

38

Fecha de presentación: Septiembre, 2021

Fecha de aceptación: Noviembre, 2021

Fecha de publicación: Diciembre, 2021

APLICACIÓN DE CRISPR-CAS

PARA TRATAR INFECCIONES POR BACTERIAS RESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS

APPLICATION OF CRISPR-CAS TO TREAT INFECTIONS CAUSED BY ANTI-BIOTIC-RESISTANT BACTERIA

Freddy Raúl García Cárdenas¹

E-mail: ma.freddyrgc35@uniandes.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1328-6322>

Maria Fernanda Latorre Barragán¹

E-mail: ua.marialatorre@uniandes.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9280-705X>

¹ Universidad Regional Autónoma de Los Andes. Ecuador.

Cita sugerida (APA, séptima edición)

García Cárdenas, F. R., & Latorre Barragán, M. F. (2021). Aplicación de CRISPR-CAS para tratar infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos. *Revista Universidad y Sociedad*, 13(S3), 291-296.

RESUMEN

Esta revisión bibliográfica integra información de publicaciones centradas en la aplicación de sistemas basados en CRISPR-CAS para el tratamiento de infecciones bacterianas resistentes a antibióticos. Además, indaga acerca de las aplicaciones de estas técnicas para eliminar genes de resistencia a los antimicrobianos, genes de virulencia y plásmidos bacterianos. Los estudios citados indican que el sistema CRISPR-CAS es capaz de editar genes de patogenicidad, de resistencia antimicrobiana o eliminar bacterias de manera selectiva sin afectar el microbiota. Esto demuestra que CRISPR-CAS es viable para tratar infecciones bacterianas a nivel extracelular incluso para aquellas bacterias que son resistentes a los antimicrobianos de alto espectro e infecciones intracelulares en menor medida.

Palabras clave: CRISPR-CAS, infección bacteriana, resistencia antimicrobiana.

ABSTRACT

This literature review integrates information from publications focused on the application of CRISPR-CAS-based systems for the treatment of antibiotic-resistant bacterial infections. In addition, its inquiries about the applications of these techniques to eliminate antimicrobial resistance genes, virulence genes and bacterial plasmids. The cited studies indicate that the CRISPR-CAS system is capable of editing pathogenicity genes, antimicrobial resistance genes or selectively eliminating bacteria without affecting the microbiota. This demonstrates that CRISPR-CAS is viable for treating bacterial infections at the extracellular level even for those bacteria that are resistant to high-spectrum antimicrobials and intracellular infections to a lesser extent.

Keywords: CRISPR-CAS, bacterial infection, antimicrobial resistance.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas son consideradas de gran importancia sanitaria a nivel mundial por su potencial de causar altos índices de mortalidad y morbilidad. De hecho, se estima que las infecciones bacterianas son las causantes de aproximadamente 16 millones de muertes anuales. (Jiang et al. 2019).

A partir de 1928, año en que se descubre la actividad antimicrobiana de ciertos compuestos, los antibióticos han ayudado a contrarrestar las infecciones bacterianas, salvando numerosas vidas. Sin embargo, con el paso de los años los efectos bactericidas de los antibióticos han perdido su eficacia ante las bacterias dado a que estos patógenos poseen la capacidad para adaptarse rápidamente al medio y sobrevivir. Existen distintos procesos biológicos que invalidan la actividad de los antibióticos, como son: los mecanismos internos propios de las bacterias, la transferencia de sus plásmidos bacterianos (intercambio de genes) y las mutaciones que ocurren en los cromosomas de estos microorganismos (Peterson & Kaur, 2018). Estos procesos o mecanismos de resistencia permiten que las bacterias alteren su estructura para evitar que un antibiótico ingrese a su medio interno, modifiquen la molécula diana a nivel genético o postranscripcional y/o creen enzimas para romper el antimicrobiano.

