

ANTIBIOTICO RESISTENZA E PEPTIDI ANTIMICROBICI

Stefania Marcheggiani
Reparto di Qualità Ambientale e Ittiocoltura

Riassunto

Le infezioni del tratto urinario (*UTIs*) affliggono milioni di persone ogni anno in tutto il mondo e rappresentano la seconda causa di infezione dopo quelle respiratorie. Negli ambienti ospedalieri queste infezioni si diffondono molto rapidamente, inoltre gli agenti eziologici responsabili di queste infezioni, presentano spesso delle multi resistenze nei confronti dei farmaci utilizzati a scopo terapeutico e profilattico. Sin dagli inizi della scoperta degli antibiotici e di conseguenza dal loro utilizzo, fu osservato lo sviluppo di resistenze da parte dei microrganismi stessi, come meccanismo di difesa.

L'immissione massiccia in commercio di farmaci antibiotici ad uso terapeutico, in zootecnia e alimentare ha determinato la comparsa e la diffusione di microrganismi epidemiologicamente importanti, tanto da essere monitorati da programmi di sorveglianza nazionali e internazionali, come ad esempio lo *Staphylococcus aureus* meticillin (-oxicillin) resistente (MRSA).

Da qui la necessità negli ultimi anni di sperimentare terapie alternative a quelle antibiotiche per ridurre e/o tentare di arginare questo fenomeno. Imparare dalla natura è una pratica sempre più diffusa nella scienza in generale, ed ha recentemente dato luogo a una specifica branca della medicina.

Tra le varie sostanze alternative che hanno suscitato molto interesse per le loro capacità antimicrobiche ci sono molecole note come Peptidi Antimicrobici (*AMPs*). Queste molecole vengono costantemente prodotte da molti organismi sia del regno vegetale che animale. Gli *AMPs* hanno caratteristiche chimico e fisiche che li rendono particolarmente adatti all'interazione con le membrane delle cellule batteriche, provocando un danno irreversibile che facilmente conduce alla loro morte. In questo studio è stata valutata l'attività antimicrobica di *AMPs* estratti dalle pelle degli anfibi, su ceppi di *Staphylococci ssp* isolati dalle urine di pazienti ospedalizzati e ambulatoriali.

Introduzione

Le infezioni del tratto urinario (*urinary tract infectious- UTIs*) affliggono milioni di persone ogni anno e rappresentano la seconda causa più comune di infezioni dopo quelle respiratorie in ambiente ospedaliero (Barton, 2008; Stamm and Ragnar, 2001; Johnson and Stamm, 1987). A seconda della loro acquisizione sono classificate in comunitarie (*community-acquired*) o nosocomiali (*hospital-acquired*).

Batteri, virus, lieviti e miceti sono gli agenti eziologici che causano le infezioni urinari. In circa l'85% dei casi l'infezione è causata dai batteri in particolar modo dai gram negativi ed *Escherichia coli* è il principale agente responsabile (Karlowsky *et al.*, 2002). Tra gli altri gram negativi responsabili *UTIs* ci sono *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e tra i gram positivi *Enterococcus sp.*, *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus* e *S. saprophyticus* (Gradwohl, 2005). L'infezione può essere causata da un solo o più agenti

patogeno quando la concentrazione corrisponde 10^5 colonie per millilitro di coltura (Kass, 1961). Più raramente queste infezioni possono essere causate da *Candida albicans*, virus, batteri anaerobi e micoplasmi. I microrganismi patogeni possono invadere e diffondere nel tratto urinario attraverso tre differenti vie: ascendente, discendente o linfatica. *UTIs* possono essere distinte in complicate, quando l'apparato urinario presenta delle anomalie strutturali e/o neurologiche, e non complicate dove detto apparato risulta normale.

Un'ulteriore classificazione può essere fatta in relazione al sito corporeo coinvolto ossia: infezione dell'alto tratto quando riguardano ureteri, pelvi renali, calici e/o parenchima renale e danno origine a pielonefriti; del basso tratto urinario quando invece interessa l'uretra e/o la vescica e da origine a cistiti, prostatiti, epididimidis, uretriti; o entrambe i tratti e danno origine a patologie più complesse.

