 in presenza dei due polisaccaridi. I risultati, che non sono stati riportati nella tesi in quanto ottenuti presso un altro laboratorio, hanno dimostrato che, in presenza di entrambi i polisaccaridi, il peptide passa dalla conformazione *random coil* a quella ad alfa-elica. Il cambio di conformazione favorisce l'aggregazione del peptide e impedisce il corretto contatto con la superficie cellulare, spiegando la diminuzione di attività (Benincasa *et al.* 2016).

E' interessante infine sottolineare che, nonostante la produzione di matrice collegata alla crescita in biofilm diminuisca notevolmente la suscettibilità di *K. pneumoniae*, alte concentrazioni di BMAP-27 sono in grado sia di uccidere le cellule sessili sia di danneggiare l'architettura del biofilm. In particolare, BMAP-27 64 μ M (210 μ g/mL) causa un evidente collasso della struttura e la morte di un'elevata percentuale di cellule (Fig. 38).

6. Risultati: *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa è il patogeno più importante per i pazienti affetti da fibrosi cistica. Uno dei problemi principali delle infezioni dovute a questo batterio è che, nel tempo, esso acquisisce numerose antibiotico-resistenze e questo contribuisce a rendere le infezioni molto difficili da trattare. I peptidi antimicrobici hanno un'attività d'inibizione della moltiplicazione sugli isolati di *P. aeruginosa* da FC antibiotico-resistenti (Zhang *et al.* 2005) e, per alcuni di essi, tra cui BMAP-27 (Pompilio *et al.* 2011), è stata anche dimostrata l'attività anti-biofilm. L'attività di Bac7(1-35) non è però mai stata saggiata da questo punto di vista, probabilmente a causa delle MIC molto elevate verso gli isolati di *P. aeruginosa* (Runti *et al.* 2017a). Tuttavia, l'esperienza con *A. baumannii* ha dimostrato che Bac7(1-35) può inibire la formazione di biofilm a concentrazioni sub-inibenti e per questo motivo abbiamo pensato di saggiare la sua attività contro alcuni ceppi selezionati di *P. aeruginosa* da FC. Sono state anche studiate alcune sostanze che erano state riportate come in grado di interferire con la formazione del biofilm o con il quorum sensing (QS), e che potrebbero quindi essere associate al Bac7(1-35) per potenziarne l'azione. Tra queste l'azitromicina (Tateda *et al.* 2001; Imperi, Leoni, and Visca 2014), il mentolo (Husain *et al.* 2015) e lo zingerone (L. Kumar, Chhibber, and Harjai 2014; N. V. Kumar *et al.* 2014; L. Kumar *et al.* 2015). Infine, come già descritto in precedenza, *P. aeruginosa* è in grado di produrre una vasta gamma di fattori di virulenza per eludere le difese dell'ospite ed evitare l'azione antimicrobica dei farmaci. Tra questi di notevole rilevanza è l'elastasi, una zinco-proteasi controllata dal sistema del QS responsabile del danno al parenchima polmonare nei soggetti affetti da infezioni polmonari croniche (Wretling and Pavlovskis 1983). Limitare o definitivamente eliminare la produzione di queste proteine può migliorare la prognosi di questi pazienti. Per tale motivo si è cercato di capire se l'azitromicina e il peptide Bac7(1-35) potessero limitare la produzione di elastasi in alcuni isolati scelti di *P. aeruginosa*.

6.1 Tipizzazione degli isolati

Gli 81 isolati di *P. aeruginosa* raccolti da 26 pazienti afferenti al Centro Regionale per la Diagnosi e la Cura della Fibrosi Cistica dell'IRCCS Burlo Garofolo di Trieste sono stati genotipizzati con lo scopo di evidenziare le eventuali correlazioni esistenti mediante macrorestrizione con l'enzima *SpeI*. La separazione dei frammenti di DNA mediante PFGE ha permesso di distinguere 28 profili denominati A-Z, 1-2 (Fig. 39 e 40) che individuano altrettanti ceppi di *P. aeruginosa* (Struelens *et al.* 1993).

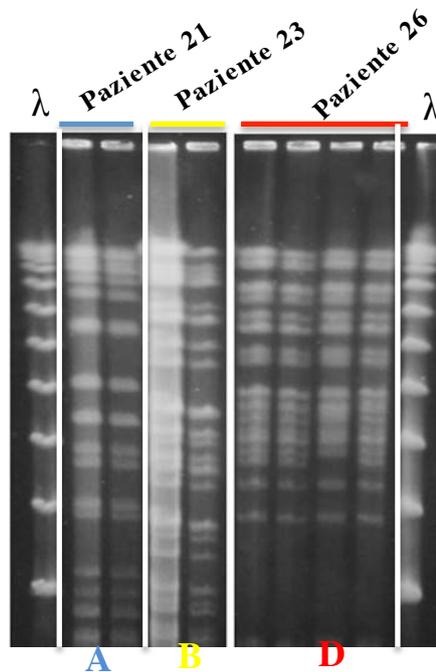


Figura 39. Esempio di separazione mediante PFGE. In alto l'identificativo del paziente, in basso i profili assegnati. λ : marker di riferimento lambda ladder.

Dice (CpI:2.00%) (Tol: 1.5%-2.0%) (H=0.0% S=0.0%) [0.0%-100.0%]
SpeI 2016

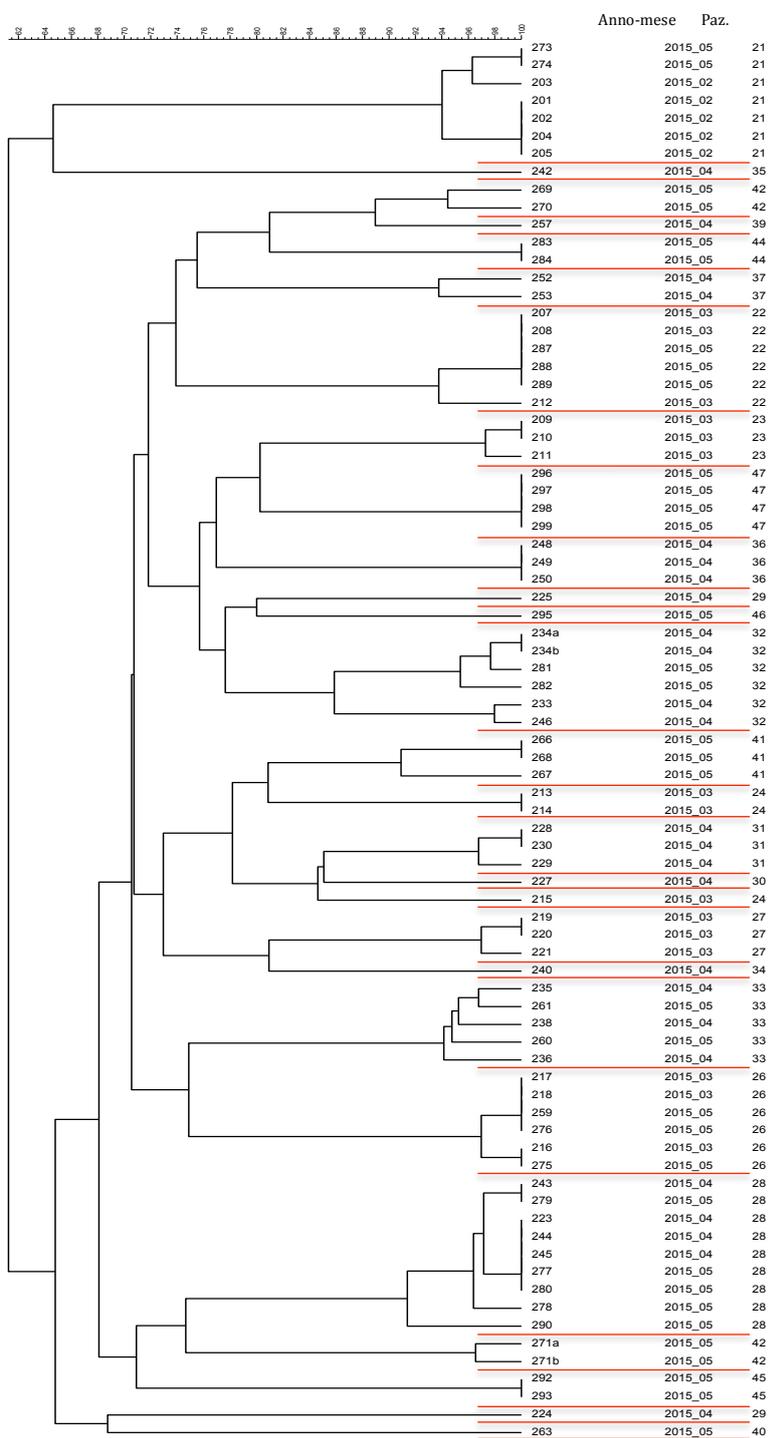


Figura 40. Dendrogramma basato sulla somiglianza dei profili generati dalla digestione del DNA genomico con *SpeI*. I profili di DNA sono stati analizzati con l'ausilio del software Gel-

Compar II v. 4.0 (Applied Maths). I livelli di similarità, osservabili nella scala in alto, sono stati calcolati con il coefficiente di Dice.