Los factores que influyen para que las bacterias desarrollen resistencia a los antibióticos y que estimulan su expansión son: la resistencia natural asociada a sus cualidades estructurales, la ingesta desordenada y descontrolada de antimicrobianos, la aplicación de antibióticos como estimuladores de crecimiento en animales de granja, inmigración humana, liberación de compuestos antimicrobianos al medio ambiente, entre otros. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016), la resistencia a los antibióticos (RAM por sus siglas en inglés) forma parte de las primeras 10 amenazas de salud pública que enfrenta la humanidad. Las bacterias resistentes y multiresistentes pueden causar infecciones graves que pueden complicarse hasta causar la muerte del paciente. Las personas más vulnerables a estas infecciones son los pacientes inmunodeprimidos, los recién nacidos, las personas de la tercera edad y los pacientes con enfermedades graves.

Para enfrentar la resistencia a antimicrobianos se ha implementado sistemas de vigilancia y monitoreo de patógenos y sus mecanismos de resistencia, se han lanzado campañas para restringir el consumo innecesario de estos fármacos, se han mejorado las prácticas de producción animal, restringiendo el uso de antibióticos para su crecimiento (Marston et al, 2016). En los últimos años

sobresale el uso de herramientas genéticas enfocadas en controlar las bacterias resistentes a antibióticos. Una de estas herramientas se basa en el uso de CRISPR-CAS (por sus siglas en inglés), el cual es un sistema basado en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas. Este se desarrolló como una forma de inmunidad adaptativa en ciertas bacterias, el cual les sirve para combatir virus (bacteriófagos o fagos) que las invaden (Cho et al. 2018). Para esto, las bacterias incorporan material genético viral en una zona específica de su genoma y en caso de existir la presencia del virus atacante en una siguiente ocasión, se produce un ARN guía el cual se encarga de reconocer el material genético viral y por acción enzimática se genera la ruptura del genoma viral. Actualmente, este principio se ha usado para manipular molecularmente genes de interés en laboratorio lo cual ha generado gran variedad de aplicaciones, entre estas esta lucha en contra de la resistencia bacteriana.

En la presente revisión bibliográfica se recopila información de estudios enfocados en uso del sistema CRISPR-CAS en el tratamiento de infecciones bacterianas resistentes a antibióticos y su aplicación para la eliminación genes resistentes a los antimicrobianos, genes de virulencia y plásmidos bacterianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La recolección de datos se realizó mediante la búsqueda en las bases de datos Google Académico, Pubmed, Web of Science y Elsevier. Se seleccionaron artículos científicos publicados entre 2009 y 2021. Los criterios de búsqueda utilizados fueron “bacteria diseases”, “crispr as antimicrobial”, and “vectors for crispr”. Bajo estos detalles, la búsqueda arrojó un total de 250 artículos publicados en inglés, de los cuales se revisaron 53 artículos científicos. Los trabajos seleccionados están relacionados con las infecciones bacterianas, el uso de las herramientas de edición genética CRISPR, antibióticos y vectores para el transporte de CRISPR al interior de una bacteria.

RESULTADOS

Antibióticos y resistencia

Durante décadas, los antibióticos han sido los agentes antibacterianos más usados, sin embargo, su aparición trajo consigo la resistencia a los mismos. La capacidad que tienen las bacterias para adaptarse al medio que las rodea de una manera rápida y eficaz, ha generado que la humanidad se enfrente a un grave problema sanitario causado por infecciones que se creían controladas con el descubrimiento y desarrollo de los antimicrobianos. Hoy

en día las bacterias generan resistencia a una gran variedad de antibióticos, incluso a los más eficaces y fuertes como la vancomicina y colistina (Arcilla et al. 2016). En la tabla 1 se resume información acerca de las especies de bacterias y la resistencia que estas han generado a lo largo de los años.

Tabla 1. Principales bacterias con sus genes de resistencia a antibióticos.

