



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

**Terapie alternative per contrastare
l'antibiotico-resistenza**

**Progress in alternative strategies to
combat antimicrobial resistance**

Relatore:
Prof. **Andrea Giacometti**

Tesi di Laurea di:
Giusy Maria Falbo

A.A. 2025/2026

"La medicina insegna prima di tutto l'umiltà"

-Appunti di un giovane medico, Michail Bulgakov

INDICE

Introduzione

1. Prospettive storiche degli antibiotici

2. Dagli antibiotici convenzionali alla terapia di combinazione

2.1. *Gruppi di antibiotici e loro meccanismo d'azione*

2.2. *Comprensione dei meccanismi di resistenza antimicrobica e dell'uso di inibitori*

2.3. *Terapia di combinazione*

2.3.1. *Combinazioni di antibiotici*

2.3.2. *Combinazione di antibiotici con inibitori delle β -lattamasi*

2.3.3. *Combinazione di antibiotici con biocidi*

3. Strategie mirate agli enzimi resistenti agli antimicrobici

3.1. *Inibitori enzimatici*

3.2. *Piante medicinali e fitochimici*

3.3. *Piccole molecole - entità chimiche migliorate (ICE)*

3.4. *Oli essenziali*

3.5. *Silenziamento dell'RNA*

3.6. *Sistema CRISPR-Cas*

4. Strategie mirate ai batteri resistenti agli antimicrobici

4.1. *Antibiotici e batteriocine*

4.2. *Peptidi antimicrobici (AMP) - Inclusa la combinazione AMP + antibiotici*

4.3. *Enzimi e AMP derivati da insetti*

4.4. *Strategie basate sulle nanoparticelle*

4.5. *Strategie di coinfezione e batteri probiotici contro i patogeni*

4.6. *Utilità degli anticorpi monoclonali contro i patogeni*

4.7. *Basato sui batteriofagi: specifico o selettivo o entrambi!*

4.7.1. *Terapia fagica*

4.7.2. *Proteine litiche derivate dai fagi come antibatterici*

4.8. *Metodi di dispersione del biofilm*

4.9. *Scoperta e ruolo degli antimicrobici anti-persistenza*

4.10. *Interruzione del Quorum Sensing*

5. Strategie basate su sistemi di rilascio di farmaci

5.1. *Sistemi di rilascio facilitato di farmaci*

5.2. *Antiplasmide e cura dei plasmidi - Tuttavia, non adatti per la sperimentazione in vivo*

5.3. *Composti antivirulenti*

6. Metodi fisico-chimici

6.1. *Plasma non termico a pressione atmosferica (APNTP)*

6.2. *Chemioterapia antimicrobica sonodinamica*

6.3. *Fotoinattivazione*

6.4. *Altri mezzi fisico-chimici*

7. Ruolo atteso dei vaccini nella lotta contro i patogeni della resistenza antimicrobica

8. Strategie non convenzionali

Conclusioni

Bibliografia

Introduzione

Negli ultimi decenni la scoperta e lo sviluppo degli antibiotici hanno rappresentato una delle più importanti rivoluzioni della medicina moderna. L'introduzione della penicillina e delle successive classi di antimicrobici ha consentito di trattare infezioni che in passato erano considerate mortali, riducendo drasticamente la mortalità e migliorando la qualità e l'aspettativa di vita della popolazione mondiale. Tuttavia, il successo della terapia antibiotica è stato progressivamente compromesso dall'emergere della resistenza antimicrobica (AMR), fenomeno biologico attraverso il quale i microrganismi sviluppano la capacità di sopravvivere all'azione dei farmaci antimicrobici. L'utilizzo eccessivo, inappropriato e spesso indiscriminato degli antibiotici in medicina umana, veterinaria e in ambito agricolo ha favorito la selezione di batteri resistenti, determinando la diffusione globale di ceppi MDR (multidrug-resistant), XDR (extensively drug-resistant) e PDR (pan drug-resistant).

L'OMS ha ufficialmente riconosciuto che gli antibiotici e altri farmaci antimicrobici stanno diventando sempre più inefficaci a causa dell'AMR e che le malattie sono diventate più difficili o addirittura impossibili da trattare [1]. Il comitato internazionale dell'OIE (Organizzazione Mondiale per la Salute Animale) ha adottato all'unanimità l'elenco degli agenti antimicrobici di importanza veterinaria durante la sua 75° sessione generale nel maggio 2007 [2]. L'AMR ha effetti significativi in termini di oneri farmaco-economici. Ad esempio, l'Infectious Disease Society of America (IDSA) ha pubblicato uno studio che ha riportato il

costoso onere dell'AMR nella popolazione Medicare statunitense, dimostrando che, nel 2017, le infezioni causate da batteri resistenti a vari antibiotici sono costate agli Stati Uniti 1,9 miliardi di dollari in costi sanitari, 400.000 giorni di degenza ospedaliera e hanno causato 10.000 decessi tra gli anziani [3]. Questo studio è stato preceduto dalla UK Review on Antimicrobial Resistance del 2014, presieduta da Lord Jim O'Neill, che ha rivelato 700.000 decessi annuali dovuti a infezioni resistenti, che dovrebbero aumentare a 10 milioni di decessi annuali con un costo totale di 100.000 miliardi di dollari in termini di produzione economica entro il 2050 se non si trovano soluzioni proattive per prevenire l'aumento della resistenza ai farmaci [4]. In una prima valutazione completa in assoluto dell'impatto globale della resistenza antimicrobica,

basata sull'analisi statistica dei dati disponibili nel 2019 provenienti da 204 paesi, è stato stimato che la resistenza antimicrobica contribuisca a 1,27 milioni di decessi tra i 4,95 milioni di decessi associati alla resistenza antimicrobica batterica. Si prevedeva che i decessi per legati alla AMR fossero i più alti nell'Africa subsahariana e i più bassi in Australasia. Inoltre, si prevedeva che lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) fosse responsabile di mezzo milione di decessi, mentre i sei patogeni *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* fossero responsabili di un numero di decessi compreso tra 50.000 e 100.000 [5].

La resistenza antimicrobica non ha confini reali e si è silenziosamente evoluta in un problema di salute pubblica globale che minaccia le popolazioni dei paesi ad alto, medio e basso rischio. L'ambiente, la produzione alimentare, la povertà, la sicurezza sanitaria e il raggiungimento degli Obiettivi di Sviluppo Sostenibile delle Nazioni Unite saranno tutti interessati, sottolineando la necessità di una strategia multisettoriale "One Health" per contenere l'AMR [6]. L'aumento della frequenza dell'AMR, in particolare tra i patogeni ESKAPEE clinicamente significativi (specie di *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, specie di *Enterobacter* ed *Escherichia coli*), ha esercitato un'enorme pressione sui settori sanitario, veterinario e agricolo, rendendolo una delle preoccupazioni di salute pubblica più urgenti al mondo [7,8]. Inoltre, in un contesto "One Health", le conseguenze della diffusione dei batteri AMR dagli animali destinati all'alimentazione umana possono avere un profondo impatto sia sulla salute animale che sulla salute pubblica [9]. Considerando l'impatto globale dei batteri AMR sulla salute e la necessità di nuovi antibiotici, si stanno implementando nuove strategie per proteggere e trattare le infezioni MDR, XDR e PDR, poiché persino i cosiddetti "antibiotics of last resort" stanno diventando inefficaci in ambito clinico [10].

L'obiettivo di questa tesi compilativa è analizzare i principali meccanismi responsabili della resistenza antimicrobica, valutare l'impatto clinico ed epidemiologico del fenomeno e approfondire le più recenti strategie terapeutiche sviluppate per contrastare la diffusione dei batteri resistenti.

Strategie alternative per combattere la resistenza antimicrobica

enzimi resistenti agli antimicrobici	batteri resistenti agli antimicrobici	sistemi di somministrazione farmaci	metodi fisico-chimici
inibitori enzimatici	lantibiotici e batteriocine	sistemi di somministrazione facilitata dei farmaci	plasma non termico a pressione atmosferica
piante medicinali e sostanze fitochimiche	peptidi antimicrobici (AMP)	polimerizzazione anti-plasmidica e plasmidica	chemioterapia antimicrobica sonodinamica
piccole molecole	strategie basate sulle nanoparticelle	composti anti-virulenza	fotoinattivazione
oli essenziali	strategie di coinfezione e probiotici		
silenzamento dell'RNA	anticorpi monoclonali		
Crispr - sistema CAS	batteriofagi basati		
	metodi di dispersione del biofilm		
	molecole anti-persistenza		
	interruzione del quorum sensing		

Figura 1. Categorie di strategie alternative per combattere la resistenza antimicrobica

1. Prospettive storiche degli antibiotici

I farmaci antimicrobici hanno rivoluzionato non solo il trattamento delle malattie infettive, ma anche la durata della vita umana. Molti di questi sviluppi sono evidenziati nella Figura 2. Il Salvarsan, un trattamento per la sifilide sviluppato da Ehrlich nel 1910 [11], è stato tra i primi agenti antimicrobici al mondo. Tuttavia, forse l'antibiotico più

noto è la penicillina, scoperta da Alexander Fleming nel 1928, seguita da Domagk e altri ricercatori, che sintetizzarono i sulfonamidi (o sulfamidici) nel 1935. Ciononostante, i sulfonamidi presentavano alcuni notevoli limiti di sicurezza ed efficacia. Nei due decenni successivi, furono sviluppate diverse nuove classi di agenti antimicrobici, dando inizio alla cosiddetta "età dell'oro" della chemioterapia antimicrobica. Alcuni esempi includono la streptomicina, un antibiotico aminoglicoside, isolato nel 1944 da un batterio del suolo chiamato *Streptomyces griseus*. Altri microrganismi del suolo hanno prodotto cloramfenicolo, rifampicina, tetracicline, macrolidi e glicopeptidi (come la vancomicina e, successivamente, la teicoplanina). Nel 1962, fu sviluppato l'agente antibatterico acido nalidixico, un antimicrobico chinolonico, seguito dalle cefalosporine, scoperte negli anni '60 e diventate rapidamente popolari tra i medici. Da allora, gli agenti antimicrobici hanno continuato a migliorare in termini di efficacia intrinseca e spettro di attività. Un ottimo esempio di ciò è la classe dei carbapenemi, progettata per possedere un'attività antibatterica ad ampio spettro, anche contro i patogeni che all'epoca mostravano resistenza ad altre classi di antibiotici [12]. Sebbene numerose aziende inizialmente si siano confrontate nello sviluppo di nuovi agenti antimicrobici, il numero di nuovi antimicrobici è in costante calo negli ultimi anni, con solo pochi agenti antimicrobici di nuove classi divenuti accessibili. All'inizio degli anni '80, diverse aziende hanno perso interesse nello sviluppo di agenti antimicrobici poiché non garantivano una continua espansione del mercato e profitti [13]. Se a ciò si aggiunge la crescente diffusione globale dell'AMR, la situazione ha fatto sì che le strategie non tradizionali diventassero potenzialmente interessanti come nuove vie terapeutiche. A differenza dei decenni passati, la maggior parte delle aziende ora coinvolte nello sviluppo di agenti antimicrobici sono aziende farmaceutiche di piccole e medie dimensioni. La notizia positiva è che ora si stanno studiando molteplici strategie alternative, come strategie anti-virulenza, strategie di modificazione del microbioma, immunomodulatori, fagi modificati e probiotici. Va notato che la terapia fagica risale a molti decenni fa in Europa, con i batteriofagi utilizzati in Russia per il trattamento di soldati affetti da dissenteria o cancrena negli anni '40 [14].

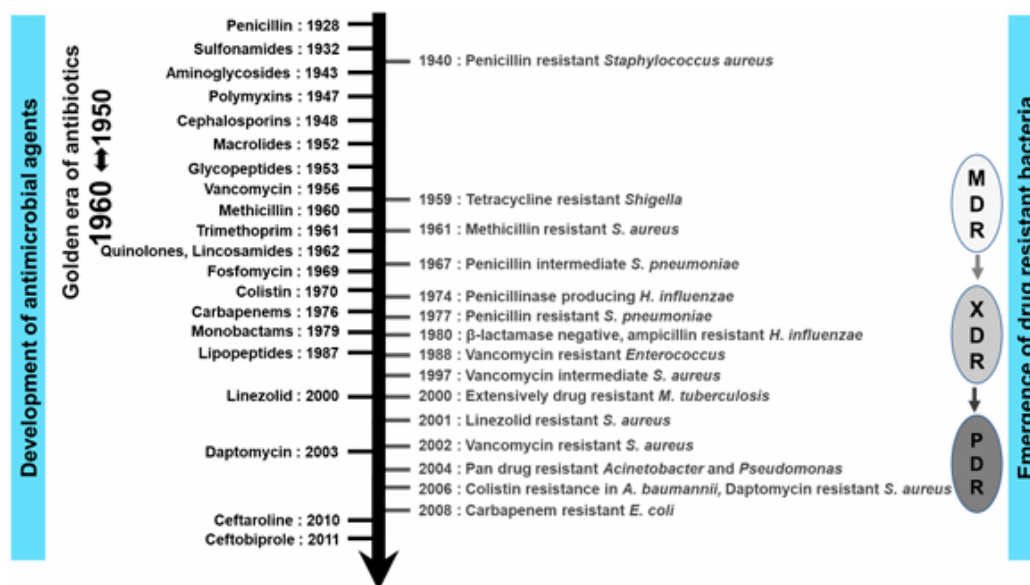


Figura 2. Linea temporale di otto decenni di scoperta di antimicrobici parallelamente all'emergenza dell'AMR. MDR: multi-farmaco-resistente, XDR: ampiamente-farmaco-resistente e PDR: pan-farmaco-resistente.

2. Dagli antibiotici convenzionali alla terapia di combinazione

2.1. Gruppi di antibiotici e loro meccanismo d'azione

Come elencato nella Tabella 1, gli antibiotici sono classificati in gruppi in base alla loro classe di molecole e ai bersagli/meccanismo d'azione primario; i bersagli antimicrobici includono le membrane cellulari, Pareti cellulari, sintesi proteica, sintesi di DNA o RNA e sintesi di composti metabolici biologici.

Tabella 1. Classe di antibiotici e meccanismo d'azione.

Antibiotic Class	Mechanism of Action	References
Beta lactams: carbapenems, cephalosporins, monobactam, penicillin, glycopeptides	Inhibit cell wall synthesis	[15]
Lipopeptides	Depolarize cell membrane	[16]
Aminoglycosides, tetracyclines Chloramphenicol, macrolides	Inhibit protein synthesis by binding to 30S ribosomal unit and 50S ribosomal unit	[17,18]
Quinolones	Inhibit nucleic acid synthesis	[19]
Sulfonamides, trimethoprim	Inhibit metabolic pathways	[20]

2.2. Comprensione dei meccanismi di resistenza antimicrobica e dell'uso di inibitori

L'aumento globale della resistenza agli antibiotici nei batteri è determinato da una varietà di meccanismi, sia ancestralmente intrinseci alla biologia di un patogeno, sia da

meccanismi emergenti, innescati dalla pressione selettiva esercitata dall'uso eccessivo e improprio di antibiotici nei settori umano, veterinario e agricolo.

Almeno quattro meccanismi di resistenza antimicrobica batterica (Figura 3) sono stati ben definiti:

- (1) Degradazione enzimatica degli antibiotici, ad esempio la sintesi batterica di β -lattamasi che degradano la classe di antibiotici β -lattamici;
- (2) Modifica del bersaglio dell'antibiotico, ovvero il bersaglio viene modificato in modo che l'antibiotico non sia più in grado di legarsi al suo sito d'azione;
- (3) Controllo dell'ingresso del farmaco attraverso mutazioni delle proteine poriniche della parete cellulare batterica e modificazioni della membrana;
- (4) Attivazione di sistemi di pompe di efflusso, in grado di pompare gli antibiotici fuori dalla cellula prima che si verifichino interazioni antibiotico-bersaglio.

La comprensione dei meccanismi della resistenza agli antibiotici ha contribuito allo sviluppo e all'utilizzo di diversi inibitori del meccanismo di resistenza, come:

- (a) silenziatori genici AMR, che silenziano i geni AMR, ad esempio: sistema CRISPR-Cas
- (b) inibitori ribosomiali, che si legano alle subunità ribosomiali e alterano la produzione proteica in modo che i batteri non possano combattere con le proteine; e
- (c) inibitori della pompa di efflusso.

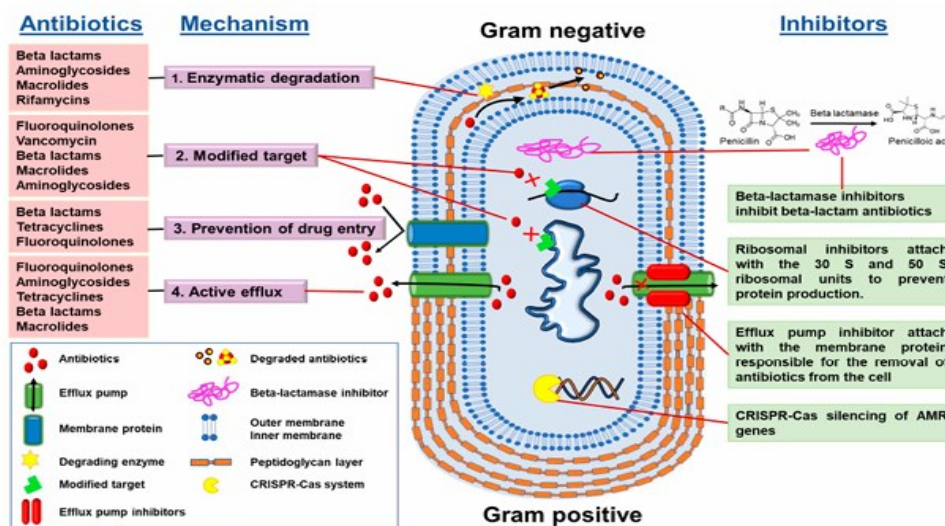


Figura 3. Classi di antibiotici, meccanismo d'azione e inibitori.

2.3. Terapia di combinazione

La terapia di combinazione antibiotica prevede la prescrizione simultanea di due o più antibiotici, con l'obiettivo di ottenere un'attività sinergica che possa essere più benefica per il trattamento dei pazienti. Il termine "sinergia antibiotica" è definito come l'effetto potenziato di un antibiotico con un altro quando combinato nel rapporto ottimale [21]. Esistono diverse combinazioni (ad esempio, antibiotico + antibiotico o antibiotico + biocida, antibiotico + piccola molecola e antibiotico + inibitore enzimatico). Dobbiamo tenere presente che, per diversi decenni, questo principio di combinazione è stato testato per trovare una combinazione che si potesse traslare dal modello in vitro a quello in vivo e infine nella clinica. non molti studi in tal senso hanno avuto successo, anche se alcuni sono riusciti nell'intento, soprattutto per quanto riguarda la combinazione di β -lattamici con inibitore della β -lattamasi e una combinazione di aminoglicosidi.

2.3.1. Combinazioni di antibiotici

Tradizionalmente, diverse combinazioni di antibiotici sono state utilizzate per combattere le infezioni da MDR. In particolare, l'ampio spettro e la sinergia degli antibiotici β -lattamici, sono caratteristiche che consentono loro di combinarsi sinergicamente con diversi altri gruppi di antibiotici. Ad esempio, l'uso di un antibiotico β -lattamico in combinazione con un antibiotico aminoglicosidico è una combinazione ben studiata, ampiamente utilizzata per il trattamento di varie infezioni batteriche Gram-negative [22]. In sostanza, la compromissione della sintesi del peptidoglicano da parte degli antibiotici β -lattamici potenzia gli aminoglicosidi aumentando rapidamente la loro concentrazione intracellulare nella cellula batterica [23,24]. Altre combinazioni di antibiotici comunemente utilizzate in clinica includono le combinazioni β -lattamico/fluorochinolone e β -lattamico/tetraciclina. Anche l'antibiotico aminoglicosidico amikacina ha mostrato sinergia quando combinato con la colistina, ma i suoi benefici terapeutici nel trattamento delle infezioni cliniche sono complessi a causa dell'eccessiva tossicità renale [25]. D'altra parte, si ritiene da tempo che alcune combinazioni di antibiotici siano più efficaci dell'uso di un singolo antibiotico; tuttavia, la reale efficacia di queste combinazioni di antibiotici non è chiara, poiché i meccanismi di resistenza continuano a evolversi [22,26]. Pertanto, l'efficacia di queste coppie di antibiotici o di qualsiasi strategia alternativa emergente in un contesto multifarmaco dovrebbe essere valutata continuamente per combattere la AMR [27].

2.3.2. Combinazione di antibiotici con inibitori delle β -lattamasi

Per le infezioni resistenti ai β -lattamici, la combinazione di quest'ultimi con inibitori delle β -lattamasi (come sulbactam, acido clavulanico e tazobactam) aiuta a ripristinarne l'azione. Questo specifico tipo di combinazione è denominato combinazione β -lattamico/inibitore delle β -lattamasi (BLBLI). Negli ultimi anni, nuovi Bis, come avibactam, relebactam, taniboractam, tazobactam, vaborbactam, enmetazobactam e zidebactam, sono stati utilizzati per ottimizzare la terapia antibiotica contro la resistenza ai nuovi antibiotici β lattamici (resistenza ai carbapenemi) o come combinazioni di antibiotici risparmiatori di carbapenemi [28]. Ad esempio, la combinazione aztreonam-avibactam è attualmente efficace contro NDM (metallo- β -lattamasi di New Delhi), VIM (metallo- β -lattamasi codificata da Verona Integron) e batteri produttori di IMP (inattivano l'imipenem) ed è utilizzata in ambito clinico per il trattamento di Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi (recentemente rinominate Enterobacterales). A differenza dell'avibactam, l'aztreonam è resistente all'azione delle metallo- β -lattamasi (poiché la prevalenza delle metallo- β -lattamasi che degradano gli antibiotici carbapenemici è elevata)[29]. Allo stesso modo, l'attività delle cefalosporine ad ampio spettro di quarta generazione, come la cefepime, viene ripristinata in combinazione con enmetazobactam[30]. Negli ultimi dieci anni, la resistenza ai patogeni ESKAPE è aumentata esponenzialmente in tutto il mondo e la PDR si è diffusa in ambito clinico [31]. Diverse combinazioni di antibiotici sono state studiate per il trattamento delle infezioni da PDR, poiché sono rimasti pochi "farmaci di ultima istanza". Studi hanno riportato la migliore efficacia terapeutica della colistina (un farmaco di ultima istanza) in combinazione con rifampicina o meropenem o tigeciclina [32].

2.3.3. Combinazione di antibiotici con biocidi

La combinazione di antibiotici con biocidi (disinfettanti, antisettici e conservanti), sebbene teoricamente efficace, ha ricevuto scarso interesse [33]. In uno studio per indagare l'effetto della combinazione di antibiotici e biocidi utilizzando tre antibiotici e sette biocidi con diverse modalità d'azione testati contro *P. aeruginosa*, i risultati hanno dimostrato diverse combinazioni di effetti che variano tra sinergismo e antagonismo [34]. La ricerca futura dovrebbe esplorare le potenziali conseguenze evolutive dell'interazione fisiologica tra antibiotici e biocidi, poiché queste combinazioni hanno

mostrato un ampio potenziale per contrastare la resistenza antimicrobica utilizzando gli agenti esistenti.

3. Strategie mirate agli enzimi resistenti agli antimicrobici

3.1. *Inibitori enzimatici*

Gli inibitori enzimatici sono particelle sintetiche a basso peso subatomico che possono ridurre o inibire completamente l'attività catalitica enzimatica in modo irreversibile o reversibile. Questo è esemplificato dagli inibitori delle monoamino ossidasi (MAO) e delle colinesterasi (ChE), che vengono utilizzati per diversi scopi farmacologici [35]. Gli enzimi rimangono bersagli ideali per i farmaci terapeutici, poiché la modifica dell'azione chimica di un enzima ha un comprovato impatto positivo sul decorso della malattia. Infatti, il 47% di tutti i farmaci attuali inibisce i bersagli enzimatici, nonostante l'aumento dell'uso di farmaci che agiscono sui recettori che regolano i segnali dall'esterno della cellula [35]. Diversi antibiotici inibiscono gli enzimi e, di conseguenza, molti enzimi batterici svolgono un ruolo chiave nello sviluppo della resistenza a questi antibiotici. Molti antibiotici sono sviluppati per colpire enzimi e lo sviluppo di resistenza si verifica in corrispondenza di cambiamenti strutturali degli enzimi bersaglio o di modificazioni enzimatiche degli elementi influenzati dagli antibiotici. Gli enzimi che solitamente fungono da bersaglio per gli antibiotici includono: enzimi coinvolti nella sintesi della parete cellulare/ nella replicazione degli acidi nucleici e metaboliti. Ad esempio, le proteine leganti la penicillina (PBP) sono componenti delle pareti cellulari batteriche che svolgono un ruolo importante nella sintesi del peptidoglicano (costituente principale delle pareti cellulari batteriche).