Il diffuso e spesso inappropriato uso di antibiotici in medicina umana e veterinaria ha determinato un progressivo sviluppo e diffusione delle resistenze agli antibiotici, da parte di molti microrganismi e conseguentemente la riduzione della loro efficacia terapeutica. Il risultato sono ceppi batterici che acquisiscono resistenza nei confronti degli antibiotici attualmente disponibili. Questo problema è particolarmente sentito negli ospedali, dove la terapia e l'uso profilattico di antibiotici ad ampio spettro ha determinato la comparsa di microrganismi multiresistenti. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e la Commissione Europea (EC) hanno da tempo evidenziato l'importanza di studiare questa emergenza delle resistenze agli antibiotici e la necessità di sviluppare delle strategie per il suo controllo (Oteo *et al.*, 2002).

A livello mondiale si è verificata la comparsa e la diffusione di microrganismi epidemiologicamente importanti, tanto da essere monitorati da programmi di sorveglianza nazionali e internazionali un esempio ne è lo *Staphylococcus aureus* *meritcillin* (*oxicillin*) *resistente* (MRSA). L'emergenza dei ceppi *meticillo-resistenti* di *S. aureus* (MRSA) è un esempio di "evoluzione accelerata" di batteri rapidamente evoluti e propagati a livello planetario grazie alla pressione selettiva di agenti antimicrobici (Oliveria *et al.* 2002). Numerosi sistemi internazionali di sorveglianza sono stati istituiti a livello mondiale, come *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (ERASS), *Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme* (DANMAP), *National Nosocomial Infection Surveillance System* (NNIS), *World Health Organization NET* (WHONET) *Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme* (DANMAP); al fine di collezionare informazioni epidemiologiche sul fenomeno della resistenza antimicrobica.

Da qui la necessità negli ultimi anni di sperimentare terapie alternative a quelle antibiotiche per ridurre e/o tentare di arginare questo fenomeno. Imparare dalla natura è una pratica sempre più diffusa nella scienza in generale, ed ha recentemente dato luogo a una specifica branca della medicina. Da molti anni tra le sostanze alternative con proprietà antibiotiche hanno suscitato molto interesse i peptidi antimicrobici (AMPs).

Gli AMPs sono prodotti da molti tessuti e tipi cellulari, in una grande varietà di specie vegetali e animali. Queste molecole sono prodotte nei siti di infezione da infiammazione ed hanno un ampio spettro di azione nei confronti di batteri, funghi, virus e protozoi. Essi agiscono direttamente con la cellula ospite modulando il processo infiammatorio e la difesa innata (Handcock and Diamond, 2000). Sono stati isolati per la prima volta da insetti, ma successivamente sono stati estratti da piante, crostacei, ascidia e vertebrati ed è chiaro che costituiscono un ruolo chiave nel sistema immune innato negli organismi multicellulari nella scala evolutiva (Zaslouff, 2002; Boman, 1995; Ganz and Lehrer, 1998; Garcia *et al.*, 1998; Otvos, 2000). Da allora più di 800 peptidi antimicrobici sono stati isolati e descritti (Vizioli & Salzet, 2002).

La pelle degli anfibi si è rivelata una ricca sorgente di tali peptidi con funzioni sia fisiologiche che difensive. AMPs sono prodotti e secreti da ghiandole granulari controllate da

nervi simpatici che scaricano il loro contenuto sul dorso dell'animale in risposta ad una varietà di stimoli (Mangoni *et al.*, 2000). La caratteristica comune è che sono peptidi cationici di natura anfipatica, pur variando nel numero di residui da 10-50 aminoacidi, interagiscono con la membrana cellulare e ne distruggono le normali funzioni. La loro sintesi è di tipo ribosomiale ma a differenza di quella classica (procarioti, funghi) avviene in un unico passaggio, partendo da un precursore da 60-170 aminoacidi ad opera di una proteasi, viene prodotto il peptide maturo biologicamente attivo (10-50 aminoacidi).