Bacteria	Resistencia	Gen
Bacillus cereus	β-Lactámicos	cytK, entFM, ces
Campylobacter jejuni	Cloranfenicol	CAT
Citrobacter freundii	β-Lactámicos	ampC
Clostridium difficile	Cloranfenicol	tet44, catD
	Vancomicina	vanGCD
Clostridium perfringens	Cloranfenicol	Tn4451
	Bacitracina	ICECpl
	Lincomicina	tISCpe8
Escherichia coli	Fluoroquinolonas	aac-(6')-1b-cr, qnrB, qnrS
	β-Lactámicos	ampC
	Sulfamidas	sul1
	Colistina	Mcr-2
Enterococcus faecium	Daptomicina	liaR
Haemophilus parainfluenzae	Fluoroquinolonas	gyrA, parC
Klebsiella pneumoniae	Tretaciclina	RND
	Rifamicina	RND
	Cefalosporina	RND
	Fenicol	RND
	Triclosan	RND
	Fluoroquinilona	RND
Colistina		Mcr 1-5
Mycobacterium tuberculosis	Etambutol	embB
	Fosfomicina	murA
	Isoniazida	ndh
	Rifampicina	rpoC
Nesseria gonorrhoeae	Azitromicina	23S ARN
	Sulfamidas	folp
	Fluoroquinilonas	gyrA
Pseudomona aeruginosa	Fluoroquinilonas	parE, gyrA
	Imipenem	Opr
	Colistina	PA1199, PA1980, PA2583, PA5447, PA5548

Staphylococcus aureus	Rinfampicina	rpoB
	Vancomicina	vanA
	Fosfomicina	GlpT
	Lisocina	menA
	Daptomicina	pgsA
Salmonella entérica	Triclosán	gyrA
	Fluoroquinolonas	gyrA, gyrB, parC
Shigella sonnei	Fluoroquinilonas	gyrA
Streptococcus pneumoniae	Macrolidos	23S ARN
	Amoxicilina	PBP1a, PBP2b
	Fluoroquinolonas	parC
Streptococcus pyogenes	Sulfamidas	folp

Uso de CRISPR-CAS en infecciones bacterianas extracelulares

CRISPR-CAS

Actualmente, el uso de herramientas moleculares ha permitido aislar y manipular el sistema CRISPR-CAS para utilizarlo como una herramienta de edición genética con miras a tratar y/o combatir enfermedades e infecciones causadas por bacterias (Lee et al. 2014). Esto es posible gracias a la facilidad que existe para crear nucleasas programables guiadas por ARN y dirigir las con gran precisión hacia una secuencia específica. Existen diferentes tipos de CRISPR-CAS, no obstante, el tipo I y II son los más usados para eliminar bacterias de una forma muy selectiva. Estos pueden llegar y editar secuencias de los genes de resistencia a antibióticos, genes de virulencia o genes contenidos en plásmidos (Hidalgo-Cantabrana, et al. 2019). Esta técnica se ha aplicado tanto *in vitro* como *in vivo* consiguiendo una alta efectividad a la hora de eliminar bacterias. Por ejemplo, en un estudio se infectó y se trató a la polilla *Galleria mellonella* la cual fue previamente infectada con *E. coli* (Fuente-Núñez et al. 2017). De la misma manera, se realizó una infección *in vitro* a un ratón con *S. aureus* para posteriormente usar CRISPR-CAS como tratamiento antimicrobiano. En ambos estudios, se consiguió eliminar a las bacterias patógenas, las cuales contenían genes de patogenicidad y de resistencia a antibióticos. Además, la eliminación fue puntual y de manera selectiva, es decir, sin afectar la microbiota del huésped.

Autores como Gomaa *et al.* (2014) contribuyeron a esta propuesta, aplicando CRISPR-CAS como antimicrobiano en cultivos *in vitro* puros y mixtos y eliminando selectivamente cepas específicas de *E. coli* y *S. enterica* (Strich &

Chertow, 2019). Además, los autores Dong *et al.* demostraron que se puede utilizar CRISPR-CAS en *E. coli* para eliminar plásmidos resistentes a cloranfenicol.

Auto direccionamiento con CRISPR

El auto direccionamiento en el hospedador es un mecanismo enzimático, en el cual la actividad de CRISPR-CAS destruye el genoma del hospedador y eventualmente el genoma del fago que lo ataca. Este se ha desarrollado de manera natural, de hecho, se han registrado aproximadamente 330 especies de bacterias que lo llevan a cabo (Stern *et al.* 2010).