Le PBP catalizzano le reazioni di transglicosilazione e transpeptidazione, che portano all'elongamento e al cross-linking delle rispettive catene peptidiche. Le PBP sono i principali bersagli per la maggior parte degli antibiotici attualmente utilizzati. Questi antibiotici agiscono come inibitori competitivi delle PBP e interrompono la sintesi della parete cellulare batterica [36]. Un altro esempio di bersagli batterici sono le topoisomerasi di tipo II (DNA girasi e topoisomerasi IV), enzimi che regolano il superavvolgimento del DNA durante la replicazione e la trascrizione. Questi enzimi fungono da bersagli per gli antibiotici derivati dai chinoloni, che si legano covalentemente ai siti attivi di questi enzimi inibendo la replicazione e la trascrizione

[19,36]. Un esempio tradizionale di inibitore delle β -lattamasi è l'acido clavulanico, una molecola semisintetica comunemente somministrata in combinazione con antibiotici β -lattamici per inattivare le β -lattamasi coinvolte nella degradazione degli antibiotici β -lattamici. La molecola contiene un anello β -lattamico ed è un inibitore "suicida" delle β -lattamasi. Più recentemente, diverse altre molecole con attività inibitoria verso enzimi, che conferiscono attività antimicrobica-resistente, sono state valutate come promettenti armi naturali o ricombinanti nella lotta contro i patogeni resistenti agli antibiotici clinicamente rilevanti [15,37].

3.2. *Piante medicinali e fitochimici*

Le piante hanno sviluppato meccanismi unici per proteggersi dai microrganismi attraverso fitochimici naturali (metaboliti secondari) presenti in semi, radici, foglie, steli, fiori e frutti [38–42]. Inoltre, le piante sintetizzano molte sostanze chimiche strutturalmente diverse che svolgono un ruolo specifico nella loro risposta agli attacchi microbici [41,43,44]. Pertanto, la potenziale efficacia dei composti derivati dalle piante come candidati farmaci ha attirato l'attenzione delle comunità farmaceutiche e scientifiche, che hanno valutato molti diversi estratti e oli vegetali come potenziali agenti antibatterici e modificatori della resistenza agli antibiotici [38–40]. I programmi di screening implementati per questa nuova scoperta di farmaci includono approcci casuali, computazionali ed etnofarmacologici [42]. Le sostanze di origine vegetale (PDS) di importanza medica che esercitano la più forte attività antimicrobica includono alcaloidi, organosolforati, composti fenolici, cumarina e terpeni [43,44]. L'attività antibatterica in vitro delle PDS è stata dimostrata contro un'ampia gamma di batteri, inclusi i MDR [41,45–56], con meccanismi d'azione che includono: (i) inibizione della sintesi della parete cellulare batterica, (ii) inibizione della fisiologia batterica, (iii) modulazione della suscettibilità agli antibiotici, (iv) inibizione del biofilm, (v) attenuazione della virulenza batterica e (vi) inibizione delle pompe di efflusso [44]. Ad esempio, alcaloidi e composti fenolici hanno un effetto inibitorio sulle pompe di efflusso di *E. coli* [57,58], *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [59–66] e *S. aureus* resistente alla meticillina (MRSA) [67–69]. Gli alcaloidi inibiscono anche la divisione cellulare, la sintesi proteica e il DNA in *E. coli* [70] e l'inibizione dell'ATP sintasi in *Listeria*, *Bacillus* e *Staphylococcus* spp. [71]. I composti fenolici inibiscono la β -chetoacil acil proteina trasportatrice sintasi (KAS) III, un catalizzatore chiave nella

biosintesi batterica degli acidi grassi, con valori di MIC di *Enterococcus faecalis* compresi tra 128 e 512 µg/mL [72]. Il meccanismo d'azione antibatterico dei composti organosolforici include l'inibizione degli enzimi dipendenti dal solfidrile, dell'ATP sintasi, del DNA e della sintesi proteica e la distruzione della membrana batterica di *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* e *Campylobacter jejuni* [62,73,74]. La cumarina inibisce la DNA girasi di *Staphylococcus aureus* [75–77], *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) [78], *E. coli* [77], *P. aeruginosa* [77] e *Helicobacter pylori* [75], mentre i terpeni portano a disturbi della membrana cellulare di *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *H. pylori* [79,80]. Inoltre, è stato riportato che l'efficienza e l'efficacia dell'antibiotico ceftiofur contro importanti batteri che causano la mastite nei bovini sono migliorate in combinazione con la fosforilcolina fitochimica [81]. I PDS hanno dimostrato una potente attività antimicrobica, da soli o in combinazione con antibiotici, e hanno un potenziale promettente nello sviluppo di nuovi farmaci per combattere la resistenza antimicrobica [44]. Infine, l'uso di prodotti fitochimici con comprovate proprietà antimicrobiche può essere una valida alternativa all'uso di promotori della crescita a base di antibiotici come additivi per mangimi nell'allevamento di bestiame e pollame [82].

3.3. Piccole molecole - entità chimiche migliorate (ICE)

I prodotti naturali e i loro derivati semisintetici, ad esempio antibiotici β-lattamici, aminoglicosidi, tetracicline e macrolidi, sono i pilastri delle attuali terapie antibiotiche. Tuttavia, l'efficacia di questi antibiotici è ora minacciata dalla diffusione globale di patogeni multifarmaco-resistenti [83–85]. Fortunatamente, i progressi nella genomica e nelle tecnologie innovative offrono la possibilità di riesaminare classi strutturali chimiche precedentemente scartate, rivitalizzare i programmi di prodotti naturali e, in definitiva, trovare nuove piste [84,85]. Nuove piccole molecole ad azione diretta possono essere generate come derivati migliorati di vecchi antibiotici o nuove sostanze chimiche con nuovi bersagli e nuovi meccanismi d'azione [83,86]. Le nuove piccole molecole includono tre gruppi che comprendono (i) peptidi antimicrobici (AMP) sintetici e naturali, (ii) sostanze chimiche naturali e (iii) inibitori, come LpxC e LpxA [83,87]. I peptidi antimicrobici (AMP) sono un gruppo naturalmente abbondante e diversificato di agenti antibatterici [88–90]. Queste piccole molecole ad azione diretta

hanno un'attività ad ampio spettro, un effetto battericida rapido e prolungato e sono altamente selettive [90]. I loro limiti sono legati alla loro breve emivita plasmatica, dovuta alla degradazione proteolitica e a problemi di tossicità [90,91]. I composti peptidomimetici antimicrobici, ad esempio gli α -peptoidi, imitano la struttura e l'attività biologica degli AMP naturali [90], ma offrono il vantaggio di superare alcuni dei problemi funzionali associati agli AMP naturali, come la stabilità in presenza di matrici biologiche [91,92]. Gli inibitori che prendono di mira enzimi essenziali possono essere utili; ad esempio, LpxC è un enzima della biosintesi del lipide A nei batteri Gram-negativi e un bersaglio promettente per lo sviluppo di antibiotici che colpiscono selettivamente i patogeni Gram-negativi [92]. A metà degli anni '90, un candidato clinico che mostrava attività inibitoria di LpxC e bassi valori di MIC contro un'ampia gamma di batteri Gram-negativi fallì nella sperimentazione clinica di fase 1 sull'uomo a causa della tossicità del prodotto [83,85]. Un crescente corpus di conoscenze ed esperienze può aiutare a superare alcuni degli attuali ostacoli, come gli effetti indesiderati causati dagli elementi strutturali comuni degli inibitori enzimatici [85].

La maggior parte delle nuove molecole ad azione diretta ora studiate prendono di mira i batteri Gram-negativi, come Enterobacterales e batteri non fermentanti, e poche prendono di mira sia i batteri Gram-negativi che quelli Gram-positivi [83]. Sono necessari più incentivi push and pull per rivitalizzare la pipeline clinica e trovare nuove terapie [83,85]. Inoltre, studi recenti evidenziano il ruolo delle piccole molecole provenienti da comunità microbiche miste nell'ostacolare gli effetti degli antibiotici e/o nel salvare le molecole antibiotiche dalla degradazione [93–98].

3.4. Oli essenziali

Gli "oli essenziali" (OE) sono miscele di composti chimici volatili sintetizzati da diverse parti di piante durante il metabolismo secondario [99–101]. Il termine "olio essenziale" fu usato per la prima volta da Paracelso di Hohenheim, un medico svizzero medievale [102]. Gli OE includono terpeni, aldeidi, composti fenolici, terpenoidi e altri costituenti aromatici che hanno dimostrato attività antimicrobica [99–101,103–114]. Gli OE contribuiscono principalmente alla distruzione della membrana cellulare batterica e all'inibizione della pompa di efflusso responsabile di alcuni AMR nei batteri Gram-negativi [100,105,114–117]. Altre modalità d'azione documentate includono l'inibizione della sintesi dello strato di peptidoglicano delle pareti cellulari batteriche legandosi alle

PBP per i batteri Gram-positivi [105,114–117]. Recenti progressi in genomica e proteomica hanno dimostrato la capacità degli oli essenziali di inibire la formazione di biofilm e la produzione di quorum sensing (QS) e di aumentare l'espressione delle proteine dello stress ossidativo [100][105]. Gli oli essenziali, da soli, in combinazione o associati ad altri antibiotici, hanno dimostrato un'efficace attività antibatterica contro diversi agenti patogeni, inclusi i batteri MDR [100,105,118]. Sono necessari studi più approfonditi per scoprire e identificare nuovi composti di oli essenziali che un giorno potrebbero essere utilizzati nella pratica clinica [100,103]. Gli oli essenziali che sono stati ampiamente studiati includono la corteccia di cannella [119–123], la lavanda [107,124,125], la menta piperita [126,127] e l'olio di melaleuca [128–131]. Altri oli essenziali studiati includono, ma non si limitano a, eucalipto, pepe nero, citronella e palmarosa [100,104,132]. Inoltre, l'uso di antibiotici come promotori della crescita nella produzione zootecnica/acquacoltura sembra necessario nel mondo odierno. In queste circostanze, gli oli essenziali sono "green" e promettenti come alternative agli attuali promotori della crescita antibiotici utilizzati dagli allevatori/acquacoltori [133,134]. È stato anche documentato che gli oli essenziali presentano proprietà di conservazione degli alimenti e vari oli essenziali sono stati sperimentati come conservanti alimentari per prolungare la durata di conservazione di carne, prodotti a base di carne, latticini, verdura e frutta [135]. L'abbinamento degli oli essenziali con la tecnologia delle nanoparticelle potrebbe potenzialmente facilitare un promettente miglioramento della stabilità chimica e della solubilità degli oli essenziali [136]. La nanotecnologia consente potenzialmente il rilascio di oli essenziali nanoincapsulati nel sito bersaglio, riducendo al minimo la tossicità e massimizzando l'efficacia degli oli essenziali. La comprensione dell'interazione tra i componenti degli oli essenziali grezzi, la scoperta di nuovi composti e l'approvazione clinica degli oli essenziali come agenti antimicrobici sta acquisendo sempre più importanza [100,103]. Vale la pena sottolineare la dimostrazione che i batteri sviluppano resistenza e tolleranza agli oli essenziali; tuttavia, non è stata segnalata resistenza crociata agli antibiotici. [137]. Il trattamento dell'infezione da *P. aeruginosa* con una concentrazione sub-inibitoria di olio di corteccia di cannella o cinnamaldeide come terapia aggiuntiva può potenzialmente indurre l'espressione delle pompe di efflusso, e questo richiede ulteriori indagini per accertare l'uso degli oli essenziali con effetti antagonisti [138].

3.5. Silenziamento dell'RNA

Un'altra strategia che ha il potenziale per generare nuovi antimicrobici è il silenziamento dell'RNA. Il silenziamento dell'RNA è presente naturalmente nei batteri, è stato descritto per la prima volta nel 1985 ed è ora noto per essere associato alla regolazione di molti geni. Il meccanismo coinvolge sequenze cis e trans complementari alle regioni regolatrici di un singolo m-RNA (sequenza antisenso) e che, una volta legate, possono bloccare reversibilmente la traduzione. Le sequenze cis antisenso possono trovarsi vicino alle regioni regolatrici di un singolo RNA o possono essere trascritte dal filamento complementare nello stesso locus genetico. Le sequenze trans sono trascritte da un locus genetico distante e formano la maggior parte della sequenza antisenso naturale. È possibile sviluppare sequenze antisenso sintetiche per reprimere la traduzione di enzimi che consentono ai batteri di resistere agli antibiotici. Il silenziamento dell'RNA viene applicato nella scoperta di nuovi composti antimicrobici, nella determinazione del requisito di rigore per tali bersagli, nello sviluppo di screening antimicrobici altamente sensibilizzati e nella determinazione della modalità d'azione [139]. Il silenziamento dell'RNA può essere applicato anche nello sviluppo di screening antibatterici. Ciò consente di inibire i geni di interesse target. Ad esempio, 250.000 prodotti naturali per inibitori di FabF/FabH (che impediscono la via di biosintesi degli acidi grassi batterici) sono stati sottoposti a screening dai Merck Research Laboratories utilizzando un ceppo di *S. aureus* che esprime RNA antisenso per fabF. Il silenziamento dell'RNA può essere applicato anche per rilevare la modalità d'azione di nuovi antibiotici; ad esempio, il silenziamento dell'RNA è stato utilizzato nella scoperta di agenti antimicrobici che coinvolgono nuovi inibitori della proteina trasportatrice enoil-acil reduttasi (FabI) [139].

3.6. Sistema CRISPR-Cas

CRISPR-Cas (clustered regularly interspersed short palindromic repeats - CRISPR come proteina associata) è un sistema immunitario adattativo batterico che utilizza processi codificati dal DNA, mediati dall'RNA o mirati al DNA per contrastare l'invasione dei batteri da parte di materiale genetico estraneo ed elementi genetici mobili, come plasmidi e fagi [140–142]. CRISPR-Cas è uno strumento di ingegneria genomica che offre nuove promettenti opportunità come antimicrobici programmabili sequenza-specifici [140,143]. Questi strumenti di editing genetico possono colpire in

modo quantitativo, specifico e selettivo i genomi batterici per ridurre o eliminare la resistenza agli antibiotici e creare nuove opportunità per il trattamento delle infezioni da MDR [140–144]. I sistemi CRISPR-Cas possono distinguere tra batteri patogeni e commensali e sono potenzialmente in grado di rimuovere selettivamente i geni AMR dalle popolazioni batteriche e dai batteri fattori di virulenza o sensibilizzare i batteri a un antibiotico eliminando i plasmidi che ospitano geni di resistenza agli antibiotici [143,145]. Tra tutte le proteine Cas, quelle utilizzate che mostrano le maggiori potenzialità per l'AMR includono (i) CRISPR-Cas9, un metodo di scissione del DNA guidato dall'RNA, (ii) dCas9, (iii) nSpCas9:rAPOBEC1, e (iv) Cas13a [146]. CRISPR-Cas9 offre nuove potenzialità per quanto riguarda l'AMR [140–151]. Sono necessari ulteriori studi per affrontare le limitazioni, concentrandosi al contempo su esperimenti in vivo [145], come (1) i problemi di somministrazione affrontati dall'uso del rilascio di fagi e fagemidi, plasmidi coniugativi, in nanoparticelle polimeriche; (2) gli effetti collaterali di potenziali modifiche off-target nel genoma dell'ospite [145,152–155].

4. Strategie mirate ai batteri resistenti agli antimicrobici

4.1. Lantibiotici e batteriocine

Il termine "lantibiotico" designa peptidi codificati da geni che contengono amminoacidi insoliti, tra cui gli amminoacidi tioeteri lantionina (Lan) e/o metillantionina (MeLan), che si formano tramite modificazione post-traduzionale e di conseguenza introducono strutture cicliche intramolecolari nel peptide necessarie per gli esportatori specifici e per la modificazione post-traduzionale [156]. Negli ultimi anni sono stati scoperti molti lantibiotici e sono state pubblicate descrizioni di diversi lantibiotici. In particolare, tutte queste sostanze sono prodotte specificamente da batteri Gram-positivi ed esercitano la loro azione inibitoria principalmente contro questo gruppo [156,157]. Ai fini di questa pubblicazione, vale la pena ricordare che la maggior parte dei lantibiotici possiede una qualche forma di attività antimicrobica e che la designazione "lantibiotico" deriva dal termine "antibiotico contenente lantionina". I lantibiotici possono essere raggruppati in peptidi di tipo A e di tipo B. In generale, i lantibiotici di tipo A sono peptidi cationici allungati, costituiti da un massimo di 34 residui di lunghezza, che mostrano somiglianze nella disposizione dei loro ponti Lan [158]. Questi peptidi agiscono principalmente interrompendo l'integrità della membrana degli organismi bersaglio e includono nisina, subtilina ed epidermide. I peptidi di tipo B sono globulari, lunghi fino a 19 residui, e

agiscono interrompendo la funzione enzimatica, ad esempio inibendo la biosintesi della parete cellulare. Le duramicine prodotte dalle specie di *Streptomyces*, mersacidina e actagardina, sono esempi di peptidi di tipo B. Tuttavia, diversi lantibiotici non rientrano in nessuna delle due categorie, il che suggerisce che la classificazione dei lantibiotici diventerà senza dubbio più complessa con la scoperta di nuovi composti [158].

Le batteriocine, un lantibiotico di tipo A, sono tossine proteiche o peptidiche prodotte dai batteri. Queste molecole sono in grado di uccidere o inibire ceppi batterici strettamente correlati o batteri non correlati, ma non danneggiano i batteri originali attraverso specifiche proteine immunitarie. È importante sottolineare che le batteriocine presentano un'ampia diversità di struttura e funzione e sono particolarmente stabili al calore [159]. Le batteriocine sono emerse grazie a vasti sforzi di scoperta di farmaci e sono diventate un'importante aggiunta all'attuale armamentario di agenti che possono essere utilizzati in futuro per trattare gravi infezioni batteriche [160]. Le batteriocine hanno suscitato notevole interesse per le loro ampie proprietà come agenti antimicrobici specializzati contro una varietà di organismi, tra cui varie specie batteriche, parassitarie e virali, e in particolare anche contro sistemi più complessi, come i biofilm batterici [161]. Questi peptidi prodotti dai ribosomi sono secreti da microbi che vivono in un ambiente polimicrobico molto complesso e vengono utilizzati per inibire specie batteriche correlate, in particolare quelle strettamente correlate. La varietà di batteriocine specifiche generate dai microrganismi conferisce a queste tossine un ampio spettro d'azione. È stato identificato un numero considerevole di batteriocine diverse e rimane spazio per l'identificazione di molte altre batteriotossine. Inoltre, le batteriocine sono utili anche contro i microbi che generano meccanismi antitossinici [162]. La diversità delle batteriotossine consente un'ampia gamma di applicazioni biotecnologiche e farmacologiche. Uno dei principali settori interessati dall'uso delle batteriocine è l'industria agroalimentare.

4.2. Peptidi antimicrobici (AMP) - Inclusa la combinazione AMP + antibiotici

Tra le diverse strategie per sviluppare antibiotici nuovi ed efficaci vi sono gli AMP, utilizzati da soli o in combinazione con antibiotici tradizionali [163–168]. Gli AMP presenti in natura hanno una composizione compresa tra 10 e 50 aminoacidi, possiedono una carica cationica complessiva e sono di natura anfipatica, con un'attività

antimicrobica simile o addirittura migliorata rispetto agli antibiotici tradizionali [169,170]. Gli AMP sono ubiquitari e si trovano in natura in vari ambienti. Tipicamente, gli AMP svolgono un ruolo come componenti del sistema immunitario innato di molti organismi terrestri e/o acquatici. Gli AMP di origine batterica sono, in condizioni naturali, parte del sistema di protezione della cellula batterica, facilitando la protezione da invasioni tossiche (ad esempio, batteriofagi, molecole esogene). Questo processo influenza l'infiammazione e aumenta l'uccisione dei patogeni [171]. Inoltre, gli AMP batterici garantiscono "spazio" ai batteri produttori nel contesto di comunità microbiche complesse che ospitano le stesse nicchie ecologiche [95,172–175]. Gli AMP possono colpire una varietà di batteri, sia Gram-positivi che Gram-negativi, attraverso i meccanismi comuni degli antibiotici tradizionali [94,170,175,176]. Una volta che gli AMP hanno penetrato la parete cellulare batterica, esercitano un'ulteriore attività antimicrobica bersagliando la biosintesi proteica, gli acidi nucleici e/o compromettendo la produzione della parete cellulare e della membrana [177]. Un'ampia ricerca sugli AMP ha già portato alla produzione delle cosiddette molecole "designer-like", ovvero peptidi sintetici ottenuti sfruttando le conoscenze sugli AMP naturali. In questo caso, diverse porzioni di AMP noti vengono assemblate per progettare AMP su misura, contenenti caratteristiche uniche e desiderate [90,170,178,179]. Sfortunatamente, tuttavia, gli AMP nativi utilizzati nella pratica clinica (in campo umano e veterinario) presentano un importante inconveniente associato alla loro facilità di degradazione da parte degli enzimi proteolitici e all'ambiente gastrico acido. Pertanto, si preferisce la somministrazione topica o sottocutanea, sebbene questa non rappresenti un metodo efficiente per la somministrazione di molecole con effetto a livello sistemico. Per superare questi problemi, si stanno valutando diversi approcci per migliorare la stabilità dell'AMP, come la produzione di AMP vincolati, ciclotidi, AMP ibridi, coniugati di AMP, mimetici di AMP e AMP immobilizzati [180]. Tra questi, la coniugazione di AMP con antibiotici tradizionali sta fornendo risultati promettenti attraverso la potenziale combinazione sinergica di due composti, consentendo un efficace targeting e uccisione di diversi patogeni resistenti [181,182]. Ad esempio, la coniugazione di AMP magainin con vancomicina ha mostrato risultati molto interessanti contro gli Enterococchi resistenti alla vancomicina [183]. Risultati simili sono stati ottenuti accoppiando il peptide antimicrobico cationico ubiquicidina con il cloramfenicolo

tramite un linker di glutaraldeide, mostrando una maggiore attività dell'antibiotico contro *E. coli* e *S. aureus* e una ridotta tossicità contro le cellule umane [184]. È interessante notare che risultati incoraggianti sono stati ottenuti anche accoppiando gli AMP con gli antibiotici con l'obiettivo di migliorare la somministrazione in situ del farmaco, migliorandone così la specificità e riducendone la tossicità [185]. Ciò dipende dal meccanismo d'azione primario degli AMP sulle strutture della parete esterna batterica. Gli AMP agiscono in modo più efficace in sinergia con gli antibiotici rispetto a quando usati singolarmente, poiché non sono in grado di penetrare la cellula microbica, quando il meccanismo di resistenza dell'antibiotico è correlato alla modificazione della membrana. Essendo in grado di superare questa barriera, gli AMP potrebbero essere in grado di restituire attività agli antibiotici precedentemente resi inefficaci [165]. I metodi di somministrazione di farmaci basati sulla nanotecnologia (nanocarrier) rappresentano un'innovazione recente che potrebbe evolversi in una potente strategia per il rilascio efficace di AMP. Il rilascio di AMP tramite nanocarrier potrebbe essere vantaggioso in quanto protegge i peptidi dalla degradazione extracellulare da parte di proteasi e altri ambienti che idrolizzano i peptidi. I nanocarrier mirati potrebbero anche contribuire alla selettività del bersaglio e al miglioramento dei profili farmacocinetici dei farmaci. Esistono diversi tipi di sistemi di rilascio di farmaci, come liposomi, micelle, nanoparticelle polimeriche e dendrimeri [186,187]. Oltre ai problemi di stabilità e al rilascio efficace di AMP, la tossicità rappresenta un ulteriore ostacolo a questo tipo di approccio. La maggior parte degli AMP non supera gli studi preclinici a causa dell'elevata tossicità in vivo. La murepavadina (POL7080), un analogo ciclico della protegrina, è un esempio di peptide ciclico con promettente attività contro *P. aeruginosa*, il cui utilizzo è stato interrotto in uno studio di fase III per il trattamento della polmonite batterica da *P. aeruginosa* associata alla ventilazione a causa della nefrotossicità e una battuta d'arresto negli studi preclinici [165,188,189]. Attualmente, a dicembre 2021, è in corso un altro studio clinico per valutare e sviluppare una nuova formulazione farmaceutica basata sulla murepavadina per uso inalatorio nel trattamento di pazienti con fibrosi cistica affetti da infezioni da *Pseudomonas spp.* [190]. Nonostante abbiano una promettente attività antimicrobica contro i principali patogeni umani per i quali c'è un elevato bisogno medico, gli AMP

negli studi clinici di solito finiscono per essere studiati come agenti topici a causa della loro instabilità e tossicità, oltre alla farmacocinetica sfavorevole [191].

