

IZS

T E R A M O

/

LABORATORIO
NAZIONALE
DI RIFERIMENTO PER
CAMPYLOBACTER

Sistema CRISPR per il controllo delle Enterobacteriaceae: verso un'alternativa agli antibiotici

Progetto di ricerca

CRISPone – CRISPR–Cas come antimicrobico in

Enterobacteriaceae produttrici di ESBL

IZS AM 07/21 RC

IZS

T E R A M O

/

LABORATORIO
NAZIONALE
DI RIFERIMENTO PER
CAMPYLOBACTER

 **frontiers** | Frontiers in [Microbiology](#)

TYPE Original Research
PUBLISHED 10 June 2025
DOI [10.3389/fmicb.2025.1595652](https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1595652)



OPEN ACCESS

EDITED BY
Hazem Ramadan,
Mansoura University, Egypt

REVIEWED BY
Jorge Blanco,
University of Santiago de Compostela, Spain
Alejandro Piña-Iturbe,
Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile
Salome N. Seiffert,
Zentrum für Labormedizin (ZLM), Switzerland

*CORRESPONDENCE
Lisa Di Marcantonio
Ldimarcantonio@izs.it

RECEIVED 18 March 2025
ACCEPTED 16 May 2025
PUBLISHED 10 June 2025

Comprehensive regional study of ESBL *Escherichia coli*: genomic insights into antimicrobial resistance and inter-source dissemination of ESBL genes

Lisa Di Marcantonio^{1*}, Sofia Chiatamone Ranieri²,
Michela Toro¹, Alice Marchegiano¹, Francesca Cito¹, Nadia Sulli¹,
Ilaria Del Matto¹, Valeria Di Lollo¹, Alessandra Alessiani¹,
Giovanni Foschi¹, Ilenia Platone², Massimiliano Paoletti¹,
Nicola D'Alterio¹, Giuliano Garofolo¹ and Anna Janowicz¹

Disseminazione

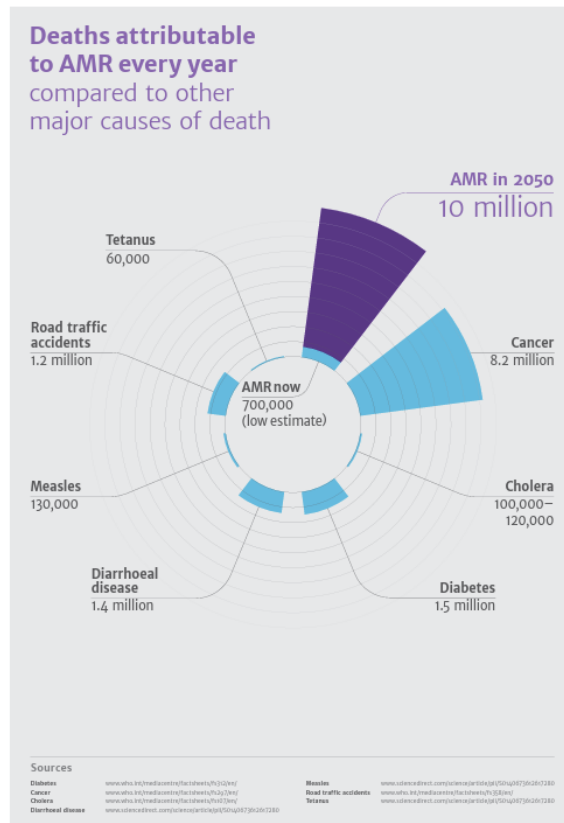
IZS AM 07/21 RC

Antibiotico resistenza

La resistenza agli antibiotici, o antibiotico-resistenza, è il fenomeno per il quale un batterio risulta resistente all'attività di un farmaco antimicrobico.

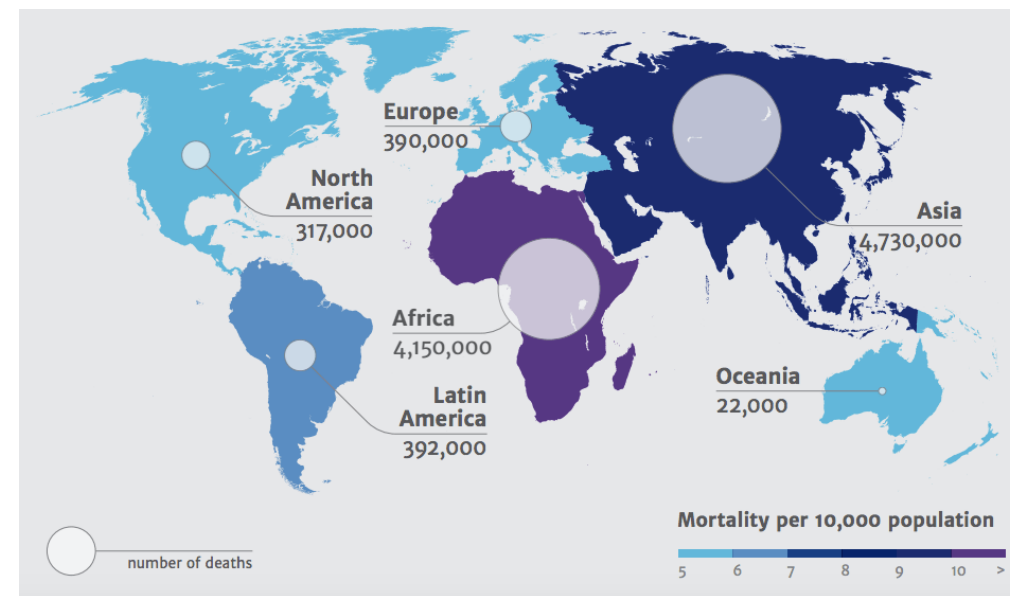
La resistenza agli antibiotici si verifica quando i batteri hanno o sviluppano la capacità di eludere i meccanismi utilizzati dai farmaci contro di loro.





- La resistenza agli antibiotici è oggi una delle più gravi minacce per la salute pubblica, che è stata accelerata dall'uso eccessivo e improprio di antimicrobici negli esseri umani e negli animali oltre a una prevenzione inadeguata delle infezioni