Analizzando la distribuzione dei profili nei diversi pazienti si può constatare che solo 4 dei 28 pazienti presentavano due profili PFGE distinti e quindi possono essere considerati coinfectati da due diversi ceppi di *P. aeruginosa*. I rimanenti sono stati ritenuti infettati da un unico ceppo: interessante sottolineare che gli isolati di questi pazienti, distinguibili per la tipologia delle colonie formate sui terreni di coltura solidi, rappresentavano varianti fenotipiche. Inoltre, ad ognuno dei profili individuati corrispondeva un unico paziente: questo dato indica non c'è stata trasmissione tra i pazienti afferenti al Centro e quindi le misure attuate per evitare la trasmissione inter-paziente dell'infezione sono efficaci.

6.2 Suscettibilità degli isolati ad antibiotici, peptidi antimicrobici e sostanze naturali

L'antibiogramma degli isolati eseguito presso il laboratorio di batteriologia dell'IRCCS Burlo Garofolo di Trieste ha evidenziato alcune differenze di suscettibilità tra gli isolati raccolti dallo stesso paziente. Tuttavia, i sistemi automatizzati in uso nei laboratori clinici (in questo caso il Vitek® 2 – Biomérieux) saggiavano solamente poche concentrazioni di specifici antibiotici, in un ambito molto limitato, vicino ai *breakpoints*, appiattendo le differenze. Per questo motivo è stata saggiata la suscettibilità a una gamma più ampia di concentrazioni di tre antibiotici ritenuti significativi, ovvero l'aminoglicosidico Tobramicina (TM), il fluorochinolone Ciprofloxacina (CIP) e la cefalosporina di terza generazione Ceftazidime (CAZ) (Tab. 10).

Tabella 10. MIC ($\mu\text{g/mL}$) e categorie di appartenenza secondo EUCAST degli isolati di *P. aeruginosa* ottenuti dai pazienti oggetto dello studio. I valori di MIC riportati sono stati ottenuti sulla base di tre esperimenti indipendenti.

PAZIENTE	ISOLATO	TM		CIP		CAZ		PAZIENTE	ISOLATO	TM		CIP		CAZ	
		MIC	categoria	MIC	categoria	MIC	categoria			MIC	categoria	MIC	categoria		
21	201	0,5	S	0,25	S	1	S	30	227	2	S	0,25	S	0,5	S
	202	0,5	S	0,25	S	1	S	31	228	1	S	2	R	0,5	S
	203	1	S	0,5	S	8	S		229	0,5	S	4	R	4	S
	204	1	S	2	R	16	R		230	2	S	2	R	1	S
	205	1	S	0,25	S	2	S	32	233	8	R	0,25	S	8	S
	273	4	S	0,25	S	4	S		234a	32	R	0,25	S	1	S
	274	16	R	0,125	S	4	S		234b	16	R	0,25	S	0,5	S
22	207	0,5	S	1	R	1	S		246	2	S	0,5	S	16	R
	208	4	S	4	R	4	S		281	8	R	0,125	S	1	S
	212	4	S	2	R	2	S	282	4	S	0,125	S	1	S	
	287	1	S	2	R	32	R	33	235	0,25	S	0,5	S	1	S
	288	0,5	S	1	R	8	S		236	0,25	S	1	R	8	S
	289	16	R	0,25	S	4	S		237a	64	R	16	R	64	R
23	209	0,5	S	4	R	8	S		238	0,5	S	0,25	S	0,5	S
	210	1	S	2	R	0,25	S		260	<0,125	S	0,25	S	0,5	S
	211	2	S	2	R	0,25	S	261	0,25	S	1	R	2	S	
24	213	4	S	2	R	0,5	S	34	240	4	S	1	R	0,25	S
	214	8	R	2	R	0,5	S	35	242	2	S	8	R	4	S
	215	4	S	2	R	1	S	36	248	2	S	0,125	S	0,5	S
26	216	1	S	2	R	4	S		249	2	S	0,125	S	0,5	S
	217	1	S	2	R	2	S		250	2	S	0,25	S	0,5	S
	218	1	S	2	R	2	S	37	252	4	S	4	R	32	R
	259	0,5	S	4	R	4	S		253	2	S	4	R	32	R
	275	0,5	S	1	R	0,5	S	39	257	2	S	4	R	2	S
	276	2	S	4	R	8	S	41	266	<0,125	S	2	R	0,5	S
27	219	2	S	16	R	1	S		267	0,25	S	0,5	S	0,5	S
	220	1	S	8	R	0,5	S		268	<0,125	S	2	R	<0,125	S
	221	1	S	16	R	0,5	S	42	269	0,5	S	0,125	S	2	S
28	222	0,5	S	0,5	S	4	S		270	0,5	S	0,25	S	2	S
	223	1	S	1	R	8	S		271a mu	0,25	S	0,5	S	0,5	S
	243	0,5	S	2	R	16	R		271b	2	S	0,125	S	8	S
	244	0,5	S	1	R	16	R		44	283	1	S	4	R	1
	245	1	S	2	R	4	S	284		8	R	8	R	>64	R
	277	4	S	2	R	16	R	45	292	0,5	S	0,5	S	1	S
	278	1	S	1	R	4	S		293	0,25	S	1	R	2	S
	279	1	S	0,5	S	4	S	46	295	0,5	S	1	R	0,5	S
	280	1	S	1	R	2	S	47	296	2	S	0,5	S	2	S
	290	0,5	S	0,5	S	32	R		297 mu	2	S	1	R	2	S
291	0,5	S	0,5	S	4	S	298		4	S	2	R	8	S	
29	224	0,25	S	0,25	S	2	S		299	<0,125	S	0,5	S	0,5	S
	225	4	S	<0,06	S	4	S								

TM: tobramicina, CIP: ciprofloxacina, CAZ: ceftazidime.
S: sensibile, R: resistente

I risultati ottenuti (Tab. 11) mostrano un'elevata attività degli antibiotici TM e CAZ mentre la maggior parte degli isolati non è sensibile all'azione del fluorochinolone.

Tabella 11. Percentuale degli isolati sensibili e resistenti ai tre antibiotici presi in esame.

	ANTIBIOTICO		
	TM	CAZ	CIP
Isolati sensibili (%)	89	86,5	42
Isolati resistenti (%)	11	13,5	58

TM: tobramicina, CIP: ciprofloxacina, CAZ: ceftazidime.

Il confronto tra isolati dello stesso paziente ha rivelato che, nonostante siano indistinguibili genotipicamente, gli isolati differiscono per quanto riguarda la suscettibilità agli antibiotici (vedi ad esempio paziente 21, 28 e 32, Tab. 10). Di fatto, quindi, come già descritto in precedenza da altri autori (Smith *et al.* 2006) varianti sensibili e resistenti dello stesso ceppo coesistono nel polmone.

Su tutti gli isolati di *P. aeruginosa* sono state eseguite anche le MIC con i peptidi antimicrobici Bac7(1-35) e BMAP-27. Poiché i valori di *breakpoints* per queste sostanze non sono ancora stati definiti, i risultati ottenuti vengono espressi come MIC₅₀ e MIC₉₀ che corrispondono, rispettivamente, alle concentrazioni necessarie per inibire la crescita del 50% e del 90% degli isolati testati.

BMAP-27 inibisce la crescita di tutti gli isolati a concentrazioni 2-4 µM (6,6-13,2 µg/mL). Questo peptide si dimostra quindi efficace anche nei numerosi ceppi MDR saggiati (Tab. 12). Al contrario, Bac7(1-35) agisce a concentrazioni più elevate (16-32 µM-67,2-134,4 µg/mL), che sono probabilmente riconducibili al meccanismo litico che questo peptide manifesta in *P. aeruginosa* (Runti *et al.* 2017).

Tabelle 12. MIC₅₀ e MIC₉₀ (µg/mL) dei peptidi antimicrobici BMAP-27 e Bac7(1-35)

	MIC ₅₀	MIC ₉₀
BMAP-27	6,6	13,2
Bac7(1-35)	67,2	134,4

Da queste analisi è risultata evidente anche la variabilità di sensibilità degli isolati ai due peptidi all'interno dello stesso paziente; nei soggetti che possiedono infatti più di un isolato a livello polmonare si sono osservate differenze di suscettibilità anche molto elevate (Fig. 41).

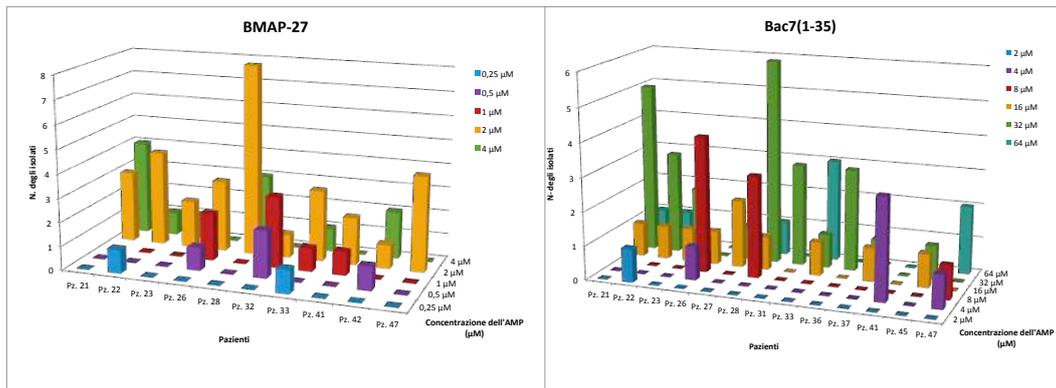


Figura 41. Istogrammi 3D che indicano la variabilità intrapaziente della suscettibilità ai peptidi antimicrobici BMAP-27 e Bac7(1-35) degli isolati di *P. aeruginosa*.