4.3. Enzimi e AMP derivati da insetti

Molti insetti producono famiglie complesse e varie di enzimi sia come meccanismi di sopravvivenza che di difesa. La diversità degli insetti è enorme e ci sono sempre più prove che il sistema naturale degli insetti sia particolarmente dinamico. Gli AMP prodotti dagli insetti sono di dimensioni più piccole e contengono gruppi cationici. Fondamentalmente, quattro gruppi di AMP si trovano negli insetti distinti in base alla loro struttura e composizione aminoacidica. Tra questi, peptidi ricchi di prolina (ad esempio, drosocina, apidaecina e lebocina), peptidi a α -elica (ad esempio, moricina e cecropina), peptidi ricchi di cisteina (ad esempio, defensina e drosomicina) e proteine ricche di glicina (ad esempio, attacina e gloverina) [192]. I principali componenti dell'immunità innata degli insetti sono peptidi ricchi di cisteina, noti per la loro capacità di inibire la formazione di biofilm [193]. Nel complesso, l'interazione tra peptide e membrana promuove direttamente l'attività antibiofilm/antibatterica. È ormai evidente che le principali molecole effettrici immunitarie degli insetti sono gli AMP. Allo stesso tempo, grazie all'evoluzione biologica conservata, le molecole bioattive e le vie di segnalazione all'interno del sistema naturale degli insetti mostrano una netta somiglianza con i vertebrati, incluso l'uomo. I ricercatori di tutto il mondo sono alla ricerca di nuove molecole bioattive con nuovi meccanismi d'azione come antimicrobici. Inoltre, gli AMP potrebbero agire sinergicamente con gli antibiotici classici per combattere varie infezioni. Diversi fattori, come la sequenza, la carica, l'elicità, l'anfipatia e l'idrofobicità complessiva degli AMP, sono cruciali per considerarli agenti antimicrobici efficaci [193,194].

4.4. Strategie basate sulle nanoparticelle

Le nanoparticelle (NP) sono particelle le cui dimensioni sono comprese tra 1 e 100 nm [195]. Le NP sono sempre più utilizzate come inibitori della crescita batterica in applicazioni come rivestimenti per dispositivi impiantabili/materiali medici e per la somministrazione di antibiotici. Possono anche essere utilizzate direttamente come agenti antibatterici [196]. È noto che alcuni metalli sfusi hanno attività antibatterica contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi; tuttavia, esistono altri metalli che sono attivi solo nella forma di NP [197]. L'esatto meccanismo d'azione attraverso il quale le

NP esercitano la loro attività antimicrobica non è ancora completamente compreso, ma sono stati proposti tre processi che si verificano simultaneamente. Questi includono lo stress ossidativo, il rilascio di ioni metallici e meccanismi non ossidativi [196,198]. Nello specifico, questi processi determinano: (1) la disintegrazione della membrana esterna batterica e/o un danno generale alla parete cellulare, (2) l'interazione tra componenti intra- ed extracellulari e ioni provenienti dalle nanoparticelle, (3) la produzione tramite fotocatalisi di specie reattive dell'ossigeno che danneggiano le strutture batteriche, (4) l'inibizione della sintesi del DNA, (5) l'inibizione dell'attività enzimatica e (6) l'interruzione della trasduzione energetica [199]. I meccanismi attraverso i quali le nanoparticelle metalliche esercitano la loro azione dipendono direttamente dalle loro caratteristiche fisiche. A seconda delle loro dimensioni, le nanoparticelle possono inibire la crescita batterica attraverso la rottura della membrana batterica e influenzare la formazione di biofilm, con nanoparticelle di piccole dimensioni che solitamente mostrano una potente attività antimicrobica e antibiofilm (ad esempio, Ag, ZnO, Mg e NO). Anche la forma ne influenza l'attività: le particelle a bastoncino inibiscono i biofilm meglio delle nanoparticelle sferiche [200]. Le caratteristiche delle particelle e i fattori intrinseci, come le dimensioni, il potenziale zeta, la carica, la morfologia della superficie e la struttura cristallina, sono responsabili dell'attività antimicrobica delle nanoparticelle [196]. Diversi studi hanno indicato che la relazione tra le nanoparticelle e le strutture esterne della parete cellulare dei batteri è fondamentale nel meccanismo d'azione delle nanoparticelle e che la composizione della parete cellulare batterica influenza l'attività delle NP [201–205]. Le NP devono interagire o superare questi componenti strutturali e possono farlo attraverso diverse interazioni. Il lipopolisaccaride (LPS) nei batteri Gram-negativi è una regione esterna carica negativamente che attrae le nanoparticelle, mentre, nei batteri Gram-positivi, si ipotizza che le nanoparticelle si distribuiscano attraverso la rete di acido teicoico [196]. A causa delle loro caratteristiche fisico-chimiche, le potenziali applicazioni antimicrobiche delle nanoparticelle includono la somministrazione per inalazione, ingestione orale, contatto cutaneo e iniezione endovenosa. Uno dei principali svantaggi dell'utilizzo delle nanoparticelle come nuovi antimicrobici è la loro tossicità. Le nanoparticelle sono generalmente tossiche per le cellule eucariotiche a concentrazioni che inibiscono la crescita batterica, e l'effetto a lungo termine delle nanoparticelle su

cellule e tessuti eucariotici è stato valutato attraverso studi sia in vitro che in vivo. È interessante notare che la tossicità potrebbe potenzialmente essere superata con la somministrazione mirata delle NP nel sito di infezione, sebbene questa strategia influenzi il potenziale delle nanoparticelle [198,199].

4.5. Strategie di coinfezione e batteri probiotici contro i patogeni

Tra le alternative complementari per ridurre la diffusione dei patogeni AMR in medicina umana e veterinaria, l'adozione di strategie di coinfezione e/o la somministrazione di specie microbiche con effetti probiotici sta guadagnando popolarità [206]. I probiotici sono microrganismi vitali, la cui somministrazione può conferire effetti benefici. L'efficacia dei probiotici nella lotta contro l'AMR si basa sulla prevenzione della pressione selettiva diretta esercitata dagli antibiotici sui microrganismi. I probiotici prevengono l'infezione attraverso diversi meccanismi ecologici, che vanno dalla competizione per lo spazio ecologico, alla resistenza alla colonizzazione e ai nutrienti, fino alla produzione di AMP con specifica attività battericida [167]. A questo proposito, diversi studi hanno già dimostrato la capacità dei probiotici di mantenere una composizione del microbiota sana ed equilibrata e una migliore funzionalità [207,208]. Questo, a sua volta, contribuisce a mantenere una salute "ottimale", riducendo così il rischio di infezioni opportunistiche. Inoltre, la somministrazione di probiotici è collegata a una significativa riduzione dell'uso di antibiotici e alla riduzione della pressione selettiva associata agli interventi terapeutici convenzionali [209]. I probiotici vengono somministrati principalmente per via orale sia nella pratica umana che veterinaria. I microrganismi con attività probiotica includono principalmente batteri, sebbene anche funghi e lieviti siano comunemente utilizzati. I batteri probiotici più comuni sono i lattobacilli e i bifidobatteri. Diversi studi hanno dimostrato la loro capacità di aderire alle cellule epiteliali intestinali e di sopravvivere in ambienti e fluidi acidi, inclusa la bile. Inoltre, le ricerche hanno dimostrato la loro capacità di uccidere o inattivare più patogeni comuni, come *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa* [210]. Oltre a lattobacilli e bifidobatteri, gli altri generi comunemente adottati come probiotici includono *Escherichia*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Bacillus*. Sebbene noto come commensale del tratto gastrointestinale umano e animale, il genere *Escherichia* comprende anche specie con proprietà benefiche per la salute. Tra queste, l'*Escherichia*

coli è stato designato come benefico per il trattamento della stitichezza, delle malattie infiammatorie intestinali, del cancro del colon e del morbo di Crohn [211–213]. Inoltre, ceppi analoghi del genere *Lactococcus* (ad esempio, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*) possono mostrare un'importante attività antibatterica contro i batteri patogeni e di deterioramento nei prodotti lattiero-caseari, e la loro capacità di aderire alle cellule epiteliali li rende buoni candidati per gli interventi probiotici [211,214]. Anche i ceppi dei generi *Streptococcus* ed *Enterococcus* sono degni di nota per le loro attività probiotiche, sebbene il comportamento patogeno opportunistico di alcuni di questi batteri ne impedisca l'uso diffuso nella pratica clinica umana, limitando la loro principale applicazione al settore veterinario [174,215]. Infine, il genere *Bacillus* include batteri con dimostrate caratteristiche probiotiche (ad esempio, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. cereus*) le cui proprietà benefiche per la salute trovano applicazioni sia in campo umano che veterinario [216–218]. D'altro canto, i probiotici sono associati a un potenziale rischio di introduzione e/o trasferimento di tratti AMR attraverso una serie di meccanismi e possono anche innescare una resistenza non geneticamente determinata nella microflora endogena (suscettibilità fenotipica dovuta al ceppo probiotico) [167,219]. I lattobacilli sono stati identificati come portatori di resistenza alla vancomicina. La resistenza agli antibiotici macrolidi, lincosamidi e streptogramine è abbastanza frequente nei lattobacilli, sebbene siano necessari studi approfonditi e mirati su singoli ceppi probiotici. I bifidobatteri vengono indicati come portatori del gene *tetW* e della conseguente resistenza alla tetraciclina. In particolare, la resistenza ai β -lattamici nei bifidobatteri è rara. Tuttavia, definire tale tendenza generalizzata è piuttosto difficile a causa delle importanti differenze osservate nei profili di resistenza dei batteri e dei probiotici isolati da diverse aree geografiche [219]. Diversi gruppi di ricerca e agenzie di regolamentazione si stanno concentrando sul superamento di questi problemi al fine di definire linee guida standardizzate nella valutazione della sicurezza dei probiotici prima di autorizzarne l'uso nella pratica clinica [219].

4.6. Utilità degli anticorpi monoclonali contro i patogeni

La terapia con anticorpi monoclonali (mAb) sta progressivamente guadagnando interesse nel trattamento delle malattie infettive. In effetti, gli mAb sono un importante strumento farmacoterapeutico con un elevato livello di specificità. Presentano una vitalità e una tolleranza senza pari rispetto ai comuni antisieri policlonali. In genere, gli

mAb sviluppati per le infezioni batteriche tipicamente mirano ad antigeni esposti sulla superficie o tossine secrete che non sono attualmente bersaglio degli antibiotici e pertanto sono difficilmente influenzati dai meccanismi di resistenza esistenti [220]. Nella corsa per affrontare la minaccia globale della resistenza agli antibiotici, l'attenzione si concentra sullo sviluppo di anticorpi terapeutici come approccio alternativo, in quanto presentano potenziali vantaggi rispetto agli antibiotici ad ampio spettro [221]. La storia dell'utilizzo di anticorpi per il trattamento delle infezioni nell'uomo risale ai primi anni del 1900. Gli antibiotici furono da subito preferiti a causa delle reazioni allergiche, dell'efficacia variabile tra i lotti e dello spettro limitato [222]. L'avvento degli strumenti di biologia molecolare ha portato allo sviluppo di anticorpi monoclonali terapeutici con maggiore efficacia, sicurezza e purezza, che hanno consentito il trasferimento di successo degli anticorpi nella pratica clinica [220,223]. La maggior parte delle terapie anticorpali attualmente praticate è mirata al trattamento di malattie di origine non infettiva e solo pochi anticorpi sono stati approvati per il trattamento di infezioni batteriche [224]. Secondo la letteratura, le iniziative per produrre anticorpi monoclonali per il trattamento di infezioni da batteri nosocomiali hanno avuto vari gradi di successo e attualmente ci sono 14 prodotti a base di anticorpi monoclonali in varie fasi di sviluppo [221]. Raxibacumab, obiltoxaximab e bezlotoxumab sono i tre anticorpi monoclonali terapeutici attualmente autorizzati per la prevenzione o il trattamento delle infezioni batteriche causate rispettivamente da *Bacillus anthracis* e *Clostridium difficile* [225,226]. Esistono inoltre diversi anticorpi monoclonali (MAb) in diverse fasi di sviluppo per patologie virali e batteriche. Come alternative ai convenzionali antivirali e antibatterici, gli anticorpi monoclonali antimicrobici sono di grande importanza. Questi anticorpi monoclonali sono più adatti alla somministrazione di patologie, come le riacutizzazioni virali in assenza di anticorpi profilattici.

4.7. Basato sui batteriofagi: specifico o selettivo o entrambi!

I batteriofagi, noti anche informalmente come fagi, sono virus che infettano e si replicano all'interno di batteri e archea. La relazione tra i due organismi è di tipo parassitario, in cui i batteriofagi utilizzano il meccanismo biosintetico dell'ospite per creare importanti componenti, come proteine e lipidi essenziali per la formazione e la riproduzione del capsido fagico [227]. Nonostante le apparenze, questi organismi non

sono patogeni per l'uomo o gli animali e possono essere utilizzati per trattare malattie batteriche. I fagi esistono in due cicli principali. Nel "ciclo litico", l'attività virale all'interno della cellula batterica porta alla distruzione cellulare, mentre, nel "ciclo lisogeno", il materiale genetico del fago viene inserito nel DNA batterico dell'ospite. Il fago litico è il ciclo più rilevante per il trattamento della AMR[228].

4.7.1. *Terapia fagica*

L'uso della terapia fagica per le malattie infettive batteriche esiste da decenni, con i batteriofagi scoperti per la prima volta da Frederick Twort nel 1915 e Félix d'Hérelle nel 1917, che ne descrissero l'effetto battericida dopo l'isolamento dalle feci di pazienti in fase di guarigione dalla dissenteria [229,230]. Durante questo periodo, si verificò un rapido aumento nello sviluppo della terapia fagica, in particolare in Europa, Stati Uniti e Unione Sovietica [231]. Tuttavia, a questo seguì un rapido declino dell'uso della terapia fagica durante gli anni '40, quando la produzione e l'uso di antibiotici aumentarono negli Stati Uniti, con l'affermarsi dell'uso della penicillina e il proseguimento dell'uso dei sulfamidici (antibiotici sintetici inizialmente scoperti in Germania negli anni '30) [231]. Nonostante questa preferenza, la terapia fagica è rimasta (e rimane) in uso in diversi paesi precedentemente alleati dell'Unione Sovietica, ovvero Polonia, Georgia e la stessa Russia [232]. Inoltre, l'aumento della resistenza agli antibiotici significa che esiste una potenziale nicchia per la terapia fagica nel trattamento/prevenzione delle infezioni batteriche da AMR. Ad esempio, la terapia fagica ha curato un paziente con fibrosi cistica infettato da *M. abscessus* disseminato farmacoresistente, mentre un altro paziente, infettato da *A. baumannii* resistente, è stato curato [228,233]. Altri esempi includono l'uso di batteriofagi nel trattamento della setticemia da *Pseudomonas aeruginosa* sensibile alla sola colistina e delle infezioni da ustioni, nonché il loro potenziale utilizzo nei pazienti anziani che presentano infezione recidivante di protesi articolari da *S. aureus* [234–236]. Inoltre, la potenziale efficacia della terapia fagica è stata ampiamente esplorata negli animali da allevamento, nel pollame e negli animali da compagnia, in particolare per le zoonosi e le malattie animali legate alla perdita economica, con alcuni risultati incoraggianti [237].

4.7.2. *Proteine litiche derivate dai fagi come antibatterici*

I fagi che prendono di mira i batteri codificano per diverse proteine litiche, in particolare le idrolasi del peptidoglicano (PGH), chiamate endolisine, e l'idrolasi del

peptidoglicano associata al virione(VAPGH), necessarie per la disgregazione dei batteri infettati dai fagi, consentendo così il rilascio di particelle fagiche nell'ambiente. D'altra parte, i piccoli fagi litici delle famiglie Microviridae e Leviviridae determinano la lisi dell'ospite batterico mediante un singolo gene, che codifica per una proteina priva di attività degradativa del peptidoglicano [238]. L'endolisina si accumula nel citoplasma del batterio al termine del ciclo di replicazione del fago. Le endolisine accumulate possono infiltrarsi nella membrana citoplasmatica attraverso i fori creati dalle oline e degradare il peptidoglicano extracellulare, consentendo alla cellula di subire osmosi.

Attualmente, le proteine litiche derivate dai fagi sono oggetto di studio come potenziali trattamenti per le infezioni batteriche da AMR, la conservazione degli alimenti, l'alimentazione animale e la coltivazione di piante. Ad esempio, l'enzima litico del batteriofago pneumococcico purificato (Pal) ha dimostrato di essere efficace contro i ceppi di *S. pneumoniae* resistenti alla penicillina nell'orofaringe umana con un effetto minimo sulla flora commensale [239]. Inoltre, studi in vivo condotti sull'attività dei lisozimi Cpl-1 e Cpl-7 hanno riportato una significativa riduzione della colonizzazione di *S. pneumoniae* in un tessuto mucoso nasofaringeo su un modello murino di infezione. Studi hanno anche dimostrato attività sinergiche di queste endolisine quando utilizzate in combinazione con altri agenti antibatterici [240]. Il fago endolisina SAL-1 ha dimostrato di essere un nuovo farmaco antibatterico per il controllo delle infezioni da stafilococchi multiresistenti [241,242]. Questo è stato ulteriormente formulato in N-Rephasin® SAL200 per uso clinico. Attualmente, questa formulazione è in fase di studio per la sicurezza e l'efficacia di una singola dose endovenosa di N-Rephasin® SAL200 per la batteriemia persistente da *S. aureus* nell'ambito di uno studio clinico di fase IIa [243]. Considerata l'efficacia dei fagi e delle lisine derivate dai fagi, l'USFDA ha approvato l'applicazione di prodotti a base di batteriofagi come approccio ecologico per il controllo dei patogeni di origine alimentare [240,244]. Inoltre, le proteine litiche derivate dai fagi presentano diversi vantaggi rispetto agli antibiotici, vale a dire: (a) azione battericida rapida ed estesa contro il patogeno bersaglio, (b) mancanza di sviluppo di resistenza grazie alla loro azione specifica sui componenti strutturali conservati dei batteri, (c) azione sinergica con altre lisine o antibiotici e (d) il loro effetto sulle cellule persistenti fenotipicamente resistenti che crescono sulle superfici

delle mucose o nei biofilm [245]. I continui progressi nell'ingegneria genetica hanno ulteriormente rivoluzionato il campo della ricerca sui batteriofagi e hanno identificato e caratterizzato diverse endolisine attive contro una vasta gamma di batteri patogeni [240,246].

4.8. *Metodi di dispersione del biofilm*

I biofilm sono comunità microbiche che esistono come strutture complesse e possono essere presenti su superfici biotiche o abiotiche nei settori alimentare e medico. La formazione del biofilm è una strategia di adattamento e sopravvivenza ed è spesso la causa principale del fallimento del trattamento antibiotico, responsabile del 65-80% di tutte le infezioni [247]. Il biofilm si sviluppa come una comunità complessa multistrato che può essere di natura mono- o polimicrobica [248]. I biofilm si formano inizialmente tramite l'adesione reversibile di singole cellule batteriche in "fase planctonica" alle superfici, con la maggior parte delle cellule batteriche che successivamente vengono racchiuse in una matrice extracellulare autoprodotta, denominata "comunità sessile". Le cellule batteriche possono continuamente fuoriuscire ("dispersersi") dal biofilm, in particolare durante la fase successiva alla formazione dello stesso. Questo processo di dispersione è un possibile meccanismo di riduzione della massa del biofilm, poiché la fase "planctonica" libera del ciclo vitale batterico è spesso più sensibile ai farmaci antimicrobici e alle risposte immunologiche. [249]. Infatti, i meccanismi di dispersione del biofilm possono essere suddivisi in due categorie: dispersione attiva e passiva. La produzione di enzimi che distruggono la matrice del biofilm e promuovono la dispersione dipende da una riduzione dei livelli intracellulari di c-di-GMP, che porta alla dispersione attiva. D'altra parte, la dispersione passiva si basa su fattori scatenanti che liberano direttamente le cellule dal biofilm [250]. A questo proposito, sia i segnali di quorum sensing intercellulare che la segnalazione intracellulare di c-di-GMP sono coinvolti nello sviluppo del biofilm. L'interferenza di queste due vie di segnalazione viene utilizzata per sviluppare nuovi approcci di controllo del biofilm [251]. Tuttavia, sia le strategie di dispersione attiva che quelle passive presentano i loro svantaggi. Il trascrittoma delle cellule disperse nel modello sperimentale è diverso da quello del biofilm e delle cellule planctoniche rilasciate naturalmente, con le cellule disperse che possiedono concentrazioni di c-di-GMP inferiori, associate a una maggiore virulenza e implicando che le cellule disperse siano più patogene delle cellule planctoniche. Anche

la tempistica e la concentrazione dei trattamenti di dispersione rimangono una sfida. [250].

4.9. Scoperta e ruolo degli antimicrobici anti-persistenza

La persistenza fu scoperta nel 1944 da Joseph Bigger e riguardava colonie di cellule batteriche che non potevano essere completamente eliminate dal trattamento con penicillina. Questa popolazione residua di batteri rimaneva vitale dopo l'esposizione agli antibiotici. Queste popolazioni di cellule non erano mutanti resistenti agli antibiotici, ma piuttosto sottopopolazioni batteriche in grado di resistere al trattamento antibiotico per adattamento fisiologico [252]. La persistenza batterica è associata a un aumento del rischio di AMR durante il trattamento, poiché le cellule persistenti, che hanno la capacità di causare ricolonizzazione e recidiva dopo il trattamento antibiotico, portano infine a infezioni croniche resistenti [253]. Sono stati sviluppati farmaci anti-persistenza per migliorare l'eradicazione delle cellule persistenti. Un esempio classico è la combinazione di tobramicina (un antibiotico aminoglicosidico) con fumerato (composto anti-persistenza) per ridurre le infezioni croniche da *Pseudomonas aureus* [254]. Un composto anti-persistenza ideale dovrebbe essere in grado di trasportarsi passivamente all'interno della cellula batterica e uccidere autonomamente le cellule persistenti senza la necessità di un metabolismo attivo [255]. L'identificazione di nuove molecole con attività anti-persistenza può essere una delle strategie per affrontare l'AMR. I futuri approcci anti-persistenza dovrebbero anche avere come target la struttura della membrana con una maggiore permeabilità per i patogeni a crescita lenta [255].

4.10. Interruzione del Quorum Sensing

I processi di formazione del biofilm e il Quorum Sensing (QS) sono indissolubilmente legati. Lo sviluppo del biofilm è un comportamento cooperativo di gruppo in cui le popolazioni batteriche vivono immerse in una matrice extracellulare che producono autonomamente. Il QS può essere definito come Processo di comunicazione cellula-cellula che armonizza e regola l'espressione genica [256]. Il QS è diverso per i batteri Gram-negativi e Gram-positivi [257]. I batteri utilizzano molecole di segnalazione, chiamate autoinduttori (Ais), per sincronizzare l'espressione genica, la virulenza e la formazione di biofilm. D'altra parte, i batteri utilizzano inibitori del quorum sensing ed enzimi che inibiscono il quorum per controllare gli autoinduttori e degradare le molecole di segnalazione [258]. L'induzione del quorum microbico può essere

controllata mediante l'uso di agenti che inibiscono il quorum, portando alla riduzione delle infezioni microbiche, della patogenicità, della formazione di biofilm e anche all'aumento della suscettibilità batterica agli agenti antimicrobici, come antibiotici e batteriofagi [258,259]. Ad esempio, è stato condotto uno studio che utilizza la modelli matematica per valutare l'effetto della combinazione delle strategie terapeutiche basate su un enzima che inibisce il quorum quenching e un inibitore del quorum sensing coinvolto nel controllo delle vie di quorum sensing in *P. aeruginosa*. Questi risultati sono stati promettenti negli studi in vitro e sono necessarie ulteriori ricerche per concentrarsi sulla determinazione dell'efficacia della terapia combinata in vivo [260]. L'identificazione di potenziali nuove ricerche è importante prima dell'uso di trattamenti basati sul QS contro i patogeni [261].

