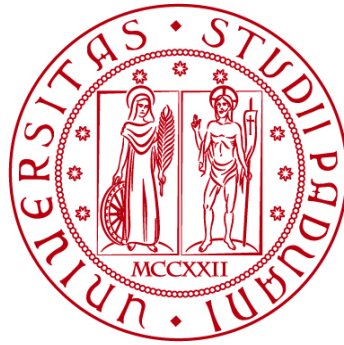


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**SYNTHETIC BIOLOGY IN ESCAPE
BACTERIA**

**Relatore: Prof.ssa Claudia Del Vecchio
Dipartimento di Medicina Molecolare**

Laureando: Alex Martini

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

1. ABSTRACT.....	1
2. INTRODUZIONE.....	2
2.1 L'ANTIBIOTICO RESISTENZA	2
2.1.1 MECCANISMI ALLA BASE DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA.....	2
2.1.2 EPIDEMIOLOGIA E IMPATTO SULLA SALUTE PUBBLICA DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA.....	3
2.1.3 FATTORI ALLA BASE DELL'INSORGENZA DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA.....	4
2.2 I BATTERI ESKAPE.....	5
2.2.1 MECCANISMO DI RESISTENZA IN <i>K. pneumoniae</i>	5
2.2.2 RUOLO DI <i>K.pneumoniae</i> NELLA DIFFUSIONE DELL'AMR	6
3. SCOPO TESI.....	8
4. MATERIALI E METODI.....	9
4.1 MATERIALI	9
4.1.1 PLASMIDE pSB1A2	9
4.1.2 PLASMIDE pSGAb- Km.....	9
4.1.3 FAGEMIDE pTZ19R_I13521.....	9
4.1.4 CEPPI BATTERICI	10
4.1.5 TERRENI DI COLTURA	11
4.1.6 SOSPENSIONE DI SEPIOLITE	11
4.1.7 OLIGONUCLEOTIDI	11
4.2 METODI	12
4.2.1 PROPAGAZIONE DEL PLASMIDE PSGAB-KM	12
4.2.2 ESTRAZIONE DEL DNA PLASMIDICO DA COLTURE MINIPREP.....	12
4.2.3 DIGESTIONE ENZIMATICA E PURIFICAZIONE DI pSGAb-km	13
4.2.4 REAZIONE DI LIGAZIONE	13
4.2.5 SEQUENZIAMENTO	14
4.2.6 PREPARAZIONE DI CELLULE COMPETENTI DI <i>K. pneumoniae</i>	14
4.2.7 ELETTROPORAZIONE DI <i>K. pneumoniae</i>	14
4.2.8 TRIBOS TRANSFORMATION	14
5. RISULTATI.....	16
5.1 OTTENIMENTO DI pSGAb iGEM.....	16
5.2 OTTENIMENTO DI pSGAb_I13507	17
5.3 OTTIMIZZAZIONE DEI PROTOCOLLI DI TRASFORMAZIONE di <i>K. pneumoniae</i>	18
5.3.1 ELETTROPORAZIONE	18
5.3.2 TRIBOS TRANSFORMATION	20
6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE	21
7. BIBLIOGRAFIA.....	23

1. ABSTRACT

La resistenza antibiotica (AMR) è considerata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità come una delle dieci principali minacce per la salute pubblica a livello mondiale.

L'OMS conta più di 700 mila morti all'anno e stima che entro il 2050 questo numero supererà i 10 milioni.

L'antibiotico resistenza è da attribuirsi ad un gruppo di microrganismi patogeni riassunti sotto la sigla ESKAPE (*E.faecium*, *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *A. spp.*, *P.aeruginosa*, *E.coli*).

In questo quadro, emerge l'importanza della ricerca di nuove strategie terapeutiche da impiegare in alternativa o in supporto all'uso degli antibiotici.

Questo progetto di tesi, nell'ambito del progetto PASTA (Phage Assisted Silencing Tool against Antibiotic resistant), si propone lo sviluppo di un approccio basato sulla specificità dei batteriofagi come piattaforma di delivery e sulla tecnologia di CRISPR interference al fine di silenziare geni batterici implicati nell'antibiotico resistenza e sviluppare una nuova strategia terapeutica da affiancare al comune utilizzo degli antibiotici per ottenere un effetto sinergico degli stessi. In particolare l'elaborato si focalizza sulla trasformazione del batterio *K.pneumoniae* al fine di trasferire il plasmide contenente il gene che trascrive la dCAS9 e la guida, implicata nel riconoscimento della sequenza target coinvolta nell'antibiotico resistenza.

2. INTRODUZIONE

2.1 L'ANTIBIOTICO RESISTENZA

La resistenza antimicrobica (AMR) è un fenomeno naturale che si verifica quando i microrganismi diventano resistenti agli antibiotici a cui erano precedentemente sensibili a causa della pressione selettiva esercitata dagli stessi, favorendo la sopravvivenza dei batteri che hanno acquisito tratti di resistenza agli antibiotici. Gli antibiotici non risultano pertanto più attivi nel trattamento delle infezioni causate da questi microrganismi, con il risultato che un numero sempre crescente di infezioni causate da batteri, diventano più difficili o impossibili da trattare.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha da tempo riconosciuto la necessità di uno sforzo globale coordinato per contenere la diffusione dell'AMR. Nel 2001, la strategia globale dell'OMS per il contenimento della resistenza antimicrobica ha fornito un quadro di interventi atti a rallentare l'emergere e ridurre la diffusione di microrganismi resistenti agli antimicrobici, così come per incoraggiare lo sviluppo di nuovi farmaci e vaccini appropriati.

A seguito dell'indicazione di un ruolo primario per la sorveglianza, nel 2014, l'OMS ha pubblicato il primo rapporto globale sulla sorveglianza dell'AMR raccogliendo esperienze dalle reti di sorveglianza nazionali e internazionali. Questo rapporto mostra che i dati di sorveglianza, ove disponibili, possono essere molto utili per orientare le scelte di trattamento, comprendere le tendenze della diffusione dell'AMR e identificare le aree dove intervenire per contenere la stessa.

La mancanza di un'adeguata sorveglianza a livello mondiale lascia tuttavia importanti lacune nella conoscenza esistente della distribuzione e dell'estensione di questo fenomeno. [1]

2.1.1 MECCANISMI ALLA BASE DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA

Esistono due tipi di resistenza agli antibiotici: la resistenza naturale, che può essere ulteriormente suddivisa in resistenza intrinseca e resistenza indotta, e la resistenza acquisita. [2]

La resistenza intrinseca si verifica quando le specie batteriche sono naturalmente resistenti a determinate classi di antibiotici indipendentemente da una precedente esposizione agli stessi. Ad esempio, alcune specie come *E.coli* mostrano resistenza intrinseca alla vancomicina (antibiotico che agisce interferendo con la sintesi della parete cellulare batterica, legandosi al terminale D-alanina-D-alanina del precursore del peptidoglicano, impedendo l'aggiunta di nuovi peptidi e la formazione di legami crociati all'interno della parete cellulare batterica).

In alternativa, la resistenza naturale può essere indotta in risposta all'esposizione agli antibiotici stessi, che agiscono come molecole segnale, responsabili

dell'attivazione dei fattori di trascrizione che regolano l'espressione dei geni coinvolti nei meccanismi di antibiotico resistenza.

La resistenza acquisita, d'altra parte, può verificarsi attraverso due processi distinti che vedono rispettivamente l'acquisizione diretta di mutazioni a carico del DNA con la possibilità di trasmissione della stessa alla progenie (trasmissione verticale) o il trasferimento genico orizzontale di elementi genici appartenenti ad un microrganismo della stessa specie o di diverse specie. Il secondo processo comprende tre diversi meccanismi di trasferimento ovvero: la trasformazione (il batterio ricevente assorbe il DNA extracellulare proveniente da un donatore), la trasduzione (il DNA del donatore viene trasferito attraverso un batteriofago che infetta il batterio ricevente) e la coniugazione (il batterio donatore trasferisce il suo DNA al batterio ricevente tramite apposite strutture).

