

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ СТРУКТУР CRISPR/CAS-СИСТЕМ В ГЕНОМАХ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Степаненко Л.А.¹,
Сухов Б.Г.²,
Конькова Т.В.²,
Бединская В.В.¹,
Клушина Н.В.²,
Злобин В.И.¹

¹ ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет»

Минздрава России (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1, Россия)

² ФГБУН Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН (630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Степаненко Лилия Александровна,
e-mail: steplia@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. *Klebsiella pneumoniae* относится к группе бактерий-оппортунистов, обладающих способностью формировать множественную антибиотикорезистентность и передавать её разным видам бактерий путём горизонтального переноса генов. Данные исследования посвящены изучению структурного и функционального разнообразия CRISPR/Cas-систем, защищающих бактерии от инородной ДНК. Их анализ на примере антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* продемонстрирует их устойчивость к определённым бактериофагам, что позволит разработать подходы в лечении сложных инфекционных заболеваний, вызванных данными микроорганизмами, путём создания таргетной фаговой терапии.

Цель исследований. Выполнить биоинформатический анализ выявленных структурных компонентов CRISPR/Cas-систем для скрининга отбора бактериофагов через спейсеры CRISPR-кассет на примере антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*.

Материалы и методы. В статье проанализированы 29 полногеномных последовательностей *Klebsiella pneumoniae*, в геноме которых были определены структуры CRISPR/Cas-систем и гены антибиотикорезистентности (по данным NCBI). Для решения поставленной цели с помощью программных методов моделирования произведён поиск Cas-генов и CRISPR-кассет, дана их структурная и функциональная характеристики.

Результаты. При помощи биоинформационных алгоритмов поиска в геноме антибиотикорезистентных штаммов были определены функционально активные CRISPR/Cas-системы с наличием одной или двух CRISPR-кассет и относящиеся к Type I Subtype 1E. Определены группы резистентных штаммов, обладающие идентичным спейсерным составом CRISPR-кассет. Проведён филогенетический анализ, подтверждающий их единое происхождение. Путём анализа спейсерных последовательностей CRISPR-кассет определён спектр разнообразия фагов бактерий рода *Klebsiella*, *Salmonella*, относящихся к одному семейству Enterobacteriaceae. Таким образом, была получена информация о бактериофагах, на которые нацелено действие CRISPR-систем штаммов *Klebsiella pneumoniae*, обладающих антибиотикорезистентностью.

Заключение. Анализ функциональных и структурных особенностей CRISPR/Cas-систем антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* позволил получить информацию об их эволюционной истории и о бактериофагах, против которых направлено их действие, то есть об их фагоустойчивости. Используемый в данном исследовании подход в дальнейшем может послужить основой для создания персонализированной фаготерапии.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, антибиотикорезистентность, CRISPR/Cas-система, спейсер, протоспейсер, бактериофаг, биоинформатика

Для цитирования: Степаненко Л.А., Сухов Б.Г., Конькова Т.В., Бединская В.В., Клушина Н.В., Злобин В.И. Идентификация и анализ структур CRISPR/Cas-систем в геномах антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Acta biomedica scientifica. 2023; 8(6): 105-116. doi: 10.29413/ABS.2023-8.6.9

Статья поступила: 27.08.2023

Статья принята: 06.12.2023

Статья опубликована: 29.12.2023

IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF CRISPR/CAS SYSTEMS STRUCTURES IN THE GENOMES OF ANTIBIOTIC-RESISTANT STRAINS OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Stepanenko L.A.¹,
Sukhov B.G.²,
Kon'kova T.V.²,
Bedinskaya V.V.¹,
Klushina N.V.²,
Zlobin V.I.¹

¹ Irkutsk State Medical University
(Krasnogo Vosstaniya str. 1, Irkutsk 664003,
Russian Federation)

² Voevodsky Institute of Chemical
Kinetics and Combustion, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences
(Institutskaya str. 3, Novosibirsk 630090,
Russian Federation)

Corresponding author:
Lilia A. Stepanenko,
e-mail: steplia@mail.ru

ABSTRACT

Background. *Klebsiella pneumoniae* belongs to a group of opportunistic bacteria that can form multiple resistance to antibiotics and transmit it to various types of bacteria through horizontal gene transfer. These studies examine the structural and functional diversity of CRISPR/Cas systems that protect bacteria from foreign DNA. Their analysis using the example of antibiotic-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* will demonstrate their resistance to certain bacteriophages, which will make it possible to develop approaches to the treatment of complex infectious diseases caused by these microorganisms by creating targeted phage therapy.