5. Strategie basate su sistemi di rilascio di farmaci

5.1. Sistemi di rilascio facilitato di farmaci

Una delle principali sfide che la ricerca sugli antibiotici sta affrontando è la scarsa permeabilità cellulare degli antibiotici. Lo sviluppo di sistemi di rilascio degli antimicrobici rappresenta un approccio promettente per migliorare l'ingresso dell'antibiotico nello spazio intracellulare [262]. Una strategia importante consiste nello sfruttare i sistemi di trasporto del ferro batterico. Analoghi sintetici dei siderofori possono agire come sistema di rilascio quando coniugati con antibiotici, facilitandone l'ingresso nei batteri. È stato riportato che l'inclusione di un coniugato con ampicillina ha aumentato di 1000 volte l'attività contro *P. aeruginosa* e di 100 volte nel caso degli enterobatteri Gram-negativi. Hanno anche dimostrato che il coniugato sideroforo + ampicillina non era un substrato per le pompe di efflusso in *P. aeruginosa* e, quindi, era in grado di eludere uno dei principali meccanismi di resistenza in questa specie [263]. Un altro esempio di coniugati con attività antipseudomonas è stato l'uso di un sideroforo triscatecolato artificiale con uno scheletro tripode per poi coniugarlo con ampicillina e amoxicillina. Entrambi i coniugati hanno notevolmente migliorato l'attività antimicrobica in vitro degli antibiotici utilizzando sistemi di assorbimento del ferro dipendenti dall'energia per attraversare la membrana esterna [264]. D'altra parte, le nanoparticelle polimeriche stanno emergendo come strategia per migliorare la solubilità, la stabilità e la biodisponibilità degli antimicrobici, nonché per ridurre l'esposizione del microbiota a dosi sub-letali che possono portare allo sviluppo di

resistenza. I sistemi polimerici nanostrutturati consentono un rilascio preciso del farmaco basato su diversi metodi, come diffusione, eluizione o controllo chimico/stimolo, e sono sintetizzati da precursori naturali, come chitosano, collagene o gelatina, che li rendono biocompatibili e meno tossici. Sono disponibili anche precursori sintetici, come acido polilattico o polietilenglicole, [265,266]. Le nanoparticelle ibride fosfatidilcolina-chitosano rivestite con gentamicina hanno confermato la capacità del costrutto di impedire la formazione di biofilm e la crescita batterica sia nei batteri Gram-negativi che in quelli Gram-positivi [267]. Un'altra nanocapsula variante ha dimostrato che i polimerisomi idrofili incapsulavano la vancomicina, che serve anche a trattare le infezioni in modo più efficiente, in questo caso quelle causate da *S. aureus* meticillino-resistente [266]. Dal 1990, nanoparticelle biodegradabili come i nanocarrier sono state studiate per migliorare il rilascio dei farmaci. La nanoincapsulazione ha dimostrato di aumentare l'efficacia antimicrobica e l'efficienza proteggendola dalla degradazione, migliorando la precisione del targeting e aumentando l'assorbimento cellulare [268,269]. Un approccio tipico per generare nanocarrier prevede l'utilizzo di nanovesicole, ad esempio nanoparticelle metalliche e, come accennato in precedenza, polimeriche, liposomi, nanotubi di carbonio o dendrimeri. I liposomi, piccoli nanosistemi a base lipidica composti da un doppio strato fosfolipidico concentrico e da una struttura biodegradabile, sono versatili nel rilascio di farmaci sia idrofobici che idrofili grazie al loro doppio strato liposomiale esterno e al compartimento acquoso interno [270,271]. Alcuni liposomi sono già disponibili sul mercato come formulazioni topiche, come l'idrogel di polivinilpirrolidone-iodio, con attività contro un'ampia gamma di batteri, per uso su ferite esterne [272]. Questa strategia offre la possibilità di regolare la dose a concentrazioni superiori alla MIC, riducendo al contempo gli effetti tossici dose-dipendenti [271]. Inoltre, è stato dimostrato che i liposomi hanno aumentato l'attività antimicrobica contro specie come *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* o *P. aeruginosa* intrappolando la polimixina B in DPPC/Chol-1,2-dipalmitoil-sn-glicerolo-3-fosfolina e colesterolo-liposomi [273]. Questo stesso concetto di coniugazione è in fase di studio con gli anticorpi monoclonali. I coniugati anticorpo-farmaco consistono in un anticorpo monoclonale che lega, attraverso un legame covalente, un farmaco chimico, come un antibiotico, sebbene se ne faccia un uso più ampio per i farmaci antitumorali. Un coniugato anticorpo-farmaco è stato approvato per la prima volta dalla

FDA nel 2000 (gentuzumab-ozogamicina) utilizzato nel trattamento della leucemia mieloide [274]. Per le infezioni batteriche, la molecola DSTA4637S (un nuovo anticorpo IgG THIOMABTM legato tramite un linker scindibile da proteasi al coniugato di antibiotici della classe delle rifamicine (dmDNA31)) è un coniugato anticorpale attualmente in studio a livello preclinico come potenziale trattamento per la batteriemia complicata da *S. aureus* [275].

5.2. Antiplasmide e cura dei plasmidi - Tuttavia, non adatti per la sperimentazione in vivo

I plasmidi possono conferire resistenza a quasi tutte le classi di antibiotici. Infatti, la disseminazione dei geni AMR tra i batteri Gram-negativi è attribuita in modo significativo alla mobilitazione dei plasmidi mediante coniugazione, trasformazione o trasduzione [276]. Nuove strategie come antiplasmidi e plasmidi curativi mirano a ridurre la prevalenza e la diffusione dei geni AMR. In altre parole, le procedure di cura a base di plasmidi sono applicate per rimuovere i plasmidi dalle popolazioni batteriche, il che rappresenta un approccio sorprendente per combattere l'AMR. Sfortunatamente, pochi meccanismi di cura sono stati testati "in vivo". C'è grande necessità di ricerca in questo settore a causa del potenziale degli agenti curativi per l'uomo e gli animali, in particolare gli animali destinati alla produzione alimentare. Altri approcci, in una prospettiva One Health, considerano la cura con plasmidi in aree ambientali critiche, come le acque reflue o gli ambienti agricoli [277]. Tuttavia, nonostante i problemi di applicabilità, la tecnologia anti-plasmide sta progredendo con successo. Gli agenti curativi spaziano da prodotti chimici a strumenti di ingegneria genetica più sofisticati, come i sistemi CRISPR-Cas. I composti chimici che hanno come bersaglio i plasmidi includono detergenti, agenti intercalanti del DNA o farmaci psicotropi. I detergenti a base di acidi biliari possono portare alla perdita del plasmide pSLT di *Salmonella Typhimurium* [278], o il composto eterociclico fenotiazina è efficace nella cura dei plasmidi di *E. coli* [279]. La clorpromazina, ad esempio, può eliminare i plasmidi da *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* o *E. cloacae*, e l'agente intercalante del DNA bromuro di etidio è noto per curare i plasmidi in *S. aureus* fin dai primi anni '70 [280]. Tuttavia, gli intercalanti del DNA hanno una potente attività mutagenica, che porta a una significativa tossicità e a conseguenze cancerogene, che ne limitano l'uso al modello "in vitro". In alternativa, oltre alle strategie chimiche, è possibile sfruttare il principio di

incompatibilità plasmidica per eliminare i plasmidi. I plasmidi appartenenti agli stessi gruppi di incompatibilità non possono sopravvivere all'interno di una cellula poiché competono per le stesse risorse. In questo modo, l'introduzione di piccoli plasmidi ad alto numero di copie eliminerà un plasmide residente. Questo metodo può ridurre la tossicità associata agli agenti di cura ed evitare le minime mutazioni cromosomiche. Un esempio di cura per incompatibilità è la costruzione del plasmide pCURE1 progettato per colpire pO157, un plasmide IncF presente nell'ospite *E. coli* O157:H7 [281]. La possibilità di somministrare plasmidi all'uomo o agli animali tramite batteri o fagi è attualmente in fase di studio, con il principale ostacolo rappresentato dalle cassette di resistenza e pressione antimicrobica nella selezione dei plasmidi di cura. Nel caso dei batteriofagi, a volte la loro semplice presenza è sufficiente per curare un plasmide, come nel caso del fago filamentoso M13, la cui proteina di rivestimento minore g3p non è solo necessaria, ma sufficiente per evitare la coniugazione del plasmide F nei ceppi di *E. coli* [282]. Un nuovo approccio include l'uso dei sistemi CRISPR-Cas per colpire i geni AMR presenti nei plasmidi e, talvolta, curare completamente il plasmide a causa delle rotture destabilizzanti a doppio filamento generate dalle nucleasi [148,283]. Questo sistema può essere adattato in plasmidi trasformativi e coniugativi. Ad esempio, il gene *mcr-1* conferisce resistenza alla colistina e successivamente ha introdotto plasmidi resistenti alla colistina in un ceppo di *E. coli*. È stato dimostrato che un plasmide trasformativo seguito da un plasmide coniugativo contenente il CRISPR-Cas9 che prende di mira il gene *mcr-1* non solo interrompe il gene *mcr-1*, ma cura completamente il plasmide fuori dalla cellula e, in questo modo, elimina la resistenza alla colistina [284]. Sebbene l'utilità del sistema per la risensibilizzazione dei batteri sia innegabile, il metodo di somministrazione rappresenta ancora un ostacolo, soprattutto per i modelli "in vivo". Anche batteriofagi e fagemidi sono stati studiati per somministrare plasmidi che incorporano il sistema CRISPR-Cas, con buoni risultati "in vitro" ma, ancora una volta, limitati quando applicati "in vivo" [283,285].

5.3. *Composti antivirulenti*

Un altro approccio diverso dai tipici inibitori della crescita cellulare consiste nel ridurre la patogenicità di specie clinicamente rilevanti attraverso lo sviluppo di composti antivirulenti. Questa strategia previene lo sviluppo di resistenze attaccando le vie alla base della patogenesi, ma non influisce sulla vitalità batterica e, pertanto, contribuisce a

ridurre la diffusione, mentre il sistema immunitario dell'ospite procede con l'eliminazione dei batteri. Numerosi fattori sono coinvolti nella virulenza batterica, quindi, a seconda del bersaglio del composto, esistono diverse categorie di inibitori della virulenza [189]. Gli inibitori del quorum sensing influenzano il sistema di comunicazione batterica, spesso necessario per modulare le risposte di virulenza, il che li rende ideali per ridurre la patogenicità della specie in questione. Il quorum sensing regola azioni come la produzione di siderofori, la formazione di biofilm o il rilascio di proteasi. L'interruzione della segnalazione del quorum può verificarsi attraverso inibitori della sintesi di molecole segnale. Altre fasi del percorso possono essere prese di mira. La segnalazione del quorum può essere inibita da enzimi specifici che degradano le molecole di segnalazione. Anche le condizioni ambientali possono influenzare questa fase del processo. Inoltre, analoghi/antagonisti delle molecole di segnalazione possono legarsi al recettore delle molecole coinvolte nel quorum sensing, sostituendole e bloccando il processo [286]. Gli inibitori del quorum sensing possono essere naturali e sintetici. I flavonoidi sono metaboliti vegetali naturali noti per la loro capacità di colpire i recettori leganti gli autoinduttori, LasR e RhlR, essenziali per il quorum sensing, in *P. aeruginosa*. La presenza dei due gruppi idrossilici nella struttura principale dell'anello A del flavone è fondamentale per la sua attività antagonista [287,288]. Anche l'inibizione dell'acil-omoserina lattone sulla lattonasi è una strategia efficace contro *P. aeruginosa* [289]. In un altro studio, è stata esaminata la potenziale attività dei derivati sintetici del 3-acilpirrolo, un elemento presente in molti farmaci e composti biologicamente attivi, per controllare le infezioni da *V. cholerae* attraverso l'inibizione del quorum sensing [290]. I composti antivirulenti possono anche agire a numerosi livelli, come ad esempio la modulazione immunitaria dell'ospite, come gli inibitori del lipide A [189]. Ad esempio, gli antagonisti della fimbria e gli inibitori del formatore dei pili prendono di mira i sistemi di secrezione o i sistemi a due componenti. La FimH di *E. coli* è un precursore dell'adesina D-mannosio della fimbrina di tipo 1 ed è una delle lectine carboidrati-specifiche più note, e gli α -D-mannosidi rappresentano un approccio promettente per inibire la formazione della fimbria attraverso la loro capacità di antagonismo con la FimH [291]. Un altro fattore di virulenza, particolarmente importante nei batteri Gram-negativi, è il sistema di secrezione di tipo tre (T3SS), che consente ai patogeni di iniettare proteine di virulenza direttamente nelle cellule ospiti,

facilitando la progressione della malattia. È stato dimostrato che gli acilidrazidi salicilidene sono stati utilizzati per bloccare la virulenza di *S. enterica* sierotipo Typhimurium [292,293].

6. Metodi fisico-chimici

6.1. Plasma non termico a pressione atmosferica (APNTP)

Il plasma non termico (o freddo) a pressione atmosferica è una tecnologia emergente attualmente in fase di studio per quanto riguarda le proprietà antimicrobiche [294]. L'applicazione in vitro dell'APNTP su una vasta gamma di microrganismi ne ha indicato l'efficacia nell'inattivazione di batteri, virus, funghi e parassiti. Grazie alla sua relativa facilità d'uso e al suo buon rapporto costo-beneficio, con effetti collaterali locali limitati finora noti, rappresenta una promettente potenziale alternativa ai trattamenti antimicrobici convenzionali, anche per alcune infezioni in determinate applicazioni [295]. Questo campo della medicina al plasma è stato valutato per l'inattivazione batterica, la sterilizzazione dell'aria, la terapia canalare e la guarigione delle ferite, soprattutto laddove gli antibiotici tradizionali spesso falliscono [296]. I meccanismi esatti dell'inattivazione batterica mediata da APNTP sono ancora in fase di studio, ma sembra essere efficace attraverso prodotti generati, come specie reattive dell'ossigeno (ROS), specie reattive dell'azoto (RNS), radiazioni UV e particelle cariche all'interno di una fase gassosa plasmatica [297]. Le specie ROS considerate coinvolte nell'inattivazione batterica sono l'ozono, l'ossigeno atomico, l'ossigeno singoletto, il superossido, il perossido e i radicali idrossilici [298,299]. Il funzionamento di base di questi meccanismi è il danneggiamento degli acidi nucleici da parte delle radiazioni UV, la perossidazione lipidica causata dalle ROS che si verificano principalmente negli acidi grassi vicino alla superficie cellulare e la modificazione chimica e la degradazione delle proteine causata principalmente dai radicali idrossilici. Altri studi hanno anche riportato l'apoptosi nelle cellule batteriche probabilmente indotta dalle ROS [300]. Il danno cellulare meccanico, in particolare la rottura elettrostatica causata dalle forze elettrostatiche delle particelle cariche, si accumula sulle cellule. Il danno cellulare meccanico è causato anche dall'elettroporazione attraverso il bombardamento diretto di particelle cariche [301]. È interessante notare che è stato dimostrato che gli organismi Gram-negativi erano più sensibili all'APNTP rispetto ai Gram-positivi, indicando che il danno indotto dall'APNTP alla membrana cellulare e alla parete cellulare è un fattore

critico [295]. È stato riportato che batteri clinicamente importanti sono stati inattivati utilizzando il plasma freddo [302]. È stato anche dimostrato che l'APNTP inibisce i batteri sia in sospensione che nei biofilm [294]. L'inattivazione in vitro del biofilm di *P. aeruginosa* è stata dimostrata anche utilizzando il sistema al plasma freddo [298]. Un potenziale vantaggio dell'APNTP è l'inattivazione dei batteri senza danneggiare le cellule di mammifero [295,303,304]. Il plasma freddo può anche essere combinato con la terapia antibiotica, sebbene non siano ancora stati trovati tentativi di quantificare il dosaggio del plasma freddo. [305].

6.2. *Chemioterapia antimicrobica sonodinamica*

La chemioterapia antimicrobica sonodinamica (SACT) si basa sull'effetto sinergico degli ultrasuoni (US) e di un composto chimico denominato "sonosensibilizzatore" (SS) [306], per cui un suono non udibile con una frequenza inferiore a 20 kHz è in grado di uccidere i microrganismi [307–309]. La SACT utilizza la sensibilizzazione del sito bersaglio con un sono sensibilizzatore non tossico e ultrasuoni a intensità relativamente bassa e ossigeno molecolare, che può produrre microbolle attraverso il processo di cavitazione acustica durante le interazioni tra l'onda US e le cellule bersaglio [13]. L'inattivazione di *E. coli* è stata segnalata mediante l'applicazione di ultrasuoni in combinazione con gli antibiotici convenzionali Ciprofloxacina e Levofloxacina grazie al miglioramento dell'assorbimento e alla produzione di ROS citotossici [310,311]. Tuttavia, la capacità degli ultrasuoni di migliorare l'assorbimento batterico degli antibiotici senza attivazione da parte delle radiazioni è ben consolidata [312]. Ancora più importante, grazie alle eccellenti caratteristiche di focalizzazione regionale e alla capacità di penetrare nei tessuti resistenti, la SACT è nota per essere una terapia più efficace con minori effetti collaterali [13]. Il vantaggio degli ultrasuoni da un punto di vista clinico è un'ottima capacità di penetrazione tissutale senza una significativa attenuazione della sua energia. Questa è una caratteristica interessante e giustifica una valutazione approfondita [313]. Sono stati identificati sono-sensibilizzatori sia organici che inorganici. Molti sensibilizzatori inorganici hanno proprietà fisico-chimiche superiori, ma la traslazione clinica rimane irrisolta a causa della non biodegradabilità e di potenziali problemi di biosicurezza. Tuttavia, i sensibilizzatori organici presentano i vantaggi di una struttura chiara e di un facile metabolismo, che favorisce l'applicazione cliniche [314].

6.3. Fotoinattivazione

La fotoinattivazione o chemioterapia antimicrobica fotodinamica (PACT) è una strategia promettente per eliminare i batteri patogeni, che utilizza la luce visibile, un cromoforo fotosensibilizzante (PS) e l'ossigeno molecolare per creare specie reattive dell'ossigeno (ROS), che provocano morte della cellulare batterica [315,316]. È stato dimostrato che la PACT agisce su un'ampia gamma di batteri, ovvero ceppi batterici Gram-negativi e Gram-positivi, resistenti o sensibili agli antibiotici [315]. Questa tecnica ha destato molta attenzione nella ricerca come strategia alternativa per combattere la resistenza antimicrobica [317,318]. I vantaggi della PACT rispetto agli antibiotici convenzionali in ambito clinico includono l'applicazione localizzata sulla ferita con minimi effetti collaterali, resistenza e tossicità (Huang et al., 2010). A differenza degli antibiotici, dosi sub-inibitorie di inattivazione fotodinamica (PDI) non sono riuscite a indurre mutazioni genomiche o ad aumentare la resistenza fotodinamica o agli antibiotici [319,320]. Sono stati apportati diversi miglioramenti per posizionare la PACT come un'alternativa efficace alla chemioterapia antimicrobica, ad esempio. L'inattivazione antimicrobica consiste nella coniugazione delle porfirine alle nanoparticelle [315]. Sfruttando le piccole dimensioni delle porfirine e dei coniugati porfirina-nanoparticelle, i fotosensibilizzatori possono attaccarsi alla parete cellulare batterica attraverso un processo di autoassemblaggio, con conseguente morte cellulare [315]. È importante migliorare l'applicazione del PACT in ambito dermatologico e nel controllo delle malattie infettive, in particolare nella gestione dell'acne e delle infezioni cutanee in generale. Data l'ampia gamma di batteri, è stato osservato che la potenziale applicazione del PACT nel trattamento delle malattie infettive è ancora arretrato [315]. Sebbene l'applicazione dei sistemi PACT sia stata ampiamente valutata per l'approccio topico/locale per le valutazioni su modelli animali, sono ancora necessari ulteriori studi sull'applicazione sistemica per valutarne completamente la stabilità in vivo e la posologia. È importante comprendere appieno i loro meccanismi d'azione e perfezionarli in modo appropriato per migliorarne la sensibilità e la selettività. In particolare, la maggior parte degli studi non disponeva di dati sulla tossicità ed è pertanto necessario che gli studi futuri includano studi sulla tossicità. La valutazione del profilo di tossicità sarà importante per garantire la fiducia nei sistemi PACT prima di sottoporre i prodotti finali alle approvazioni normative [315]. Il PACT è inoltre

fortemente limitato dall'incapacità della luce di penetrare in profondità attraverso i tessuti dei mammiferi, principalmente a causa di pigmenti endogeni, come la melanina, che competono con il sensibilizzatore per l'assorbimento della luce, e rappresenta un problema particolare nelle infezioni localizzate in cui l'area della ferita può essere gravemente scolorita a causa di lividi o infiammazioni, o nei gruppi etnici in cui la pelle è naturalmente fortemente pigmentata (Huang et al., 2008). Attualmente, i sensibilizzatori approvati assorbono nella regione visibile dello spettro elettromagnetico, limitando la penetrazione della luce a pochi millimetri e riducendo la capacità dell'APDT di eradicare i batteri situati più in profondità nelle ferite infette [321].

6.4. Altri mezzi fisico-chimici

Metalli e ossidi metallici sono stati ampiamente studiati per le loro attività antimicrobiche [322]. Le nanoparticelle di ossido metallico, note per il loro potente effetto antibatterico, includono argento (Ag), ossido di ferro (Fe_3O_4), ossido di titanio (TiO_2), ossido di rame (CuO) e ossido di zinco (ZnO). La maggior parte delle nanoparticelle di ossido metallico mostra proprietà battericide attraverso la generazione di ROS, sebbene alcune siano efficaci solo grazie alla loro struttura fisica e al rilascio di ioni metallici. A seguito del divieto imposto in Unione Europea (UE) sull'uso di antibiotici come promotori della crescita, l'uso di rame o zinco è stato promosso negli animali da allevamento e nell'acquacoltura. Tuttavia, l'uso di rame o zinco non solo provoca danni all'ambiente, ma potrebbe anche favorire la diffusione della resistenza agli antibiotici tramite co-selezione [323,324]. È ora in vigore nell'UE il divieto di utilizzo di ZnO come medicinale veterinario a livelli superiori a 150 ppm a partire da giugno 2022[325].