Infine anche l'azione antimicrobica di due sostanze naturali e dell'azitromicina (AZM) sono state osservate con il metodo della microdiluzione in brodo, come step iniziale per la messa a punto dei protocolli degli esperimenti successivi. Tutte le sostanze saggiate hanno dimostrato MIC elevate, che per zingerone e mentolo si avvicinavano ai limiti di solubilità (Tab. 13).

Tabella 13. MIC₅₀ e MIC₉₀ dello zingerone, mentolo e dell'azitromicina (µg/mL).

	Zingerone	Mentolo	Azitromicina
MIC ₅₀	> 8000	> 4000	128
MIC ₉₀	> 8000	> 4000	> 128

6.3 Valutazione dell'effetto sinergico

Una volta valutate le sensibilità degli isolati alle sostanze antimicrobiche scelte, si è cercato di capire se la combinazione di alcune di esse potesse incrementare l'effetto antibatterico. Mediante il metodo del *Checkerboard assay* è stato analizzato l'effetto dell'associazione della TM sia con lo zingerone che con l'AZM in 7 isolati (Tab. 14). Nella maggiore parte dei casi l'associazione dell'aminoglicosidico con lo zingerone porta ad un effetto additivo nell'inibizione

della crescita mentre solo dall'associazione della TM con l'AZM possiamo osservare un effetto sinergico.

Tabella 14. Percentuale dell'effetto delle sostanze TM - zingerone e TM - AZM in associazione.

Effetto	TM + zingerone	TM + AZM
Antagonismo (%)	0	0
Indifferenza (%)	43	50
Additivo (%)	57	33
Sinergia (%)	0	17

6.4 Inibizione della formazione del biofilm

L'attività di inibizione della formazione del biofilm è stata valutata sia con il metodo del CV (Stepanović *et al.* 2007) che con esperimenti di microscopia confocale (CSLM). La colorazione con il CV non ha permesso di evidenziare un'attività antibiofilm con nessuna delle sostanze testate, utilizzate a concentrazioni sub-inibenti (Fig. 42). Con gli esperimenti al microscopio confocale nella maggior parte dei casi si è osservato un forte effetto inibitore del peptide impiegato ad una concentrazioni pari a $\frac{1}{2}$ il valore di MIC (Fig. 43); meno frequentemente anche lo zingerone da solo ha alterato la struttura tridimensionale del biofilm in formazione, effetto poi intensificato con l'aggiunta di Bac7(1-35) (Fig. 44). L'elaborazione numerica delle immagini ottenute al confocale con il software COMSTAT (Heydorn *et al.* 2000) ha confermato la forte riduzione della biomassa totale con l'impiego del peptide Bac7(1-35) (Fig. 45-A) e l'aumento dell'eterogeneità del biofilm, dato che presumibilmente indica una sofferenza delle cellule all'interno della matrice (Fig. 45-B).

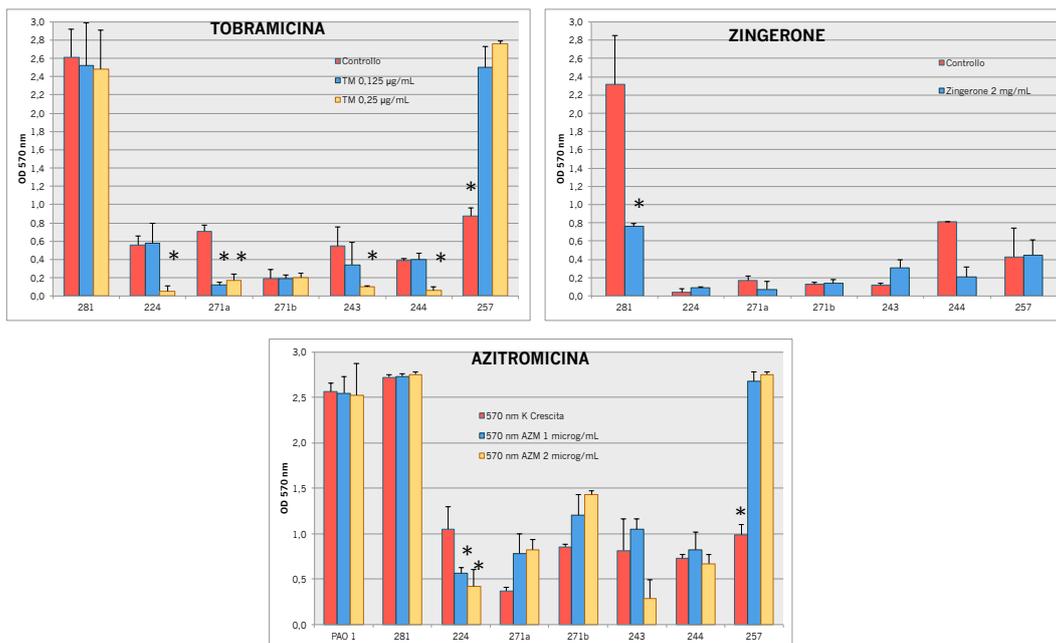


Figura 42. Attività della TM, dello zingerone e dell'AZM sulla formazione del biofilm, * p< 0,01, test Anova

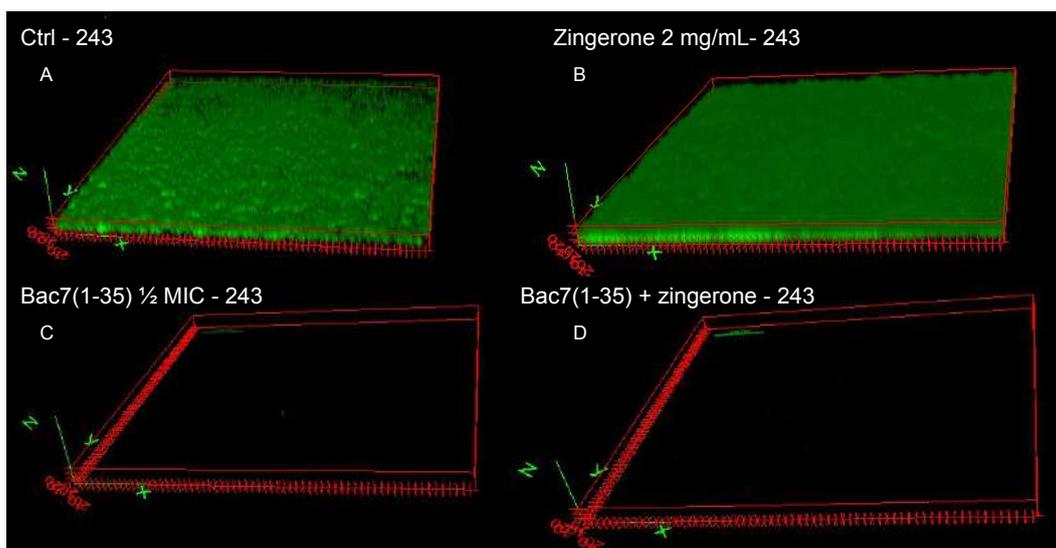


Figura 43. Immagini 3D del biofilm formato da *P. aeruginosa* (isolato 243). A: senza trattamento; B: con zingerone 2 mg/mL; C: con Bac7(1-35) ½ MIC; D: con le due sostanze insieme (D).