The aim. To perform a bioinformatics analysis of the identified structural components of CRISPR/Cas systems for screening bacteriophages through CRISPR cassette spacers using the example of antibiotic-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*.

Materials and methods. The article analyzed 29 full-genome sequences of *Klebsiella pneumoniae*, in the genome of which the structures of CRISPR/Cas systems and antibiotic resistance genes were determined (according to NCBI). To achieve this goal, using software modeling methods, a search was made for Cas genes and CRISPR cassettes, and their structural and functional characteristics were given.

Results. Using bioinformatic search algorithms in the genome of antibiotic-resistant strains, functionally active CRISPR/Cas systems with the presence of one or two CRISPR cassettes and belonging to Type I Subtype IE were identified. Groups of resistant strains with identical spacer composition of CRISPR cassettes have been identified. A phylogenetic analysis was carried out confirming their common origin. By analyzing the spacer sequences of CRISPR cassettes, the spectrum of diversity of phages of bacteria of the genus *Klebsiella*, *Salmonella*, belonging to the same family Enterobacteriaceae, was determined. Thus, information was obtained about the bacteriophages that are targeted by the action of CRISPR systems of *Klebsiella pneumoniae* strains that have antibiotic resistance.

Conclusions. Analysis of the functional and structural features of the CRISPR/Cas systems of antibiotic resistant *Klebsiella pneumoniae* strains made it possible to obtain information about their evolutionary history and about the bacteriophages against which their action is directed, that is, about their phage resistance. The approach used in this study may further serve as the basis for the creation of personalized phage therapy.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, spacer, antibiotic resistance, CRISPR/Cas-system, bacteriophage, protospacer, bioinformatics

For citation: Stepanenko L.A., Sukhov B.G., Kon'kova T.V., Bedinskaya V.V., Klushina N.V., Zlobin V.I. Identification and analysis of CRISPR/Cas systems structures in the genomes of antibiotic-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(6): 105-116. doi: 10.29413/ABS.2023-8.6.9

Received: 27.08.2023
Accepted: 06.12.2023
Published: 29.12.2023

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотики являются одним из величайших достижений человечества. С их появлением стали излечимы ранее фатальные заболевания. Однако формирование устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам на сегодняшний день является одной из серьёзнейших проблем системы здравоохранения [1]. Во всём мире регистрируется рост показателей распространённости антибиотикорезистентных штаммов [2–6]. Инфекционные заболевания, вызванные данными возбудителями, характеризуются более длительным течением, присоединением многочисленных осложнений, увеличением уровня инвалидности и смертности [7–9]. В связи с этим значительно возрастают экономические затраты, связанные с увеличением продолжительности и стоимости лечения больных в стационаре [10, 11]. В феврале 2017 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) опубликовала список бактериальных патогенов, требующих новых подходов в лечении в связи с их высокой вирулентностью и антибиотикорезистентностью. К данной группе относится *Klebsiella pneumoniae*. Она является грамотрицательным оппортунистическим патогеном, вызывающим различные инфекционные заболевания, включая инфекции мочевыводящих путей, бактериемию, пневмонию и абсцессы [12, 13]. Распространение по всему миру клонов *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра (ESBL, extended-spectrum beta-lactamases) и карбапенемазы (KPC), стало серьёзной угрозой для медицинских учреждений, так как они являются основной причиной развития опасных для жизни нозокомиальных инфекций [14]. Широкое распространение штаммов, обладающих множественной антибиотикорезистентностью, диктует необходимость поиска альтернативных методов борьбы с ними. ВОЗ в целях борьбы с антибиотикорезистентностью инициировала многочисленные кампании. Запущен в работу эпидемиологический надзор за устойчивостью микроорганизмов к антимикробным препаратам [1]. Создаются новые подходы в лечении инфекционных заболеваний, которые снижают или полностью заменяют применение антибиотиков [15]. На этом фоне в лечебной практике вновь появляется интерес к применению бактериофагов для лечения заболеваний бактериального происхождения. Одним из реальных инструментов эффективной борьбы становится недавно открытая у бактерий система CRISPR/Cas, защищающая бактерии от чужеродных мобильных генетических элементов. Бактерии способны приобретать и интегрировать генетические элементы в собственный геном [16]. Таким образом, они сохраняют генетическую запись предыдущих атак чужеродных нуклеиновых кислот в массивах CRISPR. Эти массивы состоят из коротких и консервативных повторяющихся последовательностей, называемых повторами, которые стратегически расположены между уникальными последовательностями, называемыми спейсерами. Они встраиваются специализированными белками Cas в массив CRISPR во время инфекций путём вторжения нуклеиновых кислот [17–20]. Адаптивный иммунитет прокариотов против чужеродных генетических элементов достигается за счёт образования