7. Ruolo atteso dei vaccini nella lotta contro i patogeni della resistenza antimicrobica

La vaccinazione rappresenta un approccio interessante per prevenire lo sviluppo di un'infezione e/o malattia nell'uomo e negli animali, riducendo l'uso di antibiotici e, quindi, prevenendo l'insorgenza e la diffusione di patogeni resistenti. I vaccini coniugati antipneumococcici sono un chiaro esempio dell'efficacia dei vaccini nel ridurre la resistenza antimicrobica, così come il vaccino contro *H. influenzae* di tipo B. Negli anni

'90, prima del vaccino coniugato antipneumococcico polivalente, si registravano circa 63.000 casi di malattia pneumococcica negli Stati Uniti, con un conseguente aumento significativo della resistenza alla penicillina da parte di *S. pneumoniae*, tra le varie classi di antibiotici. Dopo l'introduzione del vaccino, non solo si è ridotta la prevalenza della malattia, ma si è anche ridotta significativamente la colonizzazione batterica di questo patogeno, che ha chiaramente influenzato la diffusione dei ceppi di resistenza antimicrobica [326]. Il ruolo dei vaccini nella lotta all'AMR è sia diretto che indiretto. I vaccini hanno un effetto diretto sui patogeni resistenti, riducendo l'incidenza delle infezioni e, indirettamente, riducendo la circolazione di ceppi resistenti all'AMR ad altre specie non resistenti. Una ridotta incidenza di infezioni è correlata a una ridotta prescrizione di antibiotici e a una ridotta insorgenza di infezioni secondarie e superinfezioni che, altrimenti, richiederebbero inevitabilmente un uso massiccio di antibiotici [327,328]. La ridotta circolazione di patogeni resistenti rende la strategia vaccinale e il raggiungimento dell'immunità di gregge uno strumento prezioso contro l'AMR [329]. Recentemente, i programmi di vaccinazione nel bestiame e nel pollame hanno portato a una drastica riduzione dell'uso di antibiotici e a una concomitante diminuzione dell'AMR nelle mandrie [330], con importanti benefici anche per la salute umana attraverso la ridotta circolazione di tratti AMR negli agenti zoonotici [328]. Pertanto, la vaccinazione porta a una riduzione del carico di AMR e, di conseguenza, dell'uso di antibiotici; altrimenti, l'abuso di antibiotici rappresenta un fattore importante per l'insorgenza e la diffusione dell'AMR in ambito veterinario, agricolo e nell'acquacoltura. Inoltre, le strategie vaccinali degli ultimi decenni hanno consentito l'eradicazione di importanti agenti patogeni, come il virus del vaiolo e della peste bovina [330]. I vaccini sono anche responsabili della quasi completa eliminazione di poliomielite, difterite, tetano, pertosse, morbillo, parotite e rosolia [331]. Inoltre, il meccanismo con cui i vaccini riducono i patogeni e la circolazione dell'AMR è completamente diverso da quello degli antibiotici, con conseguente scarsa o nulla pressione selettiva sui microrganismi; pertanto, la probabilità di comparsa di agenti patogeni resistenti è decisamente inferiore rispetto agli antibiotici. La resistenza agli antibiotici è un evento comune, mentre la resistenza ai vaccini è relativamente minima [332]. La resistenza ai vaccini è stata documentata per alcuni patogeni critici, come il virus dell'epatite B [333] e la *Bordetella pertussis* [334]. Inoltre, i vaccini hanno

comunemente come bersaglio una pluralità di antigeni, aumentando la probabilità di successo delle misure profilattiche nel tempo; mentre le molecole antibiotiche agiscono su un singolo bersaglio, con conseguente drastica perdita di efficacia una volta che si verifica una singola mutazione nei campioni microbici [328,335]. Tuttavia, lo sviluppo di vaccini contro i principali patogeni resistenti agli antibiotici è ancora necessario e si stanno compiendo importanti sforzi in questo settore. I recenti progressi nella ricerca delle scienze omiche e della bioinformatica aprono nuove strade per vaccini innovativi contro i patogeni, compresi quelli resistenti agli antibiotici. Le strategie vaccinali tradizionali si basano sulla somministrazione di patogeni vivi attenuati o germi inattivati. Entrambi i metodi consentono un'immunizzazione efficiente e la stimolazione di una buona memoria immunologica, sebbene la seconda strategia sia più sicura e meno efficiente e siano necessarie stimolazioni multiple per mantenere la protezione dei soggetti vaccinati. In seguito all'avvento delle tecniche del DNA ricombinante, la vaccinologia si è evoluta notevolmente con la produzione di vaccini ricombinanti caratterizzati da livelli di sicurezza più elevati e dal potere immunologico dei vaccini vivi attenuati. Ciò garantisce un migliore controllo di patogeni, come il virus dell'epatite B, e la generazione della tossina geneticamente detossificata di *B. pertussis* [336]. La tecnologia del DNA ricombinante è stata impiegata per produrre vaccini a subunità, in cui ci si aspetta che la somministrazione di soli determinanti antigenici fornisca una buona protezione e un rischio pressoché nullo per la salute del soggetto vaccinato. Questa tecnologia è stata applicata con successo per produrre il vaccino attenuato contro l'influenza e il vaccino contro il rotavirus [336–338]. Tra i più recenti successi nel campo della vaccinologia, anche la vaccinologia inversa è degna di nota. Questo approccio innovativo si basa sulle informazioni genomiche del patogeno di interesse, ovvero l'elenco degli antigeni e degli epitopi che il microrganismo è in grado di esprimere, consentendo così uno screening rapido ed equo degli antigeni candidati da utilizzare per la formulazione vaccinale [339]. La vaccinologia inversa ha portato a un vaccino efficiente contro il meningococco di sierogruppo B; è stato segnalato il 4CMenB. Un approccio simile è stato fondamentale per la selezione di antigeni candidati per lo sviluppo di un vaccino contro *E. coli* [340] e *P. aeruginosa* [341]. Un'altra strategia innovativa della vaccinologia è l'uso di vescicole della membrana esterna come piattaforma vaccinale. Questo approccio si basa sulla produzione di

vescicole a base di membrana esterna di batteri Gram-negativi opportunamente modificati per ridurre la reattività mediata dai lipopolisaccaridi e altre reazioni interferenti indesiderate. Queste vescicole fungono da immunostimolanti sicuri e potenti contro i patogeni batterici Gram-negativi, come *Neisseria meningitidis* e *Shigella sonnei* [342–345]. Recentemente, la generazione di vaccini antimicrobici glicoconiugati è stata proposta come una semplice strategia in vivo per produrre vaccini contro batteri resistenti agli antibiotici. Questa strategia si basa sulla modifica genetica di un singolo ceppo di *E. coli* per produrre il vaccino desiderato attraverso l'oligosaccariltransferasi, PglB. Questo enzima catalizza il legame di un polisaccaride antigenico selezionato con proteine carrier bersaglio che contengono specifici siti di N-glicosilazione. Attraverso la glicosilazione guidata di specifici antigeni batterici polisaccaridici, è possibile la produzione efficiente di vaccini glicoconiugati contro patogeni resistenti agli antibiotici, come *Shigella flexneri*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* [346,347], in modo sicuro (non è necessario coltivare questi patogeni ad alto rischio) ed efficiente [348]. Un approccio recente per combinare antibiotici e vaccini per trattare la resistenza antimicrobica è l'uso di un ipotetico vaccino a spettro ristretto per colpire i ceppi più resistenti, incoraggiando così la sostituzione con ceppi sensibili. Gli antibiotici potrebbero quindi essere utilizzati per trattare con successo queste infezioni.[332]. Infine, esiste la possibilità teorica che la riduzione della densità delle popolazioni microbiche mediante vaccinazione riduca le opportunità di scambio genetico di elementi di resistenza per i vaccini contro organismi come *S. pneumoniae*, *S. aureus* e membri della famiglia Enterobacterales, che colonizzano asintomaticamente il rinofaringe, la pelle, l'intestino e altri siti [349]. Sebbene i vaccini non siano destinati a sostituire gli antibiotici, possono contribuire a ridurre al minimo la resistenza antimicrobica riducendo l'uso di antimicrobici (AMU), per evitare malattie derivanti da infezioni batteriche da resistenza antimicrobica e per prevenire la diffusione dei batteri AMR.

8. Strategie non convenzionali

In vista dell'emergenza AMR, sono stati testati diversi farmaci alternativi, tra cui antistaminici, anestetici, farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS), antipsicotici e farmaci cardiovascolari [350]. Il trapianto di microbiota fecale (FMT) è un'importante strategia alternativa in fase di sperimentazione per combattere l'AMR. Attraverso la

somministrazione di materia fecale fresca, congelata o incapsulata da un donatore idoneo, il microbiota intestinale malsano del paziente viene ripristinato, ristabilendo l'alfa-diversità. Il trattamento con FMT è particolarmente raccomandato per le infezioni ricorrenti da *Clostridium difficile*, mostrando oltre il 90% di efficacia in studi clinici randomizzati [351]. Il FMT è anche efficace nel dislocare gli Enterococchi vancomicina-resistenti quando questi sono predominanti sul resto del microbiota intestinale e anche quando è presente *C. difficile* [352].

Conclusioni

La resistenza antimicrobica, in particolare la resistenza agli antibiotici, continua a emergere e a diffondersi oltre ogni confine. Non si tratta di un problema isolato, ma è piuttosto associato a molteplici parametri. Sono necessari sforzi coordinati e collaborazioni multidisciplinari per affrontare l'AMR a livello locale, nazionale e internazionale. Un forte impegno politico può svolgere un ruolo fondamentale nella formulazione di politiche, nell'implementazione clinica, negli aggiornamenti formativi periodici basati su evidenze scientifiche per regolamentare meglio l'uso e la vendita di antibiotici sia per l'uomo che per gli animali. La promozione non etica degli antibiotici deve essere controllata e devono essere implementate strategie per eliminarne l'uso eccessivo o inappropriato. Diversi nuovi approcci sono stati testati per migliorare l'efficacia degli antibiotici attraverso nuovi bersagli e meccanismi che includono l'inattivazione, il silenziamento e l'editing dei geni resistenti. È importante sottolineare che la maggior parte delle nuove strategie alternative non innesca la resistenza agli antibiotici. Fortunatamente, si stanno esplorando molte nuove strade per combattere la resistenza attuale ed emergente, anche se ci vorranno diversi anni prima che saremo in grado di determinarne l'utilità, sia singolarmente che in combinazione, con gli sforzi compiuti dalle autorità di regolamentazione, dalle istituzioni e dai governi.

Bibliografia

1. World Health Organization. Antimicrobial Resistance. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Antimicrobial-resistance> (accessed on 31 October 2021).
2. World Organization for Animal Health. OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance. June 2019. Available online: https://www.oie.int/en/document/a_oie_list_Antimicrobials_june2019/ (accessed on 11 December 2021).
3. Nelson, R.E.; Hyun, D.; Jezek, A.; Samore, M.H. Mortality, Length of Stay, and Healthcare Costs Associated With Multidrug-Resistant Bacterial Infections Among Elderly Hospitalized Patients in the United States. *Clin. Infect. Dis.* 2021, ciab696. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab696>.

4. O'Neil, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations; Government of the United Kingdom: London, UK, 2016.
5. Murray, C.J.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Aguilar, G.R.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global burden of bacterial Antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet* 2022. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
6. Jee, Y.; Carlson, J.; Rafai, E.; Musonda, K.; Huong, T.T.G.; Daza, P.; Sattayawuthipong, W.; Yoon, T. Antimicrobial resistance: A threat to global health. *Lancet Infect. Dis.* 2018, 18, 939–940. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30471-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30471-7).
7. Ansari, S.; Hays, J.P.; Kemp, A.; Okechukwu, R.; Murugaiyan, J.; Ekwanzala, M.D.; Ruiz Alvarez, M.J.; Paul-Satyaseela, M.; Iwu, C.D.; Balleste-Delpierre, C.; et al. The potential impact of the COVID-19 pandemic on global antimicrobial and biocide resistance: An AMR Insights global perspective. *JAC Antimicrob. Resist.* 2021, 3, dlab038. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab038>.
8. Hay, S.I.; Rao, P.C.; Dolecek, C.; Day, N.P.J.; Stergachis, A.; Lopez, A.D.; Murray, C.J.L. Measuring and mapping the global burden of Antimicrobial resistance. *BMC Med.* 2018, 16, 78. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1073-z>.
9. Bengtsson, B.; Greko, C. Antibiotic resistance—Consequences for animal health, welfare, and food production. *Upsala J. Med. Sci.* 2014, 119, 96–102. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.901445>.
10. Mulani, M.S.; Kamble, E.E.; Kumkar, S.N.; Tawre, M.S.; Pardesi, K.R. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>.
11. Williams, K.J. The introduction of 'chemotherapy' using arsphenamine—The first magic bullet. *J. R. Soc. Med.* 2009, 102, 343–348. <https://doi.org/10.1258/jrsm.2009.09k036>.
12. Saga, T.; Yamaguchi, K. History of Antimicrobial agents and resistant bacteria. *Jpn. Med. Assoc. J.* 2009, 52, 103–108.
13. Ventola, C.L. The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats. *Pharm. Ther.* 2015, 40, 277–283.
14. Abedon, S.T.; Kuhl, S.J.; Blasdel, B.G.; Kutter, E.M. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 2011, 1, 66–85. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>.
15. Bush, K.; Bradford, P.A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016, 6, a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>.
16. Huang, E.; Yousef, A.E. The lipopeptide antibiotic paenibacterin binds to the bacterial outer membrane and exerts bactericidal activity through cytoplasmic membrane damage. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014, 80, 2700–2704. <https://doi.org/10.1128/AEM.03775-13>.
17. Lambert, T. Antibiotics that affect the ribosome. *Rev. Sci. Tech.* 2012, 31, 57–64. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2095>.
18. Chukwudi, C.U. rRNA Binding Sites and the Molecular Mechanism of Action of the Tetracyclines. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016, 60, 4433–4441. <https://doi.org/10.1128/AAC.00594-16>.
19. Aldred, K.J.; Kerns, R.J.; Osheroff, N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 2014, 53, 1565–1574. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>.
20. Daschner, F. Inhibition of cell wall synthesis by sulfonamides and trimethoprim. *Chemotherapy* 1976, 22, 12–18. <https://doi.org/10.1159/000221905>.

21. Coates, A.R.M.; Hu, Y.; Holt, J.; Yeh, P. Antibiotic combination therapy against resistant bacterial infections: Synergy, rejuvenation and resistance reduction. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2020, 18, 5–15. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1705155>.
22. Tamma, P.D.; Cosgrove, S.E.; Maragakis, L.L. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012, 25, 450–470. <https://doi.org/10.1128/CMR.05041-11>.
23. Davis, B.D. Bactericidal synergism between β -lactams and aminoglycosides: Mechanism and possible therapeutic implications. *Rev. Infect. Dis.* 1982, 4, 237–245. <https://doi.org/10.1093/clinids/4.2.237>.
24. Giamarellou, H. Aminoglycosides plus beta-lactams against gram-negative organisms: Evaluation of in vitro synergy and chemical interactions. *Am. J. Med.* 1986, 80, 126–137. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(86\)90490-0](https://doi.org/10.1016/0002-9343(86)90490-0).
25. Yu, L.; Zhang, J.; Fu, Y.; Zhao, Y.; Wang, Y.; Zhao, J.; Guo, Y.; Li, C.; Zhang, X. Synergetic Effects of Combined Treatment of Colistin With Meropenem or Amikacin on Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in vitro. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019, 9, 422. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00422>.
26. Gunnison, J.B.; Shevsky, M.C.; Bruff, J.A.; Coleman, V.R.; Jawetz, E. Studies on antibiotic synergism and antagonism: The effect in vitro of combinations of antibiotics on bacteria of varying resistance to single antibiotics. *J. Bacteriol.* 1953, 66, 150–158. <https://doi.org/10.1128/jb.66.2.150-158.1953>.
27. Hegreness, M.; Shores, N.; Damian, D.; Hartl, D.; Kishony, R. Accelerated evolution of resistance in multidrug environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 13977–13981. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805965105>.
28. Papp-Wallace, K.M. The latest advances in β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations for the treatment of Gram-negative bacterial infections. *Expert Opin. Pharmacother.* 2019, 20, 2169–2184. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1660772>.
29. Wenzler, E.; Deraedt, M.F.; Harrington, A.T.; Danizger, L.H. Synergistic activity of ceftazidime-avibactam and aztreonam against serine and metallo- β -lactamase-producing gram-negative pathogens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2017, 88, 352–354. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.05.009>.
30. Belley, A.; Barth, P.; Kashyap, S.; Lahlou, O.; Motta, P.; Knechtel, P.; Velicitat, P. LB-4. Cefepime-Enmetazobactam Demonstrates Superiority to Piperacillin-Tazobactam in a Subgroup of Patients with Complicated Urinary Tract Infections/Acute Pyelonephritis Caused by Extended Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacterales. *Open Forum Infect. Dis.* 2020, 7, S845-S845. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa515.1901>.
31. Mancuso, G.; Midiri, A.; Gerace, E.; Biondo, C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens* 2021, 10, 1310. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>.
32. Lenhard, J.R.; Nation, R.L.; Tsuji, B.T. Synergistic combinations of polymyxins. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2016, 48, 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.014>.
33. Brochado, A.R.; Telzerow, A.; Bobonis, J.; Banzhaf, M.; Mateus, A.; Selkrig, J.; Huth, E.; Bassler, S.; Zamarreno Beas, J.; Zietek, M.; et al. Species-specific activity of antibacterial drug combinations. *Nature* 2018, 559, 259–263. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0278-9>.
34. Pietsch, F.; Heidrich, G.; Nordholt, N.; Schreiber, F. Prevalent Synergy and Antagonism Among Antibiotics and Biocides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 2020, 11, 615618. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.615618>.

35. Ramsay, R.R.; Tipton, K.F. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules* 2017, 22, 1192. <https://doi.org/10.3390/molecules22071192>.
36. Egorov, A.M.; Ulyashova, M.M.; Rubtsova, M.Y. Bacterial Enzymes and Antibiotic Resistance. *Acta Naturae* 2018, 10, 33–48.
37. Tooke, C.L.; Hinchliffe, P.; Bragginton, E.C.; Colenso, C.K.; Hirvonen, V.H.A.; Takebayashi, Y.; Spencer, J. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol.* 2019, 431, 3472–3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>.
38. Savoia, D. Plant-derived Antimicrobial compounds: Alternatives to antibiotics. *Future Microbiol.* 2012, 7, 979–990. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.68>.
39. Shahid, M.; Shahzad, A.; Sobia, F.; Sahai, A.; Tripathi, T.; Singh, A.; Khan, H.M.U. Plant Natural Products as a Potential Source for Antibacterial Agents: Recent Trends Anti-Infect. Agents Med. Chem. Former. *Curr. Med. Chem. Anti-Infect. Agents* 2009, 8, 211–225.
40. Abreu, A.C.; McBain, A.J.; Simoes, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat. Prod. Rep.* 2012, 29, 1007–1021. <https://doi.org/10.1039/c2np20035j>.
41. Simoes, M.; Bennett, R.N.; Rosa, E.A. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Nat. Prod. Rep.* 2009, 26, 746–757. <https://doi.org/10.1039/b821648g>.
42. AlSheikh, H.M.A.; Sultan, I.; Kumar, V.; Rather, I.A.; Al-Sheikh, H.; Tasleem Jan, A.; Haq, Q.M.R. Plant-Based Phytochemicals as Possible Alternative to Antibiotics in Combating Bacterial Drug Resistance. *Antibiotics* 2020, 9, 480. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080480>.
43. Gupta, P.D.; Birdi, T.J. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *J. Ayurveda Integr. Med.* 2017, 8, 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2017.05.004>.
44. Khameneh, B.; Iranshahy, M.; Soheili, V.; Fazly Bazzaz, B.S. Review on plant antimicrobials: A mechanistic viewpoint. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 2019, 8, 118. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0559-6>.
45. Stavri, M.; Piddock, L.J.; Gibbons, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, 59, 1247–1260. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl460>.
46. Gibbons, S.; Oluwatuyi, M.; Kaatz, G.W. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003, 51, 13–17. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg044>.
47. Kang, H.K.; Kim, H.Y.; Cha, J.D. Synergistic effects between silibinin and antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens. *Biotechnol. J.* 2011, 6, 1397–1408. <https://doi.org/10.1002/biot.201000422>.
48. Willers, C.; Wentzel, J.F.; du Plessis, L.H.; Gouws, C.; Hamman, J.H. Efflux as a mechanism of antimicrobial drug resistance in clinically relevant microorganisms: The role of efflux inhibitors. *Expert Opin. Ther. Targets* 2017, 21, 23–36. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1265105>.
49. Li, X.Z.; Plesiat, P.; Nikaido, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015, 28, 337–418. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>.
50. Aghayan, S.S.; Kalalian Mogadam, H.; Fazli, M.; Darban-Sarokhalil, D.; Khoramrooz, S.S.; Jabalameli, F.; Yaslianifard, S.; Mirzazai, M. The Effects of Berberine and Palmatine on Efflux Pumps Inhibition with Different Gene Patterns in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Infections. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2017, 9, 2–7.

51. Subramani, R.; Narayanasamy, M.; Feussner, K.D. Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. *3 Biotech* 2017, 7, 172. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0848-9>.
52. Sun, J.; Marais, J.P.; Khoo, C.; LaPlante, K.; Vejborg, R.M.; Givskov, M.; Tolker-Nielsen, T.; Seeram, N.P.; Rowley, D.C. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) oligosaccharides decrease biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Funct. Foods* 2015, 17, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.016>.
53. Ulrey, R.K.; Barksdale, S.M.; Zhou, W.; van Hoek, M.L. Cranberry proanthocyanidins have anti-biofilm properties against *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complement. Altern. Med.* 2014, 14, 499. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-499>.
54. Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D.; Korzekwa, K.; Kicia, M.; Hendrich, A.B. Study of the impact of cranberry extract on the virulence factors and biofilm formation by *Enterococcus faecalis* strains isolated from urinary tract infections. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2016, 67, 1005–1016. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1211996>.
55. Bag, A.; Chattopadhyay, R.R. Efflux-pump inhibitory activity of a gallotannin from *Terminalia chebula* fruit against multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Prod. Res.* 2014, 28, 1280–1283. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.895729>.
56. Simoes, L.C.; Lemos, M.; Pereira, A.M.; Abreu, A.C.; Saavedra, M.J.; Simoes, M. Persister cells in a biofilm treated with a biocide. *Biofouling* 2011, 27, 403–411. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.579599>.
57. Dwivedi, G.R.; Maurya, A.; Yadav, D.K.; Singh, V.; Khan, F.; Gupta, M.K.; Singh, M.; Darokar, M.P.; Srivastava, S.K. Synergy of clavine alkaloid 'chanoclavine' with tetracycline against multi-drug-resistant *E. coli*. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2019, 37, 1307–1325. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1458654>.
58. Maurya, A.; Dwivedi, G.R.; Darokar, M.P.; Srivastava, S.K. Antibacterial and synergy of clavine alkaloid lysergol and its derivatives against nalidixic acid-resistant *Escherichia coli*. *Chem. Biol. Drug Des.* 2013, 81, 484–490. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12103>.
59. Holler, J.G.; Christensen, S.B.; Slotved, H.C.; Rasmussen, H.B.; Guzman, A.; Olsen, C.E.; Petersen, B.; Molgaard, P. Novel inhibitory activity of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump by a kaempferol rhamnoside isolated from *Persea lingue* Nees. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012, 67, 1138–1144. <https://doi.org/10.1093/jac/dks005>.
60. Brown, A.R.; Ettetfagh, K.A.; Todd, D.; Cole, P.S.; Egan, J.M.; Foil, D.H.; Graf, T.N.; Schindler, B.D.; Kaatz, G.W.; Cech, N.B. A mass spectrometry-based assay for improved quantitative measurements of efflux pump inhibition. *PLoS ONE* 2015, 10, e0124814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124814>.
61. Morel, C.; Stermitz, F.R.; Tegos, G.; Lewis, K. Isoflavones as potentiators of antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 5677–5679. <https://doi.org/10.1021/jf0302714>.
62. Stermitz, F.R.; Beeson, T.D.; Mueller, P.J.; Hsiang, J.; Lewis, K. *Staphylococcus aureus* MDR efflux pump inhibitors from a *Berberis* and a *Mahonia* (sensu strictu) species. *BioChem. Syst. Ecol.* 2001, 29, 793–798. [https://doi.org/10.1016/s0305-1978\(01\)00025-4](https://doi.org/10.1016/s0305-1978(01)00025-4).
63. Belofsky, G.; Percivall, D.; Lewis, K.; Tegos, G.P.; Ekart, J. Phenolic metabolites of *Dalea versicolor* that enhance antibiotic activity against model pathogenic bacteria. *J. Nat. Prod.* 2004, 67, 481–484. <https://doi.org/10.1021/np030409c>.
64. Holler, J.G.; Slotved, H.C.; Molgaard, P.; Olsen, C.E.; Christensen, S.B. Chalcone inhibitors of the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus* whole cells and enriched everted membrane vesicles. *Bioorganic Med. Chem.* 2012, 20, 4514–4521. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.05.025>.