Per composizione e struttura possono essere distinti in tre principali gruppi:

- contenenti cisteine che a loro volta si distinguono in: peptidi con più ponti disolfuro (defensine e tachiplesine) e con un solo ponte disolfuro (bactenecine, brevenine esculentine);
- alta percentuale di aminoacidi specifici prolina, arginina, triptofano, (PR-39, Bac 5 e Bac 7, indolicidina, ecc.);
- α - elica o struttura random (cecropine, melittina, magainine, dermaseptine, temporine, bombine).

La piccola taglia, la composizione aminoacidica, l'anfipaticità e la carica cationica fanno sì che gli AMPs si attacchino e inseriscano nella membrana cellulare attraverso due meccanismi, a *poro* quando l'inserzione è perpendicolare o *tappeto* quando il peptide si dispone parallelamente, danneggiando e uccidendo il microrganismo (Brogden, 2005). Il meccanismo di azione si può così riassumere:

- "attrazione" dovuta all'interazione elettrostatica tra il peptide (cationico) e le cariche negative esposte dalla parete batterica, e questo è alla base della selettività tra Gram negativi (lipopolisaccaridi) e Gram positivi (acidi teicoici e teicuronici) (Brogden, 2005);
- "attacco" la membrana cellulare è il principale bersaglio per i peptidi. L'alto potenziale trans membrana (-140 mV), facilita l'interazione del peptide che comporta una conseguente alterazione della permeabilità di membrana (Liu *et al.*, 1997; Zao, 1995).

Queste caratteristiche fanno degli AMPs una nuova e interessante classe di antimicrobici e/o agenti antiendotossici per uso terapeutico.

Lo scopo di questo studio è la valutazione dell'attività antimicrobica di sei AMPs in particolare Temporine (B, F, G ed L), Esculentina (ESC₁₋₁₈) e Bombinina (H₂), attraverso saggi microbiologici nei confronti di ceppi di *Staphylococci spp.* isolati da campioni urinari di pazienti ospedalizzati e ambulatoriali.

Materiali e metodi

Campionamento

I ceppi di *Staphylococci spp.* utilizzati in questo studio provengono da una collezione di campioni di urine di pazienti con infezioni delle tratto urinario (UTIs) dal Laboratorio di Batteriologia dell'Ospedale Villa San Pietro Fatebenefratelli di Roma, tra giugno e dicembre 2007. Il primo isolamento è stato eseguito seguendo le procedure standard utilizzate dall'unità di Batteriologia. La positività (batteriuria) della coltura viene assegnata facendo riferimento al valore di Kass (10^5 UFC/mL). L'identificati biochimica e la determinazione dell'antibiotico resistenza eseguita attraverso test di sensibilità di ogni isolato, è stata effettuata utilizzando il sistema automatizzato VITE® 2 (Biomereieux Instruments). Gli isolati sono stati successivamente ripassati in terreno nutritivo *Tryptone Soya Agar* (TSA, OXOID) incubato a $37\pm 1^\circ\text{C}$ per 24 h e conservati in microbank a 20°C fino al momento dei test.

I peptidi utilizzati in questo studio sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Struttura primaria degli AMPs utilizzati in questo studio

| Peptide | Sequenza amminoacidica | Lunghezza (aa) |
|------------------------------|-------------------------------------|----------------|
| Esc (1-18) * | GIFSKLAGKKLKNLLISG -NH ₂ | 18 |
| Temporina B ** | LLPIVGNLLK SLL-NH ₂ | 13 |
| Temporina F ** | FLPLIGKVLG GIL-NH ₂ | 13 |
| Temporina G ** | FFPVIGRILN GIL-NH ₂ | 13 |
| Temporina L ** | FVQWFSKFLG RIL-NH ₂ | 13 |
| Bombinina H ₂ *** | IIGPVLGLVGSALGGLLKI-NH ₂ | 20 |

* Simmaco M, *et al.* 1994; ** Simmaco M, *et al.* 1996; *** Mignogna G, *et al.* 1993

Minima Concentrazione Inibente (MIC)