Indipendentemente dalla natura alla base dell'insorgere della resistenza bisogna tenere in considerazione che l'AMR non è attribuibile ad un singolo meccanismo bensì è il risultato di processi complessi che dipendono dal meccanismo d'azione dell'antibiotico stesso. È pertanto possibile classificare i diversi antibiotici sia sulla base del loro meccanismo d'azione, sia sui principali meccanismi di resistenza coinvolti, che includono: la diminuzione dell'assorbimento del farmaco, l'alterazione del bersaglio del farmaco, l'inattivazione del farmaco e l'attivazione delle pompe di efflusso per il farmaco. [3]

I principali meccanismi d'azione e di resistenza sono riportati nella tabella 1.

<i>Gruppi di antibiotici</i>	<i>Meccanismo d'azione</i>	<i>Meccanismo di resistenza</i>
<i>β-Lattamici Penicilline Cefalosporine Carbapenemi</i>	Inibitori della sintesi della parete cellulare	Produzione di beta-lattamasi, Penicillinasi, Cefalosporinasi, Carbapenemasi.
<i>Inibitori delle β-lattamasi</i>	Inibitori dell'attività degli enzimi beta-lattamasi	Beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL)
<i>Aminoglicosidi, Cloramfenicolo, Macrolidi, Tetracicline</i>	Inibitori della sintesi dei ribosomi	Multifattoriale (modificazione enzimatica, modifica del sito bersaglio e pompe di efflusso)
<i>Fluorochinoloni</i>	Inibitori della replicazione del DNA	Multifattoriale (mutazioni geniche del sito bersaglio, pompe di efflusso e enzimi modificatori)
<i>Sulfonamidi e trimetoprim</i>	Inibitori del metabolismo dell'acido folico	Diffusione orizzontale di geni di resistenza, mediata da trasposoni e plasmidi, che esprimono varianti insensibili al farmaco degli enzimi bersaglio.

Tabella 1 Principali meccanismi d'azione e di resistenza delle diverse classi di antibiotici

2.1.2 EPIDEMIOLOGIA E IMPATTO SULLA SALUTE PUBBLICA DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA

L'impatto della resistenza agli antibiotici in termini di mortalità e di costo della salute pubblica è piuttosto difficile da stimare. Il Centro statunitense per il controllo

e la prevenzione delle malattie (CDC) ha stimato in modo conservativo che, negli Stati Uniti, più di due milioni di persone ogni anno sono affette da infezioni resistenti agli antibiotici, con circa 35 000 morti l'anno.

In Europa ogni anno, il numero di infezioni e decessi dovuti ai batteri multiresistenti è stato stimato rispettivamente intorno ai 400 000 infetti e 25 000 decessi.

Le infezioni causate da ceppi batterici multiresistenti sono inoltre tra i principali fattori che influenzano la morbilità e la mortalità nei pazienti sottoposti a numerose procedure ospedaliere, quali: chemioterapia, trapianto di organi, interventi chirurgici, terapia intensiva neonatale e molte altre.

Anche l'impatto economico della resistenza agli antibiotici è difficile da quantificare, poiché devono essere presi in considerazione diversi tipi di fattori. L'aumento della resistenza porta difatti: all'utilizzo di farmaci di seconda e terza linea (spesso più costosi), all'utilizzo di attrezzature specializzate, a degenze ospedaliere più lunghe e procedure di isolamento per i pazienti. A questi si aggiungono i costi sociali legati alle morti e alla perdita di produttività. Secondo uno studio commissionato dalla Commissione Europea nel 2018, si stima che l'AMR abbia un impatto economico annuo di oltre 1,5 miliardi di euro in termini di costi diretti e indiretti, con € 600.000.000 di perdita in produttività.

Negli Stati Uniti, il CDC ha stimato il costo del fenomeno dell'antibiotico resistenza a 55 miliardi di dollari all'anno con 20 miliardi di dollari in eccesso per costi sanitari diretti, e fino a 35 miliardi di dollari per i costi legati all'aspetto sociale. [1]

2.1.3 FATTORI ALLA BASE DELL'INSORGENZA DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA

Ci sono quattro settori principalmente coinvolti nello sviluppo della resistenza agli antibiotici: la medicina umana, la zootecnia, l'agricoltura e l'ambiente.

In medicina umana, l'eccessiva prescrizione di antibiotici (spesso associata ad incertezza diagnostica), l'automedicazione ed il mancato completamento del trattamento raccomandato svolgono un ruolo fondamentale nel creare le condizioni che favoriscono l'adattamento dei microrganismi e l'insorgere dell'AMR.

Secondo la relazione annuale della rete europea di sorveglianza del consumo di antimicrobici (ESAC-Net), nel 2021 il consumo di antibiotici nella comunità europea variava da 10,1 dosi giornaliere per 1000 abitanti al giorno in Svezia ed Estonia a 25,7 dosi giornaliere per 1000 abitanti al giorno in Romania.

A questo si aggiunge l'uso di antimicrobici in zootecnia, al fine di promuovere la crescita degli animali e prevenirne le malattie. Così come nell'agricoltura, dove questo è associato all'aumento della frequenza dei geni di resistenza nei batteri epifiti, con il rischio che questi possano quindi essere trasferiti a batteri clinicamente importanti.

Negli ultimi anni, è stata infine riconosciuta l'importanza dell'ambiente nella diffusione della resistenza: in particolare del suolo, considerato un serbatoio di geni

di resistenza agli antibiotici. Inoltre, le acque reflue potenzialmente contaminati da microrganismi fecali, fertilizzanti organici e metaboliti degli antibiotici stessi possono diffondere batteri resistenti nel suolo e creare un ambiente favorevole all'insorgere di geni di resistenza negli stessi microrganismi del suolo. [1]

2.2 I BATTERI ESKAPE

Nel febbraio 2017, alla luce della crescente resistenza agli antibiotici, l'OMS ha pubblicato un elenco di sei agenti patogeni designati dall'acronimo ESKAPE (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. spp.*, *P. aeruginosa*, *E. coli*), associati a numerose infezioni nosocomiali e che presentano spesso multi resistenza agli antibiotici. Questo li rende difficili da trattare causando problemi significativi di salute pubblica. [3]

Nel 2019 i batteri ESKAPE sono stati responsabili, con oltre 250.000 decessi, della maggior parte dei decessi associati alla resistenza antimicrobica (AMR).

Le principali combinazioni batterio-resistenza includono *S. aureus* resistente alla meticillina, *E. coli* resistente alle cefalosporine di terza generazione, *A. baumannii* resistente ai carbapenemi e *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi.

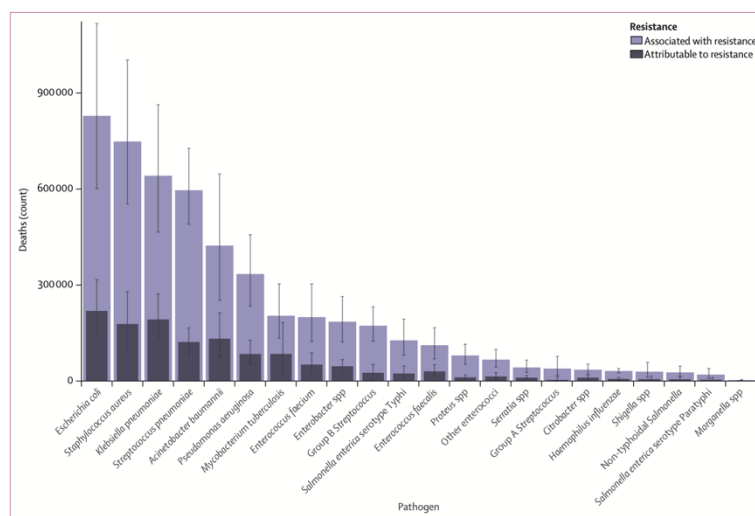


Figura 1 Andamento della mortalità associata ad AMR, 2019

Alla luce di questi dati nel 2019, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha incluso la resistenza antimicrobica come una delle prime dieci minacce alla salute globale.

2.2.1 MECCANISMO DI RESISTENZA IN *K. pneumoniae*

K. pneumoniae è un membro della famiglia Enterobacterales, bacillo gram-negativo comunemente dotato di capsula che può causare diversi tipi di infezioni nosocomiali e acquisite in comunità, tra cui infezioni del tratto urinario, polmonite, infezioni del sito chirurgico e infezioni del torrente circolatorio.

K. pneumoniae è intrinsecamente resistente all'ampicillina a causa della presenza di un gene chiamato penicillinasi SHV-1 nel suo cromosoma.