Se cree que este fenómeno se da por que se registran secuencias de ADN de la célula huésped en la matriz de su sistema CRISPR-CAS, induciendo a la destrucción de manera accidental (Stern *et al.* 2010). En base a este principio, se puede introducir secuencias propias del hospedador en su sistema CRISPR, lo cual puede lograr la eliminación de una gran cantidad de bacterias de manera controlada, incluso, con un solo espaciador. Tao Gong *et al.* utilizaron CRISPR-CAS para introducir secuencias de auto direccionamiento del gen de glucosiltransferasas del *S. mutans*, los cuales producen caries dental. El objetivo fue introducir mutaciones dentro del genoma de este microorganismo para cortar su locus de virulencia, y de esta manera inhibir su habilidad para formar las biopelículas dentarias y con esto prevenir las caries (38).

Fagos como vectores de CRISPR-CAS

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias pero son inofensivos para los humanos, animales y plantas (Gong *et al.* 2018). A estos virus se los conoce como *Caudovirales* entre los cuales se encuentran familias de *Myoviridae*, *Siphoviridae* and *Podoviridae* (Malik *et al.* 2017). Estos fagos pueden funcionar como vectores de secuencias genéticas o herramientas moleculares que permitan controlar poblaciones bacterianas. Los fagos que se utilizan para introducir material genético deben tener especificidad por las bacterias objetivo y capacidad para eliminarlas. La terapia con bacteriófagos es una alternativa cuando se trata infecciones por bacterias resistentes a antibióticos

Para esto, el vector viral se puede encapsular, mediante técnicas de ensamblaje estándar in vitro. Los genes diana se introducen a través de la cápside del fago o directamente en ADN del fago, posteriormente este inyectará dicho material genético en el interior de la bacteria y los espaciadores se registrarán en la matriz del sistema CRISPR-CAS (Reina & Reina, 2018). Una vez integrado, el sistema CRISPR-CAS corta el genoma en el loci indicado, destruyendo el material genético y con esto a la bacteria.

Es naturaleza que ciertos fagos tengan enzimas en su estructura que degraden polisacáridos presentes en la pared celular de las bacterias, lo cual destruye las biopelículas creadas por estos microorganismos (Cornelissen *et al.* 2011). Un ejemplo de este procedimiento se reportó por Bikard *et al.*, quienes utilizaron un bacteriófago para direccionar y eliminar genes de virulencia y plásmidos conteniendo genes de resistencia a los antibióticos en *S. aureus*. Como resultado se observó la disminución de la infección por esta bacteria en la piel de ratones de laboratorio. Este método se implementó para introducir el complejo CAS9-ARN guía y suprimir el gen *eae* de la *E. coli* entero hemorrágica. Este es un gen de virulencia que le permite al patógeno adherirse al epitelio intestinal.

Otros estudios reportaron el uso de fagos temperados para introducir el sistema CRISPR-CAS en *E. coli*. Este sistema fue desarrollado para eliminar únicamente los plásmidos que codifican para la resistencia a β -lactámicos y cefotaxima. Como resultado, se consiguió la eliminación de los genes de resistencia pero no se eliminó la bacteria, además que el sistema le otorgó inmunidad ante fagos líticos (Strich & Chertow, 2019)

Uso de CRISPR-CAS en infecciones bacterianas intracelulares

La evidencia científica plantea que es posible producir un auto ensamblaje del fago con el sistema CRISPR-CAS dentro estructuras no virales como: sílice o lípidos y llegar hasta el interior tanto de la célula huésped como la bacteria invasora. Para esto, los bacteriófagos son encapsulados a base de sílice, lo cual les permite evadir la respuesta inmunitaria del huésped sin perder ninguna función biológica. Esta técnica permite traspasar las 2 capas celulares (huésped y bacteria) y tratar infecciones bacterianas intracelulares como las causadas por *B. pseudomallei*.