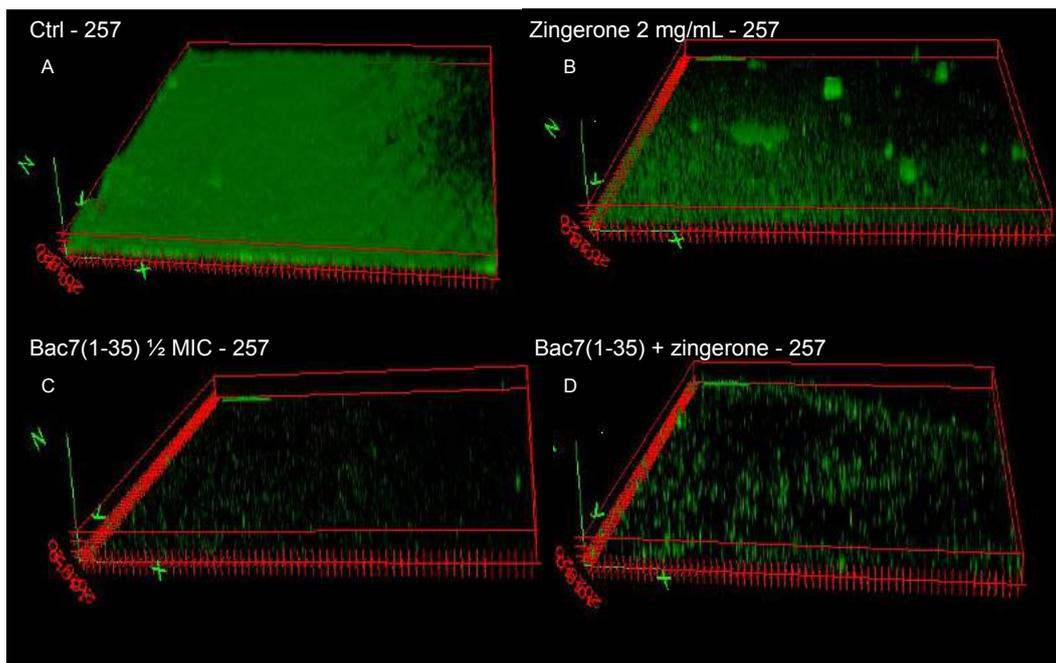


Figura 44. Immagini 3D del biofilm formato da *P. aeruginosa* (isolato 257) A: senza trattamento; B: con zingerone 2 mg/mL; C: con Bac7(1-35) 1/2 MIC; D: con le due sostanze insieme (D).

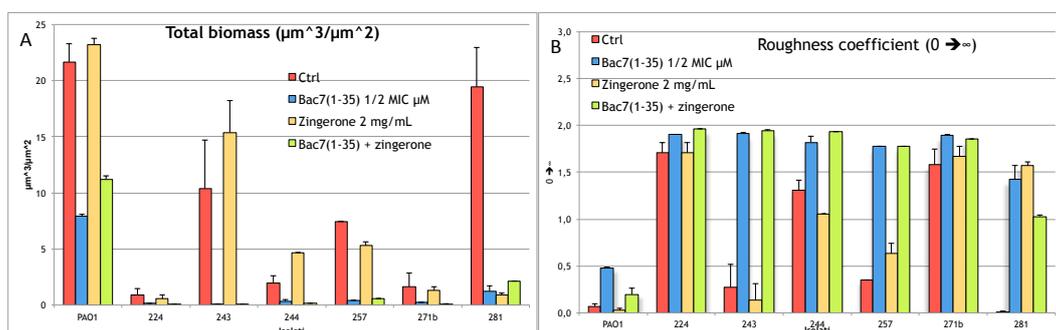


Figura 45. Istogrammi ottenuti dall'elaborazione numerica delle immagini al CLSM. (A) Biomassa totale ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) del biofilm, (B) coefficiente di eterogeneità ($0 \rightarrow \infty$).

6.5 Inibizione della produzione dell'elastasi

La produzione di elastasi è stata saggiata utilizzando una rielaborazione dell'*elastin Congo red assay* descritto da Xu *et al.* 2015. Esperimenti preliminari sono stati condotti utilizzando concentrazioni sub-MIC sia del farmaco AZM che del peptide; come si osserva in figura 46-A il macrolide è capace di ridurre fino

all'80% la produzione dell'elastasi, effetto invece non riscontrato con Bac7(1-35) (Fig. 46-B).

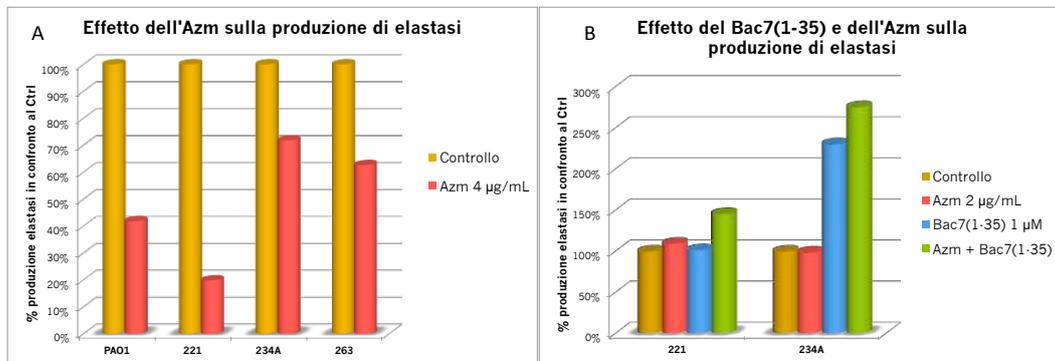


Figura 46. Produzione dell'elastasi da parte di diversi isolati di *P. aeruginosa* con l'aggiunta dell'AZM (A) e del peptide Bac7(1-35) (B).

6.6 Discussione

P. aeruginosa è il batterio più importante che si riscontra nei polmoni dei pazienti affetti da fibrosi cistica. In questo organo evolve lentamente, accumulando diverse mutazioni che lo rendono refrattario all'azione di pressoché tutte le molecole antibiotiche; nella maggior parte dei casi le infezioni portano al collasso delle vie aeree e alla morte del soggetto (Gibson *et al.*, 2003).

Durante il dottorato si è cercato di valutare la diversificazione degli isolati che infettano i pazienti oggetto dello studio sia per quanto riguarda la suscettibilità delle cellule planctoniche all'azione degli antibiotici, dei peptidi antimicrobici e di alcune sostanze naturali sia per l'inibizione della produzione di biofilm e fattori di virulenza.

Gli isolati sono stati inizialmente tipizzati (Fig. 40) per studiare eventuali correlazioni: le analisi hanno evidenziato che ciascun paziente è infettato da uno o al massimo due ceppi con profilo PFGE unico, cioè non riscontrato in nessuno degli altri pazienti. Si può quindi dedurre che i malati siano stati infettati da ceppi

diversi tra loro e che il primo “incontro” tra ospite e batteri sia avvenuto in tempi e con modalità diverse per ogni singolo soggetto. L’assenza di trasmissione tra i pazienti studiati è un ottimo risultato per il Centro del Friuli Venezia Giulia per la Fibrosi Cistica perché conferma che le tecniche di prevenzione attuate sono efficaci; i pazienti, infatti, sono ben istruiti sui rischi delle infezioni e sono pertanto invitati a non frequentarsi e, all’interno dell’ospedale, sono mantenuti ben isolati sia tra loro sia dall’ambiente ospedaliero. Questi provvedimenti non sono da sottovalutare perché la pericolosità della trasmissioni di ceppi altamente adattati e resistenti è già stata descritta in precedenza (Salunkhe *et al.* 2005).

Lo studio della sensibilità agli antibiotici (Tab. 10 e 11) ha evidenziato una ridotta suscettibilità solo all’antibiotico ciprofloxacina, mentre la tobramicina e il ceftazidime rimangono ottimi candidati per la terapia antibiotica di questi pazienti. Inoltre si è potuto osservare anche una discreta variabilità delle MIC ottenute da isolati con profili PFGE identico, presenti nello stesso espettorato (Tab. 10); questo aspetto deve essere tenuto nella opportuna considerazione quando si devono eseguire gli antibiogrammi come guida alla terapia antibiotica.

Gli isolati studiati sono risultati per la maggior parte suscettibili al peptide BMAP-27 a concentrazioni basse (2-4 μ M-6,6-13,2 μ g/mL) mentre è necessaria una concentrazione superiore di Bac7(1-35) per inibirne la crescita (16-32 μ M-67,2-134,4 μ g/mL) (Tab. 12). Questo aspetto probabilmente trova spiegazione nell’assenza, a livello della membrana di *P. aeruginosa*, del trasportatore necessario all’internalizzazione del peptide (Runti *et al.* 2017). È interessante inoltre notare come gli isolati di uno stesso paziente abbiano suscettibilità diverse non solo verso gli antibiotici, ma anche verso i due peptidi (Fig. 41). Le ragioni di queste differenze, al momento solo oggetto di speculazione, potrebbero essere correlate con alterazioni del lipopolisaccaride. È noto che l’abbassamento della carica negativa del LPS riduce l’interazione dei CAMPs con la membrana esterna del batterio, limitando così l’azione antimicrobica della molecola (Gellatly and Hancock 2013).

Le sostanze naturali e l'antibiotico macrolide azitromicina, già noto per la sua azione anti QS in diverse specie batteriche tra le quali *P. aeruginosa* (Tateda *et al.* 2001; Imperi *et al.*, 2014), si sono dimostrate poco attive se utilizzate singolarmente (Tab. 13) mentre hanno leggermente aumentato l'efficacia del farmaco aminoglicosidico tobramicina (Tab. 14), anche se la sinergia si è potuta registrare solo in pochi casi (Tab. 14).

L'attività d'inibizione della formazione del biofilm del peptide Bac7(1-35) è stata ben evidenziata con esperimenti di microscopia confocale; in tutti i casi testati l'impiego del peptide a concentrazioni sub-inibenti ha ridotto la biomassa totale del biofilm anche del 90%. In alcuni casi, ma meno frequentemente, anche lo zingerone ha presentato un effetto simile ma a livelli meno considerevoli; l'aggiunta di entrambe le sostanze altera comunque la struttura tridimensionale del biofilm, dato misurabile con l'aumento del coefficiente di rugosità, facendo supporre una sofferenza dei microrganismi all'interno della matrice (Fig. 43-45).