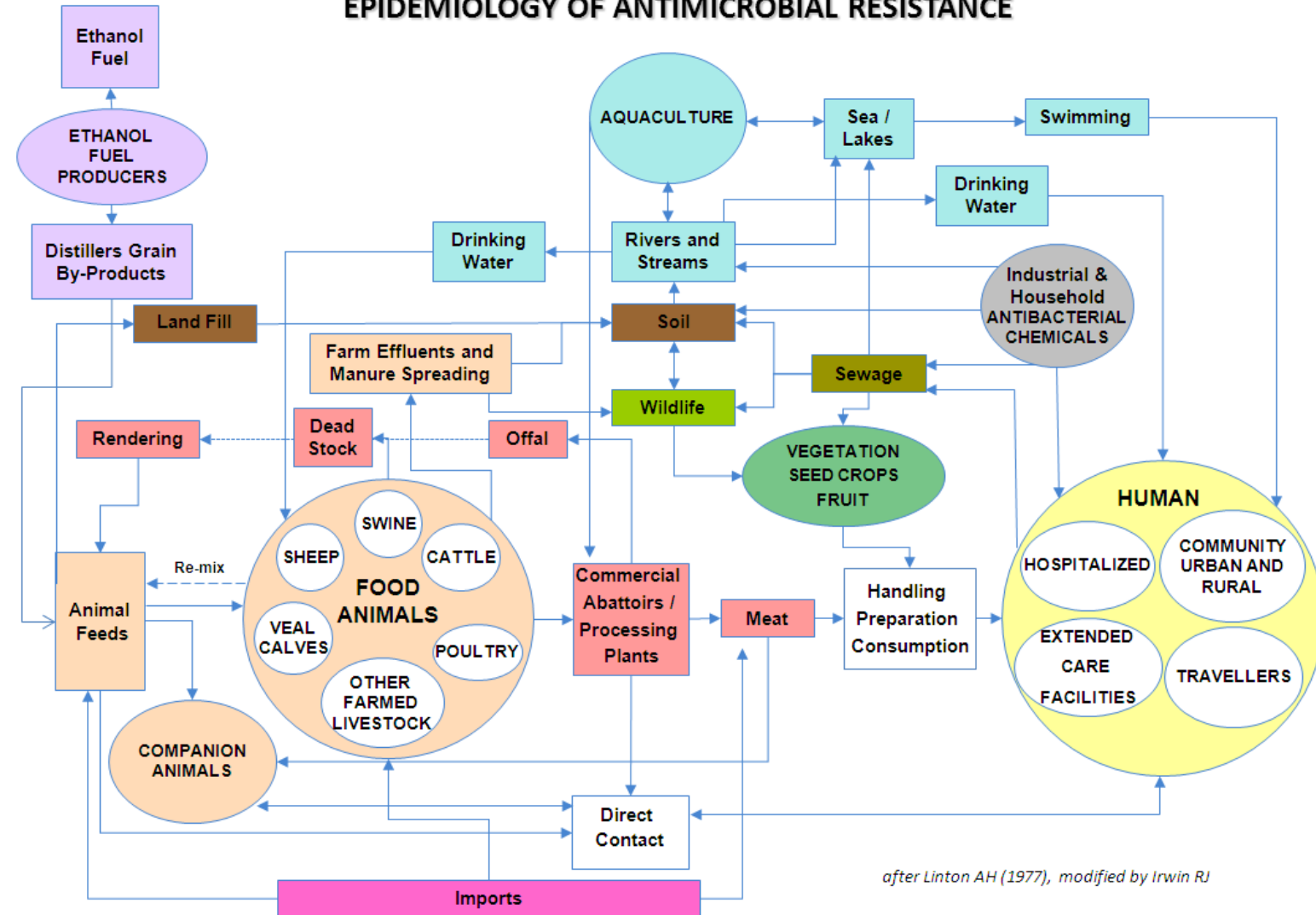
Antibiotico resistenza



It is estimated that globally approximately 700,000 deaths are attributed annually to antimicrobial resistance and this could rise to 10 million deaths per year by 2050 (O'Neill 2014).

In 2021, we estimated 4.71 million (95% UI 4.23–5.19) deaths were associated with bacterial AMR, including 1.14 million (1.00–1.28) deaths attributable to bacterial AMR.

EPIDEMIOLOGY OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE



Che cosa è l'antibiotic-resistenza?

"The time may come when penicillin can be bought by anyone in the shops. Then there is the danger that the ignorant man may easily underdose himself and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug make them resistant"

Alexander Flemming, Noble lecture, 1945



Problema noto sin dall'inizio....

Nel **1928** Alexander Fleming scopre la penicillina.

Nel **1940** vengono rilevati i primi stafilococchi resistenti alla penicillina.

Nel **1959** viene introdotta la meticillina per contrastare le prime penicillinasi.

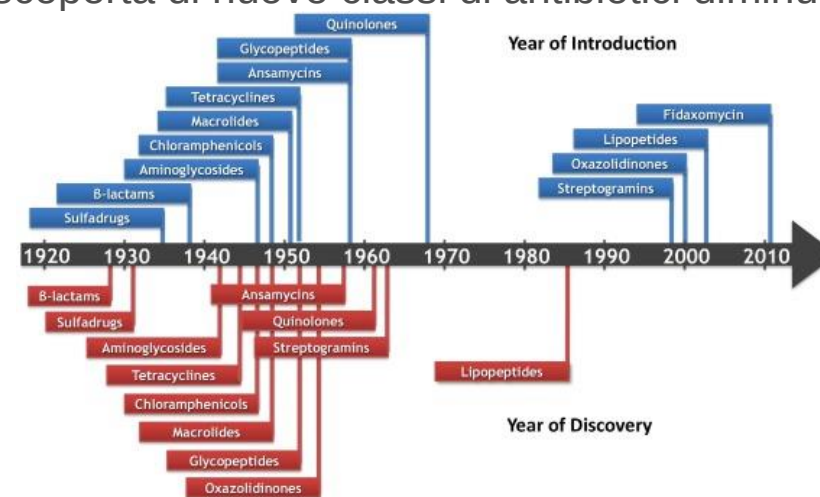
Nel **1960** viene ritrovato il primo Staphylococcus resistente alla meticillina.

Nel **1958** viene introdotta la vancomicina per il trattamento di stafilococchi resistenti alla meticillina.

Nel **1979** vengono scoperti stafilococchi coagulasi-negativi resistenti alla vancomicina.

Nel **1996** viene introdotta la levofloxacin nella pratica clinica, ma già nello stesso anno viene riportato il primo pneumococco resistente alla levofloxacin.

Tra il **1960** e il **1980** si ha una produzione adeguata di nuovi antimicrobici da parte dell'industria farmaceutica, ma dopo gli anni '80 il tasso di scoperta di nuove classi di antibiotici diminuisce notevolmente.





Antibiotici

Limiti nella Scoperta e Sviluppo degli Antibiotici

Una crisi che si sta aggravando

•Aumento della Resistenza Batterica

Negli ultimi anni, infezioni resistenti agli antibiotici sono diventate più frequenti e difficili da trattare.

•Diminuzione degli Investimenti

Sempre meno aziende farmaceutiche investono nella ricerca antibiotica: tra il 2000 e il 2020, molti grandi gruppi hanno abbandonato questo settore.

•Poche Nuove Scoperte

Dal 2000 in poi, sono stati scoperti pochissimi nuovi antibiotici veramente innovativi.

•Uso eccessivo e improprio

L'abuso di antibiotici in medicina e zootecnia ha accelerato la comparsa di batteri resistenti.



New WHO report presents progress in G7 countries in tackling antibiotic pipeline crisis

14 October 2024 | Departmental update | Geneva, Switzerland | Reading time: 3 min (699 words)

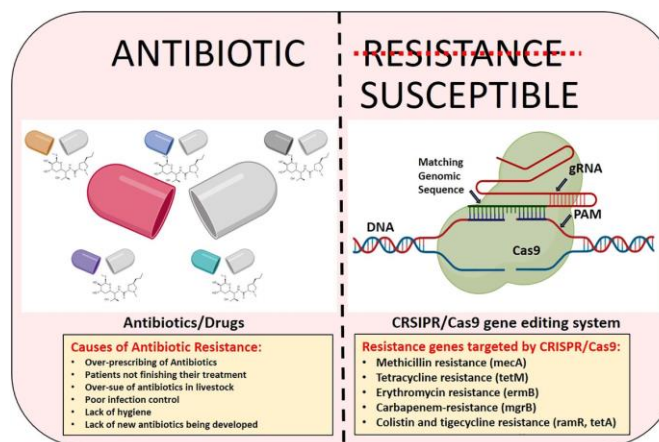
Antimicrobial resistance is associated with more than a million deaths every year, however the research and development pipeline for new antibiotics is sparse, with lengthy and costly development and little innovation.

The World Health Organization (WHO), in partnership with the [Global AMR Research and Development \(R&D\) Hub](#), has released a [new report](#) for G7 Finance and Health Ministers detailing progress on incentivizing the development of new antibacterial treatments. It highlights the urgent need for innovative strategies to enhance research and preserve access to essential antibiotics.

Nuove Soluzioni....

L'utilizzo del sistema **CRISPR-Cas** come antimicrobico rappresenta un'area di ricerca ancora in fase di sviluppo, ma che ha suscitato grande interesse nel campo della microbiologia e della biotecnologia.

L'idea alla base dell'utilizzo del sistema **CRISPR-Cas** come antimicrobico consiste nell'ingegnerizzare questo sistema per poterlo utilizzare come un'arma selettiva contro i patogeni. In particolare, si potrebbe utilizzare una versione del sistema CRISPR-Cas che è in grado di riconoscere e distruggere specifici elementi genici presenti nei patogeni, come plasmidi o fagi.