Il test di suscettibilità è stato eseguito con il metodo delle microdiluizioni liquide seguendo le procedure del *Clinical and Laboratory Standard Institute (ex-NCCLS, 2001)*. Una singola pallina della *microbank* di ogni ceppo isolato, viene rigenerata strisciandola su TSA agar e incubata a 37±1°C per 24 ore. Una singola colonia ben isolata, viene inoculata in 10 mL di Muller Hinton brodo (MH 1X) (OXOID) e incubata a 37±1°C, in agitazione continua. 50 µL di coltura batterica (1,2 10⁸ cell/mL; λ₅₉₀=0,8 A) vengono risospesi in 10 mL di MH (1X). Ogni pozzetto della piastra da 96 (Sigma-Aldrich), ha un volume finale di 100µL così preparato: 50 µL di MH (2X), e diluizioni seriali (1:2) dei differenti AMPs (B, G, F, L, H₂, ESC₁₋₁₈), precedentemente diluiti in etanolo 20% , partendo da una concentrazione 128 a 1µM. Ad ogni pozzetto vengono aggiunti 50 µL di coltura batterica (concentrazione 10⁵ UFC/mL). Sulle piastre sono presenti 3 controlli positivi (50 µL sospensione batterica e 50 µL terreno) e tre controlli negativi (50 µL terreno e 50 µL di acqua sterile). Le piastre multi pozzetto vengono incubate a 37±1°C per 18-20 ore. MIC è definita come la più bassa concentrazione alla quale si osserva un'inibizione della crescita (torbidità), i risultati sono stati letti visivamente. Ogni prova è stata eseguita in triplicato.

Minima Concentrazione Battericida (MBC)

L'attività battericida dei peptidi nei confronti dei 5 ceppi di staphylococchi è stata valutata con saggi di microdiluizioni liquide in PBS (PBS; K₂HPO₄ 3 g/mL, KH₂PO₄ 1 g/mL, NaCl 8,5 g/mL; pH 7,2 ± 0,2) 10 mM (Maisetta *et al.*, 2006). Ogni ceppo viene rigenerato e messo a crescere come sopra descritto. 20 µL di ogni sospensione batterica (1,2 10⁸ cell/mL; λ₅₉₀=0,8 A) vengono addizionati 980 µL di PBS (concentrazione finale 105 UFC /mL). Per ogni peptide vengono preparati 3 tubi sterili (1,5 mL) ognuno con un volume finale di 100 µL e una differente concentrazioni di peptide 0,5X , 1X e 2X quella MIC. Ogni tubo contiene 50 µL di sospensione batterica (10⁵ UFC/mL) una delle tre concentrazioni di peptide e PBS.

I tubi vengono posti ad incubare a 37±1°C per 1,5 ore in agitazione. Dopo l'incubazione i campioni vengono diluiti e ciascuna aliquota seminata per inclusione in TSA. I risultati espressi UFC/mL sono stati determinati dopo 24 ore di incubazione a 37±1°C, gli esperimenti vengono eseguiti in triplicato. I controlli vengono preparati mettendo in tubi sterili, 50 µL di sospensione batterica e 50 µL di PBS. A differenti tempi vengono prelevate opportune aliquote, piastrate e incubate come sopra. L'attività battericida definita come la minima concentrazione battericida (MBC) alla quale la più bassa concentrazione di peptide uccide il 99,9% del inoculo batterico.

Risultati

Gli isolati clinici utilizzati in questo studio sono risultati essere appartenenti due a *S. aureus* (S_6 e S_42) e tre a *S. saprophyticus* (S_23, S_51 e S_80).

I risultati espressi come valori medi degli esperimenti effettuati in triplicato della determinazione minima concentrazione inibente (MIC), degli AMPs testati su tutti i ceppi di *Staphylococcus spp.* sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2. Risultati della attività antimicrobica (MIC) espressi come micromolari (μM) dei sei AMPs

| Ceppo | Codice | Temporine | | | | Bombinine | Esculentina |
|-------------------------|--------|-----------|-----|-----|-----|----------------|---------------------|
| | | B | F | G | L | H ₂ | ESC ¹⁻¹⁸ |
| <i>S. aureus</i> | S_6 | 32 | 32 | 16 | 16 | 16 | ≥64 |
| <i>S. saprophyticus</i> | S_23 | 16 | 16 | 8 | 2 | 8 | 32 |
| <i>S. aureus</i> | S_42 | ≥64 | ≥64 | ≥64 | ≥64 | ≥64 | ≥64 |
| <i>S. saprophyticus</i> | S_51 | ≥64 | ≥64 | 32 | 16 | 16 | ≥64 |
| <i>S. saprophyticus</i> | S_80 | 32 | 32 | 16 | 16 | 16 | 64 |