Esperimenti preliminari sono stati condotti per valutare se le sostanze antimicrobiche oggetto di questo studio potessero inibire anche altri fattori di virulenza prodotti dal batterio. L'azitromicina si è dimostrata un forte inibente del rilascio dell'elastasi già a concentrazioni molto basse (4 µg/mL) mentre, al momento, il peptide Bac7(1-35) non sembra sortire lo stesso effetto (Fig. 46). Ulteriori indagini sono necessarie ma poter agire su diversi aspetti della patogenicità di *P. aeruginosa* è un traguardo auspicabile per debellare le infezioni croniche e le conseguenze nefaste che questo batterio causa nei soggetti affetti da fibrosi cistica.

7. Conclusioni

Il problema dei microrganismi resistenti ai farmaci antimicrobici è ormai diffuso globalmente; dopo decenni dal primo trattamento con una sostanza antimicrobica, le infezioni batteriche sono nuovamente divenute una minaccia a causa dell'evoluzione e dell'adattamento dei microrganismi (Ventola 2015a, 2015b). A seguito di mutazioni spontanee e/o indotte dall'impiego del farmaco, i batteri possono modificarsi genotipicamente e fenotipicamente per eludere le strategie d'azione dell'antibiotico, adattarsi all'ambiente circostante e sopravvivere per tempi prolungati causando infezioni impossibili da eradicare che possono condurre alla morte dell'ospite. Il tutto poi si complica con la capacità dei batteri di crescere nella forma sessile, racchiusi nella matrice del biofilm, dove la suscettibilità agli antibiotici è drammaticamente più bassa rispetto a quella delle stesse cellule cresciute nella forma planctonica. Questa ridotta sensibilità è un processo multifattoriale dovuto, oltre all'acquisizione di fattori genici mobili per la resistenza, anche alla diffusione ridotta o al sequestro delle sostanze antimicrobiche da parte della matrice e alle diverse fasi replicative delle cellule all'interno del biofilm che rendono gli antibiotici attivi solo su specifiche sub-popolazioni batteriche e quindi non eliminando completamente il problema (Batoni, Maisetta, and Esin 2016).

Il continuo aumento di ceppi batterici resistenti agli antibiotici convenzionali ha spinto i ricercatori di tutto il mondo a ricercare nuove strategie per sconfiggerli. Tra queste stanno avendo un ruolo sempre più importante i peptidi antimicrobici, molecole ampiamente diffuse e ben conservate del sistema immunitario in molte classi d'organismi (Hancock and Sahl 2006). I vantaggi nell'impiego di queste sostanze sono molteplici: hanno la capacità di eliminare anche i batteri MDR, presentano una bassa propensione nello sviluppo di resistenze, hanno un ampio spettro d'azione che comprende Gram positivi e negativi, virus, funghi, lieviti e protozoi, presentano un rapido meccanismo d'azione e diverse potenziali applicazioni (da soli, in combinazione con altre molecole antibiotiche, come immunomodulatori e neutralizzatori delle endotossine). Ovviamente

esiste anche l'altra faccia della medaglia che ha rallentato l'entrata di queste molecole nei *trials* clinici e di conseguenza l'immissione sul mercato: i costi di preparazione sono spesso elevati, diverse molecole presentano tossicità locale e sistemica, presentano una ridotta attività in ambienti con alta salinità e in presenza di siero, si sono riscontrati problemi nella farmacodinamica e farmacocinetica e spesso hanno bassa stabilità *in vivo* in seguito a fenomeni di degradazione proteolitica nei liquidi biologici (Batoni, Maisetta, and Esin 2016).

Ad oggi ci sono diversi peptidi che hanno raggiunto la fase III dei *trials* clinici, soprattutto con finalità di un trattamento topico e solo uno per somministrazione endovenosa (hLF1-11) (Mahlapuu *et al.* 2016). La maggior parte rimane bloccata nello studio *in vitro* a causa della loro scarsa stabilità, sicurezza ed efficacia all'interno del corpo umano.

Numerosi studi sono stati condotti negli anni sui due peptidi antimicrobici trattati in questo lavoro, BMAP-27 e Bac7(1-35) (Benincasa *et al.* 2004; Pompilio *et al.* 2011; Mardirossian *et al.* 2014; Mardirossian *et al.* 2016; Runti *et al.* 2017).

L'efficacia di BMAP-27 nei confronti delle cellule planctoniche e sessili sia di Gram-negativi sia di Gram-positivi è stata già confermata (Pompilio *et al.* 2011) ma la sua moderata citotossicità ne rallenta il passaggio degli studi dalla fase *in vitro* a quella *in vivo*; la progettazione e lo sviluppo di molecole analoghe a BMAP-27 non tossiche sono già oggetto di indagine e promettono di svincolare al suo unico limite riscontrato sinora (Ahmad *et al.* 2009).

L'azione intracellulare a basse concentrazioni del peptide Bac7(1-35) limita il suo campo d'azione ai soli batteri in possesso dei trasportatori a livello della membrana (Runti *et al.* 2013; Krizsan, Knappe, and Hoffmann 2015); nei microrganismi sprovvisti di tali passaggi l'azione del peptide è prevalentemente litica ma è necessario aumentarne il dosaggio anche di 8-16 volte. Un effetto però inibitore della formazione del biofilm è stato descritto proprio in questo lavoro nei confronti di *P. aeruginosa*: sembra quindi non necessaria la sua internalizzazione per agire a livello di altri aspetti della patogenicità di questo batterio.

La ricerca, sviluppo e perfezionamento di nuove sostanze e strategie che impediscano lo sviluppo delle infezioni dei *superbugs* sono *steps* fondamentali e obbligatori per contrastare quello che ormai è divenuto un fenomeno globale allarmante, ovvero le infezioni causate da batteri multi-resistenti che provocano ogni anno, solo in Europa, 25000 morti. E, anche se la strada risulta ancora lunga e tortuosa, i peptidi antimicrobici sembrano essere una delle poche soluzioni sinora trovate.

8. Bibliografia

- Ahmad, Aqeel, Sarfuddin Azmi, Raghvendra M. Srivastava, Saurabh Srivastava, Brijesh K. Pandey, Rubha Saxena, Virendra Kumar Bajpai, and Jimut Kanti Ghosh. 2009. "Design of Nontoxic Analogues of Cathelicidin-Derived Bovine Antimicrobial Peptide BMAP-27: The Role of Leucine as Well as Phenylalanine Zipper Sequences in Determining Its Toxicity." *Biochemistry* 48 (46):10905–17. <https://doi.org/10.1021/bi9009874>.
- Alarcon, Irania, David J. Evans, and Suzanne M. J. Fleiszig. 2009. "The Role of Twitching Motility in *Pseudomonas aeruginosa* Exit from and Translocation of Corneal Epithelial Cells." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50 (5):2237–44. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2785>.
- Allesen-Holm, Marie, Kim Bundvig Barken, Liang Yang, Mikkel Klausen, Jeremy S. Webb, Staffan Kjelleberg, Søren Molin, Michael Givskov, and Tim Tolker-Nielsen. 2006. "A Characterization of DNA Release in *Pseudomonas aeruginosa* Cultures and Biofilms." *Molecular Microbiology* 59 (4):1114–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x>.
- Ambler, R. P. 1980. "The Structure of β -Lactamases." *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 289 (1036):321–31. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>.
- Antonelli, Guido, Massimo Clementi, Gianni Pozzi, and Gian Maria Rossolini. 2012. "Principi Di Microbiologia Medica - II Edizione." 2012. <https://www.ibs.it/principi-di-microbiologia-medica-libro-vari/e/9788808180735>.
- Bals, R. 2000. "Epithelial Antimicrobial Peptides in Host Defense against Infection." *Respiratory Research* 1 (3):141–50. <https://doi.org/10.1186/rr25>.
- Barraud, Nicolas, David Schleheck, Janosch Klebensberger, Jeremy S. Webb, Daniel J. Hassett, Scott A. Rice, and Staffan Kjelleberg. 2009. "Nitric Oxide Signaling in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Mediates Phosphodiesterase Activity, Decreased Cyclic Di-GMP Levels, and Enhanced

- Dispersal.” *Journal of Bacteriology* 191 (23):7333–42. <https://doi.org/10.1128/JB.00975-09>.
- Batoni, Giovanna, Giuseppantonio Maisetta, and Semih Esin. 2016. “Antimicrobial Peptides and Their Interaction with Biofilms of Medically Relevant Bacteria.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1858 (5):1044–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.013>.
- Benincasa, Monica, Cristina Lagatolla, Lucilla Dolzani, Annalisa Milan, Sabrina Pacor, Gianfranco Liut, Alessandro Tossi, Paola Cescutti, and Roberto Rizzo. 2016. “Biofilms from *Klebsiella pneumoniae*: Matrix Polysaccharide Structure and Interactions with Antimicrobial Peptides.” *Microorganisms* 4 (3):26. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4030026>.
- Benincasa, Monica, Marco Scocchi, Elena Podda, Barbara Skerlavaj, Lucilla Dolzani, and Renato Gennaro. 2004. “Antimicrobial Activity of Bac7 Fragments against Drug-Resistant Clinical Isolates.” *Peptides* 25 (12):2055–61. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.08.004>.
- Bjarnsholt, Thomas, Peter Østrup Jensen, Tim Holm Jakobsen, Richard Phipps, Anne Kirstine Nielsen, Morten Theil Rybtke, Tim Tolker-Nielsen, et al. 2010. “Quorum Sensing and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during Lung Infection of Cystic Fibrosis Patients.” *PLOS ONE* 5 (4):e10115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010115>.
- Boucher, R.C. 2004. “New Concepts of the Pathogenesis of Cystic Fibrosis Lung Disease.” *European Respiratory Journal* 23 (1):146–58. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00057003>.
- Brooun, A., S. Liu, and K. Lewis. 2000. “A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (3):640–46.
- Campos, Miguel A., Miguel A. Vargas, Verónica Regueiro, Catalina M. Llompart, Sebastián Albertí, and José A. Bengoechea. 2004. “Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides.” *Infection and Immunity* 72 (12):7107–14. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.7107-7114.2004>.