эффекторных комплексов из РНК-ориентированных эндонуклеаз, которые способны обнаруживать и разрезать чужеродную ДНК, предварительно включённую в массив CRISPR, при вторичном заражении [17, 21]. Таким образом, изучение особенностей строения и работы CRISPR/Cas систем штаммов *Klebsiella pneumoniae*, обладающих антибиотикорезистентностью, позволит разработать подходы создания таргетной фаговой терапии при лечении сложных инфекционных заболеваний.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выполнить биоинформатический анализ выявленных структурных компонентов CRISPR/Cas-систем для скрининга бактериофагов через спейсеры CRISPR-кассет на примере антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на базе лаборатории молекулярной вирусологии и биотехнологии Научно-исследовательского института биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России. Системный дизайн проведённых исследований представлен на рисунке 1.

При проведении данных исследований случайно были определены 50 полногеномных последовательностей *Klebsiella pneumoniae*, в геноме которых биоинформатическим методом были выявлены CRISPR/Cas-системы. Объектом исследования послужили 29 из 50 полногеномных последовательностей *Klebsiella pneumoniae*, загруженные из базы данных GenBank, в геноме которых определялись гены антибиотикорезистентности (по данным NCBI (National Center for Biotechnology Information)). Для решения поставленной цели с помощью разработанного биоинформационного программного алгоритма произведён поиск Cas генов и CRISPR-кассет, даны их структурная и функциональная характеристики.

Для поиска CRISPR/Cas-систем и генов Cas использовались программные методы моделирования: Macromolecular System Finder (MacSyF, ver. 1.0.2) с вспомогательными пакетами makeblastDB (ver. 3.0) и HMMER (ver. 2.2.28). Детекция и анализ CRISPR-кассет в геномах проводились с использованием онлайн-сервисов доступных программ: CRISPRCasFinder [22] и CRISPROne [23]. Для поиска фагов расшифрованные спейсерные последовательности в формате FASTA были загружены в онлайн-приложение CRISPRTarget. В работе были использованы только те штаммы, в геноме которых определялись CRISPR/Cas-системы по результатам всех используемых программ ряде программ.

Построение филогенетических деревьев и их выравнивание проводились с помощью программы MEGA X по методу ближайших соседей (NJ, neighbor joining) с анализом статистической значимости топологии бутстрэп-методом (число реплик – 500) и с использованием модели генетических дистанций Maximum

Composite Likelihood. Для «укоренения» дерева к выборке исследуемых организмов добавлен штамм дру-

гого вида *Escherichia coli* (NC 000913.3), который составил аутгруппу.

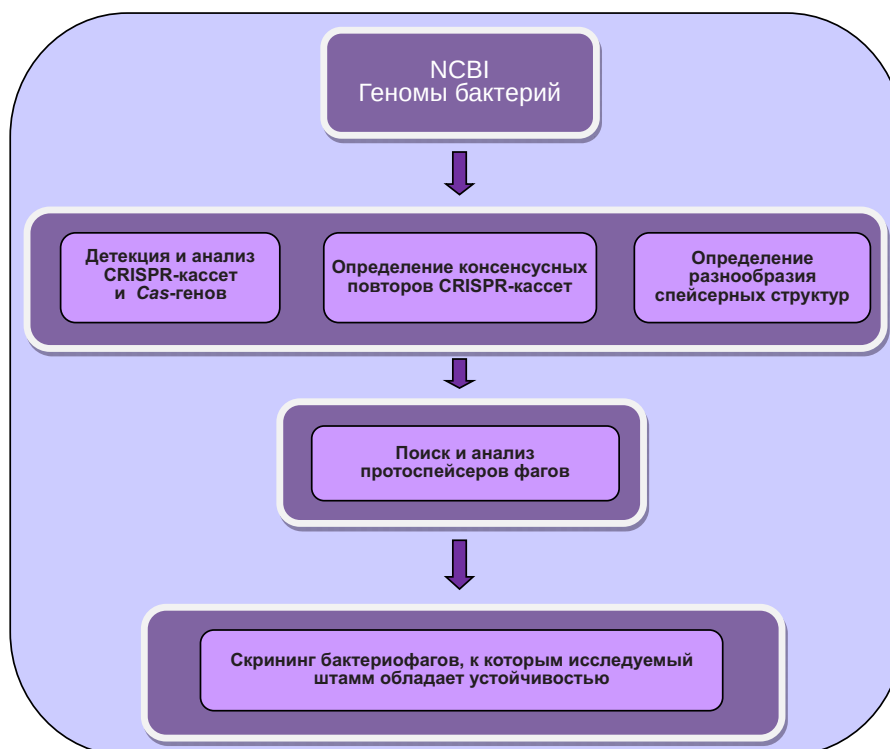


РИС. 1.