La resistenza ad altri farmaci può occasionalmente svilupparsi attraverso mutazioni cromosomiche, ma la maggior parte della resistenza antimicrobica in *K. pneumoniae* è dovuta all'acquisizione di geni attraverso il trasferimento orizzontale, principalmente tramite plasmidi coniugativi di grandi dimensioni. L'accumulo di determinanti di resistenza in un singolo ceppo può portare alla formazione di ceppi pan-resistenti che non possono essere trattati con gli antibiotici ad oggi disponibili. Recentemente, si è osservato un rapido aumento del numero di ceppi di *K. pneumoniae* multiresistenti, con particolare attenzione rivolta a quelli che producono beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL). Questi ceppi mostrano resistenza alle penicilline, alle cefalosporine (comprese le cefalosporine di terza generazione) e all'aztreonam. [1]

Inoltre, è di notevole rilevanza clinica la presenza di ceppi di *K. pneumoniae* appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae (CRE) resistenti ai carbapenemi in quanto questi ultimi costituiscono spesso l'ultima opzione terapeutica per le infezioni persistenti da batteri gram-negativi. [3][5]

2.2.2 RUOLO DI *K.pneumoniae* NELLA DIFFUSIONE DELL'AMR

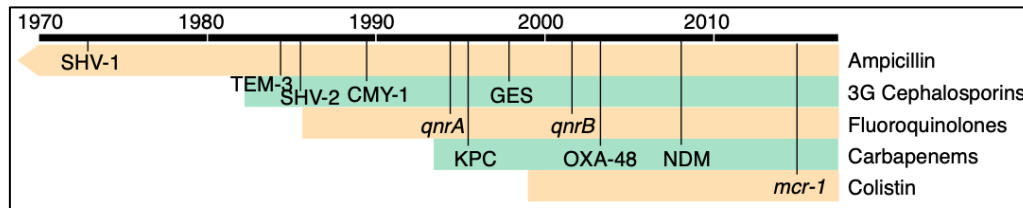
Oltre ad essere un problema clinico significativo di per sé, *K.pneumoniae* è la specie all'interno della quale sono stati scoperti diversi nuovi geni di resistenza agli antibiotici prima di diffondersi ad altri agenti patogeni (ad esempio i geni di resistenza ai carbapenemi KPC, OXA-48 e NDM-1). Sebbene sia impossibile quantificare il contributo specifico di *K. pneumoniae* alla crisi globale dell'AMR, le evidenze attuali suggeriscono che questo batterio ha una distribuzione ecologica più ampia, una composizione del DNA più varia, una maggiore diversità genica dell'AMR e un maggior numero di plasmidi rispetto ad altri batteri opportunisti Gram-negativi. Pertanto, è probabile che *K. pneumoniae* svolga un ruolo chiave nella diffusione dei geni di resistenza antimicrobica dai microbi ambientali agli agenti patogeni clinicamente rilevanti. A conferma di questo si osserva che nei genomi di *K. pneumoniae* sono presenti oltre 400 geni di resistenza acquisiti, il doppio rispetto a *E. coli* e il 50% in più rispetto alle altre specie, nonché un contenuto medio di G+C dei geni accessori che varia dal 20% al più del 70%, indicando che provengono da donatori tassonomicamente diversificati.

Inoltre si è notato che *K. pneumoniae* ospita mediamente tre plasmidi per microrganismo, un valore significativamente superiore rispetto ad altre specie, che dimostra la notevole permissività nei confronti dell'acquisizione e della trasmissione di plasmidi da parte dello stesso.

K. pneumoniae è pertanto un importante veicolo per la disseminazione dei geni di resistenza agli antibiotici tra diverse popolazioni batteriche associate all'uomo. Questo è spiegabile osservando la sua distribuzione ecologica ampia, così come la sua presenza in numerosi microbiomi umani e animali, che aumentano l'esposizione

di *K. pneumoniae* all'uso di antimicrobici e favoriscono il contatto con altri agenti patogeni clinicamente importanti.

È importante sottolineare inoltre che non sembrano esserci sottopopolazioni distinte di *K. pneumoniae* tra fonti umane, animali e ambientali, suggerendo che gli isolati provenienti da diverse nicchie possano interagire e scambiarsi geni di resistenza. Questo fenomeno contribuisce alla diversificazione genetica e alla diffusione dei geni di resistenza. [6][7]



Cronologia dei geni AMR mobili rilevati per la prima volta in *K. pneumoniae*. L'ombreggiatura indica il periodo da cui sono stati riportati isolati di *K. pneumoniae* resistenti a ciascuna classe di farmaci; da allora sono stati tutti riportati in Enterobacteriaceae clinicamente importanti e altri batteri Gram-negativi. Nota che la resistenza all'ampicillina è intrinseca a *K. pneumoniae* a causa del gene cromosomico beta-lattamasi SHV-1, e questo gene ha dimostrato di essere mobilitato dai plasmidi in *E. coli* e *K. pneumoniae* negli anni '70. Gli altri geni mostrati non hanno avuto origine in *K. pneumoniae*, ma sono stati rilevati per la prima volta in forma mobile (cioè all'interno di elementi genetici mobili sui plasmidi) negli isolati di *K. pneumoniae*

(modificato da K. L. Wyres and K. E. Holt, "Klebsiella pneumoniae as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 45. Elsevier Ltd, pp. 131–139, Oct. 01, 2018. doi: 10.1016/j.mib.2018.04.004)

3. SCOPO TESI

L'Italia, insieme a Grecia, Romania e Bulgaria rappresenta una delle nazioni più colpite dalla resistenza antibiotica (AMR) con una stima di circa 11.000 morti l'anno, secondo l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Il fenomeno dell'antibiotico resistenza è da attribuirsi ad un numero ristretto di microrganismi patogeni riassunti con l'acronimo ESKAPE (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. spp.*, *P. aeruginosa*, *E. coli*).

Dai dati presenti in letteratura abbiamo constatato come la principale problematica associata all'AMR è la difficoltà nella ricerca di nuove molecole terapeutiche; correlate a costi di sviluppo a volte difficilmente sostenibili e tempi di ricerca troppo lenti per fronteggiare la velocità con cui questa problematica avanza.

In tale contesto, il progetto, PASTA (Phage Assisted Silencing Tool against Antibiotic resistant), si prefigge lo sviluppo di un approccio basato sulla specificità dei batteriofagi quale piattaforma di delivery associata alla tecnologia di CRISPR interference al fine di silenziare geni batterici implicati nell'antibiotico resistenza. Il sistema sviluppato non vuole sostituire la terapia antibiotica, bensì affiancarsi ad essa affinché l'approccio sinergico abbia un'efficacia migliore.

In particolare questo elaborato si focalizzerà sulle tecniche di trasformazione del batterio *K. pneumoniae* richieste per il trasferimento del plasmide contenente le sequenze geniche che garantiscono l'espressione della guida e dCAS9, implicati nel riconoscimento della sequenza target coinvolta nell'antibiotico resistenza.

4. MATERIALI E METODI

4.1 MATERIALI

4.1.1 PLASMIDE pSB1A2

pSB1A2 è un plasmide ad alto numero di copie che porta resistenza all'ampicillina. Questo presenta tra le sequenze di suffisso e prefisso la cassetta iGEM i13507 di 887 pb, contenente la sequenza Ribosome Binding Site_b0034, il gene reporter rfp BBA_e1010 e il terminatore BBA_b0015.

4.1.2 PLASMIDE pSGAb- Km

pSGAb- Km: ha una dimensione di 6073 bp.

Presenta il gene di resistenza alla Kanamicina e due siti ORI (Origin of Chromosome replication) che ne permettono la rispettiva replicazione in *E. coli* e in *A. baumannii* e *K. Pneumoniae*. È presente il promotore J23119 contenente al suo interno un sito di restrizione per SpeI. Il promotore è derivato da *E. coli* ed è un promotore di forza moderata con la capacità di funzionare in una vasta gamma di microrganismi.

Ulteriori elementi sono rappresentati in figura 2.