>CP003557_2

```
ATTCTGCGGGACGACTCTCTAGCCTTCCGGCTAGTTTCGTGCGACTCTATTTTCGGAGTGAGTCCGTCGACTGACGGAC
GAACGGAGACCCCCGCTGTAAGCGGGGCAATTCTACAATAGTACGATTAAGACTGTAAAGGATCGCAACGGCAAGGTA
ATTAGAAAAGCATTTCATTCTACAATAGTACGATTAAGACATTGAAGATGATTCTTGCAGTCATACGGCACACATAAT
TTCAATTCTACAATAGTACGATTAAGACCCTACCCTGAAGACGTTCTTATTGAATACATAGAGATTTCATTCTACAATA
GTACGATTAAGACTCGCTTTTTATCCGCTCCCTCCACATCCCTTGCAAATATTTCAATTCTACAATAGTACGATTAAGAC
TGCTCGACCCTAACGCCGCCGATTATCAAATATATCATTTCATTCTACAATAGTACGATTAAGACACGAATTAACAAC
GGTATTTTGGGTGCCATTAGAGGCAATTTCATTCTACAATAGTACGATTAAGACGACCACTTACGGATATTGCACTAT
ACTCGAAGATTAATTTCATTCTACAATAGTACGATTAAGACGGCAATCGCCGGTTGTGGTATGGAGATATAGAAGTT
AATTTCAATTCTACAATAGTACGATTAAGACTTCTCTTTAACGGCCAGGAATCTGCAACTGAATTCGCATTTCATTCT
ACAATAGTACGATTAAGACTCGTAACCTCTCTGCTTCTTCTACTTCGTCTCTCAATTTCAATTCTACAATAGTACGATT
AAGACATTATTAACGAACTACAAAAGAAAACTATTAAAAATTTTCATTCTACAATAGTACGATTAAGACACGCCGC
CGCCTTTTTCTGAATCGAGTCGAGTATGATTTCATTCTACAATAGTACGATTAAGACTTTTAAATGAAGATTGTTAAT
TCATTTATTAATTCTATTTCATTCTACAATAGTACGATTAAGACTCAAAAATTTTGTCCGCTGGTCCCGGAAATTAT
TATTTCAATTCTACAATAGTACGATTAAGACGCTCGCATGGGACAATATGTACATGAGCCAGGCTACTCATTTCAATTC
TACAATAGTACGATTAAGACTTTCTTCAACTAAAAATAAATCATTTTCAATACTATAATTTCAATTCTACAATAGTACGA
TTAAGACCCGCTAAATTCATAATTTTCAAGCTGTTTTGCAAGTATTTTTTCACTTTGCGTCGTCGACCTCCGATAGTGC
AAAAATCCCGGGGGGTCGACGACTTT
```

Spacers

Direct Repeats



Take a closer look at this DNA sequence...

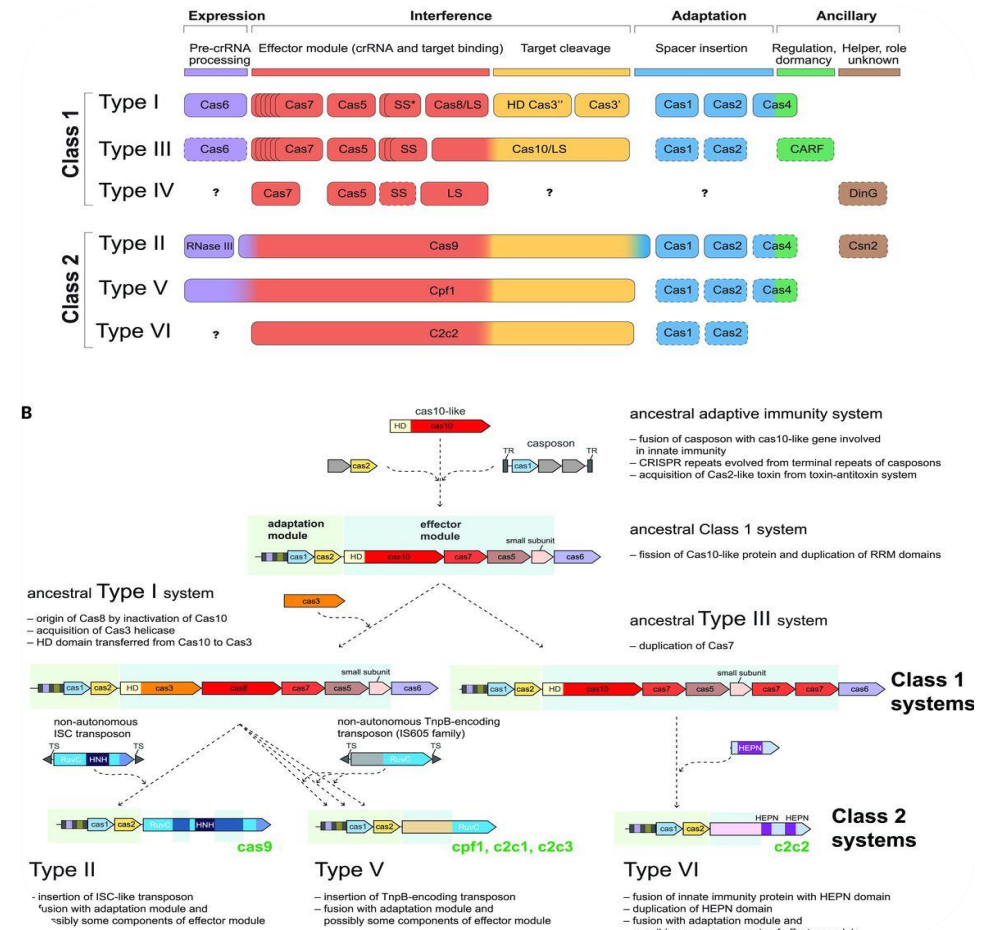
Can you spot anything in particular?

These repeated sequences and unique spacers define a CRISPR array:
nature's molecular memory of past invaders.

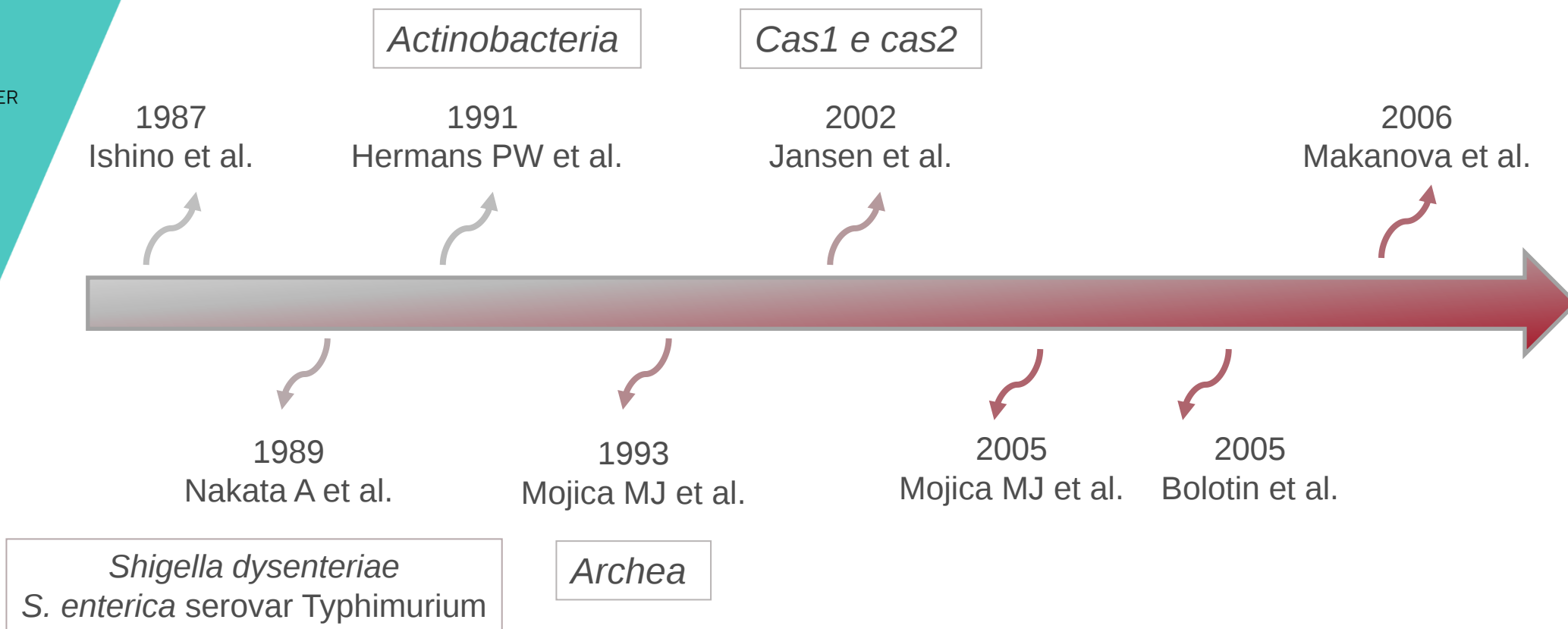
- Initially discovered as repeated DNA sequences in **bacteria** and **archaea**
- Function as an adaptive immune system against **viruses** and **plasmids**
- Three main stages:
 - Adaptation – acquisition of foreign DNA
 - crRNA biogenesis – transcription and processing
 - Interference – targeting by crRNA–Cas complex
- Multiple CRISPR types; **Type II** (Cas9) is the simplest and programmable
- Cas9 is an RNA-guided endonuclease from ***Streptococcus pyogenes***

- Mohanraju, P., Makarova, K. S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E. V., & Van der Oost, J. (2016). Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science*, 353(6299), aad5147.