- Chung, Pooi Yin, and Ramona Khanum. 2017. "Antimicrobial Peptides as Potential Anti-Biofilm Agents against Multidrug-Resistant Bacteria." *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 50 (4):405–10. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.12.005>.
- CLSI. 2016. "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard." Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Costerton, J. W., G. G. Geesey, and K. J. Cheng. 1978. "How Bacteria Stick." *Scientific American* 238 (1):86–95.
- Da Silva, Gabriela Jorge, and Sara Domingues. 2017. "Interplay between Colistin Resistance, Virulence and Fitness in *Acinetobacter baumannii*." *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 6 (4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics6040028>.
- Davey, Mary Ellen, and George A. O'toole. 2000. "Microbial Biofilms: From Ecology to Molecular Genetics." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (4):847–67.
- Dessel, Helke van, Lenie Dijkshoorn, Tanny van der Reijden, Nancy Bakker, Armand Paauw, Peterhans van den Broek, Jan Verhoef, and Sylvain Brisse. 2004. "Identification of a New Geographically Widespread Multiresistant *Acinetobacter baumannii* Clone from European Hospitals." *Research in Microbiology* 155 (2):105–12. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.10.003>.
- Diancourt, Laure, Virginie Passet, Alexandr Nemeč, Lenie Dijkshoorn, and Sylvain Brisse. 2010. "The Population Structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding Multiresistant Clones from an Ancestral Susceptible Genetic Pool." *PLOS overnighTE* 5 (4):e10034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010034>.
- Dice, Lee R. 1945. "Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species." *Ecology* 26 (3):297–302. <https://doi.org/10.2307/1932409>.
- Dijkshoorn, L, H Aucken, P Gerner-Smidt, P Janssen, M E Kaufmann, J Garaizar, J Ursing, and T L Pitt. 1996. "Comparison of Outbreak and Nonoutbreak

- Acinetobacter baumannii* Strains by Genotypic and Phenotypic Methods.” *Journal of Clinical Microbiology* 34 (6):1519–25.
- Doi, Yohei, and Yoshichika Arakawa. 2007. “16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides.” *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 45 (1):88–94. <https://doi.org/10.1086/518605>.
- Dolzani, L., E. Tonin, C. Lagatolla, L. Prandin, and C. Monti-Bragadin. 1995. “Identification of *Acinetobacter* Isolates in the A. Calcoeticus-A. *baumannii* Complex by Restriction Analysis of the 16S-23S rRNA Intergenic-Spacer Sequences.” *Journal of Clinical Microbiology* 33 (5):1108–13.
- Donati, Manuela, Antonietta Di Francesco, Renato Gennaro, Monica Benincasa, Simone Magnino, Salvatore Pignanelli, Alisa Shurdhi, et al. 2007. “Sensitivity of *Chlamydia Suis* to Cathelicidin Peptides.” <https://doi.org/doi:10.1016/j.vetmic.2007.02.011>.
- Drenkard, Eliana. 2003. “Antimicrobial Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms.” *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 5 (13):1213–19.
- Epanand, Richard M., and Hans J. Vogel. 1999. “Diversity of Antimicrobial Peptides and Their Mechanisms of Action.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1462 (1–2):11–28. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00198-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00198-4).
- Garcia-Quintanilla, Meritxell, Marina R. Pulido, and Michael J. McConnell. 2013. “First Steps towards a Vaccine against *Acinetobacter baumannii*.” *Current Pharmaceutical Biotechnology* 14 (10):897–902.
- Gellatly, Shaan L., and Robert E. W. Hancock. 2013. “*Pseudomonas aeruginosa* : New Insights into Pathogenesis and Host Defenses.” *Pathogens and Disease* 67 (3):159–73. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>.
- Gibson, Ronald L., Jane L. Burns, and Bonnie W. Ramsey. 2003a. “Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168 (8):918–51. <https://doi.org/10.1164/rccm.200304-505SO>.

- Gombac, Francesca, Maria Letizia Riccio, Gian Maria Rossolini, Cristina Lagattola, Enrico Tonin, Carlo Monti-Bragadin, Annamaria Lavenia, and Lucilla Dolzani. 2002. "Molecular Characterization of Integrons in Epidemiologically Unrelated Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* from Italian Hospitals Reveals a Limited Diversity of Gene Cassette Arrays." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (11):3665–68.
- Grundmann, H, C Schneider, D Hartung, F D Daschner, and T L Pitt. 1995. "Discriminatory Power of Three DNA-Based Typing Techniques for *Pseudomonas aeruginosa*." *Journal of Clinical Microbiology* 33 (3):528–34.
- Hancock, R. E., and H. G. Sahl. 2006. "Antimicrobial and Host-Defense Peptides as New Anti-Infective Therapeutic Strategies." *Nat Biotechnol* 24. <https://doi.org/10.1038/nbt1267>.
- Hancock, Robert E. W., and Daniel S. Chapple. 1999. "Peptide Antibiotics." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 (6):1317–23.
- Harshey, Rasika M. 2003. "Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal." *Annual Review of Microbiology* 57:249–73. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.091014>.
- Hartzell, Joshua D., Andrew S. Kim, Mark G. Kortepeter, and Kimberly A. Moran. 2007. "*Acinetobacter pneumonia*: A Review." *Medscape General Medicine* 9 (3):4.
- Hauck, Yolande, Charles Soler, Patrick Jault, Audrey Mérens, Patrick Gérôme, Christine Mac Nab, François Trueba, et al. 2012. "Diversity of *Acinetobacter baumannii* in Four French Military Hospitals, as Assessed by Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis." *PloS One* 7 (9):e44597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044597>.
- Hauser, Alan R., Manu Jain, Maskit Bar-Meir, and Susanna A. McColley. 2011. "Clinical Significance of Microbial Infection and Adaptation in Cystic Fibrosis." *Clinical Microbiology Reviews* 24 (1):29–70. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-10>.
- Herasimenka, Yury, Monica Benincasa, Maura Mattiuzzo, Paola Cescutti, Renato Gennaro, and Roberto Rizzo. 2005. "Interaction of Antimicrobial Peptides

- with Bacterial Polysaccharides from Lung Pathogens.” *Peptides* 26 (7):1127–32. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.020>.
- Herrmann, Gloria, Liang Yang, Hong Wu, Zhijun Song, Hengzhuang Wang, Niels Høiby, Martina Ulrich, Søren Molin, Joachim Riethmüller, and Gerd Döring. 2010. “Colistin-Tobramycin Combinations Are Superior to Monotherapy Concerning the Killing of Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*.” *The Journal of Infectious Diseases* 202 (10):1585–92. <https://doi.org/10.1086/656788>.
- Heydorn, A., A. T. Nielsen, M. Hentzer, C. Sternberg, M. Givskov, B. K. Ersbøll, and S. Molin. 2000. “Quantification of Biofilm Structures by the Novel Computer Program COMSTAT.” *Microbiology (Reading, England)* 146 (Pt 10) (October):2395–2407. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2395>.
- Howard, Aoife, Michael O’Donoghue, Audrey Feeney, and Roy D. Sleator. 2012. “*Acinetobacter baumannii*.” *Virulence* 3 (3):243–50. <https://doi.org/10.4161/viru.19700>.
- Hsieh, M. H., C. M. Yu, V. L. Yu, and J. W. Chow. 1993. “Synergy Assessed by Checkerboard. A Critical Analysis.” *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 16 (4):343–49.
- Husain, Fohad M., Iqbal Ahmad, Mohammad S. Khan, Ejaz Ahmad, Qudisa Tahseen, Mohd Shahnawaz Khan, and Nasser A. Alshabib. 2015. “Sub-MICs of Mentha Piperita Essential Oil and Menthol Inhibits AHL Mediated Quorum Sensing and Biofilm of Gram-Negative Bacteria.” *Frontiers in Microbiology* 6 (May). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00420>.
- Imperi, Francesco, Livia Leoni, and Paolo Visca. 2014. “Antivirulence Activity of Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa*.” *Frontiers in Microbiology* 5 (April). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00178>.
- Jamal, Muhsin, Ufaq Tasneem, Tahir Hussain, and Saadia Andleeb. 2015. “Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections.” *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology* 4 (3).