La temporina L, mostra un'alta attività antimicrobica nei confronti di tutti i ceppi testati: in particolare si ha avuto una concentrazione della MIC di 16 μM per i ceppi S_6, S_51 ed S_80 e una concentrazione di 64 μM per il ceppo S_42. Il ceppo S_23 è risultato essere estremamente sensibile all'azione di tutti e sei peptidi: in particolare la concentrazione della MIC di 2 μM per la temporina L; di 16 μM per la temporina B ed F; di 8 μM per la temporina G e di 32 μM per la bombinina H₂.

I risultati relativi agli esperimenti di determinazione dell'attività battericida (MBC) di ogni peptide, dopo 1,5 ore di incubazione, nei confronti dei ceppi di *Staphylococci spp.*, sono stati eseguiti in triplicato e riportati in Tabella 3.

Tabella 3. Risultati della minima concentrazione battericida (MBC) espressi come percentuale di mortalità, usando tre diverse concentrazioni dei peptidi uguale (1X), la metà(0,5X) e il doppio (2X) del valore della (MIC)

| AMPs | Concentrazione (μM) | Percentuale (%) di mortalità | | | | |
|---------------------|----------------------------------|------------------------------|------|------|------|------|
| | | S_6 | S_23 | S_42 | S_51 | S_80 |
| T_B | 2X | 92 | 92 | - | - | 93 |
| | 1X | - | - | - | - | - |
| | 0,5X | - | - | - | - | - |
| T_F | 2X | 92 | 94 | - | - | 92,7 |
| | 1X | - | - | - | - | - |
| | 0,5X | - | - | - | - | - |
| T_G | 2X | 92 | 93,8 | - | 97,5 | 92 |
| | 1X | - | 92 | - | - | - |
| | 0,5X | - | - | - | - | - |
| T_L | 2X | - | 100 | - | - | - |
| | 1X | - | 100 | - | - | - |
| | 0,5X | 99,9 | 99,9 | - | 99,9 | 99,9 |
| B_H ₂ | 2X | 99,9 | 98,8 | - | 94,1 | 92 |
| | 1X | - | 96,3 | - | - | - |
| | 0,5X | - | 93,8 | - | - | - |
| Esc ¹⁻¹⁸ | 2X | - | 99,9 | - | - | - |
| | 1X | 92 | 99,6 | - | - | 98,2 |
| | 0,5X | - | 95,2 | - | - | - |

Come si osserva dai risultati tutti i peptidi hanno mostrato un'attività battericida (99% della mortalità) in un intervallo tra 1 e 64 μM . La temporina L è stata, tra tutti i peptidi testati, quella che ha mostrato una maggiore azione battericida contro 4 su 5 cinque ceppi Gram-positivi testati (S_80, S_6, S_51, S_23), ad un valore della concentrazione compreso tra 1 a 8 μM . L'esculentina (Esc 1-18) ha mostrato un'attività battericida nei confronti del ceppo S_23 (*S. saprophyticus*); la bombiniba H₂ nei confronti del ceppo S_6 (*S. aureus*). Quest'ultima ha anche mostrato alti livelli di attività antimicrobica (98,8%) nei confronti del S_23. Altri livelli di attività microbica (98,2%), sono stati, inoltre ottenuti per Esc (1-18) contro il ceppo S_80. In tutti i casi al doppio della concentrazione del valore della MIC, tutti peptidi hanno mostrato una attività antibatterica superiore al 92%.