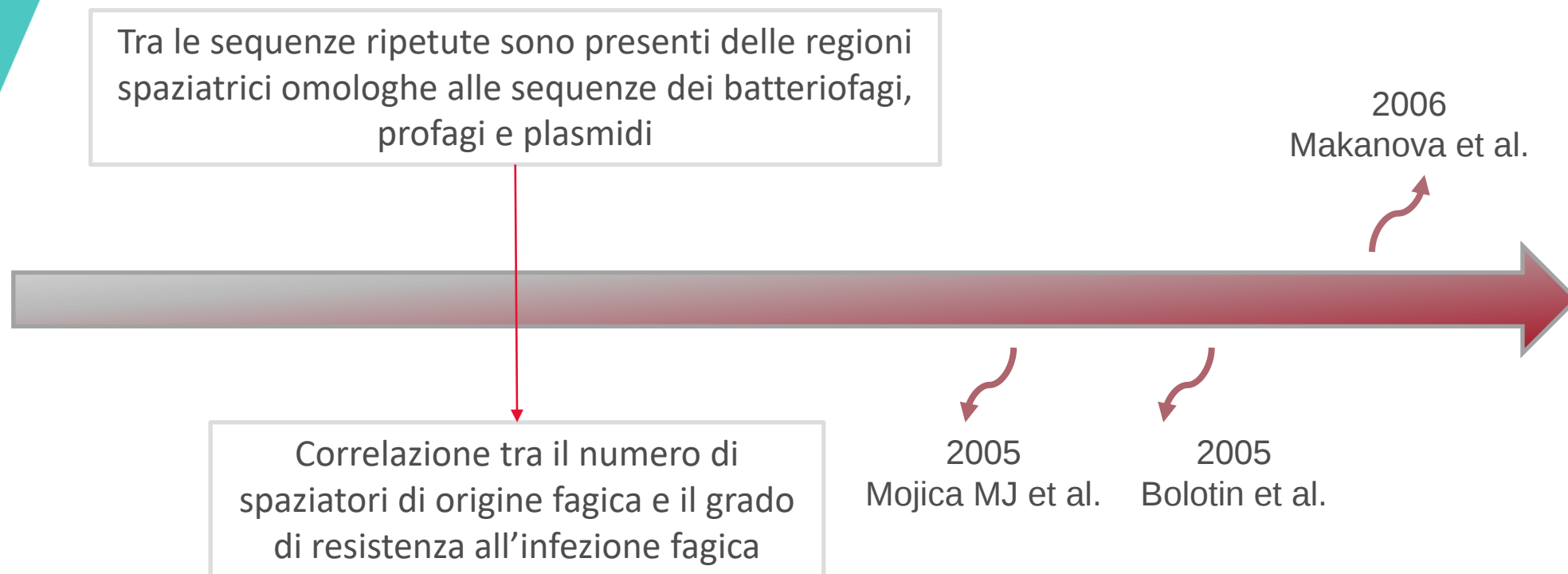
CRISPR–Cas: Origins



Un po' di storia



Un po' di storia



Un po' di storia

2007

CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes

RODOLPHE BARRANGOU, CHRISTOPHE FREMAUX, HÉLÈNE DEVEAU, MELISSA RICHARDS, PATRICK BOYAVAL, SYLVAIN MOINEAU, DENNIS A. ROMERO, AND PHILIPPE HORVATH

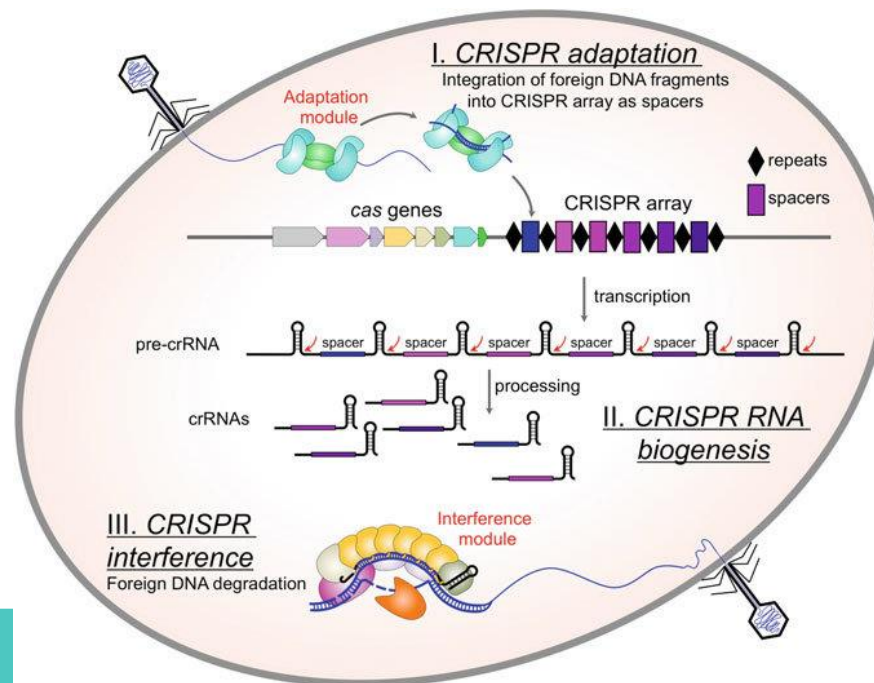
[Authors Info & Affiliations](#)

La funzione del sistema CRISPR-Cas come sistema immunitario procariotico acquisito è stata finalmente dimostrato sperimentalmente utilizzando il batterio *Streptococcus thermophilus*

Biologia del sistema CRISPR-Cas

Adaptation, Expression, Interference

- CRISPR viene tipicamente trascritto in RNA pre-CRISPR (**pre-crRNA**) - che viene trasformato in RNA CRISPR maturi (**crRNA**), ciascuno contenente la sequenza spaziatrice e parti delle ripetizioni laterali. Questo processo è mediato da un complesso Cas o anche RNase non Cas