<http://www.rroij.com/peer-reviewed/bacterial-biofilm-its-composition-formation-and-role-in-human-infections-61426.html>.

- Josenhans, Christine, and Sebastian Suerbaum. 2002. "The Role of Motility as a Virulence Factor in Bacteria." *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 291 (8):605–14. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00173>.
- Karah, Nabil, Bjørg Haldorsen, Nils O. Hermansen, Yngvar Tveten, Eivind Ragnhildstveit, Dag H. Skutlaberg, Ståle Tofteland, Arnfinn Sundsfjord, and Ørjan Samuelsen. 2011. "Emergence of OXA-Carbapenemase- and 16S RRNA Methylase-Producing International Clones of *Acinetobacter baumannii* in Norway." *Journal of Medical Microbiology* 60 (Pt 4):515–21. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.028340-0>.
- Ko, Kwan Soo, Ji Yoeun Suh, Ki Tae Kwon, Sook-In Jung, Kyong-Hwa Park, Cheol In Kang, Doo Ryeon Chung, Kyong Ran Peck, and Jae-Hoon Song. 2007. "High Rates of Resistance to Colistin and Polymyxin B in Subgroups of *Acinetobacter baumannii* Isolates from Korea." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60 (5):1163–67. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm305>.
- Krizsan, Andor, Daniel Knappe, and Ralf Hoffmann. 2015. "Influence of the YjiL-MdtM Gene Cluster on the Antibacterial Activity of Proline-Rich Antimicrobial Peptides Overcoming *Escherichia coli* Resistance Induced by the Missing SbmA Transporter System." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (10):5992–98. <https://doi.org/10.1128/AAC.01307-15>.
- Kumar, Lokender, Sanjay Chhibber, and Kusum Harjai. 2014. "Structural Alterations in *Pseudomonas aeruginosa* by Zingerone Contribute to Enhanced Susceptibility to Antibiotics, Serum and Phagocytes." *Life Sciences* 117 (1):24–32. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.09.017>.
- Kumar, Lokender, Sanjay Chhibber, Rajnish Kumar, Manoj Kumar, and Kusum Harjai. 2015. "Zingerone Silences Quorum Sensing and Attenuates Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*." *Fitoterapia* 102 (April):84–95. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.02.002>.

- Kumar, N. Vijendra, Pushpa S. Murthy, J. R. Manjunatha, and B. K. Bettadaiah. 2014. "Synthesis and Quorum Sensing Inhibitory Activity of Key Phenolic Compounds of Ginger and Their Derivatives." *Food Chemistry* 159 (September):451–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.039>.
- Lee, Chang-Ro, Jung Hun Lee, Moonhee Park, Kwang Seung Park, Il Kwon Bae, Young Bae Kim, Chang-Jun Cha, Byeong Chul Jeong, and Sang Hee Lee. 2017. "Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7:55. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>.
- Li, Wen-Ru, Xiao-Bao Xie, Qing-Shan Shi, Hai-Yan Zeng, You-Sheng Ou-Yang, and Yi-Ben Chen. 2010. "Antibacterial Activity and Mechanism of Silver Nanoparticles on *Escherichia coli*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (4):1115–22. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2159-5>.
- Llobet, Enrique, Juan M. Tomás, and Jose A. Bengoechea. 2008. "Capsule Polysaccharide Is a Bacterial Decoy for Antimicrobial Peptides." *Microbiology (Reading, England)* 154 (Pt 12):3877–86. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/022301-0>.
- Magiorakos, A.-P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, et al. 2012. "Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance." *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 (3):268–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
- Mahlapuu, Margit, Joakim Håkansson, Lovisa Ringstad, and Camilla Björn. 2016. "Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>.
- Mardirossian, Mario, Renata Grzela, Carmela Giglione, Thierry Meinnel, Renato Gennaro, Peter Mergaert, and Marco Scocchi. 2014. "The Host Antimi-

- crobial Peptide Bac71-35 Binds to Bacterial Ribosomal Proteins and Inhibits Protein Synthesis.” *Chemistry & Biology* 21 (12):1639–47. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.10.009>.
- Mardirossian, Mario, Arianna Pompilio, Valentina Crocetta, Serena De Nicola, Filomena Guida, Margherita Degasperi, Renato Gennaro, Giovanni Di Bonaventura, and Marco Scocchi. 2016. “In Vitro and in Vivo Evaluation of BMAP-Derived Peptides for the Treatment of Cystic Fibrosis-Related Pulmonary Infections.” *Amino Acids* 48 (9):2253–60. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2266-4>.
- McConnell, Michael J., Luis Actis, and Jerónimo Pachón. 2013. “*Acinetobacter baumannii*: Human Infections, Factors Contributing to Pathogenesis and Animal Models.” *FEMS Microbiology Reviews* 37 (2):130–55. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x>.
- Milan, Annalisa, Linda Furlanis, Franca Cian, Raffaella Bressan, Roberto Luzzati, Cristina Lagatolla, Maria Luisa Deiana, Anna Knezevich, Enrico Tonin, and Lucilla Dolzani. 2016. “Epidemic Dissemination of a Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clone Carrying ArmA Two Years After Its First Isolation in an Italian Hospital.” *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, March. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0167>.
- Moskowitz, Samuel M., Jessica M. Foster, Julia Emerson, and Jane L. Burns. 2004a. “Clinically Feasible Biofilm Susceptibility Assay for Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Patients with Cystic Fibrosis.” *Journal of Clinical Microbiology* 42 (5):1915–22.
- Overhage, Joerg, Andrea Campisano, Manjeet Bains, Ellen C. W. Torfs, Bernd H. A. Rehm, and Robert E. W. Hancock. 2008. “Human Host Defense Peptide LL-37 Prevents Bacterial Biofilm Formation.” *Infection and Immunity* 76 (9):4176–82. <https://doi.org/10.1128/IAI.00318-08>.
- Paczosa, Michelle K., and Joan Mecsas. 2016. “*Klebsiella Pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 80 (3):629–61. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>.

- Peng, Shih-Yi, Ren-In You, Meng-Jiun Lai, Nien-Tsung Lin, Li-Kuang Chen, and Kai-Chih Chang. 2017. "Highly Potent Antimicrobial Modified Peptides Derived from the *Acinetobacter baumannii* Phage Endolysin LysAB2." *Scientific Reports* 7 (1):11477. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11832-7>.
- Pires, João, Thissa N. Siriwardena, Michaela Stach, Regula Tinguely, Sara Kasraian, Francesco Luzzaro, Stephen L. Leib, Tamis Darbre, Jean-Louis Raymond, and Andrea Endimiani. 2015. "In Vitro Activity of the Novel Antimicrobial Peptide Dendrimer G3KL against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (12):7915–18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01853-15>.
- Pompilio, A., M. Scocchi, S. Pomponio, F. Guida, A. Di Primio, E. Fiscarelli, R. Gennaro, and G. Di Bonaventura. 2011a. "Antibacterial and Anti-Biofilm Effects of Cathelicidin Peptides against Pathogens Isolated from Cystic Fibrosis Patients." *Peptides* 32. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.08.002>.
- Principe, Luigi, Aurora Piazza, Tommaso Giani, Silvia Bracco, Maria Sofia Caltagirone, Fabio Arena, Elisabetta Nucleo, et al. 2014. "Epidemic Diffusion of OXA-23-Producing *Acinetobacter baumannii* Isolates in Italy: Results of the First Cross-Sectional Countrywide Survey." *Journal of Clinical Microbiology* 52 (8):3004–10. <https://doi.org/10.1128/JCM.00291-14>.
- Pritt, Bobbi, Linda O'Brien, and Washington Winn. 2007. "Mucoic Pseudomonas in Cystic Fibrosis." *American Journal of Clinical Pathology* 128 (1):32–34. <https://doi.org/10.1309/KJRPC7DD5TR9NTDM>.
- Rada, Balázs. 2017. "Interactions between Neutrophils and *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis." *Pathogens* 6 (1):10. <https://doi.org/10.3390/pathogens6010010>.
- Rampioni, Giordano, Livia Leoni, and Paul Williams. 2014. "The Art of Antibacterial Warfare: Deception through Interference with Quorum Sensing-