Схема системного дизайна исследований

FIG. 1.

Systematic research design flowchart



РИС. 2.

Схема расположения CRISPR-кассет и Cas-генов системы Type I Subtype IE в геноме штаммов *Klebsiella pneumoniae* (данные из GenBank: NZ_CP011624.1, NZ_CP006798.1)

FIG. 2.

Scheme of the location of CRISPR cassettes and Cas genes of the Type I Subtype IE system in the genome of *Klebsiella pneumoniae* strains (data from GenBank: NZ_CP011624.1, NZ_CP006798.1)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объектом исследования послужили 29 из 50 штаммов с наличием CRISPR/Cas-системы в геноме и обладающие генами устойчивости к антибактериальным препаратам (по данным NCBI). Из 29 исследуемых штаммов 55,2 % ($n = 16$) обладали карбапенемазной активностью, по 3,4 % ($n = 1$) были устойчивы к рифампицину и триметоприм-сульфаметоксазолу и 11 (37,9 %) штаммов обладали множественной антибиотикорезистентностью.

При помощи нескольких биоинформационных программ поиска в CRISPR/Cas-системах исследуемых штаммов идентифицировано наличие одной или двух CRISPR-кассет. Во всех случаях рядом с кассетами определён полный набор Cas-генов, характерный для систем Type I Subtype IE (*cas2*, *cas1*, *cas5*, *cas7*, *cas6*, *cse2gr11*, *cas8*, *cas3*), что свидетельствует о функциональной активности CRISPR/Cas-систем исследуемых бактерий (рис. 2).

Во всех исследуемых CRISPR-кассетах количество выявленных спейсеров составило 1629. Из них 498 спейсеров не повторялись, 276 спейсеров имели повторы в двух и более CRISPR-локусах. Внутри кассет спейсерных повторов не регистрировалось. Количество спейсеров в кассетах составляло от 4 до 64. При этом в штаммах, содержащих одну кассету, суммарное количество спейсеров было больше по сравнению со штаммами, содержащими две кассеты.

Проведённый анализ позволил определить два вида консенсусных последовательностей повторов CRISPR-кассет. Это может свидетельствовать о наличии определённого типа CRISPR-системы (в нашем случае это Type I Subtype IE) и о достаточно стабильной её работе, так как именно данные повторы распознаются белками эндонуклеазы Cas, действие которых направлено на разрезание и разрушение мишени (рис. 3).

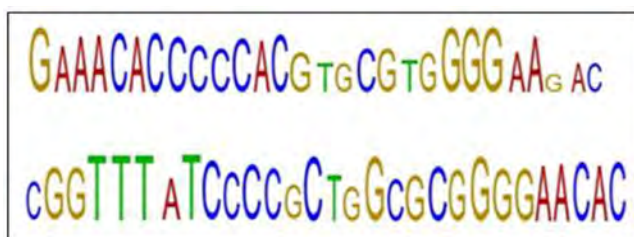


РИС. 3.

Нуклеотидная последовательность консенсусных повторов CRISPR-кассет антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*

FIG. 3.

Nucleotide sequence of consensus repeats of CRISPR cassettes of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains

Скрининг спейсерных последовательностей CRISPR-кассет исследуемых штаммов показал их полное соответствие протоспейсерам фагов бактерий семейства *Enterobacteriaceae* рода *Klebsiella* (табл. 1). Необходимо отметить, что к большинству спейсеров не было выяв-

лено полного соответствия протоспейсеров фагов из известных баз данных.

При анализе установлено, что в CRISPR-кассетах исследуемых штаммов (NZ_CP013322.1) отмечалось соответствие участка одного спейсера (6) протоспейсерам нескольких фагов бактерий одного семейства, а также соответствие нескольких спейсеров (52, 55) одного штамма (NZ_CP017934.1) протоспейсерам одного и того же фага. Это может свидетельствовать о том, что в процессе эволюции бактерии приспособились приобретать только те спейсеры из ДНК фага, которые эффективно распознаются их эффекторным комплексом, что повышает защитное действие систем CRISPR/Cas.

Таким образом, был определён полный спектр бактериофагов, детектируемых через спейсерные последовательности CRISPR-кассет антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* с доступом к их полному геному в GenBank. Учитывая принцип работы CRISPR/Cas-систем бактерий, можно предполагать, что при встрече с данными фагами они будут уничтожены Cas-нуклеазами при условии соответствия участка его генома последовательности спейсера в CRISPR-кассете бактерий. Данный подход в дальнейшем может быть использован как основа создания персонализированной фаготерапии.