New strategies based on genomic editing

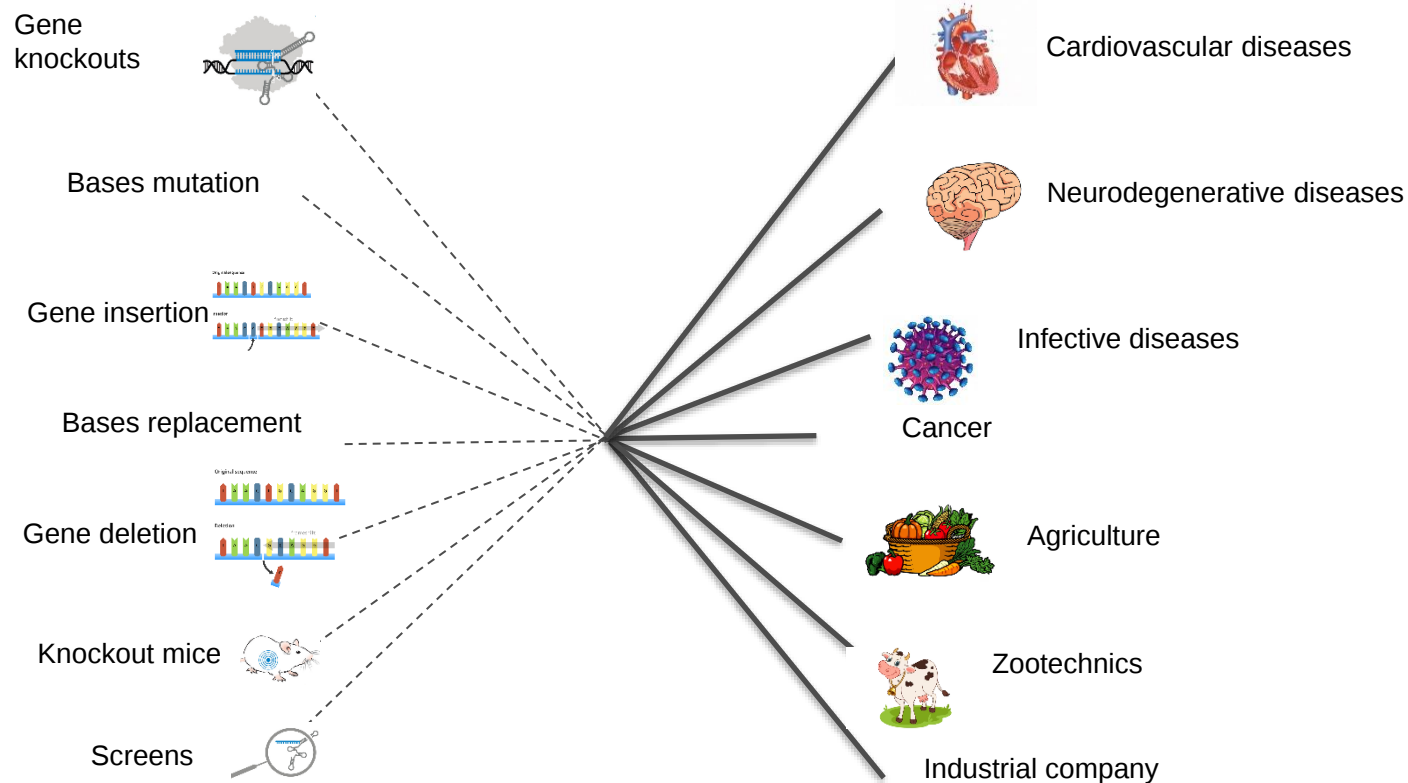
GENOME EDITING

The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9

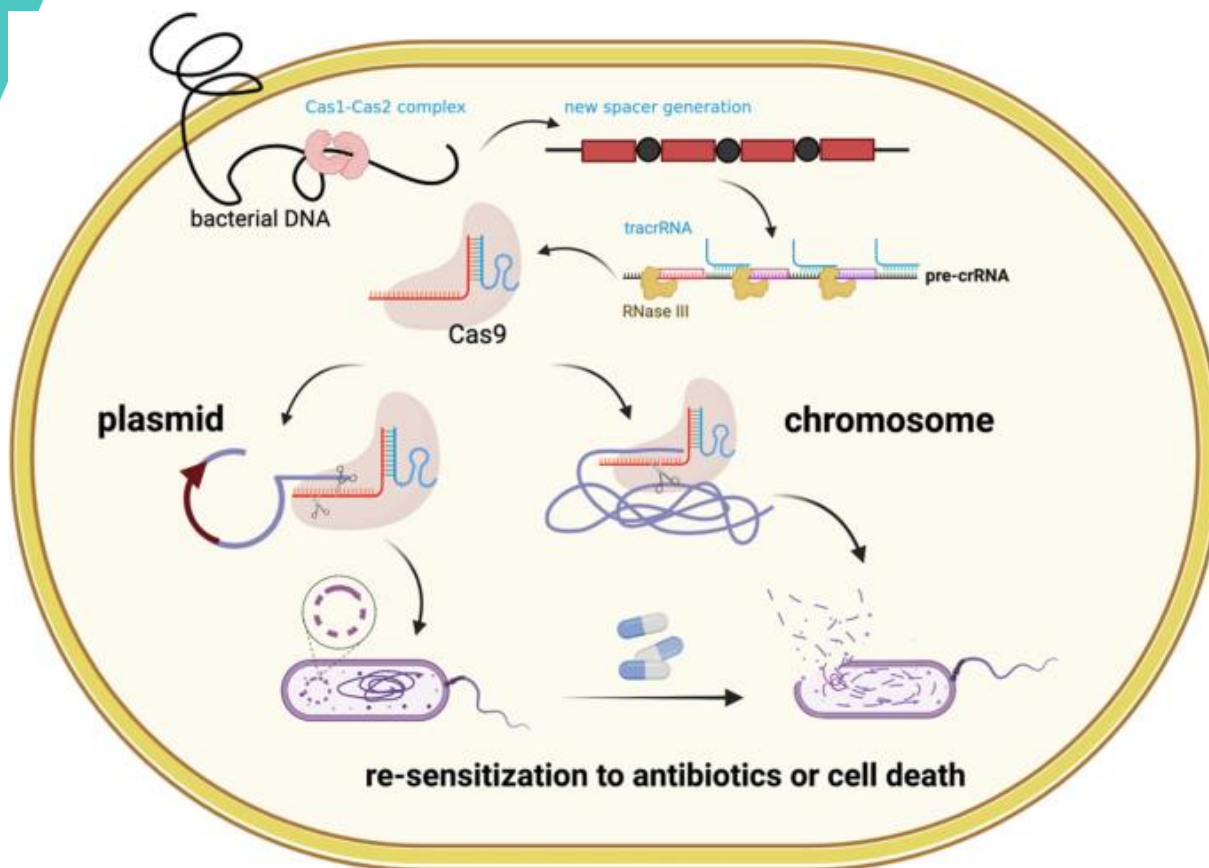
Jennifer A. Doudna* and Emmanuelle Charpentier*



2020 Nobel Prize in Chemistry



Nuove strategie sistema CRISPR-Cas9 come antimicrobico



- La nucleasi Cas9 guidata dall'RNA può avere come bersaglio un plasmide e/o il cromosoma