65. de Araujo, R.S.; Barbosa-Filho, J.M.; Scotti, M.T.; Scotti, L.; da Cruz, R.M.; Falcao-Silva Vdos, S.; de Siqueira-Junior, J.P.; Mendonca-Junior, F.J. Modulation of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus* with Coumarin Derivatives. *Scientifica* 2016, 2016, 6894758. <https://doi.org/10.1155/2016/6894758>.
66. Khameneh, B.; Iranshahy, M.; Ghandadi, M.; Ghoochi Atashbeyk, D.; Fazly Bazzaz, B.S.; Iranshahi, M. Investigation of the antibacterial activity and efflux pump inhibitory effect of co-loaded piperine and gentamicin nanoliposomes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2015, 41, 989–994. <https://doi.org/10.3109/03639045.2014.920025>.
67. Mun, S.H.; Joung, D.K.; Kim, S.B.; Park, S.J.; Seo, Y.S.; Gong, R.; Choi, J.G.; Shin, D.W.; Rho, J.R.; Kang, O.H.; et al. The mechanism of antimicrobial activity of sophoraflavanone B against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathog. Dis.* 2014, 11, 234–239. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1627>.
68. Abulrob, A.N.; Suller, M.T.; Gumbleton, M.; Simons, C.; Russell, A.D. Identification and biological evaluation of grapefruit oil components as potential novel efflux pump modulators in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial strains. *Phytochemistry* 2004, 65, 3021–3027. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.08.044>.
69. Roy, S.K.; Kumari, N.; Pahwa, S.; Agrahari, U.C.; Bhutani, K.K.; Jachak, S.M.; Nandanwar, H. NorA efflux pump inhibitory activity of coumarins from *Mesua ferrea*. *Fitoterapia* 2013, 90, 140–150. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.07.015>.
70. Boberek, J.M.; Stach, J.; Good, L. Genetic evidence for inhibition of bacterial division protein FtsZ by berberine. *PLoS ONE* 2010, 5, e13745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013745>.
71. Guay, I.; Boulanger, S.; Isabelle, C.; Brouillette, E.; Chagnon, F.; Bouarab, K.; Marsault, E.; Malouin, F. Tomatidine and analog FC04-100 possess bactericidal activities against *Listeria*, *Bacillus* and *Staphylococcus* spp. *BMC Pharmacol. Toxicol.* 2018, 19, 7. <https://doi.org/10.1186/s40360-018-0197-2>.
72. Jeong, K.W.; Lee, J.Y.; Kang, D.I.; Lee, J.U.; Shin, S.Y.; Kim, Y. Screening of flavonoids as candidate antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *J. Nat. Prod.* 2009, 72, 719–724. <https://doi.org/10.1021/np800698d>.
73. Wu, H.Z.; Fei, H.J.; Zhao, Y.L.; Liu, X.J.; Huang, Y.J.; Wu, S.W. [Antibacterial mechanism of sulforaphane on *Escherichia coli*. *Sichuan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban* 2012, 43, 386–390.
74. Reiter, J.; Levina, N.; van der Linden, M.; Gruhlke, M.; Martin, C.; Slusarenko, A.J. Diallylthiosulfinate (Allicin), a Volatile Anti-microbial from Garlic (*Allium sativum*), Kills Human Lung Pathogenic Bacteria, Including MDR Strains, as a Vapor. *Molecules* 2017, 22, 1711. <https://doi.org/10.3390/molecules22101711>.
75. Basile, A.; Sorbo, S.; Spadaro, V.; Bruno, M.; Maggio, A.; Faraone, N.; Rosselli, S. Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae). *Molecules* 2009, 14, 939–952. <https://doi.org/10.3390/molecules14030939>.
76. Tan, N.; Yazici-Tutunis, S.; Bilgin, M.; Tan, E.; Miski, M. Antibacterial Activities of Pyrenylated Coumarins from the Roots of *Prangos hulusii*. *Molecules* 2017, 22, 1098. <https://doi.org/10.3390/molecules22071098>.
77. El-Seedi, H.R. Antimicrobial arylcoumarins from *Asphodelus microcarpus*. *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 118–120. <https://doi.org/10.1021/np060444u>.
78. Bazzaz, B.S.; Memariani, Z.; Khashiarmansh, Z.; Iranshahi, M.; Naderinasab, M. Effect of galbanic Acid, a sesquiterpene coumarin from *ferula szowitsiana*, as an inhibitor of efflux mechanism in resistant clinical

- isolates of *Staphylococcus aureus*. *Braz. J. Microbiol.* 2010, 41, 574–580. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000300006>.
79. Rathinam, P.; Vijay Kumar, H.S.; Viswanathan, P. Eugenol exhibits anti-virulence properties by competitively binding to quorum sensing receptors. *Biofouling* 2017, 33, 624–639. <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1350655>.
 80. Ali, S.M.; Khan, A.A.; Ahmed, I.; Musaddiq, M.; Ahmed, K.S.; Polasa, H.; Rao, L.V.; Habibullah, C.M.; Sechi, L.A.; Ahmed, N. Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2005, 4, 20. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-4-20>.
 81. Rajamanickam, K.; Yang, J.; Chidambaram, S.B.; Sakharkar, M.K. Enhancing Drug Efficacy against Mastitis Pathogens-An In Vitro Pilot Study in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Animals* 2020, 10, 2117. <https://doi.org/10.3390/ani10112117>.
 82. Jouany, J.P.; Morgavi, D.P. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal* 2007, 1, 1443–1466. <https://doi.org/10.1017/S1751731107000742>.
 83. Theuretzbacher, U.; Outtersen, K.; Engel, A.; Karlen, A. The global preclinical antibacterial pipeline. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020, 18, 275–285. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0288-0>.
 84. Rossiter, S.E.; Fletcher, M.H.; Wuest, W.M. Natural Products as Platforms To Overcome Antibiotic Resistance. *Chem. Rev.* 2017, 117, 12415–12474. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00283>.
 85. Kalinin, D.V.; Holl, R. LpxC inhibitors: A patent review (2010–2016). *Expert Opin. Ther. Pat.* 2017, 27, 1227–1250. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1360282>.
 86. World Health Organization. 2020 Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development: An Overview and Analysis. Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240021303> (accessed on 25 October 2021).
 87. Ryan, M.D.; Parkes, A.L.; Corbett, D.; Dickie, A.P.; Southey, M.; Andersen, O.A.; Stein, D.B.; Barbeau, O.R.; Sanzone, A.; Thommes, P.; et al. Discovery of Novel UDP-N-Acetylglucosamine Acyltransferase (LpxA) Inhibitors with Activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Chem.* 2021, 64, 14377–14425. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00888>.
 88. Ciunac, D.; Gong, H.; Hu, X.; Lu, J.R. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *J. Colloid Interface Sci.* 2019, 537, 163–185. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.103>.
 89. Kang, H.K.; Kim, C.; Seo, C.H.; Park, Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): A patent review. *J. Microbiol.* 2017, 55, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6452-1>.
 90. Molchanova, N.; Hansen, P.R.; Franzyk, H. Advances in Development of Antimicrobial Peptidomimetics as Potential Drugs. *Molecules* 2017, 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22091430>.
 91. Kuppusamy, R.; Willcox, M.; Black, D.S.; Kumar, N.; Kuppusamy, R.; Willcox, M.; Black, D.S.; Kumar, N. Short Cationic Peptidomimetic Antimicrobials. *Antibiotics* 2019, 8, 44. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020044>.
 92. Wright, G.D. Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. *Nat. Prod. Rep.* 2017, 34, 694–701. <https://doi.org/10.1039/c7np00019g>.
 93. Rogers, G.B.; Carroll, M.P.; Bruce, K.D. Enhancing the utility of existing antibiotics by targeting bacterial behaviour? *Br. J. Pharmacol.* 2012, 165, 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01643.x>.
 94. Tilocca, B.; Balmas, V.; Hassan, Z.U.; Jaoua, S.; Migheli, Q. A proteomic investigation of *Aspergillus carbonarius* exposed to yeast volatiles or to its major component 2-phenylethanol reveals major shifts in

- fungal metabolism. *Int. J. Food Microbiol.* 2019, 306, 108265. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108265>.
95. Freimoser, F.M.; Rueda-Mejia, M.P.; Tilocca, B.; Migheli, Q. Biocontrol yeasts: Mechanisms and applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2019, 35, 154. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>.
 96. Tilocca, B.; Cao, A.; Migheli, Q. Scent of a Killer: Microbial Volatilome and Its Role in the Biological Control of Plant Pathogens. *Front. Microbiol.* 2020, 11, 41. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00041>.
 97. Wang, C.H.; Hsieh, Y.H.; Powers, Z.M.; Kao, C.Y. Defeating Antibiotic-Resistant Bacteria: Exploring Alternative Therapies for a Post-Antibiotic Era. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1061. <https://doi.org/10.3390/ijms21031061>.
 98. Gray, D.A.; Wenzel, M. Multitarget Approaches against Multiresistant Superbugs. *ACS Infect. Dis.* 2020, 6, 1346–1365. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00001>.
 99. Swamy, M.K.; Akhtar, M.S.; Sinniah, U.R. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* 2016, 2016, 3012462. <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>.
 100. Yang, S.K.; Tan, N.P.; Chong, C.W.; Abushelaibi, A.; Lim, S.H.; Lai, K.S. The Missing Piece: Recent Approaches Investigating the Antimicrobial Mode of Action of Essential Oils. *Evol. Bioinform.* 2021, 17, 1176934320938391. <https://doi.org/10.1177/1176934320938391>.
 101. Valdivieso-Ugarte, M.; Gomez-Llorente, C.; Plaza-Diaz, J.; Gil, A. Antimicrobial, Antioxidant, and Immunomodulatory Properties of Essential Oils: A Systematic Review. *Nutrients* 2019, 11, 2786. <https://doi.org/10.3390/nu11112786>.
 102. Boyle, W.S. Pices and Essential Oils as Preservatives. *Am. Perfum. Essent. Oil Rev.* 1955, 66, 25–28.
 103. Chouhan, S.; Sharma, K.; Guleria, S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils-Present Status and Future Perspectives. *Medicines* 2017, 4, 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>.
 104. Helal, I.M.; El-Bessoumy, A.; Al-Bataineh, E.; Joseph, M.R.P.; Rajagopalan, P.; Chandramoorthy, H.C.; Ben Hadj Ahmed, S. Antimicrobial Efficiency of Essential Oils from Traditional Medicinal Plants of Asir Region, Saudi Arabia, over Drug Resistant Isolates. *Biomed Res. Int.* 2019, 2019, 8928306. <https://doi.org/10.1155/2019/8928306>.
 105. Iseppi, R.; Mariani, M.; Condo, C.; Sabia, C.; Messi, P. Essential Oils: A Natural Weapon against Antibiotic-Resistant Bacteria Responsible for Nosocomial Infections. *Antibiotics* 2021, 10, 417. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040417>.
 106. Trifan, A.; Luca, S.V.; Greige-Gerges, H.; Miron, A.; Gille, E.; Aprotosoae, A.C. Recent advances in tackling microbial multidrug resistance with essential oils: Combinatorial and nano-based strategies. *Crit. Rev. Microbiol.* 2020, 46, 338–357. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1782339>.
 107. Ciocarlan, A.; Lupascu, L.; Aricu, A.; Dragalin, I.; Popescu, V.; Geana, E.I.; Ionete, R.E.; Vornicu, N.; Dului, O.G.; Hristozova, G.; et al. Chemical Composition and Assessment of Antimicrobial Activity of Lavender Essential Oil and Some By-Products. *Plants* 2021, 10, 1829. <https://doi.org/10.3390/plants10091829>.
 108. Sakkas, H.; Gousia, P.; Economou, V.; Sakkas, V.; Petsios, S.; Papadopoulou, C. In vitro antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates. *J. Interact. EthnoPharmacol.* 2016, 5, 212–218. <https://doi.org/10.5455/jice.20160331064446>.
 109. Caceres, M.; Hidalgo, W.; Stashenko, E.; Torres, R.; Ortiz, C. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Anti-Biofilm and Anti-Quorum Sensing Activities against Pathogenic Bacteria. *Antibiotics* 2020, 9, 147. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040147>.

110. Condo, C.; Anacarso, I.; Sabia, C.; Iseppi, R.; Anfelli, I.; Forti, L.; de Niederhausern, S.; Bondi, M.; Messi, P. Antimicrobial activity of spices essential oils and its effectiveness on mature biofilms of human pathogens. *Nat. Prod. Res.* 2020, 34, 567–574. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1490904>.
111. Oliva, A.; Costantini, S.; De Angelis, M.; Garzoli, S.; Bozovic, M.; Mascellino, M.T.; Vullo, V.; Ragno, R. High Potency of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil against Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacteria and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 2018, 23, 2584. <https://doi.org/10.3390/molecules23102584>.
112. Yap, P.S.; Krishnan, T.; Chan, K.G.; Lim, S.H. Antibacterial Mode of Action of *Cinnamomum verum* Bark Essential Oil, Alone and in Combination with Piperacillin, Against a Multi-Drug-Resistant *Escherichia coli* Strain. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2015, 25, 1299–1306. <https://doi.org/10.4014/jmb.1407.07054>.
113. Vasconcelos, N.G.; Queiroz, J.; Silva, K.E.D.; Vasconcelos, P.C.P.; Croda, J.; Simionatto, S. Synergistic effects of *Cinnamomum cassia* L. essential oil in combination with polymyxin B against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *PLoS ONE* 2020, 15, e0236505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236505>.
114. Yap, P.S.; Yiap, B.C.; Ping, H.C.; Lim, S.H. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *Open Micro- biol. J.* 2014, 8, 6–14. <https://doi.org/10.2174/1874285801408010006>.
115. Langeveld, W.T.; Veldhuizen, E.J.; Burt, S.A. Synergy between essential oil components and antibiotics: A review. *Crit. Rev. Microbiol.* 2014, 40, 76–94. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.763219>.
116. Kuok, C.F.; Hoi, S.O.; Hoi, C.F.; Chan, C.H.; Fong, I.H.; Ngok, C.K.; Meng, L.R.; Fong, P. Synergistic antibacterial effects of herbal extracts and antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A computational and experimental study. *Exp. Biol. Med.* 2017, 242, 731–743. <https://doi.org/10.1177/1535370216689828>.
117. Gill, A.O.; Holley, R.A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 108, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.009>.
118. Yap, P.S.; Lim, S.H.; Hu, C.P.; Yiap, B.C. Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid- conferred multidrug resistant bacteria. *Phytomedicine* 2013, 20, 710–713. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.02.013>.
119. Domadia, P.; Swarup, S.; Bhunia, A.; Sivaraman, J.; Dasgupta, D. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamal- dehyde. *BioChem. Pharmacol.* 2007, 74, 831–840. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.029>.
120. Nazzaro, F.; Fratianni, F.; De Martino, L.; Coppola, R.; De Feo, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* 2013, 6, 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>.
121. Clemente, I.; Aznar, M.; Nerin, C. Synergistic properties of mustard and cinnamon essential oils for the inactivation of food- borne moulds in vitro and on Spanish bread. *Int. J. Food Microbiol.* 2019, 298, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmi- cro.2019.03.012>.
122. de Rapper, S.; Viljoen, A.; van Vuuren, S. The In Vitro Antimicrobial Effects of *Lavandula angustifolia* Essential Oil in Combina- tion with Conventional Antimicrobial Agents. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2016, 2016, 2752739. <https://doi.org/10.1155/2016/2752739>.
123. Yang, S.K.; Yusoff, K.; Thomas, W.; Akseer, R.; Alhosani, M.S.; Abushelaibi, A.; Lim, S.H.; Lai, K.S. Lavender essential oil in- duces oxidative stress which modifies the bacterial membrane permeability of

- carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Sci. Rep.* 2020, 10, 819. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55601-0>.
124. Yap, P.S.; Krishnan, T.; Yiap, B.C.; Hu, C.P.; Chan, K.G.; Lim, S.H. Membrane disruption and anti-quorum sensing effects of synergistic interaction between *Lavandula angustifolia* (lavender oil) in combination with antibiotic against plasmid-conferred multi-drug-resistant *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 2014, 116, 1119–1128. <https://doi.org/10.1111/jam.12444>.
 125. Prashar, A.; Locke, I.C.; Evans, C.S. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Prolif.* 2004, 37, 221–229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2004.00307.x>.
 126. Muntean, D.; Licker, M.; Alexa, E.; Popescu, I.; Jianu, C.; Buda, V.; Dehelean, C.A.; Ghiulai, R.; Horhat, F.; Horhat, D.; et al. Evaluation of essential oil obtained from *Mentha×piperita* L. against multidrug-resistant strains. *Infect. Drug Resist.* 2019, 12, 2905–2914. <https://doi.org/10.2147/IDR.S218141>.
 127. Unalan, I.; Slavik, B.; Buettner, A.; Goldmann, W.H.; Frank, G.; Boccaccini, A.R. Physical and Antibacterial Properties of Pep- permInt Essential Oil Loaded Poly (ϵ -caprolactone) (PCL) Electrospun Fiber Mats for Wound Healing. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019, 7, 346. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00346>.
 128. Ziolkowska-Klinkosz, M.; Kedzia, A.; Meissner, H.O.; Kedzia, A.W. Evaluation of the Tea Tree Oil Activity to Anaerobic Bacteria--in Vitro Study. *Acta Pol. Pharm.* 2016, 73, 389–394.
 129. Cox, S.D.; Mann, C.M.; Markham, J.L.; Gustafson, J.E.; Warmington, J.R.; Wyllic, S.G. Determining the Antimicrobial Actions of Tea Tree Oil. *Molecules* 2001, 6, 87–91.
 130. Li, W.R.; Li, H.L.; Shi, Q.S.; Sun, T.L.; Xie, X.B.; Song, B.; Huang, X.M. The dynamics and mechanism of the Antimicrobial activity of tea tree oil against bacteria and fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 8865–8875. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7692-4>.
 131. Brun, P.; Bernabe, G.; Filippini, R.; Piovan, A. In Vitro Antimicrobial Activities of Commercially Available Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oils. *Curr. Microbiol.* 2019, 76, 108–116. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1594-x>.
 132. Pattnaik, S.; Subramanyam, V.R.; Kole, C. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbios* 1996, 86, 237–246.
 133. Dawood, M.A.O.; El Basuini, M.F.; Zaineldin, A.I.; Yilmaz, S.; Hasan, M.T.; Ahmadifar, E.; El Asely, A.M.; Abdel-Latif, H.M.R.; Alagawany, M.; Abu-Elala, N.M.; et al. Antiparasitic and Antibacterial Functionality of Essential Oils: An Alternative Approach for Sustainable Aquaculture. *Pathogens* 2021, 10, 185. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020185>.
 134. Nehme, R.; Andres, S.; Pereira, R.B.; Ben Jemaa, M.; Bouhallab, S.; Cecilian, F.; Lopez, S.; Rahali, F.Z.; Ksouri, R.; Pereira, D.M.; et al. Essential Oils in Livestock: From Health to Food Quality. *Antioxidants* 2021, 10, 330. <https://doi.org/10.3390/antiox10020330>.
 135. Falleh, H.; Ben Jemaa, M.; Saada, M.; Ksouri, R. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. *Food Chem.* 2020, 330, 127268. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127268>.
 136. Patra, J.K.; Das, G.; Fraceto, L.F.; Campos, E.V.R.; Rodriguez-Torres, M.D.P.; Acosta-Torres, L.S.; Diaz-Torres, L.A.; Grillo, R.; Swamy, M.K.; Sharma, S.; et al. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *J. NanoBiotechnol.* 2018, 16, 71. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>.
 137. Berdejo, D.; Pagan, E.; Merino, N.; Pagan, R.; Garcia-Gonzalo, D. Incubation with a Complex Orange Essential Oil Leads to Evolved Mutants with Increased Resistance and Tolerance. *Pharmaceuticals* 2020, 13, 239. <https://doi.org/10.3390/ph13090239>.

138. Tetard, A.; Zedet, A.; Girard, C.; Plesiat, P.; Llanes, C. Cinnamaldehyde Induces Expression of Efflux Pumps and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019, 63. <https://doi.org/10.1128/AAC.01081-19>.
139. Good, L.; Stach, J.E. Synthetic RNA silencing in bacteria—Antimicrobial discovery and resistance breaking. *Front. Microbiol.* 2011, 2, 185. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00185>.
140. Gholizadeh, P.; Kose, S.; Dao, S.; Ganbarov, K.; Tanomand, A.; Dal, T.; Aghazadeh, M.; Ghotaslou, R.; Ahangarzadeh Rezaee, M.; Yousefi, B.; et al. How CRISPR-Cas System Could Be Used to Combat Antimicrobial Resistance. *Infect. Drug Resist.* 2020, 13, 1111–1121. <https://doi.org/10.2147/IDR.S247271>.
141. Duan, C.; Cao, H.; Zhang, L.H.; Xu, Z. Harnessing the CRISPR-Cas Systems to Combat Antimicrobial Resistance. *Front. Micro- biol.* 2021, 12, 716064. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.716064>.
142. Briner, A.E.; Barrangou, R. Deciphering and shaping bacterial diversity through CRISPR. *Curr. Opin. Microbiol.* 2016, 31, 101– 108. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.03.006>.
143. Palacios Araya, D.; Palmer, K.L.; Duerkop, B.A. CRISPR-based Antimicrobials to obstruct antibiotic-resistant and pathogenic bacteria. *PLoS Pathog.* 2021, 17, e1009672. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009672>.
144. Aslam, B.; Rasool, M.; Idris, A.; Muzammil, S.; Alvi, R.F.; Khurshid, M.; Rasool, M.H.; Zhang, D.; Ma, Z.; Baloch, Z. CRISPR- Cas system: A potential alternative tool to cope antibiotic resistance. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 2020, 9, 131. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00795-6>.
145. Gonzalez de Aledo, M.; Gonzalez-Bardanca, M.; Blasco, L.; Pacios, O.; Bleriot, I.; Fernandez-Garcia, L.; Fernandez-Quejo, M.; Lopez, M.; Bou, G.; Tomas, M. CRISPR-Cas, a Revolution in the Treatment and Study of ESKAPE Infections: Pre-Clinical Stud- ies. *Antibiotics* 2021, 10, 756. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070756>.
146. Kiga, K.; Tan, X.E.; Ibarra-Chavez, R.; Watanabe, S.; Aiba, Y.; Sato'o, Y.; Li, F.Y.; Sasahara, T.; Cui, B.; Kawauchi, M.; et al. Development of CRISPR-Cas13a-based Antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria. *Nat. Commun.* 2020, 11, 2934. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16731-6>.
147. Lam, K.N.; Spanogiannopoulos, P.; Soto-Perez, P.; Alexander, M.; Nalley, M.J.; Bisanz, J.E.; Nayak, R.R.; Weakley, A.M.; Yu, F.B.; Turnbaugh, P.J. Phage-delivered CRISPR-Cas9 for strain-specific depletion and genomic deletions in the gut microbiome. *Cell Rep.* 2021, 37, 109930. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109930>.
148. Kim, J.S.; Cho, D.H.; Park, M.; Chung, W.J.; Shin, D.; Ko, K.S.; Kweon, D.H. CRISPR/Cas9-Mediated Re-Sensitization of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Harboring Extended-Spectrum β -Lactamases. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 26, 394–401. <https://doi.org/10.4014/jmb.1508.08080>.
149. Rodrigues, M.; McBride, S.W.; Hullahalli, K.; Palmer, K.L.; Duerkop, B.A. Conjugative Delivery of CRISPR-Cas9 for the Selective Depletion of Antibiotic-Resistant Enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019, 63, e01454-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01454-19>.
150. Park, J.Y.; Moon, B.Y.; Park, J.W.; Thornton, J.A.; Park, Y.H.; Seo, K.S. Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 Antimicrobials against *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* 2017, 7, 44929. <https://doi.org/10.1038/srep44929>.
151. Tagliaferri, T.L.; Guimaraes, N.R.; Pereira, M.P.M.; Vilela, L.F.F.; Horz, H.P.; Dos Santos, S.G.; Mendes, T.A.O. Exploring the Potential of CRISPR-Cas9 Under Challenging Conditions: Facing High-Copy Plasmids and Counteracting Beta-Lactam Resistance in Clinical Strains of Enterobacteriaceae. *Front. Microbiol.* 2020, 11, 578. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00578>.