Далее при анализе антибиотикорезистентных штаммов были определены группы бактерий, обладающие идентичным спейсерным составом CRISPR-кассет. Первую группу составили два штамма, обладающие различным сочетанием генов карбапенемаз (NDM-1, OXA-48, OXA-181), которые были связаны с другими детерминантами устойчивости, включая β -лактамазы расширенного спектра и метилазу ArmA, кодирующую устойчивость к аминогликозидам. Поэтому они были определены как панрезистентные, так как обладали множественной антибиотикоустойчивостью. Среди антибиотикорезистентных бактерий выявлены пять штаммов. Необходимо отметить, что данные штаммы, имея сходный спейсерный состав, были выделены в разных регионах мира (Южная Корея, Китай (Шанхай)) и в разное время (2013, 2014 гг.) (табл. 2).

Вторую группу составили три штамма, обладающие множественной антибиотикоустойчивостью, выделенные в одном стационаре (Греция), но в разное время (2011, 2013 гг.). Они были определены как внутригоспитальные штаммы. В их геноме определялось по одной CRISPR-кассете. Причем два штамма имели одинаковый спейсерный состав кассет, представленный 24 спейсерами (табл. 3).

Третью группу составили восемь штаммов, продуцирующих карбапенемазу и выделенных от больных, находившихся на лечении в стационаре Нижней Саксонии (Германия), где была зарегистрирована нозокомиальная вспышка, вызванная *Klebsiella pneumoniae*. Установлено, что данные штаммы имели в геноме по одной CRISPR-кассете, состоящие из 35 спейсеров, полностью идентичных друг другу. Также в данную группу вошли еще три штамма, имеющие аналогичный спейсерный состав кассет, но выделенные в разных регионах мира (Арабские Эмираты, США, Сингапур) и в разное время (2015, 2016, 2014 гг.).

Сходство спейсерного состава кассет в геномах штаммов представленных групп может свидетельство-

ТАБЛИЦА 1

РАЗНООБРАЗИЕ СПЕЙСЕРОВ И СООТВЕТСТВУЮЩИХ
ИМ ПРОТОСПЕЙСЕРОВ ФАГОВ В ГЕНОМАХ
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA*
PNEUMONIAE

TABLE 1

DIVERSITY OF SPACERS AND CORRESPONDING PHAGE
PROTOSPACERS IN THE GENOMES OF ANTIBIOTIC-
RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS

Штамм	Кассета/спейсер	Бактериофаг	Номер доступа в GenBank
NZ_CP008929.1	1/6	<i>Klebsiella</i> phage ST13-OXA48phi12.4	MK422450