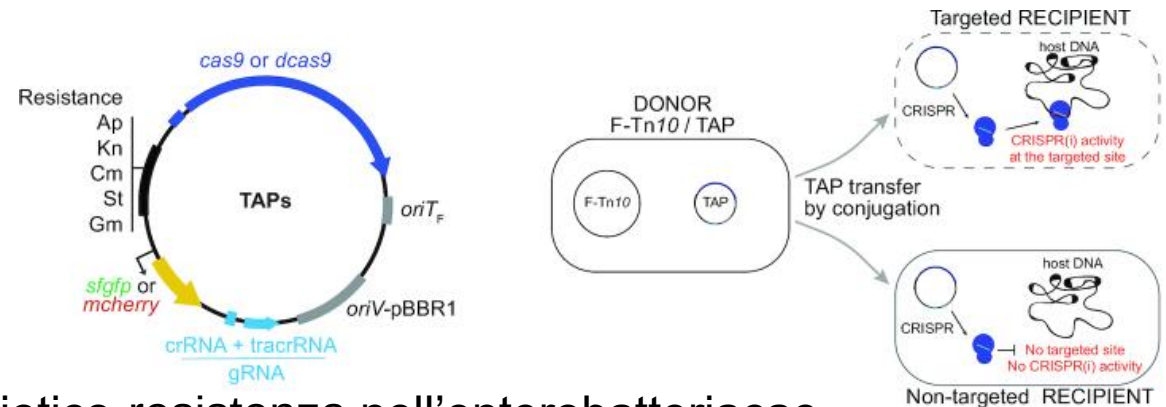
Risensibilizzazione agli antibiotici

Morte cellulare

Wu Y, 2021



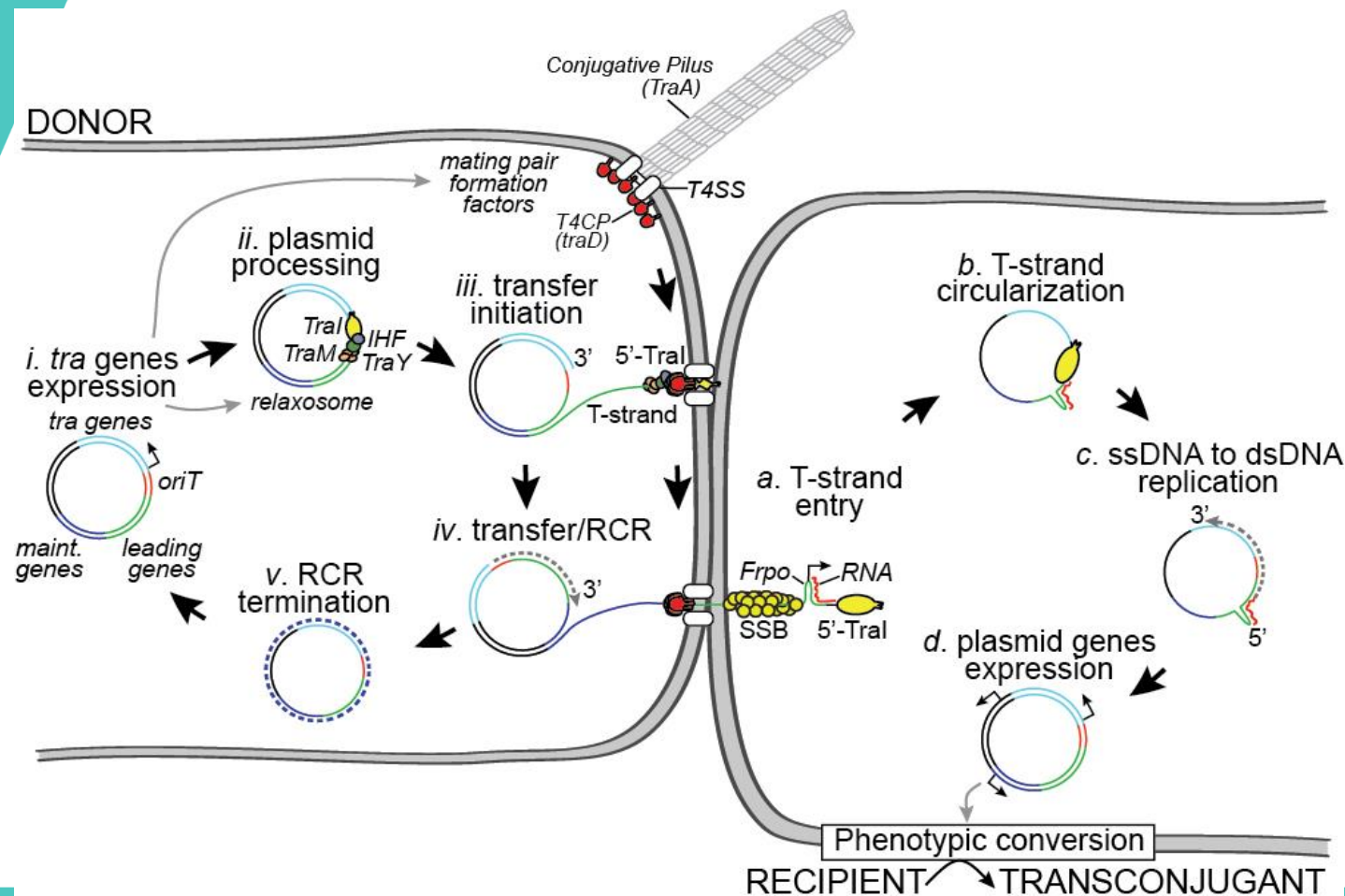
Scopo del lavoro



- Contrastare il fenomeno dell'antibiotico-resistenza nell'enterobatteriacae

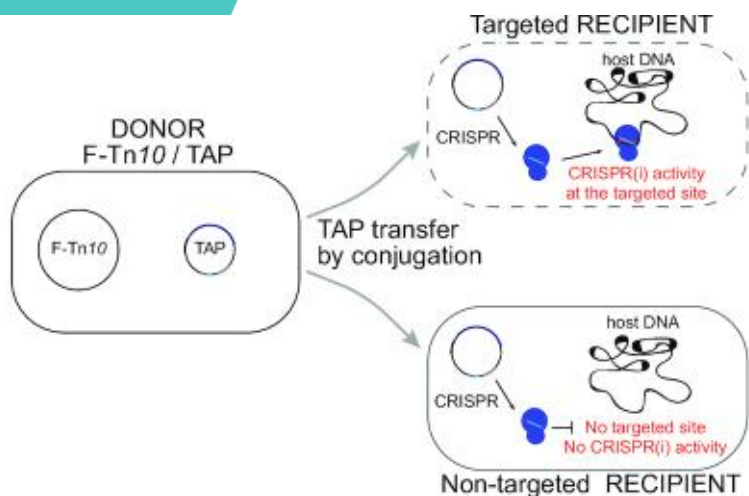
- Valutare la capacità del sistema CRISPR di indurre l'uccisione dei ceppi LacZ+ di *E. coli* utilizzando TAP contenenti nel gRNA una sequenza complementare a un frammento del gene LacZ
- Progettare nuovi plasmidi antibatterici che codificano per il sistema CRISPR-cas9 e che hanno come sequenze gRNA di geni di resistenza antimicrobica e sequenze di vitalità batterica per ceppi di *Salmonella* spp
- Sfruttare il processo di coniugazione batterica per trasferire plasmidi antibatterici TAP in batteri target di *E.coli* and *S. infantis* e valutare l'efficienza di uccisione e di ri-sensibilizzazione antibiotica dei batteri

Coniugazione batterica come meccanismo di trasferimento genico



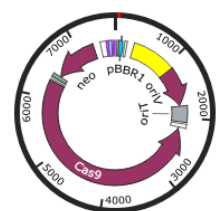
Bacterial conjugation is a horizontal gene transfer mechanism conserved in gram-positive and gram-negative bacteria. In this process, DNA is transferred from the donor bacterium to the recipient bacterium by a specialized multi-protein complex called a conjugation apparatus.

E. coli e *Salmonella infantis*

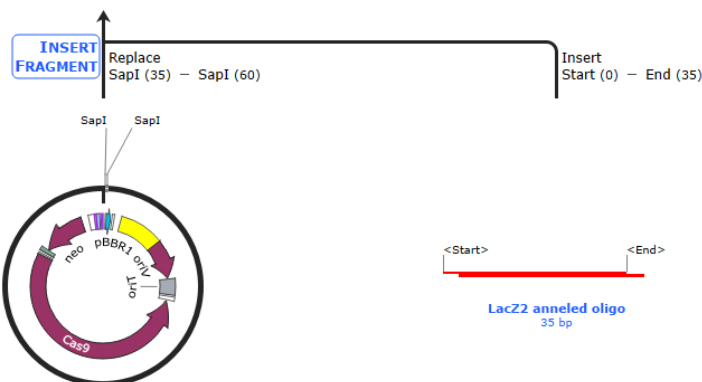


NAME	GENOTYPE	COMMENTS: Origine, Reference	PHENOTYPE
LY1370	Tb28/ F-Tn10 / TAP-F-Kn-Cas9-LacZ	Per exp LcacZ	Cm, Tc, Kn, Lac-
LY1369	Tb28/ F-Tn10 / TAP-F-Kn-Cas9-nsp	Per exp LcacZ	Cm, Tc, Kn, Lac-
LY827	MS388-Ap	Per exp LcacZ	St, Amp, Lac+
LY1675	E. coli HS StR / F-Tn10 / TAP-F-Kn-Cas9-nsp	Inviato da Lione	St, Kn, Tc, lac+
LY1677	E. coli IAI1 St / F-Tn10 / TAP-F-Kn-Cas9-nsp	Inviato da Lione	St, Kn, Tc, lac+
LY2630	E. coli MS388/ F-Tn10 / TAP-F-Kn-Cas9-nsp	Inviato da Lione	St, Kn, Tc
MS388	E. coli MG1655 rpsl + stR	Inviato da Lione	St
2020.PE.2340.1.6	S.infantis/pESI	IZSAM	St, Amp, Tc
B19	E. coli MG1655 rpsl + stR / F-Tn10 / F-TAP/CTMX1	Trasformazione E.coli / F-Tn10 con tap-CTMX1	St,Tc,Kn
B20	E. coli MG1655 rpsl + stR / F-Tn10 / F-TAP/DNAE	Trasformazione E.coli / F-Tn10 con tap-DNAE	St,Tc,Kn
B21	E. coli MG1655 rpsl + stR / F-Tn10 / F-TAP/RepB	Trasformazione E.coli / F-Tn10 con tap-RepB	St,Tc,Kn