152. Fage, C.; Lemire, N.; Moineau, S. Delivery of CRISPR-Cas systems using phage-based vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2021, 68, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.11.012>.
153. Kang, Y.K.; Kwon, K.; Ryu, J.S.; Lee, H.N.; Park, C.; Chung, H.J. Nonviral Genome Editing Based on a Polymer-Derivatized CRISPR Nanocomplex for Targeting Bacterial Pathogens and Antibiotic Resistance. *Bioconjugate Chem.* 2017, 28, 957–967. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00676>.
154. Wan, F.; Draz, M.S.; Gu, M.; Yu, W.; Ruan, Z.; Luo, Q. Novel Strategy to Combat Antibiotic Resistance: A Sight into the Combination of CRISPR/Cas9 and Nanoparticles. *Pharmaceutics* 2021, 13, 352. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030352>.
155. Lima, R.; Del Fiol, F.S.; Balcao, V.M. Prospects for the Use of New Technologies to Combat Multidrug-Resistant Bacteria. *Front. Pharmacol.* 2019, 10, 692. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00692>.
156. Bierbaum, G.; Sahl, H.G. Lantibiotics: Mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2009, 10, 2–18. <https://doi.org/10.2174/138920109787048616>.
157. Daly, K.M.; Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, R.P. Lantibiotic production by pathogenic microorganisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2012, 13, 509–523. <https://doi.org/10.2174/138920312803582997>.
158. McAuliffe, O.; Ross, R.P.; Hill, C. Lantibiotics: Structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* 2001, 25, 285–308. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00579.x>.
159. Mullur, R.; Liu, Y.Y.; Brent, G.A. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 2014, 94, 355–382. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2013>.
160. Cotter, P.D.; Ross, R.P.; Hill, C. Bacteriocins—A viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, 11, 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>.
161. Mathur, H.; Field, D.; Rea, M.C.; Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, R.P. Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2018, 4, 9. <https://doi.org/10.1038/s41522-018-0053-6>.
162. Simons, A.; Alhanout, K.; Duval, R.E. Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria. *Microorganisms* 2020, 8, 639. <https://doi.org/10.3390/microorgan-isms8050639>.
163. Dijksteel, G.S.; Ulrich, M.M.W.; Middelkoop, E.; Boekema, B. Review: Lessons Learned from Clinical Trials Using Antimicrobial Peptides (AMPs). *Front. Microbiol.* 2021, 12, 616979. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.616979>.
164. Ageitos, J.M.; Sanchez-Perez, A.; Calo-Mata, P.; Villa, T.G. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *BioChem. Pharmacol.* 2017, 133, 117–138. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.018>.
165. Sierra, J.M.; Fuste, E.; Rabanal, F.; Vinuesa, T.; Vinas, M. An overview of Antimicrobial peptides and the latest advances in their development. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2017, 17, 663–676. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1315402>.
166. Zharkova, M.S.; Orlov, D.S.; Golubeva, O.Y.; Chakchir, O.B.; Eliseev, I.E.; Grinchuk, T.M.; Shamova, O.V. Application of Anti-microbial Peptides of the Innate Immune System in Combination With Conventional Antibiotics-A Novel Way to Combat Antibiotic Resistance? *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2019, 9, 128. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00128>.
167. Palma, E.; Tilocca, B.; Roncada, P. Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine: An Overview. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1914. <https://doi.org/10.3390/ijms21061914>.

168. Tilocca, B.; Costanzo, N.; Morittu, V.M.; Spina, A.A.; Soggiu, A.; Britti, D.; Roncada, P.; Piras, C. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *J. Proteom.* 2020, 210, 103534. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>.
169. Blondelle, S.E.; Houghten, R.A. Design of model amphipathic peptides having potent Antimicrobial activities. *Biochemistry* 1992, 31, 12688–12694. <https://doi.org/10.1021/bi00165a020>.
170. Sheard, D.E.; O'Brien-Simpson, N.M.; Wade, J.D.; Separovic, F. Combating bacterial resistance by combination of antibiotics with Antimicrobial peptides. *Pure Appl. Chem.* 2019, 91, 199–209.
171. Kumar, P.; Kizhakkedathu, J.N.; Straus, S.K. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules* 2018, 8, 4. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>.
172. Wang, G. Human Antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals* 2014, 7, 545–594. <https://doi.org/10.3390/ph7050545>.
173. Huan, Y.; Kong, Q.; Mou, H.; Yi, H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front. Microbiol.* 2020, 11, 582779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>.
174. Troscher-Mussotter, J.; Tilocca, B.; Stefanski, V.; Seifert, J. Analysis of the Bacterial and Host Proteins along and across the Porcine Gastrointestinal Tract. *Proteomes* 2019, 7, 4. <https://doi.org/10.3390/proteomes7010004>.
175. Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 2005, 3, 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>.
176. Rima, M.; Rima, M.; Fajloun, Z.; Sabatier, J.M.; Bechinger, B.; Naas, T. Antimicrobial Peptides: A Potent Alternative to Antibiotics. *Antibiotics* 2021, 10, 1095. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091095>.
177. Nguyen, L.T.; Haney, E.F.; Vogel, H.J. The expanding scope of Antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 2011, 29, 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>.
178. Otvos, L., Jr.; Wade, J.D.; Lin, F.; Condie, B.A.; Hanrieder, J.; Hoffmann, R. Designer antibacterial peptides kill fluoroquinolone-resistant clinical isolates. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 5349–5359. <https://doi.org/10.1021/jm050347i>.
179. Luther, A.; Urfer, M.; Zahn, M.; Muller, M.; Wang, S.Y.; Mondal, M.; Vitale, A.; Hartmann, J.B.; Sharpe, T.; Monte, F.L.; et al. Chimeric peptidomimetic antibiotics against Gram-negative bacteria. *Nature* 2019, 576, 452–458. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1665-6>.
180. Brogden, N.K.; Brogden, K.A. Will new generations of modified Antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *Int. J. Antimicrob. Agents* 2011, 38, 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.05.004>.
181. Grassi, L.; Maisetta, G.; Esin, S.; Batoni, G. Combination Strategies to Enhance the Efficacy of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 2409. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02409>.
182. Wenyi, L.; O'Brien-Simpson, N.M.; Holden, J.A.; Otvos, L.; Reynolds, E.C.; Separovic, F.; Hossain, M.A.; Wade, J.D. Covalent conjugation of cationic Antimicrobial peptides with a beta-lactam antibiotic core. *Peptide Sci.* 2018, 110, 9.
183. Arnusch, C.J.; Pieters, R.J.; Breukink, E. Enhanced membrane pore formation through high-affinity targeted Antimicrobial peptides. *PLoS ONE* 2012, 7, e39768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039768>.

184. Reinhardt, A.; Neundorff, I. Design and Application of Antimicrobial Peptide Conjugates. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17050701>.
185. Riber, C.F.; Smith, A.A.; Zelikin, A.N. Self-Immolative Linkers Literally Bridge Disulfide Chemistry and the Realm of Thiol- Free Drugs. *Adv. Healthc. Mater.* 2015, 4, 1887–1890, 701. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500344>.
186. Biswaro, L.S.; da Costa Sousa, M.G.; Rezende, T.M.B.; Dias, S.C.; Franco, O.L. Antimicrobial Peptides and Nanotechnology, Recent Advances and Challenges. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 855. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00855>.
187. Ritsema, J.A.; der Weide, H.V.; Te Welscher, Y.M.; Goessens, W.H.; van Nostrum, C.F.; Storm, G.; Bakker-Woudenberg, I.A.; Hays, J.P. Antibiotic-nanomedicines: Facing the challenge of effective treatment of antibiotic-resistant respiratory tract infections. *Future Microbiol.* 2018, 13, 1683–1692. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0194>.
188. Sader, H.S.; Flamm, R.K.; Dale, G.E.; Rhomberg, P.R.; Castanheira, M. Murepavadin activity tested against contemporary (2016– 17) clinical isolates of XDR *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018, 73, 2400–2404. <https://doi.org/10.1093/jac/dky227>.
189. Vila, J.; Moreno-Morales, J.; Balleste-Delpierre, C. Current landscape in the discovery of novel antibacterial agents. *Clin. Micro- biol. Infect.* 2020, 26, 596–603. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.09.015>.
190. Polyphor. A Novel Class of Highly Specific Outer Membrane Protein Targeting Antibiotic to Treat *Pseudomonas* Infections in People with Cystic Fibrosis. Available online: <https://www.polyphor.com/pol7080/> (accessed on 15 October 2021).
191. Greber, K.E.; Dawgul, M. Antimicrobial Peptides Under Clinical Trials. *Curr. Top. Med. Chem.* 2017, 17, 620–628. <https://doi.org/10.2174/1568026616666160713143331>.
192. Otvos, L., Jr. Antibacterial peptides isolated from insects. *J. Pept. Sci.* 2000, 6, 497–511. [https://doi.org/10.1002/1099- 1387\(200010\)6:10<497::AID-PSC277>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1099- 1387(200010)6:10<497::AID-PSC277>3.0.CO;2-W).
193. Sahoo, A.; Swain, S.S.; Behera, A.; Sahoo, G.; Mahapatra, P.K.; Panda, S.K. Antimicrobial Peptides Derived From Insects Offer a Novel Therapeutic Option to Combat Biofilm: A Review. *Front. Microbiol.* 2021, 12, 661195. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.661195>.
194. Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R.E. Peptide Antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, 19, 491–511. <https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>.
195. Zamborini, F.P.; Bao, L.; Dasari, R. Nanoparticles in measurement science. *Anal. Chem.* 2012, 84, 541–576. <https://doi.org/10.1021/ac203233q>.
196. Wang, L.; Hu, C.; Shao, L. The Antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *Int. J. Nanomed.* 2017, 12, 1227–1249. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>.
197. Slavin, Y.N.; Asnis, J.; Hafeli, U.O.; Bach, H. Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J. NanoBiotechnology* 2017, 15, 65. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>.
198. Seil, J.T.; Webster, T.J. Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. *Int. J. Nanomed.* 2012, 7, 2767– 2781. <https://doi.org/10.2147/IJN.S24805>.
199. Herman, A.; Herman, A.P. Nanoparticles as Antimicrobial agents: Their toxicity and mechanisms of action. *J. NanoSci. Nano- technol.* 2014, 14, 946–957. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9054>.

200. Slomberg, D.L.; Lu, Y.; Broadnax, A.D.; Hunter, R.A.; Carpenter, A.W.; Schoenfisch, M.H. Role of size and shape on biofilm eradication for nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2013, 5, 9322–9329. <https://doi.org/10.1021/am402618w>.
201. Sarwar, A.; Katas, H.; Samsudin, S.N.; Zin, N.M. Regioselective Sequential Modification of Chitosan via Azide-Alkyne Click Reaction: Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Chitosan Derivatives and Nanoparticles. *PLoS ONE* 2015, 10, e0123084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123084>.
202. Yu, J.; Zhang, W.; Li, Y.; Wang, G.; Yang, L.; Jin, J.; Chen, Q.; Huang, M. Synthesis, characterization, Antimicrobial activity and mechanism of a novel hydroxyapatite whisker/nano zinc oxide biomaterial. *Biomed. Mater.* 2014, 10, 015001. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/1/015001>.
203. Hyldgaard, M.; Mygind, T.; Vad, B.S.; Stenvang, M.; Otzen, D.E.; Meyer, R.L. The Antimicrobial mechanism of action of epsilon- poly-L-lysine. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014, 80, 7758–7770. <https://doi.org/10.1128/AEM.02204-14>.
204. Sohm, B.; Immel, F.; Bauda, P.; Pagnout, C. Insight into the primary mode of action of TiO₂ nanoparticles on *Escherichia coli* in the dark. *Proteomics* 2015, 15, 98–113. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400101>.
205. Ansari, M.A.; Khan, H.M.; Khan, A.A.; Cameotra, S.S.; Saquib, Q.; Musarrat, J. Interaction of Al₂O₃ nanoparticles with *Escherichia coli* and their cell envelope biomolecules. *J. Appl. Microbiol.* 2014, 116, 772–783. <https://doi.org/10.1111/jam.12423>.
206. Lee, J.S.; Chung, M.J.; Seo, J.G. In Vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria against *Clostridium difficile*. *Toxicol. Res.* 2013, 29, 99–106. <https://doi.org/10.5487/TR.2013.29.2.099>.
207. Deusch, S.; Tilocca, B.; Camarinha-Silva, A.; Seifert, J. News in livestock research—Use of Omics-technologies to study the mi- crobiota in the gastrointestinal tract of farm animals. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2015, 13, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.12.005>.
208. Tilocca, B.; Witzig, M.; Rodehutscord, M.; Seifert, J. Variations of Phosphorous Accessibility Causing Changes in Microbiome Functions in the Gastrointestinal Tract of Chickens. *PLoS ONE* 2016, 11, e0164735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164735>.
209. Aponte, M.; Murru, N.; Shoukat, M. Therapeutic, Prophylactic, and Functional Use of Probiotics: A Current Perspective. *Front. Microbiol.* 2020, 11, 562048. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562048>.
210. Celestine Sau-Chan Tham; Kok-Khiang Peh; Bhat, R.; Liong, M.-T. Probiotic properties of bifidobacteria and lactobacilli isolated from local dairy products. *Ann. Microbiol.* 2012, 62, 1079–1087.
211. Fijan, S. Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2014, 11, 4745–4767. <https://doi.org/10.3390/ijerph110504745>.
212. Behnsen, J.; Deriu, E.; Sassone-Corsi, M.; Raffatellu, M. Probiotics: Properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2013, 3, a010074. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010074>.
213. Chmielewska, A.; Szajewska, H. Systematic review of randomised controlled trials: Probiotics for functional constipation. *World J. Gastroenterol.* 2010, 16, 69–75. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i1.69>.
214. Guo, Q.; Goldenberg, J.Z.; Humphrey, C.; El Dib, R.; Johnston, B.C. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2019, 4, CD004827. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004827.pub5>.
215. Cao, G.T.; Zeng, X.F.; Chen, A.G.; Zhou, L.; Zhang, L.; Xiao, Y.P.; Yang, C.M. Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal

- microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poult. Sci.* 2013, 92, 2949–2955. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03366>.
216. Tompkins, T.A.; Xu, X.; Ahmarani, J. A comprehensive review of post-market clinical studies performed in adults with an Asian probiotic formulation. *Benef. Microbes* 2010, 1, 93–106. <https://doi.org/10.3920/BM2008.1005>.
 217. Trapecar, M.; Leouffre, T.; Faure, M.; Jensen, H.E.; Granum, P.E.; Cencic, A.; Hardy, S.P. The use of a porcine intestinal cell model system for evaluating the food safety risk of *Bacillus cereus* probiotics and the implications for assessing enterotoxigenicity. *APMIS* 2011, 119, 877–884. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02797.x>.
 218. Tilocca, B.; Burbach, K.; Heyer, C.M.E.; Hoelzle, L.E.; Mosenthin, R.; Stefanski, V.; Camarinha-Silva, A.; Seifert, J. Dietary changes in nutritional studies shape the structural and functional composition of the pigs' fecal microbiome—From days to weeks. *Microbiome* 2017, 5, 144. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0362-7>.
 219. Ouwehand, A.C.; Forssten, S.; Hibberd, A.A.; Lyra, A.; Stahl, B. Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Ann. Med.* 2016, 48, 246–255. <https://doi.org/10.3109/07853890.2016.1161232>.
 220. Motley, M.P.; Banerjee, K.; Fries, B.C. Monoclonal antibody-based therapies for bacterial infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2019, 32, 210–216. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000539>.
 221. Zurawski, D.V.; McLendon, M.K. Monoclonal Antibodies as an Antibacterial Approach Against Bacterial Pathogens. *Antibiotics* 2020, 9, 155. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040155>.
 222. Casadevall, A. Antibody-based therapies for emerging infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 1996, 2, 200–208. <https://doi.org/10.3201/eid0203.960306>.
 223. Saeed, A.F.; Wang, R.; Ling, S.; Wang, S. Antibody Engineering for Pursuing a Healthier Future. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 495. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00495>.
 224. Tsao, L.C.; Force, J.; Hartman, Z.C. Mechanisms of Therapeutic Antitumor Monoclonal Antibodies. *Cancer Res.* 2021, 81, 4641–4651. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-1109>.
 225. Dejnirattisai, W.; Wongwiwat, W.; Supasa, S.; Zhang, X.; Dai, X.; Rouvinski, A.; Jumnainsong, A.; Edwards, C.; Quyen, N.T.H.; Duangchinda, T.; et al. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nat. Immunol.* 2015, 16, 170–177. <https://doi.org/10.1038/ni.3058>.
 226. Wilcox, M.H.; Gerding, D.N.; Poxton, I.R.; Kelly, C.; Nathan, R.; Birch, T.; Cornely, O.A.; Rahav, G.; Bouza, E.; Lee, C.; et al. Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *N. Engl. J. Med.* 2017, 376, 305–317. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602615>.
 227. Ofir, G.; Sorek, R. Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights. *Cell* 2018, 172, 1260–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.045>.
 228. Brives, C.; Pourraz, J. Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: Obstacles and possible futures. *Palgrave Commun.* 2020, 6, 110.
 229. Twort, F.W. An Investigation on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses. *Lancet* 1915, 186, 1241–1243.
 230. D'Herelle, F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: Brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Res. Microbiol.* 2007, 158, 553–554. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.07.005>.
 231. Myelnikov, D. Creature features: The lively narratives of bacteriophages in Soviet biology and medicine. *Notes Rec. R. Soc. J. Hist. Sci.* 2020, 74, 579–597. <https://doi.org/10.1098/rsnr.2019.0035>.

232. Gorski, A.; Miedzybrodzki, R.; Wegrzyn, G.; Jonczyk-Matysiak, E.; Borysowski, J.; Weber-Dabrowska, B. Phage therapy: Current status and perspectives. *Med. Res. Rev.* 2020, 40, 459–463. <https://doi.org/10.1002/med.21593>.
233. Dedrick, R.M.; Guerrero-Bustamante, C.A.; Garlena, R.A.; Russell, D.A.; Ford, K.; Harris, K.; Gilmour, K.C.; Soothill, J.; Jacobs-Sera, D.; Schooley, R.T.; et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat. Med.* 2019, 25, 730–733. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>.
234. Jennes, S.; Merabishvili, M.; Soentjens, P.; Pang, K.W.; Rose, T.; Keersebilck, E.; Soete, O.; Francois, P.M.; Teodorescu, S.; Verween, G.; et al. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in a patient with acute kidney injury—a case report. *Crit. Care* 2017, 21, 129. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1709-y>.
235. Ferry, T.; Leboucher, G.; Fevre, C.; Herry, Y.; Conrad, A.; Josse, J.; Batailler, C.; Chidiac, C.; Medina, M.; Lustig, S.; et al. Salvage Debridement, Antibiotics and Implant Retention ("DAIR") With Local Injection of a Selected Cocktail of Bacteriophages: Is It an Option for an Elderly Patient With Relapsing *Staphylococcus aureus* Prosthetic-Joint Infection? *Open Forum Infect. Dis.* 2018, 5, ofy269. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy269>.
236. Jault, P.; Leclerc, T.; Jennes, S.; Pirnay, J.P.; Que, Y.A.; Resch, G.; Rousseau, A.F.; Ravat, F.; Carsin, H.; Le Floch, R.; et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): A randomized, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect. Dis.* 2019, 19, 35–45. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30482-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30482-1).
237. Loponte, R.; Pagnini, U.; Iovane, G.; Pisanelli, G. Phage Therapy in Veterinary Medicine. *Antibiotics* 2021, 10, 421. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040421>.
238. Young, I.; Wang, I.; Roof, W.D. Phages will out: Strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol.* 2000, 8, 120–128. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01705-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01705-4).
239. Corsini, B.; Diez-Martinez, R.; Aguinalde, L.; Gonzalez-Camacho, F.; Garcia-Fernandez, E.; Letrado, P.; Garcia, P.; Yuste, J. Chemotherapy with Phage Lysins Reduces Pneumococcal Colonization of the Respiratory Tract. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018, 62, 02212–02217. <https://doi.org/10.1128/AAC.02212-17>.
240. Xu, Y. Phage and phage lysins: New era of bio-preservatives and food safety agents. *J. Food Sci.* 2021, 86, 3349–3373. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15843>.
241. Jun, S.Y.; Jung, G.M.; Son, J.S.; Yoon, S.J.; Choi, Y.J.; Kang, S.H. Comparison of the antibacterial properties of phage endolysins SAL-I and LysK. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, 55, 1764–1767. <https://doi.org/10.1128/AAC.01097-10>.
242. Bae, J.Y.; Jun, K.I.; Kang, C.K.; Song, K.H.; Choe, P.G.; Bang, J.H.; Kim, E.S.; Park, S.W.; Kim, H.B.; Kim, N.J.; et al. Efficacy of Intranasal Administration of the Recombinant Endolysin SAL200 in a Lethal Murine *Staphylococcus aureus* Pneumonia Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019, 63, 02009–02018. <https://doi.org/10.1128/AAC.02009-18>.
243. Phase IIa Clinical Study of N-Rephasin® SAL200. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03089697> (accessed on 15 December 2021).
244. Ramos-Vivas, J.; Elexpuru-Zabaleta, M.; Samano, M.L.; Barrera, A.P.; Forbes-Hernandez, T.Y.; Giampieri, F.; Battino, M. Phages and Enzybiotics in Food Biopreservation. *Molecules* 2021, 26, 5138. <https://doi.org/10.3390/molecules26175138>.

245. Abdelrahman, F.; Easwaran, M.; Daramola, O.I.; Ragab, S.; Lynch, S.; Oduselu, T.J.; Khan, F.M.; Ayobami, A.; Adnan, F.; Tor-rents, E.; et al. Phage-Encoded Endolysins. *Antibiotics* 2021, 10, 124. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020124>.
246. Vazquez, R.; Garcia, E.; Garcia, P. Phage Lysins for Fighting Bacterial Respiratory Infections: A New Generation of Antimicro-bials. *Front. Immunol.* 2018, 9, 2252. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02252>.
247. Jamal, M.; Ahmad, W.; Andleeb, S.; Jalil, F.; Imran, M.; Nawaz, M.A.; Hussain, T.; Ali, M.; Rafiq, M.; Kamil, M.A. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.* 2018, 81, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>.
248. Penesyan, A.; Paulsen, I.T.; Kjelleberg, S.; Gillings, M.R. Three faces of biofilms: A microbial lifestyle, a nascent multicellular organism, and an incubator for diversity. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2021, 7, 80. <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00251-2>.
249. Rumbaugh, K.P.; Sauer, K. Biofilm dispersion. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020, 18, 571–586. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>.
250. Wille, J.; Coenye, T. Biofilm dispersion: The key to biofilm eradication or opening Pandora's box? *Biofilm* 2020, 2, 100027. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2020.100027>.
251. Chew, S.C.; Yang, L. Biofilms; In *Encyclopedia of Food and Health*; Caballero, B., Finglas, P.M., Toldrá, F., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2016; pp. 407–415. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00069-6>.
252. Lewis, K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010, 64, 357–372. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>.
253. Windels, E.M.; Michiels, J.E.; Fauvart, M.; Wenseleers, T.; Van den Bergh, B.; Michiels, J. Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by increasing survival and mutation rates. *ISME J.* 2019, 13, 1239–1251. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0344-9>.
254. Koeva, M.; Gutu, A.D.; Hebert, W.; Wager, J.D.; Yonker, L.M.; O'Toole, G.A.; Ausubel, F.M.; Moskowitz, S.M.; Joseph-McCarthy, D. An Antipersister Strategy for Treatment of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017, 61, e00987-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00987-17>.
255. Salcedo-Sora, J.E.; Kell, D.B. A Quantitative Survey of Bacterial Persistence in the Presence of Antibiotics: Towards Antipersister Antimicrobial Discovery. *Antibiotics* 2020, 9, 508. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080508>.
256. Solano, C.; Echeverz, M.; Lasa, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2014, 18, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.008>.
257. Rutherford, S.T.; Bassler, B.L. Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012, 2, a012427. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427>.
258. Remy, B.; Mion, S.; Plener, L.; Elias, M.; Chabriere, E.; Daude, D. Interference in Bacterial Quorum Sensing: A Biopharmaceutical Perspective. *Front. Pharmacol.* 2018, 9, 203. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00203>.
259. Zhao, X.; Yu, Z.; Ding, T. Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Microorganisms* 2020, 8, 425. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030425>.
260. Fong, J.; Zhang, C.; Yang, R.; Boo, Z.Z.; Tan, S.K.; Nielsen, T.E.; Givskov, M.; Liu, X.W.; Bin, W.; Su, H.; et al. Combination Therapy Strategy of Quorum Quenching Enzyme and Quorum Sensing Inhibitor in Suppressing Multiple Quorum Sensing Pathways of *P. aeruginosa*. *Sci. Rep.* 2018, 8, 1155.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-19504-w>. 261. Krzyzek, P. Challenges and Limitations of Anti-quorum Sensing Therapies. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 2473. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02473>.