Otra aplicación es la encapsulación de fagos en liposomas. Los liposomas son nanopartículas lipídicas muy simples, las cuales son usadas como vehículos para llevar fármacos, antibióticos, vacunas, entre otros. En este caso, los liposomas son usados para encapsular un conjunto de fagos previamente modificados. Esta técnica es viable teniendo en cuenta las características químicas de los liposomas así como su estabilidad, propiedades farmacocinéticas y su facilidad para atravesar las membranas celulares (Bozzuto & Molinari, 2015).

DISCUSIÓN

Esta revisión bibliográfica describe la aplicación del sistema CRISPR-CAS para tratar infecciones bacterianas resistentes a antibióticos y su aplicación para la eliminación

genes resistentes a los antimicrobianos, genes de virulencia y plásmidos bacterianos.

Si se compara los antimicrobianos de hace décadas con los de hoy en día son los mismos, sin embargo, las bacterias no lo son, ya que no poseen las mismas características, debido a que han evolucionado para adaptarse y contrarrestar los mecanismos de acción de un gran número de antibióticos (Peterson & Kaur, 2018). En otras palabras, esto vuelve inocuos a los antimicrobianos para las bacterias volviendo al inicio del problema de las enfermedades bacterianas. La evidencia científica demuestra que se puede manipular el sistema CRISPR desarrollado por las bacterias, como una herramienta de edición genética y enfrentar la gran problemática de la resistencia a antibióticos incluso prevenir y tartar enfermedades causadas por bacterias, incluso si una bacteria en particular no posee en sistema CRISPR se podría inocular en conjunto con el ARN guía para producir cortes en su genoma ya sea para eliminar o inactivar genes de dicho patógeno (Bikard & Barrangou, 2017). Los autores Bikard y Greene coinciden que su aplicación es viable gracias a la facilidad que hay para crear ARN que guían a la caspasa hacia un punto de corte específico (Greene, 2018). Con esto se puede manipular estas herramientas para eliminar cualquier tipo de bacteria extracelular que se tenga su secuencia genética. En el caso de bacterias que son parte de la microbiota y que su eliminación tendría consecuencias negativas, se puede utilizar CRISPR-CAS para eliminar o silenciar sus genes de virulencia o plásmidos bacterianos convirtiendo al microorganismo inofensivo para el huésped pero manteniendo la microbiota intacta. En este punto es importante remarcar un beneficio de CRISPR como tratamiento antibacteriano, ya que, a diferencias de los antibióticos farmacológicos que eliminan a todas las bacterias por igual (Calvo & Martínez-Martínez, 2009) CRISPR-CAS puede ser diseñado para ser altamente selectivo y que no afecta bacterias beneficiosas.

Para introducir el complejo CRISPR o ARN guías al interior de una bacteria se puede utilizar bacteriófagos como transportadores para tratar infecciones extracelulares. La ventaja de estos vehículos biológicos es que no producen toxicidad y su espectro antibiótico es bajo. Sin embargo, existen limitaciones en este punto debido a que los fagos deben ser específicos para la bacteria objetivo, y pueden presentar problemas de disponibilidad. Por otro lado, para tratar infecciones por bacteria intracelulares los fagos únicamente no son suficientes para atravesar las 2 membranas celulares, en este caso es necesario que los virus sean encapsulados en nanopartículas de sílice o liposomas las cuales le permitan sobrevivir a la respuesta inmunitaria del huésped y mantener intacta sus

funciones. Aún es necesarios estudios que ayuden a validar la aplicación estas nanopartículas y encontrar nuevos métodos para transportar el complejo CRISPR-CAS al interior de una célula eucariota de forma segura.

CONCLUSIONES

CRISPR-CAS es una herramienta que se puede implementar para el tratamiento antibiótico. Esta herramienta molecular puede ser utilizada de manera selectiva, eliminando únicamente los genes que codifican para los factores de virulencia y/o de resistencia. Esto asegura un tratamiento que previene el desarrollo de infecciones difíciles de tratar, así como evitar la alteración de la microbiota del huésped. De la misma manera, se puede aplicar este principio para eliminar poblaciones enteras de alguna cepa de bacteria manteniendo con vida a las bacterias deseadas.