- Mediated Communication.” *Bioorganic Chemistry* 55 (August):60–68. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2014.04.005>.
- Ruiz, J., I. Castro, E. Calabuig, and M. Salavert. 2017. “Non-Antibiotic Treatment for Infectious Diseases.” *Revista Espanola De Quimioterapia: Publicacion Oficial De La Sociedad Espanola De Quimioterapia* 30 Suppl 1 (September):66–71.
- Runti, Giulia, Monica Benincasa, Grazia Giuffrida, Giulia Devescovi, Vittorio Venturi, Renato Gennaro, and Marco Scocchi. 2017a. “The Mechanism of Killing by the Proline-Rich Peptide Bac7(1-35) against Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Differs from That Showed against Other Gram-Negative Bacteria.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, January, AAC.01660-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01660-16>.
- Runti, Giulia, Maria del Carmen Lopez Ruiz, Tatiana Stoilova, Rohanah Hussain, Matthew Jennions, Hassanul G. Choudhury, Monica Benincasa, Renato Gennaro, Konstantinos Beis, and Marco Scocchi. 2013. “Functional Characterization of SbmA, a Bacterial Inner Membrane Transporter Required for Importing the Antimicrobial Peptide Bac7(1-35).” *Journal of Bacteriology* 195 (23):5343–51. <https://doi.org/10.1128/JB.00818-13>.
- Salunkhe, Prabhakar, Catherine H. M. Smart, J. Alun W. Morgan, Stavroula Pannagea, Martin J. Walshaw, C. Anthony Hart, Robert Geffers, Burkhard Tümmler, and Craig Winstanley. 2005. “A Cystic Fibrosis Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Displays Enhanced Virulence and Antimicrobial Resistance.” *Journal of Bacteriology* 187 (14):4908–20. <https://doi.org/10.1128/JB.187.14.4908-4920.2005>.
- Scocchi, Marco, Alessandro Tossi, and Renato Gennaro. 2011. “Proline-Rich Antimicrobial Peptides: Converging to a Non-Lytic Mechanism of Action.” *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 68 (13):2317–30. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0721-7>.
- Seifert, Harald, Lucilla Dolzani, Raffaella Bressan, Tanny van der Reijden, Beppe van Strijen, Danuta Stefanik, Herre Heersma, and Lenie Dijkshoorn. 2005. “Standardization and Interlaboratory Reproducibility Assessment of

- Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Generated Fingerprints of *Acinetobacter baumannii*.” *Journal of Clinical Microbiology* 43 (9):4328–35. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4328-4335.2005>.
- Skerlavaj, B., R. Gennaro, L. Bagella, L. Merluzzi, A. Risso, and M. Zanetti. 1996. “Biological Characterization of Two Novel Cathelicidin-Derived Peptides and Identification of Structural Requirements for Their Antimicrobial and Cell Lytic Activities.” *J Biol Chem* 271. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.45.28375>.
- Skerlavaj, Barbara, Renato Gennaro, Luigi Bagella, Laura Merluzzi, Angela Risso, and Margherita Zanetti. 1996. “Biological Characterization of Two Novel Cathelicidin-Derived Peptides and Identification of Structural Requirements for Their Antimicrobial and Cell Lytic Activities.” *Journal of Biological Chemistry* 271 (45):28375–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.45.28375>.
- Skiebe, Evelyn, Véronique de Berardinis, Peter Morczinek, Tobias Kerrinnes, Franziska Faber, Daniela Lepka, Bettina Hammer, et al. 2012a. “Surface-Associated Motility, a Common Trait of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*, Depends on 1,3-Diaminopropane.” *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 302 (3):117–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.03.003>.
- Smith, Eric E., Danielle G. Buckley, Zaining Wu, Channakhone Saenphimachak, Lucas R. Hoffman, David A. D’Argenio, Samuel I. Miller, et al. 2006. “Genetic Adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the Airways of Cystic Fibrosis Patients.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (22):8487–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602138103>.
- Sousa, Ana Margarida, and Maria Olívia Pereira. 2014. “*Pseudomonas aeruginosa* Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs—A Review.” *Pathogens* 3 (3):680–703. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030680>.

- Stepanović, Srdjan, Dragana Vuković, Veronika Hola, Giovanni Di Bonaventura, Slobodanka Djukić, Ivana Ćirković, and Filip Ruzicka. 2007. “Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by *Staphylococci*.” *APMIS* 115 (8):891–99. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
- Struelens, M. J., V. Schwam, A. Deplano, and D. Baran. 1993. “Genome Macrorestriction Analysis of Diversity and Variability of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Infecting Cystic Fibrosis Patients.” *Journal of Clinical Microbiology* 31 (9):2320–26.
- Tateda, Kazuhiro, Rachel Comte, Jean-Claude Pechere, Thilo Köhler, Keizo Yamaguchi, and Christian Van Delden. 2001. “Azithromycin Inhibits Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (6):1930–33. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1930-1933.2001>.
- Taylor, Patrick K., Amy T. Y. Yeung, and Robert E. W. Hancock. 2014. “Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Towards the Development of Novel Anti-Biofilm Therapies.” *Journal of Biotechnology*, Special Issue dedicated to Karl-Erich Jaeger on the occasion of his 60th Birthday, 191 (December):121–30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.003>.
- Tré-Hardy, Marie, Carole Nagant, Naïma El Manssouri, Francis Vanderbist, Hamidou Traore, Mario Vaneechoutte, and Jean-Paul Dehaye. 2010. “Efficacy of the Combination of Tobramycin and a Macrolide in an in Vitro *Pseudomonas aeruginosa* Mature Biofilm Model.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (10):4409–15. <https://doi.org/10.1128/AAC.00372-10>.
- Ventola, C. Lee. 2015a. “The Antibiotic Resistance Crisis.” *Pharmacy and Therapeutics* 40 (4):277–83.
- Vuotto, Claudia, Francesca Longo, Maria Pia Balice, Gianfranco Donelli, and Pietro E. Varaldo. 2014. “Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation

- in *Klebsiella pneumoniae*.” *Pathogens* 3 (3):743–58. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030743>.
- Westritschnig, Kerstin, Romana Hochreiter, Gerhard Wallner, Christa Firbas, Michael Schwameis, and Bernd Jilma. 2014. “A Randomized, Placebo-Controlled Phase I Study Assessing the Safety and Immunogenicity of a *Pseudomonas aeruginosa* Hybrid Outer Membrane Protein OprF/I Vaccine (IC43) in Healthy Volunteers.” *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 10 (1):170–83. <https://doi.org/10.4161/hv.26565>.
- “WHO | Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics.” 2017. WHO. 2017. <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>.
- Woodford, Neil, Matthew J. Ellington, Juliana M. Coelho, Jane F. Turton, M. Elaina Ward, Susan Brown, Sebastian G. B. Amyes, and David M. Livermore. 2006a. “Multiplex PCR for Genes Encoding Prevalent OXA Carbapenemases in *Acinetobacter* Spp.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 27 (4):351–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004>.
- Wretling, B., and O. R. Pavlovskis. 1983. “*Pseudomonas aeruginosa* Elastase and Its Role in *Pseudomonas* Infections.” *Reviews of Infectious Diseases* 5 Suppl 5 (December):S998-1004.
- Wu, Qingyu, Ye Olivia Xu-Cai, Shenghan Chen, and Wei Wang. 2009. “Corin: New Insights into the Natriuretic Peptide System.” *Kidney International* 75 (2):142–46. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.418>.
- Xu, Zhi-Gang, Yu Gao, Jian-Guo He, Wei-Feng Xu, Mei Jiang, and Huan-Sheng Jin. 2015. “Effects of Azithromycin on *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Catheter-Associated Urinary Tract Infection.” *Experimental and Therapeutic Medicine* 9 (2):569–72. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.2120>.
- Yigit, H., A. M. Queenan, G. J. Anderson, A. Domenech-Sanchez, J. W. Biddle, C. D. Steward, S. Alberti, K. Bush, and F. C. Tenover. 2001. “Novel Car-

bapenem-Hydrolyzing Beta-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (4):1151–61. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>.

Zaman, Sojib Bin, Muhammed Awlad Hussain, Rachel Nye, Varshil Mehta, Kazi Taib Mamun, and Naznin Hossain. 2017. “A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells Are Ringing.” *Cureus* 9 (6). <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>.

Zhang, Lijuan, Jody Parente, Scott M. Harris, Donald E. Woods, Robert E. W. Hancock, and Timothy J. Falla. 2005. “Antimicrobial Peptide Therapeutics for Cystic Fibrosis.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (7):2921–27. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2921-2927.2005>.

9. Ringraziamenti

Si ringraziano

il Laboratorio dei Peptidi Antimicrobici dell'Università degli Studi di Trieste, in particolare il prof. Scocchi M., la dr Benincasa M., la prof.ssa Pacor S., il dr Mardirossian M., la dr Runti G., il prof. Tossi A. e il prof. Gennaro R. per il contributo scientifico, per aver fornito i peptidi e per gli esperimenti al citofluorimetro.

La prof.ssa Cescutti P. e prof. Rizzo R. per l'estrazione della matrice polisaccaridica di *K. pneumoniae*.

Il dr Baj G. per il costante supporto ed istruzione negli esperimenti di microscopia confocale.

Il dr Petix V. (IRCCS Materno Infantile "Burlo Garofolo", Trieste) e le dott.sse Deiana L., Cian F., Knezevich A. e Buseti M. (Ospedale di Cattinara, Trieste) per l'isolamento dei ceppi da materiale clinico.

Il laboratorio di microbiologia dell'Università degli Studi di Trieste dove ho svolto il dottorato, la prof.ssa Dolzani L., la prof.ssa Lagatolla C., la dr Bressan R. ed il prof. Tonin E. A. che in questi tre anni sono stati come una seconda famiglia, guidandomi passo dopo passo nella parte sperimentale e nella stesura della tesi e con la quale ho trascorso momenti che porterò per sempre nel cuore.

E un grazie, come sempre, alla mia famiglia e a Michele, che senza la loro educazione e il loro affetto non avrei mai raggiunto questo importante traguardo.