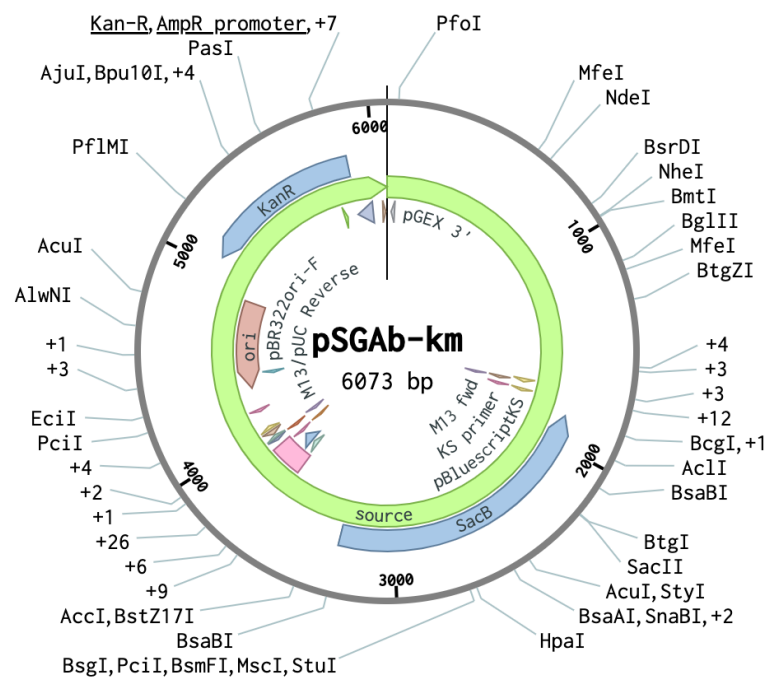


Figura 2 Mappa di pSGAb-km

4.1.3 FAGEMIDE pTZ19R_I13521

pTZ19R_I13521 ha una dimensione di 3807 bp e contiene il gene reporter RFP.

Nella regione upstream (a monte) e downstream (a valle) di questa sequenza, si trovano due elementi noti come prefisso e suffisso, che costituiscono un sistema standardizzato per l'identificazione e la condivisione delle parti genetiche. Questi elementi consentono inoltre la sostituzione del gene reporter con un gene di interesse mediante una reazione di digestione enzimatica seguita da una reazione di ligazione.

Il fagemide contiene inoltre il gene di resistenza all'Ampicillina (AmpR), utilizzato come marcatore di selezione positiva, e un sito ORI (Origin of Chromosome replication) che ne permette la replicazione in *E.coli*.

E poi presente una sequenza IR denominata f1 origin che rappresenta il segnale di incapsidamento dello stesso.

Ulteriori elementi sono rappresentati in figura 3.

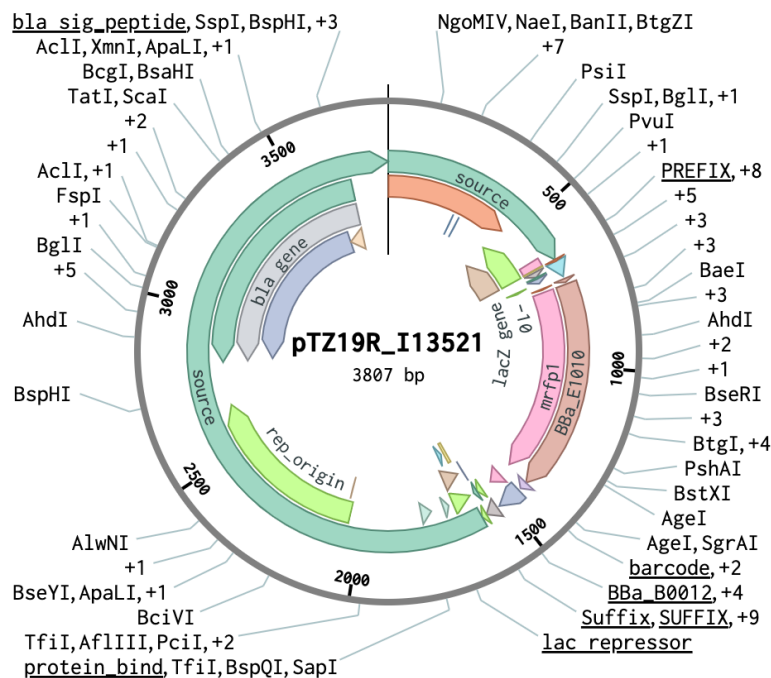


Figura 3 Mappa di pTZ19R_I13521

4.1.4 CEPPI BATTERICI

NCTC 9633: Ceppo di *K. pneumoniae* depositato presso l'American Type Culture Collection (ATCC), con applicazione nei test di preservazione antimicrobica, resistenza biologica, supporto di crescita e controllo qualità.

Il ceppo è classificato come sierotipo 3 e necessita di un BSL2.

Le condizioni di crescita raccomandate per il ceppo NCTC 9633 includono l'utilizzo del terreno di coltura ATCC Medium 3, contenente estratto di carne e peptone, a una temperatura di 37°C e in aerobiosi.

TOP 10 (genotipo: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ): ceppo di *E.coli* adatto alla trasformazione sia chimica che elettrica.

4.1.5 TERRENI DI COLTURA

Luria-Bertani (LB): terreno per colture batteriche. Composizione: 10g/L NaCl (CarloErba), 10g/L Bacto™ Triptone (BD Biosciences), 5 g/L Bacto™ Yeast Extract (BD Biosciences), tamponato a pH 7 con NaOH 0,1 mM.

Sterilizzato in autoclave a 121°C, 2 bar per 20'. Addizionato, in sterilità, con antibiotici: Kanamicina (Kan) 50 μ g/ml e/o Ampicillina (Amp) 100 μ g/ml.

LB Agar (LBA): variante solida del precedente LB. Addizionato con 15 g/L Bacto™ Agar (BD Biosciences).

Brain Heart Infusion (BHI) Agar: terreno per colture batteriche. Composizione: Infuso di cuore e cervello (solidi) 8,0 g/L, digerito peptico di tessuto animale 5,0 g/L, digerito pancreatico di caseina 16,0 g/L, NaCl 5,0g/L glucosio 2,0 g/L, fosfato di sodio dibasico 2,5 g/L, agar 13,5 g/L pH 7,4 \pm 0,2

4.1.6 SOSPENSIONE DI SEPIOLITE

Composizione:

- sepiolite 0,01% (p/v) (diluizione 1:100 da sepiolite 1%p/V)
- HEPES 5 mM pH 7.4
- KCl 200 mM
- acqua deionizzata

Le diverse soluzioni devono essere sterilizzate in autoclave a 121°C, 2 bar per 20'.

Sepiolite: minerale argilloso a struttura fibrosa composto principalmente da silicati di magnesio che agiscono come supporto per il DNA, consentendo una maggiore stabilità e protezione durante l'assorbimento nelle cellule batteriche. La sua struttura porosa e la capacità di formare complessi con il DNA aiutano a migliorare l'efficienza della trasformazione.

4.1.7 OLIGONUCLEOTIDI

In tabella 2 sono riportate le principali caratteristiche degli oligonucleotidi utilizzati.

Nome	Sequenza 5'-3'	GC	Tm
FW_seq_pSGAb	gcaactggtctatatttcctc	45%	50,5°C
RV_seq_pSGAb	gcaacgcaattaatgtgagt	40%	51,8°C

Tabella 2: Oligonucleotidi utilizzati per il sequenziamento di pSGAb_I13507

4.2 METODI

4.2.1 PROPAGAZIONE DEL PLASMIDE PSGAB-KM

Per propagare il plasmide, 5 ml di terreno LB selettivo (addizionato di ampicillina 100 µg/ml) sono stati aggiunti a una provetta da 15 ml. Successivamente, una singola colonia proveniente da una piastra di trasformazione è stata prelevata utilizzando un puntale sterile e inoculata nel terreno liquido.

La provetta è stata quindi incubata a 37°C in agitazione a 220 rpm per 16 ore.

4.2.2 ESTRAZIONE DEL DNA PLASMIDICO DA COLTURE MINIPREP

Il DNA plasmidico è stato estratto utilizzando il kit QIAprep Spin Miniprep® (QIAGEN), seguendo il protocollo fornito dal produttore:

1,5 mL di coltura batterica sono stati trasferiti in un tubo Eppendorf da 1,5 mL e centrifugati a 13000 rpm per 1 minuto. Il surnatante è stato eliminato tramite inversione e il pellet è stato risospeso in 250 µL di Buffer P1 contenente RNAsi e 250 µL di Buffer P2. La sospensione è stata quindi mescolata per inversione fino a ottenere una consistenza uniforme. Per arrestare il processo di lisi, sono stati aggiunti 350 µL di Buffer N3, miscelati per inversione.