NZ_CP009208.1	1/2	<i>Klebsiella</i> phage ST512-KPC3phi13.1	MK448235
NZ_CP009208.1	1/2	<i>Klebsiella</i> phage ST11-VIM1phi8.1	MK448233
NZ_CP009208.1	2/4	<i>Klebsiella</i> phage ST147-VIM1phi7.2	MK448232
NZ_CP009208.1	2/4	<i>Klebsiella</i> phage 1 LV-2017	KY271401
NZ_CP012426.1	1/3	<i>Klebsiella</i> phage ST101-KPC2phi6.1	MK448231
NZ_CP012743.1	1/12	<i>Klebsiella</i> phage ST11-OXA245phi3.2	MK416010
NZ_CP012744.1	1/12	<i>Klebsiella</i> phage ST11-OXA245phi3.2	MK416010
NZ_CP012745.1	1/3	<i>Klebsiella</i> phage ST101-KPC2phi6.1	MK448231
NZ_CP012745.1	1/22	<i>Klebsiella</i> phage YMC1601N133_KPN_BP	MF476925
NZ_CP012745.1	1/25	<i>Klebsiella</i> phage 2b LV-2017	KY271395
NZ_CP013322.1	1/6	<i>Klebsiella</i> phage ST512-KPC3phi13.1	MK448235
NZ_CP013322.1	1/6	<i>Klebsiella</i> phage ST101-KPC2phi6.1	MK448231
NZ_CP013322.1	1/6	<i>Klebsiella</i> phage ST11-VIM1phi8.1	MK448233
NZ_CP013322.1	1/6	<i>Klebsiella</i> phage 2 LV-2017	KY271396
NZ_CP013322.1	1/6	<i>Klebsiella</i> phage 2b LV-2017	KY271395
NZ_CP015382.1	1/3	<i>Klebsiella</i> phage ST101-KPC2phi6.1	MK448231
NZ_CP015500.1	1/3	<i>Klebsiella</i> phage ST101-KPC2phi6.1	MK448231
NZ_CP015500.1	1/22	<i>Klebsiella</i> phage YMC1601N133_KPN_BP	MF476925
NZ_CP015500.1	1/25	<i>Klebsiella</i> phage 2b LV-2017	KY271395
NZ_FO834906.1	1/10	<i>Klebsiella</i> phage ST11-VIM1phi8.2	MK448234
NZ_CP022127.1	2/6	<i>Klebsiella</i> phage ST13-OXA48phi12.4	MK422450
NZ_CP017934.1	1/53	<i>Klebsiella</i> phage ST405-OXA48phi1.2	MK416007
	1/55	<i>Klebsiella</i> phage 1 LV-2017	KY271401
	1/22	<i>Klebsiella</i> phage ST101-KPC2phi6.3	MK416017
	1/36	<i>Klebsiella</i> phage 2b LV-2017	KY271395
	1/52	<i>Klebsiella</i> phage ST101-KPC2phi6.3	MK416017
	1/52	<i>Klebsiella</i> phage ST147-VIM1phi7.2	MK448232
	1/52	<i>Klebsiella</i> phage 1 LV-2017	KY271401
	1/18	<i>Klebsiella</i> phage ST16-OXA48phi5.1	MK416013
NZ_CP018140.1 NZ_CP018686.1 NZ_CP018695.1 NZ_CP018701.1 NZ_CP018707.1 NZ_CP018713.1 NZ_CP018719 NZ_CP017985.1	1/18	<i>Klebsiella</i> phage 5 LV-2017	KY271399
	1/3	<i>Klebsiella</i> phage ST101-KPC2phi6.1	MK448231
NZ_CP018140.1 NZ_CP018686.1 NZ_CP018695.1 NZ_CP018701.1 NZ_CP018707.1 NZ_CP018713.1 NZ_CP018719 NZ_CP017985.1	1/14	<i>Klebsiella</i> phage YMC1601N133_KPN_BP	MF476925