262. Pham, T.N.; Loupias, P.; Dassonville-Klimpt, A.; Sonnet, P. Drug delivery systems designed to overcome Antimicrobial resistance. *Med. Res. Rev.* 2019, 39, 2343–2396. <https://doi.org/10.1002/med.21588>.
263. Mollmann, U.; Heinisch, L.; Bauernfeind, A.; Kohler, T.; Ankel-Fuchs, D. Siderophores as drug delivery agents: Application of the "Trojan Horse" strategy. *Biometals* 2009, 22, 615–624. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9219-2>.
264. Ji, C.; Miller, P.A.; Miller, M.J. Iron transport-mediated drug delivery: Practical syntheses and in vitro antibacterial studies of tris-catecholate siderophore-aminopenicillin conjugates reveals selectively potent antipseudomonal activity. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 9898–9901. <https://doi.org/10.1021/ja303446w>.
265. Spirescu, V.A.; Chircov, C.; Grumezescu, A.M.; Andronescu, E. Polymeric Nanoparticles for Antimicrobial Therapies: An Up-To-Date Overview. *Polymers* 2021, 13. <https://doi.org/10.3390/polym13050724>.
266. Walvekar, P.; Gannamani, R.; Salih, M.; Makhathini, S.; Mocktar, C.; Govender, T. Self-assembled oleylamine grafted hyaluronic acid polymersomes for delivery of vancomycin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Colloids Surf. B Bio-interfaces* 2019, 182, 110388. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110388>.
267. Qiu, Y.; Xu, D.; Sui, G.; Wang, D.; Wu, M.; Han, L.; Mu, H.; Duan, J. Gentamicin decorated phosphatidylcholine-chitosan nanoparticles against biofilms and intracellular bacteria. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 156, 640–647. <https://doi.org/10.1016/j.ijbi-omac.2020.04.090>.
268. Kumari, A.; Yadav, S.K.; Pakade, Y.B.; Singh, B.; Yadav, S.C. Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2010, 80, 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.06.002>.
269. Kumari, A.; Singla, R.; Guliani, A.; Yadav, S.K. Nanoencapsulation for drug delivery. *EXCLI J.* 2014, 13, 265–286.
270. Li, M.; Du, C.; Guo, N.; Teng, Y.; Meng, X.; Sun, H.; Li, S.; Yu, P.; Galons, H. Composition design and medical application of liposomes. *Eur. J. Med. Chem.* 2019, 164, 640–653. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.007>.
271. Ferreira, M.; Ogren, M.; Dias, J.N.R.; Silva, M.; Gil, S.; Tavares, L.; Aires-da-Silva, F.; Gaspar, M.M.; Aguiar, S.I. Liposomes as Antibiotic Delivery Systems: A Promising Nanotechnological Strategy against Antimicrobial Resistance. *Molecules* 2021, 26, 2047. <https://doi.org/10.3390/molecules26072047>.
272. Augustin, M.; Goepel, L.; Jacobi, A.; Bosse, B.; Mueller, S.; Hopp, M. Efficacy and tolerability of liposomal polyvinylpyrrolidone-iodine hydrogel for the localized treatment of chronic infective, inflammatory, dermatoses: An uncontrolled pilot study. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2017, 10, 373–384. <https://doi.org/10.2147/CCID.S141887>.
273. Alipour, M.; Halwani, M.; Omri, A.; Suntres, Z.E. Antimicrobial effectiveness of liposomal polymyxin B against resistant Gram-negative bacterial strains. *Int. J. Pharm.* 2008, 355, 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.035>.
274. Beck, A.; Goetsch, L.; Dumontet, C.; Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017, 16, 315–337. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.268>.

275. Deng, R.; Zhou, C.; Li, D.; Cai, H.; Sukumaran, S.; Carrasco-Triguero, M.; Saad, O.; Nazzal, D.; Lowe, C.; Ramanujan, S.; et al. Preclinical and translational pharmacokinetics of a novel THIOMABTM antibody-antibiotic conjugate against *Staphylococcus aureus*. *MAbs* 2019, 11, 1162–1174. <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1627152>.
276. Carattoli, A. Plasmids and the spread of resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* 2013, 303, 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>.
277. Buckner, M.M.C.; Ciusa, M.L.; Piddock, L.J.V. Strategies to combat Antimicrobial resistance: Anti-plasmid and plasmid curing. *FEMS Microbiol. Rev.* 2018, 42, 781–804. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy031>.
278. Garcia-Quintanilla, M.; Prieto, A.I.; Barnes, L.; Ramos-Morales, F.; Casadesus, J. Bile-induced curing of the virulence plasmid in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 2006, 188, 7963–7965. <https://doi.org/10.1128/JB.00995-06>.
279. Spengler, G.; Molnar, A.; Schelz, Z.; Amaral, L.; Sharples, D.; Molnar, J. The mechanism of plasmid curing in bacteria. *Curr. Drug Targets* 2006, 7, 823–841. <https://doi.org/10.2174/138945006777709601>.
280. Rubin, S.J.; Rosenblum, E.D. Effects of ethidium bromide on growth and on loss of the penicillinase plasmid of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 1971, 108, 1200–1204. <https://doi.org/10.1128/jb.108.3.1200-1204.1971>.
281. Hale, L.; Lazos, O.; Haines, A.; Thomas, C. An efficient stress-free strategy to displace stable bacterial plasmids. *Biotechniques* 2010, 48, 223–228. <https://doi.org/10.2144/000113366>.
282. Lin, A.; Jimenez, J.; Derr, J.; Vera, P.; Manapat, M.L.; Esvelt, K.M.; Villanueva, L.; Liu, D.R.; Chen, I.A. Inhibition of bacterial conjugation by phage M13 and its protein g3p: Quantitative analysis and model. *PLoS ONE* 2011, 6, e19991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019991>.
283. Bikard, D.; Euler, C.W.; Jiang, W.; Nussenzweig, P.M.; Goldberg, G.W.; Duportet, X.; Fischetti, V.A.; Marraffini, L.A. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific Antimicrobials. *Nat. Biotechnol.* 2014, 32, 1146–1150. <https://doi.org/10.1038/nbt.3043>.
284. Dong, H.; Xiang, H.; Mu, D.; Wang, D.; Wang, T. Exploiting a conjugative CRISPR/Cas9 system to eliminate plasmid harbouring the *mcr-1* gene from *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2019, 53, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.017>.
285. Yosef, I.; Manor, M.; Kiro, R.; Qimron, U. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2015, 112, 7267–7272. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500107112>.
286. Buroni, S.; Chiarelli, L.R. Antivirulence compounds: A future direction to overcome antibiotic resistance? *Future Microbiol.* 2020, 15, 299–301. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0294>.
287. Defoirdt, T. Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. *Trends Microbiol.* 2018, 26, 313–328. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.005>.
288. Paczkowski, J.E.; Mukherjee, S.; McCready, A.R.; Cong, J.P.; Aquino, C.J.; Kim, H.; Henke, B.R.; Smith, C.D.; Bassler, B.L. Fla-vonoids Suppress *Pseudomonas aeruginosa* Virulence through Allosteric Inhibition of Quorum-sensing Receptors. *J. Biol. Chem.* 2017, 292, 4064–4076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.770552>.
289. Fleitas Martinez, O.; Cardoso, M.H.; Ribeiro, S.M.; Franco, O.L. Recent Advances in Anti-virulence Therapeutic Strategies With a Focus on Dismantling Bacterial Membrane Microdomains, Toxin

- Neutralization, Quorum-Sensing Interference and Biofilm Inhibition. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019, 9, 74. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00074>.
290. Perez, L.J.; Karagounis, T.K.; Hurley, A.; Bassler, B.L.; Semmelhack, M.F. Highly Potent, Chemically Stable Quorum Sensing Agonists for *Vibrio Cholerae*. *Chem. Sci.* 2014, 5, 151–155. <https://doi.org/10.1039/C3SC52572D>.
291. Firon, N.; Ofek, I.; Sharon, N. Interaction of mannose-containing oligosaccharides with the fimbrial lectin of *Escherichia coli*. *BioChem. Biophys. Res. Commun.* 1982, 105, 1426–1432. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(82\)90947-0](https://doi.org/10.1016/0006-291x(82)90947-0).
292. Duncan, M.C.; Linington, R.G.; Auerbuch, V. Chemical inhibitors of the type three secretion system: Disarming bacterial pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56, 5433–5441. <https://doi.org/10.1128/AAC.00975-12>.
293. Hudson, D.L.; Layton, A.N.; Field, T.R.; Bowen, A.J.; Wolf-Watz, H.; Elofsson, M.; Stevens, M.P.; Galyov, E.E. Inhibition of type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by small-molecule inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, 51, 2631–2635. <https://doi.org/10.1128/AAC.01492-06>.
294. Brun, P.; Bernabe, G.; Marchiori, C.; Scarpa, M.; Zuin, M.; Cavazzana, R.; Zaniol, B.; Martines, E. Antibacterial efficacy and mechanisms of action of low power atmospheric pressure cold plasma: Membrane permeability, biofilm penetration and Anti- microbial sensitization. *J. Appl. Microbiol.* 2018, 125, 398–408. <https://doi.org/10.1111/jam.13780>.
295. Mai-Prochnow, A.; Murphy, A.B.; McLean, K.M.; Kong, M.G.; Ostrikov, K.K. Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2014, 43, 508–517. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.01.025>.
296. Ermolaeva, S.A.; Varfolomeev, A.F.; Chernukha, M.Y.; Yurov, D.S.; Vasiliev, M.M.; Kaminskaya, A.A.; Moisenovich, M.M.; Romanova, J.M.; Murashev, A.N.; Selezneva, I.I.; et al. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J. Med. Microbiol.* 2011, 60, 75–83. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.020263-0>.
297. Bourke, P.; Ziuzina, D.; Han, L.; Cullen, P.J.; Gilmore, B.F. Microbiological interactions with cold plasma. *J. Appl. Microbiol.* 2017, 123, 308–324. <https://doi.org/10.1111/jam.13429>.
298. Alkawareek, M.Y.; Algwari, Q.T.; Laverty, G.; Gorman, S.P.; Graham, W.G.; O'Connell, D.; Gilmore, B.F. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by atmospheric pressure non-thermal plasma. *PLoS ONE* 2012, 7, e44289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044289>.
299. Joshi, S.G.; Cooper, M.; Yost, A.; Paff, M.; Ercan, U.K.; Fridman, G.; Friedman, G.; Fridman, A.; Brooks, A.D. Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, 55, 1053–1062. <https://doi.org/10.1128/AAC.01002-10>.
300. Ctvrticková, L.; Pichová, A.; Scholtz, V.; Khun, J.; Julák, J. Non-thermal plasma-induced apoptosis in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Contrib. Plasma Phys.* 2019, 59, e201800064.
301. Scholtz, V.; Pazlarova, J.; Souškova, H.; Khun, J.; Julák, J. Nonthermal plasma—A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol. Adv.* 2015, 33, 1108–1119. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.002>.
302. Scholtz, V.; Vankova, E.; Kasparova, P.; Premanath, R.; Karunasagar, I.; Julák, J. Non-thermal Plasma Treatment of ESKAPE Pathogens: A Review. *Front. Microbiol.* 2021, 12, 737635. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737635>.

303. Heinlin, J.; Isbary, G.; Stolz, W.; Zeman, F.; Landthaler, M.; Morfill, G.; Shimizu, T.; Zimmermann, J.L.; Karrer, S. A randomized two-sided placebo-controlled study on the efficacy and safety of atmospheric non-thermal argon plasma for pruritus. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2013, 27, 324–331. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2011.04395.x>.
304. Maisch, T.; Shimizu, T.; Li, Y.F.; Heinlin, J.; Karrer, S.; Morfill, G.; Zimmermann, J.L. Decolonisation of MRSA, *S. aureus* and *E. coli* by cold-atmospheric plasma using a porcine skin model in vitro. *PLoS ONE* 2012, 7, e34610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034610>.
305. Bayliss, D.L.; Shama, G.; Kong, M.G. Restoration of antibiotic sensitivity in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* following treatment with a non-thermal atmospheric gas plasma. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2013, 41, 398–399. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.12.005>.
306. Rosenthal, I.; Sostaric, J.Z.; Riesz, P. Sonodynamic therapy--a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrason. Sonochemistry* 2004, 11, 349–363. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.03.004>.
307. Serpe, L.; Giuntini, F. Sonodynamic Antimicrobial chemotherapy: First steps towards a sound approach for microbe inactivation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2015, 150, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.05.012>.
308. Rengeng, L.; Qianyu, Z.; Yuehong, L.; Zhongzhong, P.; Libo, L. Sonodynamic therapy, a treatment developing from photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2017, 19, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.06.003>.
309. Harris, F.; Dennison, S.R.; Phoenix, D.A. Using sound for microbial eradication--light at the end of the tunnel? *FEMS Microbiol. Lett.* 2014, 356, 20–22. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12484>.
310. Liu, B.; Wang, J.; Wang, X.; Liu, B.M.; Kong, Y.M.; Wang, D.; Xu, S.K. Spectrometric studies on the sonodynamic damage of protein in the presence of levofloxacin. *J. Fluoresc.* 2010, 20, 985–992. <https://doi.org/10.1007/s10895-010-0645-x>.
311. Liu, B.; Wang, D.J.; Liu, B.M.; Wang, X.; He, L.L.; Wang, J.; Xu, S.K. The influence of ultrasound on the fluoroquinolones antibacterial activity. *Ultrason. Sonochemistry* 2011, 18, 1052–1056. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.02.001>.
312. Erriu, M.; Blus, C.; Szmukler-Moncler, S.; Buogo, S.; Levi, R.; Barbato, G.; Madonnaripa, D.; Denotti, G.; Piras, V.; Orru, G. Microbial biofilm modulation by ultrasound: Current concepts and controversies. *Ultrason. Sonochemistry* 2014, 21, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.05.011>.
313. Wang, L.V.; Hu, S. Photoacoustic tomography: In vivo imaging from organelles to organs. *Science* 2012, 335, 1458–1462. <https://doi.org/10.1126/science.1216210>.
314. Son, S.; Kim, J.H.; Wang, X.; Zhang, C.; Yoon, S.A.; Shin, J.; Sharma, A.; Lee, M.H.; Cheng, L.; Wu, J.; et al. Multifunctional sonosensitizers in sonodynamic cancer therapy. *Chem. Soc. Rev.* 2020, 49, 3244–3261. <https://doi.org/10.1039/c9cs00648f>.
315. Oyim, J.; Omolo, C.A.; Amuhaya, E.K. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy: Advancements in Porphyrin-Based Photosensitizer Development. *Front. Chem.* 2021, 9, 635344. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.635344>.
316. Klausen, M.; Ucuncu, M.; Bradley, M. Design of Photosensitizing Agents for Targeted Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Molecules* 2020, 25, 5239. <https://doi.org/10.3390/molecules25225239>.
317. Zeina, B.; Greenman, J.; Purcell, W.M.; Das, B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br. J. Dermatol.* 2001, 144, 274–278. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2001.04013.x>.

318. Sobotta, L.; Skupin-Mrugalska, P.; Piskorz, J.; Mielcarek, J. Porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria. *Eur. J. Med. Chem.* 2019, 175, 72–106. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.057>.
319. Giuliani, F.; Martinelli, M.; Cocchi, A.; Arbia, D.; Fantetti, L.; Roncucci, G. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for Antimicrobial photodynamic therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, 54, 637–642. <https://doi.org/10.1128/AAC.00603-09>.
320. Tavares, A.; Carvalho, C.M.; Faustino, M.A.; Neves, M.G.; Tome, J.P.; Tome, A.C.; Cavaleiro, J.A.; Cunha, A.; Gomes, N.C.; Alves, E.; et al. Antimicrobial photodynamic therapy: Study of bacterial recovery viability and potential development of re- sistance after treatment. *Mar. Drugs* 2010, 8, 91–105. <https://doi.org/10.3390/md8010091>.
321. O’Riordan, K.; Akilov, O.E.; Hasan, T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodi- agnosis Photodyn. Ther.* 2005, 2, 247–262.
322. Loomba, L.; Scarabelli, T. Metallic nanoparticles and their medicinal potential. Part II: Aluminosilicates, nanobiomagnets, quan- tum dots and cochleates. *Ther. Deliv.* 2013, 4, 1179–1196. <https://doi.org/10.4155/tde.13.74>.
323. Fu, Z.; Wu, F.; Chen, L.; Xu, B.; Feng, C.; Bai, Y.; Liao, H.; Sun, S.; Giesy, J.P.; Guo, W. Copper and zinc, but not other priority toxic metals, pose risks to native aquatic species in a large urban lake in Eastern China. *Environ. Pollut.* 2016, 219, 1069–1076. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.007>.
324. Seiler, C.; Berendonk, T.U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agri- culture and aquaculture. *Front. Microbiol.* 2012, 3, 399. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00399>.
325. Ew Nutrition. 5 Key Facts Pig Producers Need to Know about the EU’s ZnO Ban. Available online: <https://ew-nutrition.com/5-key-facts-pig-producers-need-to-know-about-the-eus-zno-ban/> (accessed on 1 February 2022).
326. Jansen, K.U.; Anderson, A.S. The role of vaccines in fighting Antimicrobial resistance (AMR). *Hum. Vaccines Imm unother.* 2018, 14, 2142–2149. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1476814>.
327. Klugman, K.P.; Black, S. Impact of existing vaccines in reducing antibiotic resistance: Primary and secondary effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2018, 115, 12896–12901. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721095115>.
328. Micoli, F.; Bagnoli, F.; Rappuoli, R.; Serruto, D. The role of vaccines in combatting Antimicrobial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2021, 19, 287–302. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00506-3>.
329. Sihvonen, R.; Siira, L.; Toropainen, M.; Kuusela, P.; Patari-Sampo, A. Streptococcus pneumoniae Antimicrobial resistance decreased in the Helsinki Metropolitan Area after routine 10-valent pneumococcal conjugate vaccination of infants in Finland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2017, 36, 2109–2116. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3033-5>.
330. Hoelzer, K.; Bielke, L.; Blake, D.P.; Cox, E.; Cutting, S.M.; Devriendt, B.; Erlacher-Vindel, E.; Goossens, E.; Karaca, K.; Lemiére, S.; et al. Vaccines as alternatives to antibiotics for food producing animals. Part 1: Challenges and needs. *Veter. Res.* 2018, 49, 64. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0560-8>.
331. Mishra, R.P.; Oviedo-Orta, E.; Prachi, P.; Rappuoli, R.; Bagnoli, F. Vaccines and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2012, 15, 596–602. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.08.002>.
332. Buchy, P.; Asciglu, S.; Buisson, Y.; Datta, S.; Nissen, M.; Tambyah, P.A.; Vong, S. Impact of vaccines on Antimicrobial resistance. *Int. J. Infect. Dis.* 2020, 90, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.10.005>.

333. Romano, L.; Paladini, S.; Galli, C.; Raimondo, G.; Pollicino, T.; Zanetti, A.R. Hepatitis B vaccination. *Hum. Vaccines Immunother.* 2015, 11, 53–57. <https://doi.org/10.4161/hv.34306>.
334. Octavia, S.; Sintchenko, V.; Gilbert, G.L.; Lawrence, A.; Keil, A.D.; Hogg, G.; Lan, R. Newly emerging clones of *Bordetella pertussis* carrying *prn2* and *ptxP3* alleles implicated in Australian pertussis epidemic in 2008–2010. *J. Infect. Dis.* 2012, 205, 1220–1224. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis178>.
335. Bagnoli, F.; Payne, D.J. Reaction: Alternative Modalities to Address Antibiotic-Resistant Pathogens. *Catalysis* 2017, 3, 369–372.
336. Rosini, R.; Nicchi, S.; Pizza, M.; Rappuoli, R. Vaccines Against Antimicrobial Resistance. *Front. Immunol.* 2020, 11, 1048. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01048>.
337. Nogales, A.; Martinez-Sobrido, L. Reverse Genetics Approaches for the Development of Influenza Vaccines. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 18, 20. <https://doi.org/10.3390/ijms18010020>.
338. Finco, O.; Rappuoli, R. Designing vaccines for the twenty-first century society. *Front. Immunol.* 2014, 5, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00012>.
339. Serruto, D.; Serino, L.; Masignani, V.; Pizza, M. Genome-based approaches to develop vaccines against bacterial pathogens. *Vaccine* 2009, 27, 3245–3250. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.072>.
340. Moriel, D.G.; Bertoldi, I.; Spagnuolo, A.; Marchi, S.; Rosini, R.; Nesta, B.; Pastorello, I.; Corea, V.A.; Torricelli, G.; Cartocci, E.; et al. Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 9072–9077. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915077107>.
341. Bianconi, I.; Alcalá-Franco, B.; Scarselli, M.; Dalsass, M.; Buccato, S.; Colaprico, A.; Marchi, S.; Masignani, V.; Bragonzi, A. Ge- nome-Based Approach Delivers Vaccine Candidates Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Immunol.* 2018, 9, 3021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03021>.
342. Martinez-Becerra, F.J.; Kissmann, J.M.; Diaz-McNair, J.; Choudhari, S.P.; Quick, A.M.; Mellado-Sanchez, G.; Clements, J.D.; Pa- setti, M.F.; Picking, W.L. Broadly protective *Shigella* vaccine based on type III secretion apparatus proteins. *Infect. Immun.* 2012, 80, 1222–1231. <https://doi.org/10.1128/IAI.06174-11>.
343. Launay, O.; Ndiaye, A.G.W.; Conti, V.; Loulergue, P.; Scire, A.S.; Landre, A.M.; Ferruzzi, P.; Nedjaai, N.; Schutte, L.D.; Auer- bach, J.; et al. Booster Vaccination With GVGH *Shigella sonnei* 1790GAHB GMMA Vaccine Compared to Single Vaccination in Unvaccinated Healthy European Adults: Results From a Phase 1 Clinical Trial. *Front. Immunol.* 2019, 10, 335. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00335>.
344. Launay, O.; Lewis, D.J.M.; Anemona, A.; Loulergue, P.; Leahy, J.; Scire, A.S.; Maugard, A.; Marchetti, E.; Zancan, S.; Huo, Z.; et al. Safety Profile and Immunologic Responses of a Novel Vaccine Against *Shigella sonnei* Administered Intramuscularly, Intra- dermally and Intranasally: Results From Two Parallel Randomized Phase 1 Clinical Studies in Healthy Adult Volunteers in Europe. *EBioMedicine* 2017, 22, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.07.013>.
345. Gerke, C.; Colucci, A.M.; Giannelli, C.; Sanzone, S.; Vitali, C.G.; Sollai, L.; Rossi, O.; Martin, L.B.; Auerbach, J.; Di Cioccio, V.; et al. Production of a *Shigella sonnei* Vaccine Based on Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMA), 1790GAHB. *PLoS ONE* 2015, 10, e0134478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134478>.
346. Riddle, M.S.; Kaminski, R.W.; Di Paolo, C.; Porter, C.K.; Gutierrez, R.L.; Clarkson, K.A.; Weerts, H.E.; Duplessis, C.; Castellano, A.; Alaimo, C.; et al. Safety and Immunogenicity of a Candidate Bioconjugate Vaccine against *Shigella flexneri* 2a Administered to Healthy Adults: A Single-Blind, Randomized Phase I Study. *Clin. Vaccine Immunol.* 2016, 23, 908–917. <https://doi.org/10.1128/CVI.00224-16>.

347. Kampf, M.M.; Braun, M.; Sirena, D.; Ihssen, J.; Thony-Meyer, L.; Ren, Q. In vivo production of a novel glycoconjugate vaccine against *Shigella flexneri* 2a in recombinant *Escherichia coli*: Identification of stimulating factors for in vivo glycosylation. *Microb. Cell Factories* 2015, 14, 12. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0195-7>.
348. Poolman, J.T.; Wacker, M. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field. *J. Infect. Dis.* 2016, 213, 6–13. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv429>.
349. Lipsitch, M.; Siber, G.R. How Can Vaccines Contribute to Solving the Antimicrobial Resistance Problem? *mBio* 2016, 7, e00428-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00428-16>.
350. Pereira, S.G.; Domingues, V.S.; Theriaga, J.; Chasqueira, M.J.; Paixao, P. Non-Antimicrobial Drugs: Etodolac as a Possible Antimicrobial or Adjuvant Agent Against ESKAPE Pathogens. *Open Microbiol. J.* 2018, 12, 353. <https://doi.org/10.2174/1874285801812010353>.
351. Dharmaratne, P.; Rahman, N.; Leung, A.; Ip, M. Is there a role of faecal microbiota transplantation in reducing antibiotic resistance burden in gut? A systematic review and Meta-analysis. *Ann. Med.* 2021, 53, 662–681. <https://doi.org/10.1080/07853890.2021.1927170>.
352. Stripling, J.; Kumar, R.; Baddley, J.W.; Nellore, A.; Dixon, P.; Howard, D.; Ptacek, T.; Lefkowitz, E.J.; Tallaj, J.A.; Benjamin, W.H., Jr.; et al. Loss of Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Fecal Dominance in an Organ Transplant Patient With *Clostridium difficile* Colitis After Fecal Microbiota Transplant. *Open Forum Infect. Dis.* 2015, 2, ofv078. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv078>.