La miscela è stata centrifugata a 13000 rpm per 10 minuti e i detriti batterici e il DNA genomico raccolti sul fondo del contenitore.

Sono stati quindi prelevati 800 µL del surnatante e trasferiti in una colonna di centrifuga per filtrazione e centrifugati a 13000 rpm per 1 minuto.

L'eluato è stato scartato ed il DNA legato alla matrice della colonna è stato lavato una prima volta con 500 µL di Buffer PB (e centrifugato a 13000 rpm per 1 minuto), e con due ulteriori lavaggi mediante l'aggiunta di 750 µL di Buffer PE e successiva centrifugazione a 13000 rpm per 1 minuto al fine di rimuovere tutti i residui di buffer. Infine, è stata eseguita una terza centrifugazione di un minuto per rimuovere eventuali residui di Buffer PE.

La colonna è stata trasferita in un secondo tubo Eppendorf da 1,5 mL e il contenuto è stato eluito con 30 µL di acqua nuclease-free mediante una centrifugazione finale a 13000 rpm per 1 minuto.

Infine, il DNA è stato quantificato utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis (ThermoFisher).

4.2.3 DIGESTIONE ENZIMATICA E PURIFICAZIONE DI pSGAb-km

Per allestire la reazione di digestione, sono stati utilizzati 100ng di DNA plasmidico, 10 U di HindIII (ThermoFisher), 10 U di SacI (ThermoFisher), 2,5 µL di CutSmart Buffer 10X e acqua demineralizzata in un volume finale di 25 µL.

La reazione è stata condotta a 37°C per 60 minuti.

Successivamente, un'aliquota del prodotto di reazione è stata caricata su un gel di agarosio al 1% (p/v) per valutare il risultato della digestione. Il campione rimanente è stato poi purificato utilizzando il kit QIAquick® PCR Purification (Qiagen) seguendo le procedure fornite dal produttore. Infine, la concentrazione di DNA è stata quantificata utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis (ThermoFisher).

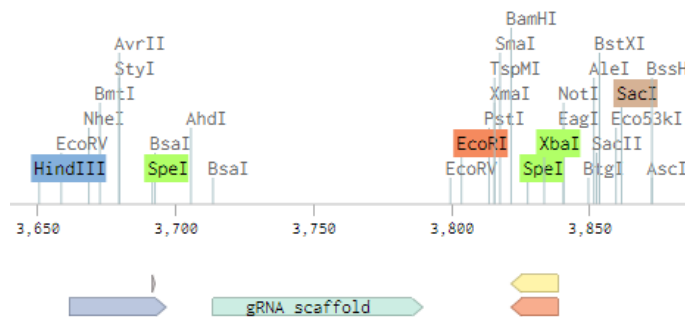


Figura 4 Rappresentazione schematica dei siti di restrizione HindIII e SacI

4.2.4 REAZIONE DI LIGAZIONE

La reazione di ligazione è stata eseguita in un tubo da 0,2 ml contenente DNA vettore, DNA inserto, 2 µL di Buffer Ligasi 10X, 400 U di T4 DNA ligasi (ThermoFisher) e acqua deionizzata in volume finale di 10 µL.

Le quantità di vettore ed inserto da utilizzare nella reazione di ligazione vengono determinate utilizzando la seguente formula:

$$X \text{ (ng)} = [Y \text{ pb} \times 300 \text{ ng}] / V \text{ pb}$$

Dove: X = ng inserto,

Y pb = paia di basi dell'inserto,

300 ng = 300 ng di vettore,

V pb = paia di basi del vettore plasmidico (pSGAb).

La reazione è stata incubata a 16°C per 16 ore, al termine delle quali l'enzima è stato inattivato tramite trattamento termico a 65°C per 10 minuti, prima di procedere con la trasformazione.

4.2.5 SEQUENZIAMENTO

Il sequenziamento dei campioni è stato effettuato da Eurofins Genomics, Padova. I campioni sono stati preparati secondo le loro indicazioni, aggiungendo 10 pMol di primer (vedi tabella 2) al DNA concentrato 100ng/ μ L.

4.2.6 PREPARAZIONE DI CELLULE COMPETENTI DI *K. pneumoniae*

Una singola colonia del ceppo NCTC 9633, è stata prelevata e inoculata in un volume di 5 ml di terreno LB. Questa coltura è stata quindi posta in un incubatore per 16 ore, al termine delle quali 1 ml dalla stessa è stato prelevato e diluito in 100 ml di brodo LB. La coltura cellulare è stata quindi posta in incubazione a 128 rpm e 37°C fino a quando la densità ottica a 600 nm (OD600) ha raggiunto il valore compreso tra 0,5 e 0,7. Successivamente, la coltura è stata posta in ghiaccio per 20 minuti e successivamente trasferita in due falcon da 50 ml e centrifugata a 5.600 rpm per 5 minuti.

Il surnatante è stato eliminato e le cellule sono state delicatamente risospese in 15 ml di glicerolo sterile freddo al 10% (v/v).

Questi passaggi di centrifugazione e risospensione sono stati ripetuti due volte.

Infine, le cellule sono state risospese in 1 ml di glicerolo al 10% (v/v) e poste in aliquote di 50 microlitri, congelate in azoto liquido e conservate a una temperatura di -80°C o utilizzate direttamente per l'elettroporazione. [8]

4.2.7 ELETTROPORAZIONE DI *K. pneumoniae*

Un' aliquota di 50 μ l di cellule competenti è stata scongelata in ghiaccio per alcuni minuti. Successivamente, è stata mescolata con 5 μ l di plasmide pSGAb_I13507 (100 ng/ μ g) e il contenuto è stato trasferito in una cuvetta di elettroporazione da 2 mm (Bio-Rad), sottoponendolo a un impulso elettrico impostando l'elettroporatore (Gene Pulser Xcell™, BIO-RAD) a 2,5 kV, 200 Ω e 25 μ F.

Le cellule sono state poi trasferite in un eppendorf da 1,5 ml contenente 1 ml di terreno LB e lasciate riposare a 30°C per 90 minuti prima di essere seminate su piastre di LBA addizionate con kanamicina (50 μ g/ml).

Le piastre sono state incubate a 30°C per 16 ore. [8]

4.2.8 TRIBOS TRANSFORMATION

Per semplificare la procedura, è stata utilizzata una sospensione autoclavata al 1% (p/v) di sepiolite, diluita allo 0,01% (100 μ g/ml) in una soluzione sterile di HEPES 5 mM pH 7.4, KCl 200 mM e acqua deionizzata (sospensione di sepiolite).

A partire da una coltura in fase logaritmica di *E. coli* Top10 (con un'assorbanza a 600 nm compresa tra 0,5 e 1), sono stati prelevati 500 μ l, centrifugati e il pellet batterico è stato risospeso in 100 μ l di sospensione di sepiolite.

In seguito, ai 100 μ l di miscela sono stati aggiunti 50 ng di DNA plasmidico (pTZ19R_I13521), successivamente seminati su una piastra di LB addizionato con ampicillina (100 μ g/ml) precedentemente asciugata sotto una cappa di sicurezza biologica per circa 10 minuti.

La sospensione è stata quindi seminata su un'opportuna piastra fino a completo adsorbimento.

Le piastre sono state incubate a 37°C per 16 ore.

5. RISULTATI

Nell'ambito del progetto PASTA, che si prefigge di sviluppare un approccio molecolare per contrastare il fenomeno dell'antibiotico resistenza, il presente lavoro ha previsto l'ottenimento del plasmide pSGAb_I13507 che verrà successivamente utilizzato per il clonaggio delle sequenze dCas9 e guida dirette contro specifici geni coinvolti nell'AMR. Parallelamente, sono stati saggiati differenti protocolli per la trasformazione di *K. pneumoniae* basati rispettivamente sull'elettroporazione e sulla "tribos transformation".

5.1 OTTENIMENTO DI pSGAb iGEM

Al fine di inserire le sequenze prefisso e suffisso nel plasmide pSGAb-km, è stata eseguita la reazione di digestione atta a rimuovere il promotore J23119 (contenente un sito di restrizione per SpeI), e il Multiple Cloning Site. In particolare, la reazione di restrizione è stata allestita impiegando gli enzimi di restrizione HindIII e SacI. Si è proceduto successivamente alla reazione di ligazione del "backbone" così ottenuto con l'inserto (raffigurato in figura 5) dotato di estremità compatibili.