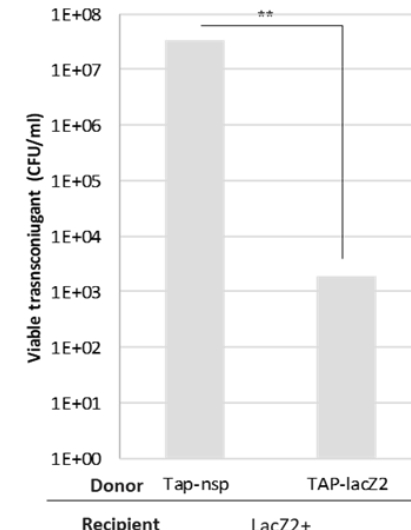
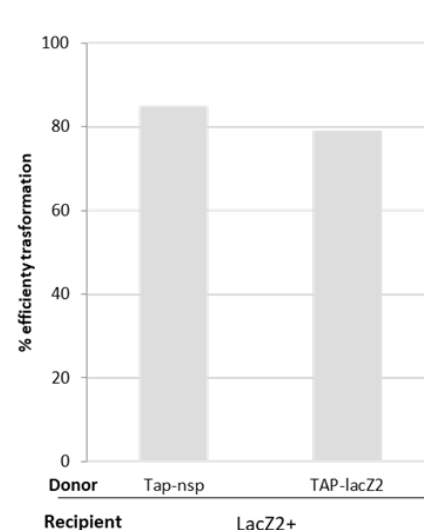
Valutazione dell'attività antibatterica di TAP-LacZ2 e valutazione dell'uccisione mediata da TAP nelle cellule di *E. coli* mirate



pBG29 (TAP-F-Kn-Cas9-LacZ2)
7641 bp



pBG29 TAP-F-Kn-Cas9-nsp
7631 bp

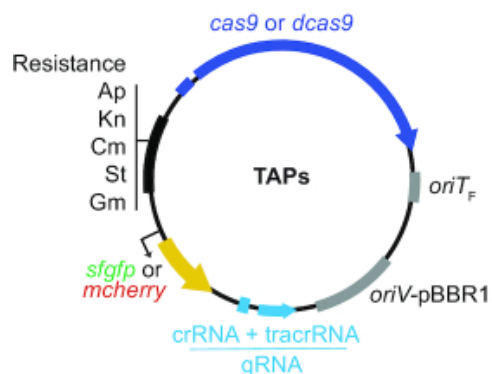


- L'acquisizione di TAP-LacZ porta a una diminuzione dei transconjuganti vitali e quindi a una diminuzione della vitalità cellulare di ~4 log
- Questa attività di uccisione può essere osservata nella mancanza di aumento del conteggio totale delle cellule riceventi durante l'accoppiamento con il ceppo donatore TAP-Cas9-lacZ2, rispetto a un aumento di ~20 volte con i donatori TAP-Cas9-nsp



Salmonella infantis

NAME	GENOTYPE	COMMENTS: Origine, Reference	PHENOTYPE
2020.PE.2340.1.6	S.infantis/pESI	IZSAM	St, Amp, Tc
B19	E. coli MG1655 rpsL + stR / F-Tn10 / F-TAP/CTMX1	Trasformazione E.coli / F-Tn10 con tap-CTMX1	St,Tc,Kn
B20	E. coli MG1655 rpsL + stR / F-Tn10 / F-TAP/DNAE	Trasformazione E.coli / F-Tn10 con tap-DNAE	St,Tc,Kn
B21	E. coli MG1655 rpsL + stR / F-Tn10 / F-TAP/RepB	Trasformazione E.coli / F-Tn10 con tap-RepB	St,Tc,Kn



Definizione del target

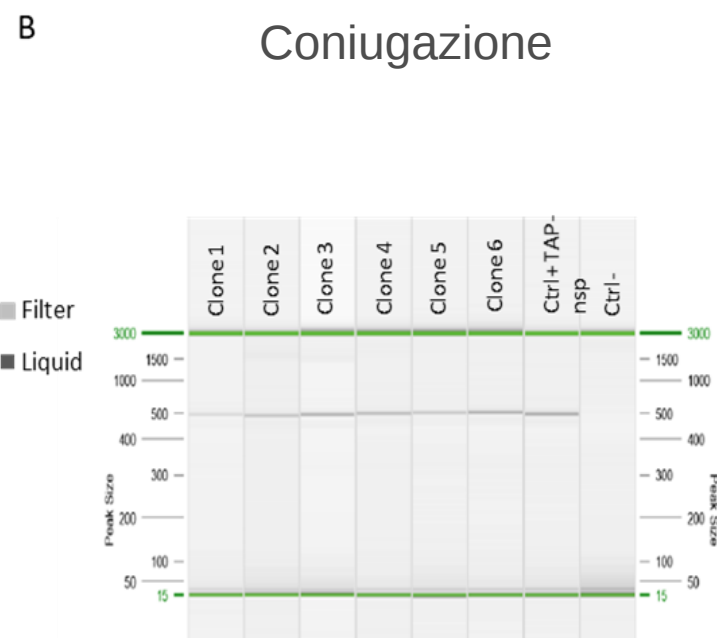
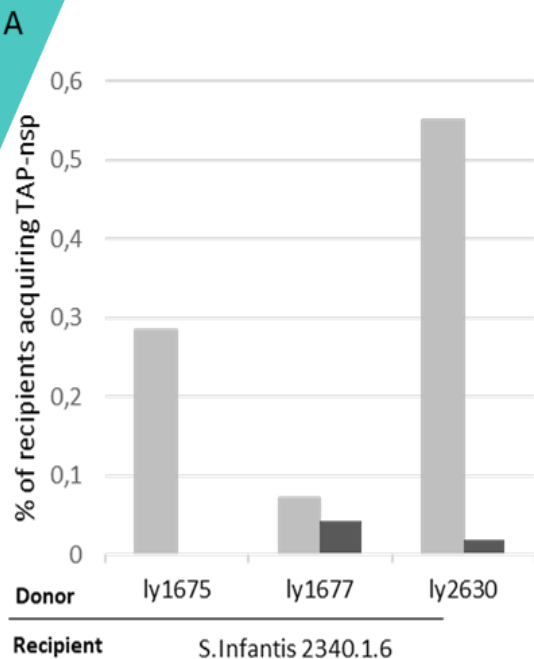
- Identificare la sequenza da inserire (es. gene, promotore, tag, etc.)
- Valutarne lunghezza, funzione
- Amplificazione del target
- Assemblaggio del plasmide
- Trasformazione e selezione dei ceppi donator sviluppati

Salmonella infantis – Risultati

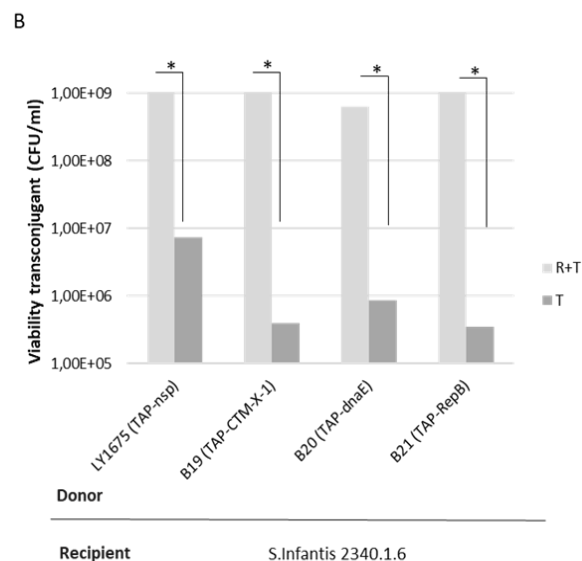
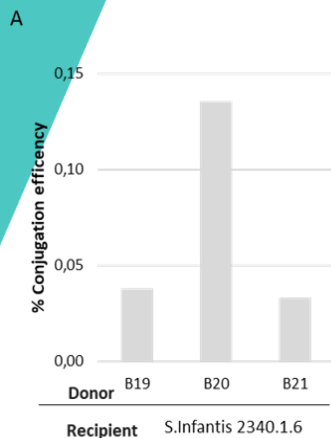
Progettazione e costruzione di nuovi plasmidi antibatterici mirati contro i geni specifici di *Salmonella infantis* e trasformazione di ceppi *E.coli* (MG1655 rpsl + stR/F-Tn10)

gene	type	function	predicted effect of the knockout/silencing
repB	plasmid gene	plasmid replication	progeny cured of the plasmid, antimicrobial susceptibility
dnaE	core gene	Polymerase III subunit, DNA replication	loss of viability
CTX-M-1	Antimicrobial resistance gene	Antimicrobial resistance to cephalosporine	antimicrobial susceptibility

Valutazione del trasferimento TAP-nsp mediato dal sistema di coniugazione del plasmide F-Tn10 nei ceppi di *Salmonella infantis*



- I ceppi donatori di *E. coli* hanno trasformato il ceppo di *S. infantis* acquisendo il TAP-nsp tramite il sistema coniugativo del plasmide F
- L'efficienza di coniugazione è stata misurata in condizioni di accoppiamento su filtro e in coltura liquida
- Il plasmide TAP-NSP viene trasferito in modo più efficiente in condizioni di coltura solida grazie alla capacità di stabilire un contatto stabile tra cellule donatrici e riceventi