Discussione e conclusioni

Tra tutti i microrganismi responsabili delle infezioni del tratto urinario (UTIs) questo studio si è concentrato sui ceppi di Staphylococchi per l'importanza epidemiologica di quest'ultimi in generale e di *S. aureus* MRSA in particolare, usando un approccio alternativo ovvero la valutazione dell'attività antimicrobica e battericida degli AMPs nei confronti di questi ceppi. I test di conferma sono stati effettuati per avere l'identificazione certa a livello di specie e quindi di poter affermare che si tratta di due ceppi di *S. aureus* e di tre *S. saprophyticus*. Quest'ultimo è un coagulasi-negativo spesso associato ad infezioni urinarie del basso tratto urinario nelle donne giovani e di mezza età (Widerström *et al.*, 2007; Hovelius, 1984). *S. saprophyticus* è resistente alla novobiocina e questa caratteristica è spesso utilizzata nei laboratori per distinguerlo da *S. epidermidis* anch'esso coagulasi negativo. I peptidi antimicrobici, prodotti da molti organismi sia del regno vegetale che animale rappresentano una classe emergente di antibiotici, che potrebbe rappresentare un'alternativa e/o supporto al trattamento di batteri multiresistenti. Studi progressi hanno dimostrato l'attività antimicrobica nei confronti di un ampio spettro di batteri (Wade *et al.* 2000). Utilizzando saggi MIC e MBC in questo studio è stata testata l'attività di sei peptidi contro i 5 ceppi di Staphylococchi multi resistenti. I sei AMPs testati in questo studio sono stati isolati dal derma degli anfibi da un gruppo di ricerca dell'Università la Sapienza.

I risultati degli esperimenti relativi alla determinazione della minima concentrazione inibente (MIC), mostrano che la temporina L ha non solo una attività antimicrobica nei confronti di tutti i ceppi testati rispetto agli altri 5 AMPs, in concentrazioni comprese tra 2 e 16 μM , ma è stato anche l'unico AMP ad aver un'azione antimicrobica nei confronti del ceppo *S. aureus* (S_42), uno dei due ceppi meticillina resistente. Questi risultati sono in accordo con quanto già riportato in letteratura, dove si mostra che le temporine sono generalmente più attive nei confronti dei Gram positivi rispetto ai Gram negativi (Mangoni *et al.*, 2008). Gli esperimenti per la determinazione della minima concentrazione battericida (MBC) sono stati eseguiti utilizzando PBS per escludere ogni eventuali interazioni elettrostatiche tra il peptide (cationico) e i componenti del terreno, imitando inoltre le condizioni fisiologiche. Anche in questo caso la temporina L, ha mostrato una forte attività battericida rispetto agli altri AMPs. Interessante, è il fatto che al doppio del valore della MIC, altri due AMPs hanno mostrato attività battericida ovvero bombina H₂ (contro S_6) ed esculentina (ESC 1-18) (contro S_23). Molti degli AMPs mostrano un'attività simile nei confronti degli isolati nell'ambito della stessa specie, sebbene solo cinque ceppi siano stati testati. Un alto grado di variabilità è stato osservato nel caso delle temporine B,G, F, H₂ ed esculentine nei confronti sia dei *S. saprophyticus* che *S. aureus*. L'effetto battericida contro i batteri Gram positivi è stato osservato all'intervallo di concentrazione da 1 a 32 μM .

Questo studio contribuisce alle conoscenze di base relative all'attività antimicrobica degli AMPs nei confronti di isolati clinici provenienti da campioni urinari. Questa classe di molecole considerate alternative (AMPs) agli antibiotici classici, agisce a livello della membrana cellulare, e di conseguenza non innesca lo sviluppo di resistenze. Molti passaggi sono ancora necessari per la validazione e l'effettivo uso di queste sostanze antimicrobiche che vanno dalla valutazione dell'effetto tossico, ai test sugli animali e alla sperimentazione su umani volontari, ma sicuramente rappresentano una classe di molecole sulle quali investire e che potrebbero contribuire alla riduzione del globale fenomeno dell'antibiotico resistenza. Lo studio del fenomeno delle antibiotico resistenze rappresenta uno degli argomenti prioritari di ricerca sia a livello Europeo (VII Programma Quadro) che nei progetti nazionali del CCN (Ministero della Salute). La sperimentazione di soluzioni innovative che derivano da un approccio integrato sembra essere l'unico modo per contenere l'epidemia di multiresistenza e di sviluppare una cura per uno dei principali problemi di sanità pubblica oggi.