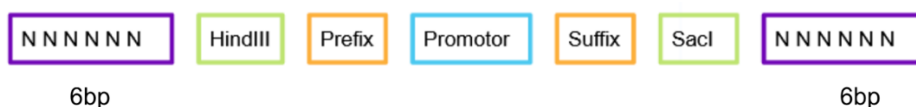


Figura 5 Rappresentazione schematica dell'inserto

Nella regione upstream (a monte) e downstream (a valle) di questa sequenza, si trovano il prefisso e il suffisso, rispettivamente affiancati dalle sequenze di taglio per Hind III e Sac I. Nelle due regioni terminali dell'inserto sono presenti 6bp necessarie al fine di garantire il corretto riconoscimento della sequenza da digerire da parte dell'enzima di restrizione. Il plasmide così ottenuto, rappresentato in figura 6, presenta una dimensione pari a 5966 pb ed è stato denominato pSGAb iGem.

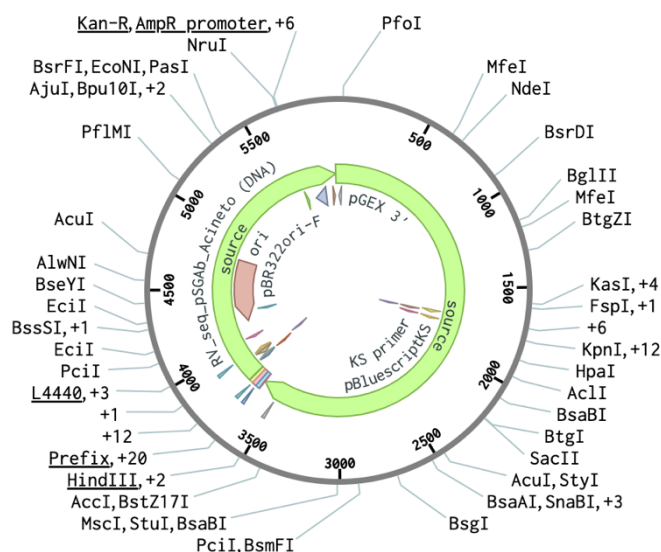


Figura 6 Mappa di pSGAb iGem

5.2 OTTENIMENTO DI pSGAb_I13507

Si è proceduto successivamente con una seconda reazione di digestione enzimatica utilizzando gli enzimi XbaI (Thermofisher) e PstI (Thermofisher), i cui siti di restrizione sono contenuti rispettivamente al livello di prefisso e suffisso. Il “backbone” così ottenuto è stato sottoposto a reazione di ligazione con la cassetta iGEM i13507 di 887 pb, contenente la sequenza Ribosome Binding Site_b0034, il gene reporter rfp BBA_e1010 e il terminatore BBA_b0015, ottenuta mediante restrizione enzimatica del plasmide pSB1A2 con gli enzimi XbaI e PstI.

Questo ha permesso di ottenere il plasmide pSGAb_I13507, che presenta una dimensione pari a 6835 bp, contiene il gene reporter RFP a valle del promotore standardizzato iGEM denominato BBa_J23119 (figura 7)

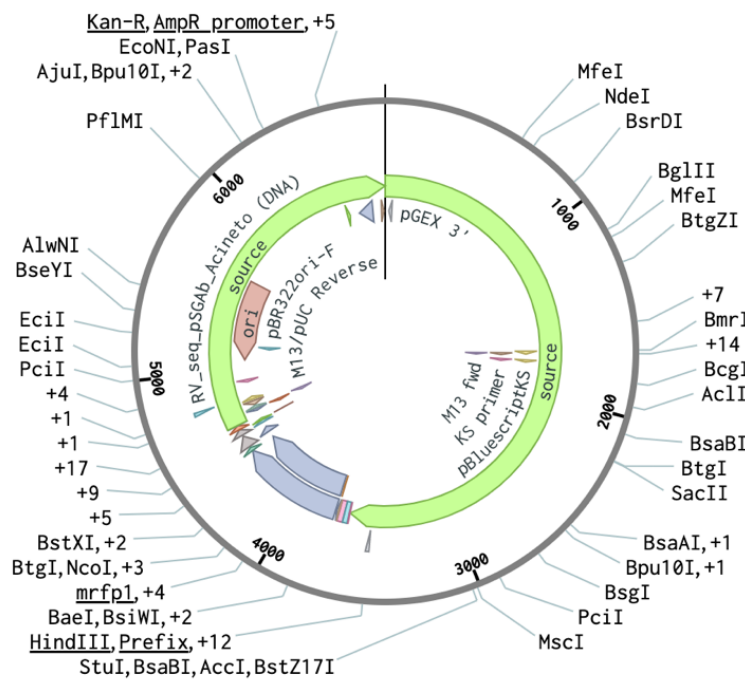


Figura 7 Mappa di pSGAb_I13507_iGEM

Il promotore BBa orza moderata
 con la capacità di funzionare in una vasta gamma di microrganismi, incluso *K. pneumoniae*. Nella regione upstream (a monte) e downstream (a valle) di questa sequenza, si trovano due elementi noti come prefisso e suffisso, che costituiscono un sistema standardizzato per l'identificazione e la condivisione delle parti genetiche. Questi elementi consentono inoltre la sostituzione del gene reporter con un gene di interesse mediante una reazione di digestione enzimatica seguita da una reazione di ligazione. Nel nostro caso, il gene di interesse corrisponde al gene di trascrizione per dCas9 e per il filamento guida.

Il plasmide mantiene inoltre il gene di resistenza alla Kanamicina (Kan-R) utilizzato come marcatore di selezione positiva nei batteri trasformati, i due siti ORI (Origin of Chromosome replication) che ne permettono la rispettiva replicazione in *E.coli*, in *A. baumannii* e *K. Pneumoniae*

Per verificare l'avvenuto clonaggio il plasmide, il pSGAb_I13507 è stato sequenziato utilizzando il primer FW_seq_pSGAb (tabella 2).

L'analisi della sequenza ha fornito evidenza del corretto inserimento delle sequenze nel plasmide pSGAb-km, confermando la presenza delle sequenze di prefisso e suffisso, nonché del gene reporter RFP posizionato a valle del promotore J23119.

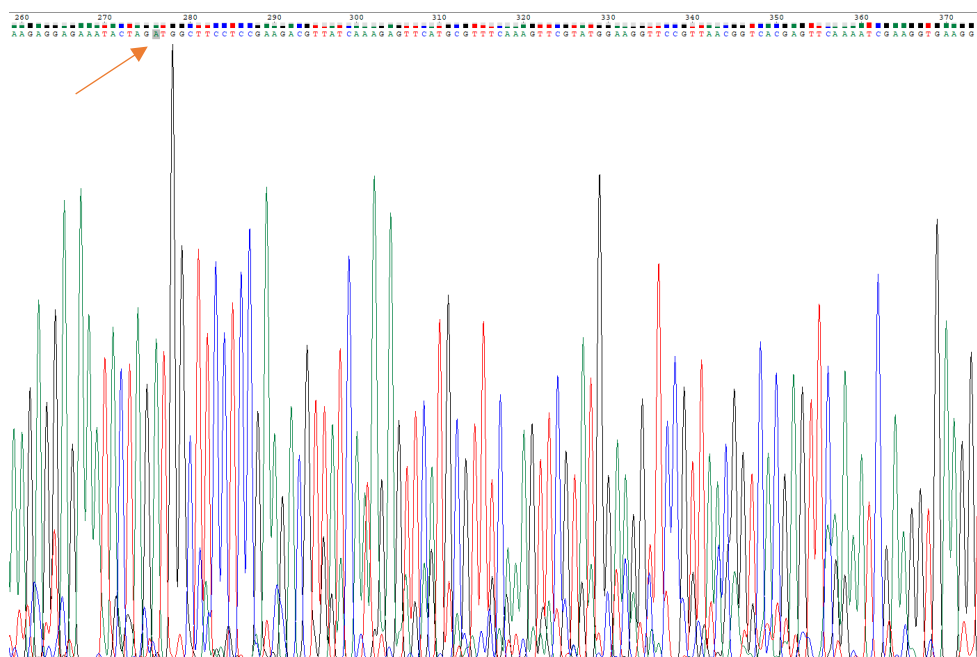


Figura 8: Sequenziamento genico del plasmide pSGAb_I13507. In figura è evidenziato l'inizio della sequenza del gene reporter *rfp*.