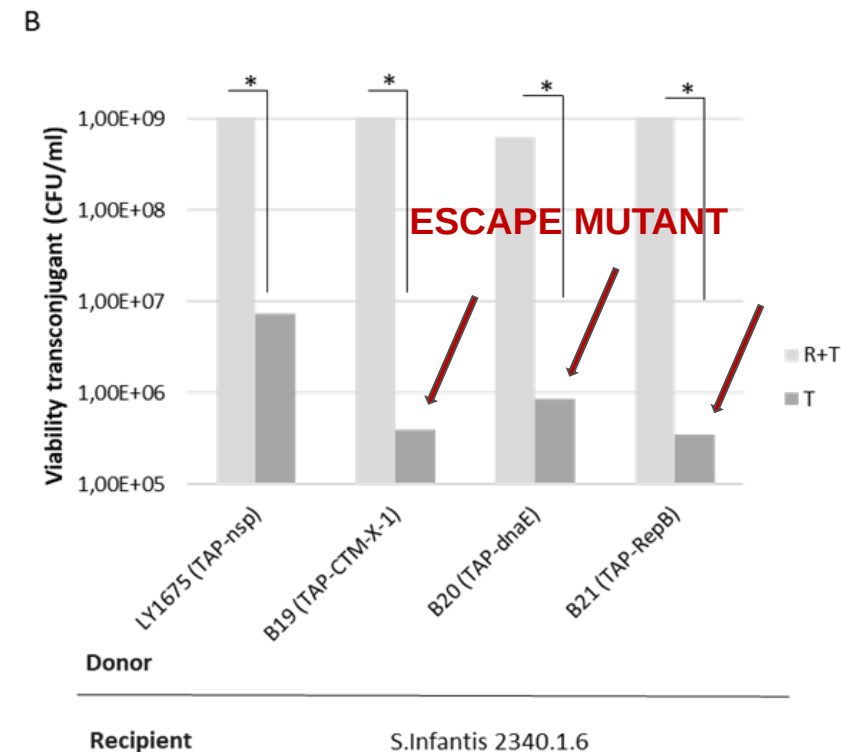
Salmonella infantis – TAP

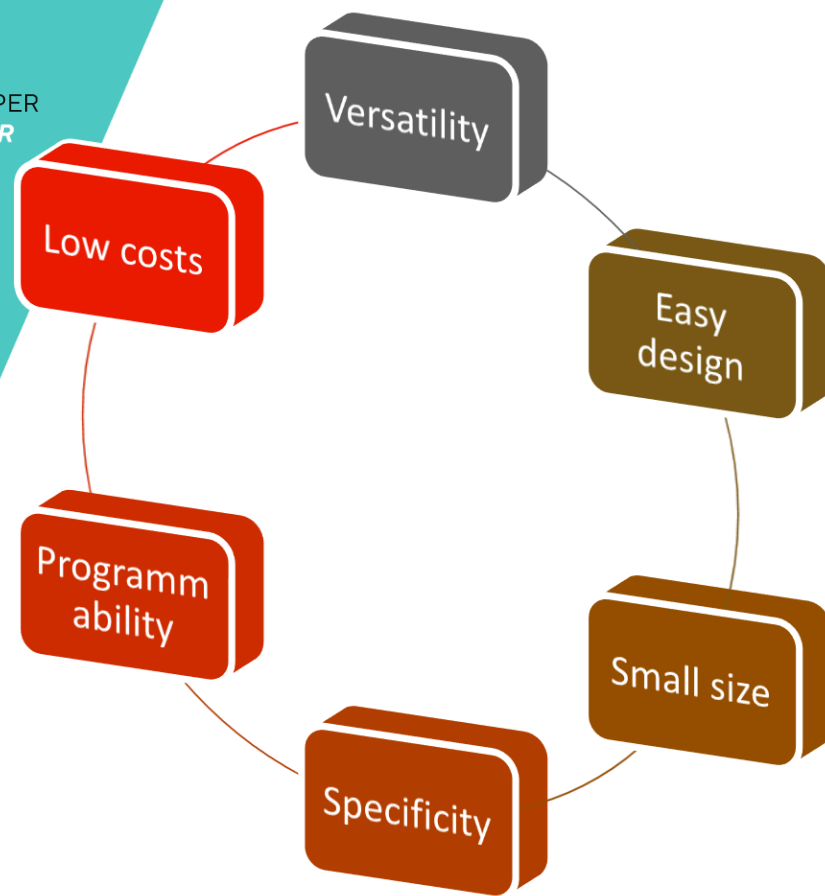
1. I plasmidi **TAP-nsp**, **TAP-CTX-M-1**, **TAP-dnaE** e **TAP-RepB** mostrano un'efficienza di trasferimento simile nelle cellule riceventi dopo 4 ore di accoppiamento, con valori compresi tra **0,03% e 0,14%**.
2. L'acquisizione del plasmide **TAP-CTX-M-1** comporta una significativa **riduzione della vitalità cellulare (~2 log)**. Questo effetto è dovuto al taglio del gene **CTX-M-1** mediato dalla proteina **Cas9**, che porta alla **ri-sensibilizzazione del ceppo *S. infantis* all'ampicillina**.
3. L'effetto di ri-sensibilizzazione è evidenziato dall'**assenza di aumento nel conteggio delle colonie riceventi** durante l'accoppiamento con il donatore **TAP-CTX-M-1**, rispetto all'incremento osservato con il donatore di controllo **TAP-nsp**.
4. Il donatore **TAP-dnaE** ha causato una **significativa riduzione della vitalità batterica**, attribuibile al **taglio del gene essenziale *dnaE***, responsabile dell'uccisione di *S. infantis*.
5. Con il donatore **TAP-RepB** si è osservata una **maggiore efficienza di trasferimento**. Il taglio del gene **RepB** da parte di **Cas9** ha portato all'**eliminazione del plasmide pESI**, che contiene il gene di resistenza all'**ampicillina**, determinando così la **ri-sensibilizzazione del ceppo**.

Salmonella infantis – Risultati

Formazione di cellule transconiuganti che sfuggono all'attività antibatterica di CRISPR mediata dai TAP

- Una percentuale di transconiuganti sopravvissuta nonostante l'acquisizione di TAP con sequenze specifiche
- 30 cloni transconiuganti per esperimento di coniugazione sono stati analizzati tramite sequenziamento WGS
- L'analisi della sequenza conferma la presenza di TAP sequenza-specifici nel genoma batterico, ma non sono evidenti mutazioni o delezioni nei geni target e nel sistema CRISPR





Conclusioni

- Il trasferimento dei TAP in *S. infantis* mostra un'efficienza bassa (0,03–0,15%) rispetto all'accoppiamento *E. coli*–*E. coli*, dove l'efficienza può raggiungere quasi il 100%. Nei trasferimenti tra ceppi filogeneticamente distanti di enterobatteri, l'efficienza varia dallo 0,01% al 10%, rappresentando un fattore limitante.
- Migliorare l'efficienza di coniugazione, ad esempio utilizzando i sistemi F-Tn10 e RP4, è cruciale per facilitare l'accoppiamento anche in comunità batteriche eterogenee. La creazione di plasmidi helper mutanti potrebbe essere una strategia utile per aumentare l'efficienza e ampliare lo spettro di ospiti batterici verso cui indirizzare i plasmidi antibatterici.
- L'eliminazione dei geni di resistenza mediata da CRISPR-Cas9 ha dimostrato di poter risensibilizzare efficacemente *S. infantis* agli antibiotici β -lattamici. In particolare, un plasmide antibatterico progettato contro il gene CTX-M-1 ha ripristinato la sensibilità all'ampicillina.
- Questi risultati indicano che il targeting dei TAP contro **bla-CTX-M-1** è una strategia promettente non solo per eliminare la resistenza, ma anche per prevenirne la diffusione, proteggendo sia i donatori che i riceventi privi di plasmidi.



Ministero della Salute



Francesca Marotta
Anna Janowicz
Roberta Di Romualdo
Teresa Romualdi
Federica Di Timoteo
Lisa Di Marcantonio
Katuscia Zilli
Elisa Di Domenico
Anna Abass
Eugenio Felicioni
Cecilia Villani
Giovanni Foschi