Los estudios aquí revisados demuestran que CRISPR-CAS es viable para tratar cualquier infección bacteriana a nivel extracelular incluso para aquellas que son resistentes a los antimicrobianos de alto espectro.

Contrarrestar una bacteria con CRISPR a nivel intracelular es un área que aún requiere estudios dado a que los vectores disponibles no han sido bien estandarizados y/o experimentados. Para esto, es necesario el desarrollo de nuevos vectores que permitan introducir CRISPR-CAS con efectividad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arcilla, M. S., van Hattem, J. M., Matamoros, S., Melles, D. C., Penders, J., de Jong, M. D., & Schultsz, C. (2016). Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet infectious diseases*, 16(2), 147-149.
- Bikard, D., & Barrangou, R. (2017). Using CRISPR-Cas systems as antimicrobials. *Current opinion in Microbiology*, 37, 155-160.
- Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International journal of nanomedicine*, 10, 975; 1-25.
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(1), 44-52.
- Cho, S., Shin, J., & Cho, B. K. (2018). Applications of CRISPR/Cas system to bacterial metabolic engineering. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1089.

- Cornelissen, A., Ceysens, P. J., T'syen, J., Van Praet, H., Noben, J. P., Shaburova, O. V., ... & Lavigne, R. (2011). The T7-related *Pseudomonas putida* phage ϕ 15 displays virion-associated biofilm degradation properties. *PloS one*, 6(4), e18597.
- Fuente-Núñez, C., Torres, M. D., Mojica, F. J., & Lu, T. K. (2017). Next-generation precision antimicrobials: towards personalized treatment of infectious diseases. *Current opinion in microbiology*, 37, 95-102.
- Gomaa, A. A., Klumpe, H. E., Luo, M. L., Selle, K., Barrangou, R., & Beisel, C. L. (2014). Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems. *MBio*, 5(1), e00928-13.
- Gong, T., Tang, B., Zhou, X., Zeng, J., Lu, M., Guo, X., ... & Li, Y. (2018). Genome editing in *Streptococcus mutans* through self-targeting CRISPR arrays. *Molecular oral microbiology*, 33(6), 440-449.
- Greene, A. C. (2018). CRISPR-based antibacterials: transforming bacterial defense into offense. *Trends in biotechnology*, 36(2), 127-130.
- Hidalgo-Cantabrana, C., Goh, Y. J., & Barrangou, R. (2019). Characterization and repurposing of type I and type II CRISPR-Cas systems in bacteria. *Journal of molecular biology*, 431(1), 21-33.
- Jiang, Q., Chen, J., Yang, C., Yin, Y., & Yao, K. (2019). Quorum sensing: a prospective therapeutic target for bacterial diseases. *BioMed Research International*, 1(special issue), 1-9.
- Lee, J. Y., Na, I. Y., Park, Y. K., & Ko, K. S. (2014). Genomic variations between colistin-susceptible and-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates and their effects on colistin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(5), 1248-1256.
- Malik, D. J., Sokolov, I. J., Vinner, G. K., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladislavjevic, G. T., ... & Kirpichnikova, A. (2017). Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Advances in colloid and interface science*, 249, 100-133.
- Marston, H. D., Dixon, D. M., Knisely, M., Palmore, T. N., & Fauci, A. S. (2016). Resistencia antimicrobiana. *JAMA*, 316(11), 1193-204.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf>
- Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in microbiology*, 9, 2928, 1-21.
- Reina, J., & Reina, N. (2018). Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia?. *Revista Española de Quimioterapia*, 31(2), 101.
- Stern, A., Keren, L., Wurtzel, O., Amitai, G., & Sorek, R. (2010). Self-targeting by CRISPR: gene regulation or autoimmunity? *Trends in genetics*, 26(8), 335-340.
- Strich, J. R., & Chertow, D. S. (2019). CRISPR-Cas biology and its application to infectious diseases. *Journal of clinical microbiology*, 57(4), e01307-18.