5.3 OTTIMIZZAZIONE DEI PROTOCOLLI DI TRASFORMAZIONE di *K. pneumoniae*

5.3.1 ELETTROPORAZIONE

Al fine di ottimizzare il protocollo di preparazione delle cellule competenti, sono state ottenute le curve di crescita di *K. pneumoniae* in due diversi terreni di coltura, rispettivamente LB e BHI. La crescita batterica è stata monitorata misurando l'assorbanza ottica a 600 nm (OD₆₀₀) ogni due ore durante il periodo di crescita. I risultati di queste misurazioni sono riportati nelle figure 9 e 10.

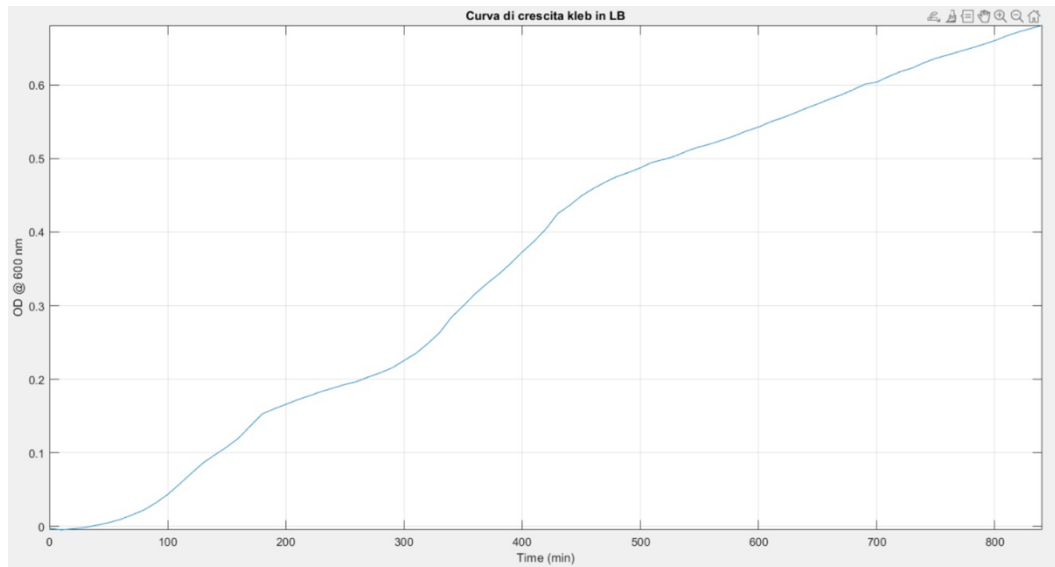


Figura 9 Curva di crescita di *K. pneumoniae* in terreno LB

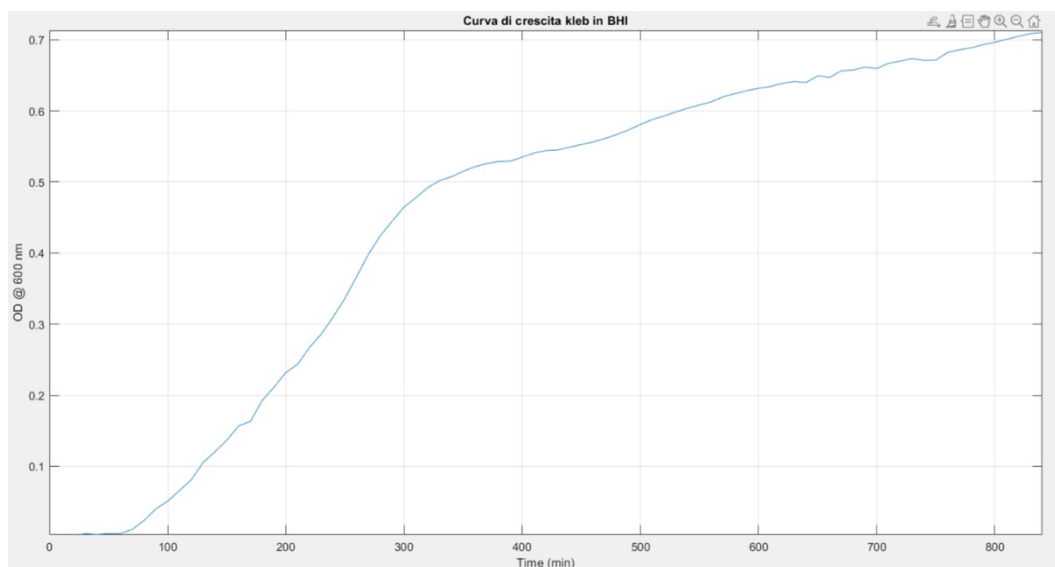


Figura 10 Curva di crescita di *K. pneumoniae* in terreno BHI

Il protocollo per rendere le cellule di *K. Pneumoniae* competenti, descritto nelle metodologie, ha presentato tuttavia diversi punti critici.

Nello specifico, dopo aver risospeso i batteri in 15 ml di glicerolo al 10% (v/v) ed averli centrifugati, non si è ottenuta la separazione del pellet dal glicerolo causando la perdita di sedimento batterico durante il passaggio di inversione necessario al fine di rimuovere il surnatante.

Al fine di superare questa problematica, sono state apportate modifiche al metodo di rimozione del glicerolo, adottando l'approccio di eliminazione mediante rimozione utilizzando un puntale. Tuttavia, a causa della formazione di un aggregato tra il glicerolo concentrato e il pellet batterico, è risultato impossibile rimuovere completamente il glicerolo dalle cellule di *K. Pneumoniae*. La presenza di glicerolo ha inficiato negativamente sulla successiva fase di elettroporazione.

Al fine di rimuovere il glicerolo sono state quindi effettuate altre due centrifugazioni a 13 000 rpm per 3 minuti. Tuttavia, anche in questo caso, il risultato ottenuto è stato una soluzione completamente omogeneo in cui batteri e glicerolo erano mescolati in modo uniforme, probabilmente a causa di una densità simile tra i due componenti.

In base ai risultati ottenuti il protocollo è stato ulteriormente modificato riducendo la velocità della centrifugazione a 8000 rpm per 15 minuti, al fine di permettere la separazione del pellet batterico dal surnatante senza causare la separazione del glicerolo dall'acqua. Nonostante ciò anche questo tentativo è stato fallimentare, risultando nella concentrazione del glicerolo sul fondo del tubo e nella mancata separazione del pellet batterico.

Alla luce dei risultati ottenuti si è proceduto con il protocollo di trasformazione denominato “tribos transformation”.

5.3.2 TRIBOS TRANSFORMATION

Nel processo della Tribos transformation, una soluzione colloidale contenente nanofibre minerali viene miscelata insieme ai batteri e al DNA plasmidico. Successivamente, questa miscela viene seminata su opportune piastre di terreno di coltura. Durante la diffusione dei batteri sulla superficie dell'agar, si genera attrito scorrevole grazie al processo di semina. Queste forze di attrito permettono alle nanofibre minerali di interagire con la superficie dell'agar e di penetrare all'interno delle cellule batteriche (effetto Yoshida). Di conseguenza, il DNA trasformante, adsorbito sulle nanofibre minerali, viene introdotto all'interno dei batteri, dove fenomeni di competizione permettono allo stesso di essere rilasciato, mantenuto ed espresso in modo efficace. [9]

Al fine di determinare l'efficienza del protocollo di “tribos transformation” è stata effettuata una prova di trasformazione su cellule *E.coli* TOP10.

La trasformazione è avvenuta con successo, evidenziato dalla comparsa di un fenotipo resistente all'ampicillina da parte dei batteri conferita dal gene di resistenza presente nel plasmide pTZ19. Inoltre, la presenza di colonie di colore rosso ha evidenziato l'espressione del marcatore fluorescente RFP, come riportato nella figura 11.