Bibliografia

- Barton MJ. *UTI Report*. Brandon, SD, USA: Barton Publishing; 2008.
- Boman H. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Ann Rev Immunol* 1995;13:61-92.
- Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005;3:238-50.
- Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* 1998;10:41-4.
- Olmedo G, Molina F, Alamillo JM. Plant defense peptides *Biopoly* 1998;47:479-91.
- Gradwohl SE, Chenoweth CHE, Fonde KR, Van Harrison R, Zoschnick LB. Urinary Tract Infection. University of Michigan Health System; 2005.
- Hancock REW, Chapple DS. Peptide antibiotics (Minireview). *Antimicrob Agents Chemot* 1999;43(6):1317-23.
- Hancock REW, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbio* 2000;8(9):402-10.
- Hovelius B, Mardh PA. Staphylococcus saprophyticus as a common cause of urinary tract infections. *Rev Infect Dis* 1984;6:328-37.
- Johnson JR, Stamm WE. Diagnosis and treatment of acute urinary tract infections. *Infect Dis Clin North Am* 1987;1(4):773-91.
- Karlowitsky JA, Kelly JL, Thornsberry C, Jones ME, Sahm DF. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of Escherichia coli from female outpatients in the United States. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 2002;46:2540-5.
- Kass E. Pyelonephritis and bacteriuria. *Ann Intern Med* 1961;56:46-53.
- Liu L, Zhao C, Heng H, Ganz, T. The human b-defensin-1 and a-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry. *Genom* 1997;43:316-20.
- Maisetta G, Batoni G, Esin S, Florio W, Bottai D, Favilli F and Campa M. In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:806-9.
- Mangoni ML, Rinaldi AC, Di Giulio A, Mignogna G, Bozzi A, Barra D and Simmaco M. Structure function relationships of temporins, small antimicrobial peptides from amphibian skin. *Eur J Biochem* 2000;267:1447-54.

- Mangoni ML, Maisetta G, Di Luca M, Marcellini L, Gaddi H, Esin S, Florio W, Brancatisano F L, Barra D, Campa M, Batoni G. Comparative analysis of the bactericidal activities of amphibian peptide analogues against multidrug-resistant nosocomial bacterial strains. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 2008;52(1):85-91.
- Mignogna G, Simmaco M, Kreil G and Barra D. Antibacterial and haemolytic peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina variegata*. *EMBO J* 1993;12:4829-32.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. International Supplement (11th edition). Wayne, Pa and Nimes, France: NCCLS; 2001.
- Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect Dis* 2002;2(3):180-9
- Oteo J, Aracil B, Hoyo JF. Do the quinolones still constitute valid empirical therapy for community-acquired urinary tract infections in Spain? *Clin Microbiol Infect* 1999;5:654-6.
- Otvos L Jr. Antibacterial peptides isolated from insects. *J Pept Sci* 2000;6(10):497-11.
- Pantosti A, Sanchini A, Monaco M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Fut Microbiol* 2007;2:323-34.
- Simmaco M, Mignogna G, Barra D and Bossa F. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNAs encoding esculentin and brevinins and isolation of new active peptides. *J Biol Chem* 1994;269:11956-961.
- Simmaco M, Mignogna G, Canofeni S, Miele R, Mangoni ML, and Barra D. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur J Biochem* 1996;242:788-92.
- Stamm W and Ragnar Norrby S. Urinary Tract Infections: Disease Panorama and Challenges. *J Infect Dis* 2001;183:S1-S4.
- Vizioli J and Salzet M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:494-6.
- Wade D, Silberring J, Soliymani R, Heikkinen S, Kilpelainen I, Lankinen H and Kuusela P. Antibacterial activities of temporin A analogs. *FEBS Lett* 2000;479:6-9.
- Widerström M, Wiström J, Ferry S, Karlsson C and Monsen T. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus saprophyticus* Isolated from Women with Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infection. *J Clin Microbiol* 2007;45(5):1561-4.
- Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002;415:389-95.
- Zhao C, Ganz T, Lehrer RI. Structures of genes for two cathelin-associated antimicrobial peptides: prophenin-2 and PR-39. *FEBS Lett* 1995;376:130-4.