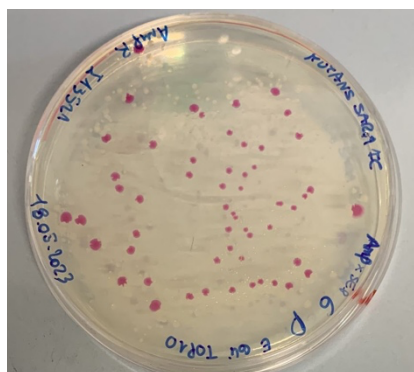


Figura 11 Colonie di *E. coli* TOP 10 trasformate con pTZ19 ed esprimenti RFP

6. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

La resistenza antimicrobica (AMR) è ad oggi universalmente riconosciuta come un problema di estrema importanza che richiede l'adozione di specifiche misure al fine di contrastarne la diffusione. Il rapporto globale dell'OMS sulla sorveglianza dell'AMR ha fornito una panoramica senza precedenti sull'entità del fenomeno, mettendo in luce la mancanza di adeguata rete di sorveglianza e di significative lacune nelle informazioni sui microrganismi di rilevanza per la salute pubblica.

Pertanto, è di fondamentale importanza rafforzare e armonizzare la sorveglianza dell'AMR mediante lo sviluppo di metodi epidemiologici e microbiologici condivisi, nonché l'adozione di definizioni comuni per migliorare la capacità di condividere e confrontare le informazioni sulla resistenza e garantire una migliore coordinazione delle reti di sorveglianza. È altresì essenziale affrontare la mancanza di informazioni sull'antibiotico resistenza, promuovendo la consapevolezza e l'educazione sul corretto utilizzo degli antibiotici sia tra i professionisti sanitari che tra l'utilizzatore finale. Si rende necessario limitare l'automedicazione e l'abuso di antibiotici, adottando pratiche di prescrizione responsabili, promuovendo l'uso appropriato di questi farmaci. Inoltre, è necessario adottare misure per ridurre l'uso di antimicrobici nell'agricoltura e nella zootecnia, al fine di limitare la diffusione dell'antibiotico resistenza nell'ambiente.

Parallelamente risulta fondamentale la ricerca di approcci terapeutici innovativi per contrastare l'AMR. In questo panorama, il presente elaborato di tesi rientra in un progetto di ricerca più ampio denominato PASTA (Phage Assisted Silencing Tool against Antibiotic resistant), che si propone la realizzazione di una nuova strategia terapeutica che possa andare ad affiancarsi alla terapia antibiotica, al fine di contribuire alla lotta contro l'AMR.

Il progetto si propone di sviluppare una piattaforma di delivery basata sull'utilizzo dei batteriofagi, data la loro elevata specificità di infezione nei confronti dei batteri, allo scopo di veicolare una sequenza genica che codifica rispettivamente una dCas e un filamento guida correlato ad un gene batterico coinvolto nella resistenza agli antibiotici.

Nell'ambito di questo progetto, dapprima è stato ottenuto in due passaggi il plasmide pSGAb_I13507 contenente le sequenze prefisso e suffisso, il gene reporter RFP posizionato a valle del promotore J23119. Tale plasmide è stato impiegato per l'ottimizzazione del protocollo di trasformazione di *K. pneumoniae* e successivamente sarà utilizzato per l'inserimento della sequenza genica codificante dCas e il filamento guida diretti contro la sequenza che conferisce resistenza agli antibiotici. A tal proposito, sono attualmente oggetto di analisi diversi geni target, come mostrato nella figura 12. Tuttavia, solo la Beta-lattamase SHV-1 risulta presente nel ceppo NCTC 9633. Inoltre, sono state considerate diverse classi di dCAS9 e sulla base dei dati presenti in letteratura, quelle più promettenti sono quelle di *S. pyogenes* (PAM: NGG) e *S. aureus* (PAM: NNGRRT o NNGR).

immagine

Klebsiella	Locus Start	Locus End	Name	Product
	3424636	3425058	fosA	Glutathione transferase FosA
	26087	27055	bla	Beta-lactamase SHV-1
	3911761	3912960	tetA	Tetracycline resistance protein_class B

Figura 12 geni target alla base dell'AMR in *K.pneumoniae*

I dati sperimentali fino ad ora ottenuti dimostrano che la trasformazione mediante elettroporazione di *K. pneumoniae* non è efficiente, dovuta alla presenza di elevate concentrazioni di glicerolo nei batteri. È stato quindi introdotto il protocollo di “tribos transformation” utilizzando un ceppo di *E. coli* impiegando il fagemide pTZ19. La comparsa di un fenotipo resistente all’ampicillina da parte dei batteri trasformati e la presenza di colonie di colore rosso evidenzia l’efficacia del protocollo di trasformazione. L’efficienza di trasformazione ottenuta è paragonabile ai metodi convenzionali di trasformazione (elettroporazione e trasformazione chimica). Tuttavia, è importante sottolineare che l’efficacia della sepiolite come agente di trasformazione può variare a seconda del ceppo batterico e delle specifiche condizioni sperimentali. Un altro aspetto importante da considerare riguarda il rapporto tra le nanofibre minerali/sepiolite e il DNA trasformante. È stato suggerito infatti dagli stessi studi di Yoshida e Sato (2009) che la variazione di questa proporzione può influenzare significativamente l’efficacia della trasformazione. L’ottimizzazione di tale rapporto potrebbe favorire l’assorbimento del DNA nelle cellule batteriche e migliorare l’efficienza del processo di trasformazione. [10].

Va inoltre considerato un altro fattore cruciale, ovvero la modulazione delle forze di attrito scorrevole durante la semina. La scelta adeguata della concentrazione di agar (1% - 4%(p/v)), la lunghezza e la forza della semina possono difatti influire sull’interazione tra le nanofibre minerali/sepiolite e le cellule batteriche durante il processo di trasformazione. Pertanto la regolazione precisa di queste variabili potrebbe migliorare l’adesione delle cellule batteriche alla sepiolite e facilitare l’assorbimento del DNA.

Alla luce dei risultati ottenuti e delle considerazioni riportate si rende necessario procedere con l’ottimizzazione del protocollo di “tribos transformation” per *K. pneumoniae*.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] F. Prestinaci, P. Pezzotti, and A. Pantosti, “Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon,” *Pathogens and Global Health*, vol. 109, no. 7. Maney Publishing, pp. 309–318, Oct. 01, 2015. doi: 10.1179/2047773215Y.0000000030.
- [2] W. C Reygaert, “An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria,” *AIMS Microbiol*, vol. 4, no. 3, pp. 482–501, 2018, doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482.
- [3] G. Mancuso, A. Midiri, E. Gerace, and C. Biondo, “Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens,” *Pathogens*, vol. 10, no. 10. MDPI, Oct. 01, 2021. doi: 10.3390/pathogens10101310.
- [4] C. J. Murray *et al.*, “Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis,” *The Lancet*, vol. 399, no. 10325, pp. 629–655, Feb. 2022, doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- [5] S. Gualtero *et al.*, “Factors associated with mortality in Infections caused by Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae,” *Journal Infect Dev Ctries*, vol. 14, no. 6, pp. 654–659, Jun. 2020, doi: 10.3855/jidc.12267.
- [6] K. L. Wyres and K. E. Holt, “Klebsiella pneumoniae as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria,” *Current Opinion in Microbiology*, vol. 45. Elsevier Ltd, pp. 131–139, Oct. 01, 2018. doi: 10.1016/j.mib.2018.04.004.
- [7] V. Takhaveev and M. Heinemann, “Metabolic heterogeneity in clonal microbial populations,” *Current Opinion in Microbiology*, vol. 45. Elsevier Ltd, pp. 30–38, Oct. 01, 2018. doi: 10.1016/j.mib.2018.02.004.
- [8] Y. Wang *et al.*, “CRISPR-Cas9 and CRISPR-Assisted Cytidine Deaminase Enable Precise and Efficient Genome Editing in Klebsiella pneumoniae,” *aem.asm.org 1 Applied and Environmental Microbiology Downloaded*, vol. 84, pp. 1834–1852, 2018, doi: 10.1128/AEM.
- [9] G. Wilharm, D. Lepka, F. Faber, J. Hofmann, T. Kerrinnes, and E. Skiebe, “A simple and rapid method of bacterial transformation,” *Journal Microbiol Methods*, vol. 80, no. 2, pp. 215–216, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.mimet.2009.12.002.
- [10] N. Yoshida, K. Kodama, K. Nakata, M. Yamashita, and T. Miwa, “Escherichia coli cells penetrated by chrysotile fibers are transformed to antibiotic resistance by incorporation of exogenous plasmid DNA,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 60, no. 4, pp. 461–468, Dec. 2002, doi: 10.1007/s00253-002-1148-8.