ТАБЛИЦА 1 (продолжение)

TABLE 1 (continued)

NZ_CP018140.1 NZ_CP018686.1 NZ_CP018695.1 NZ_CP018701.1 NZ_CP018707.1 NZ_CP018713.1 NZ_CP018719 NZ_CP017985.1	1/17	<i>Klebsiella</i> phage 2b LV-2017	KY271395
NZ_CP018458.1	2/6	<i>Klebsiella</i> phage ST13-OXA48phi12.4	MK422450
NZ_CP019047.1	2/11	<i>Klebsiella</i> phage 2 LV-2017	KY271396
NZ_CP019047.1	2/5	<i>Klebsiella</i> phage ST11-OXA245phi3.2	MK416010
NZ_CP019047.1	2/13	<i>Klebsiella</i> phage ST101-KPC2phi6.1	MK448231
NZ_CP019047.1	2/12	<i>Klebsiella</i> phage ST16-OXA48phi5.2	MK448230

ТАБЛИЦА 2

**СПЕЙСЕРНЫЙ СОСТАВ CRISPR-КАССЕТ
ПЕРВОЙ ГРУППЫ ПАН-РЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ
*KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

TABLE 2

**SPACER COMPOSITION OF CRISPR CASSETTES
OF THE FIRST GROUP OF PAN-RESISTANT
KLEBSIELLA PNEUMONIAE STRAINS**

№ штамма в GenBank	NZ_CP014004.1	NZ_CP012753.1
Место и год выделения штамма	Китай, Цзянси 2014	Южная Корея 2013
Кассета 1	TGCCTCCAATGCAATCACCAGCCTGCTAACCGG	TGCCTCCAATGCAATCACCAGCCTGCTAACCGG
	CGTGTGCAAGCGCACCTCGTAGCCGAGCCAGTC	CGTGTGCAAGCGCACCTCGTAGCCGAGCCAGTC
	CGTCATCAGCGCCTTGTTCCAGCGGCGACCACC	CGTCATCAGCGCCTTGTTCCAGCGGCGACCACC
	TCCAGTCGTCGTAGTCTCGGTAATGTCCTCGA	TCCAGTCGTCGTAGTCTCGGTAATGTCCTCGA
	TATCGTGCAGAGTCACAACCTGACGGGATTATC	TATCGTGCAGAGTCACAACCTGACGGGATTATC
	TCGTGCATGGTGAGGATTCTACAGTCGCACCAT	TCGTGCATGGTGAGGATTCTACAGTCGCACCAT
	TACCTCCCGGCGTCCGCGCCAGGGCGATCACGTG	TACCTCCCGGCGTCCGCGCCAGGGCGATCACGTG
	CCTGCAGCTGGCCGTCGAGCTGACGGATGCCGG	CCTGCAGCTGGCCGTCGAGCTGACGGATGCCGG
	TTCATCACGTGTGAGCGGATTTGGCTCTATCCT	TTCATCACGTGTGAGCGGATTTGGCTCTATCCT
	TATCATCCCTATCGCGCAGCACTTCGACGGCGA	TATCATCCCTATCGCGCAGCACTTCGACGGCGA
	TACCGCCGCGATACTGGCAGTTTTCAGCTGAAT	TACCGCCGCGATACTGGCAGTTTTCAGCTGAAT
	TCCCGCTGGGTAAGCAATATATAACATTTGACG	
	TTTAACATTCTGAAAGTGCAATTTTGGAGGCTC	
	TTAAGGAGGGGCGCCATGGAGCCCGTATTGATT	
Кассета 2	CAGCGGCGGCGGTAACGCCGCCAGGAGCAACCT	CAGCGGCGGCGGTAACGCCGCCAGGAGCAACCT
	CACCGATCTGCGCCAGCTGGGTGAGACGATGAC	CACCGATCTGCGCCAGCTGGGTGAGACGATGAC
	TACACTCAAGAAAACAAAATCTCAGGTTGATAC	TACACTCAAGAAAACAAAATCTCAGGTTGATAC
	TGGAAGGCGCGATTGGAGATAGAGCAGCATGA	TGGAAGGCGCGATTGGAGATAGAGCAGCATGA
	CTCGCACAGCATCGCCCGGATCCGCTTCCACGC	CTCGCACAGCATCGCCCGGATCCGCTTCCACGC
	CACCCGCGTTTTTCGAAAGGGATGGCGGCTATGT	CACCCGCGTTTTTCGAAAGGGATGGCGGCTATGT
	CGACGGGGCAGGTTTACGTCTACCCGGGCAGGG	CGACGGGGCAGGTTTACGTCTACCCGGGCAGGG
	CATACCAGTCTCCGCCGCGGTCTACTCAATAT	CATACCAGTCTCCGCCGCGGTCTACTCAATAT
	TCCGCCGTTTAAATCGCGGTGATGATATCCGGCA	TCCGCCGTTTAAATCGCGGTGATGATATCCGGCA
	GGAATCCACGACGCGCCGTACCAGCGCGGGCATTCTGTTCT	TGGAATCCACGACGCGCCGTACCAGCGCGGGCATTCTGTTCT

Примечание. Цветом выделены идентичные спейсеры/

ТАБЛИЦА 3
СПЕЙСЕРНЫЙ СОСТАВ CRISPR-КАССЕТ ВТОРОЙ ГРУППЫ РЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
TABLE 3
SPACER COMPOSITION OF CRISPR CASSETTES OF THE SECOND GROUP OF RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS

№ штамма в GenBank	NZ_CP012743.1	NZ_CP012744.1	NZ_CP012745.1
Место и год выделения штамма	Греция 2011	Греция 2013	Греция 2013
Кассета 1	CATTTCATAGTATCGACTATTTAATTAACA	CATTTCATAGTATCGACTATTTAATTAACA	GAGCAGGCACCGCCGCAACGACGAAGAGCGC
	AGTTCAGCAGGGCAAAGTCTTTACGGTATGC	AGTTCAGCAGGGCAAAGTCTTTACGGTATGC	AAATCAGCCAGCACACGATTCTGGGAAATTT
	TCTGCTGGTTACAGGAGAAAAAATGATTGGT	TCTGCTGGTTACAGGAGAAAAAATGATTGGT	ACAGGCTTACCGTATTGAGACGGTTGCTGAA
	TTATTTCATAAACTAAGTTTGTTCATGCAGT	TTATTTCATAAACTAAGTTTGTTCATGCAGT	GAAACCCCATCAGATGACCTCCCCATGTTGGC
	TTTTTTTGACGAAGACGGCAACGAGTTAGAAG	TTTTTTTGACGAAGACGGCAACGAGTTAGAAG	TTGCTGCTGCTGCTTGGTGATGATCCGTGGTA
	GTCTCTGCCAGTTTACCTGCTCAGCGGATAA	GTCTCTGCCAGTTTACCTGCTCAGCGGATAA	TACAGAACGACTGAGGCGGCGTGTATTGCATA
	CTGACAGCTGGCGCTAACCCGCTGTTTATCGC	CTGACAGCTGGCGCTAACCCGCTGTTTATCGC	GATCTTAACTCTATTGCCAATGGCGCAATTCA
	CGTGAGCATCTGGGCATCTTCAGTGATAGCGT	CGTGAGCATCTGGGCATCTTCAGTGATAGCGT	GGCGATGCGGCTCTGCTGGCTATCGGTAAAA
	TATTTTTGAGATGATGGATTGTTGCACACCAG	TATTTTTGAGATGATGGATTGTTGCACACCAG	AATGCAGCAACGGCAAAATATATCGCCGGTAA
	CGCTTCTCGGCTTCTCTGAATTTATCCGCCCA	CGCTTCTCGGCTTCTCTGAATTTATCCGCCCA	GGGCTGCCGACGCTGGGACGAGTCGAGCCC
	ATCCCGACCCGCTCTCCAGAGCGAATACGAT	ATCCGACCCGCTCTCCAGAGCGAATACGAT	CCGCAATAACAAAAATAAATGAGGGTTAAAGT
	TGCTTTATGGCAAATAAGAGAGGATATAACCA	TGCTTTATGGCAAATAAGAGAGGATATAACCA	GTAAATGGGAATGAGTAGAAGAGCGTCATTGG
	GCGTCGCGCTCCCAAATAGCCAGGCTGTTATT	GCGTCGCGCTCCCAAATAGCCAGGCTGTTATT	CCCCCGGCACATGCTTAAACGCGCTATCACG
	TAAATCCAGCTGGTTTGACGTAGTGGCACCTG	TAAATCCAGCTGGTTTGACGTAGTGGCACCTG	GGCATCTGTTGTGTAATGTTGAGTTTTTTTCA
	CAATGAAGGCTTATAAGGGTGAAAGAGAGCAGG	CAATGAAGGCTTATAAGGGTGAAAGAGAGCAGG	CAGGTTAAACATGTAAAAAATGACCGTCGCCG
	CAGTCGGTAACGGCTGGCGGTGACCTCAAAGC	CAGTCGGTAACGGCTGGCGGTGACCTCAAAGC	CACATTGCCGGTCTGAAAAAGTATTGAAAAT
	GTGCCATTTTATTGCTTAAATAAATATC	GTGCCATTTTATTGCTTAAATAAATATC	TCCGCACAGTCAAACGCTCCAGACACCAACCC
	CCTATTGTGTCAGTCGTACACAGCTGAATCAG	CCTATTGTGTCAGTCGTACACAGCTGAATCAG	CCGGAACACCAACAGTAACAGTACTGTAGGC
	GGCGCGCGGAATAACCACTTTATGAGCAGGT	GGCGCGCGGAATAACCACTTTATGAGCAGGT	TGACCCCTGTTGATTTTGTTCAGGTAATACGT
	GCGACCATGCGGTAGTCTTCAATGACGTAATC	GCGACCATGCGGTAGTCTTCAATGACGTAATC	TTAACCTGCTGTTCTGGTTTCCGCCCAGGAT
	CCCCGTCGTCATTGCGGCATCTGCGCACAGA	CCCCGTCGTCATTGCGGCATCTGCGCACAGA	GAACTGAATTCGAAGGTGGGTGATCATCTTCC
	TAAACAGGGCCATTTCCCGGGTTGCCAGACGA	TAAACAGGGCCATTTCCCGGGTTGCCAGACGA	GGACCCGAGCGACCCGGTCAACCTCCGACCT
	TCACCTCGTAGCCGATACCACTTTTCGCGCAG	TCACCTCGTAGCCGATACCACTTTTCGCGCAG	CCGTCGAACGGCGGTTATATCATCTTGTAGTC
	GGGTTCACTTGGGTGAACCTGAACCTAAT	GGGTTCACTTGGGTGAACCTGAACCTAAT	ACCGATCCCACAATTGCGCGGTTGAGATTGA

вать об их едином происхождении. Можно предположить, что в результате широкой циркуляции штаммы генетически изменялись, но при этом сохраняли структуру CRISPR-кассет, а в условиях стационара (внутригоспитальные вспышки) обменивались генетической информацией, приобретая новые свойства, но при этом также сохраняли структуру CRISPR-кассеты. Для подтверждения данного момента был проведён филогенетический анализ исследуемых штаммов на основе нуклеотидной последовательности 16S rRNA (рис. 4).

Филогенетический анализ показал, что в исследуемых группах штаммы со сходным спейсерным со-

ставом CRISPR-кассет являются близкородственными, так как располагаются на ветках, имеющих одного предка (один узел). При этом штамм (NZ_CP012745.1), входящий в группу 2 и обладающий индивидуальным спейсерным составом CRISPR-кассет, не имеет единого предка с остальными представителями данной группы.

Таким образом, обнаружение схожих спейсеров в CRISPR-кассетах различных штаммов может указывать на филогенетические связи между штаммами. Данный приём может быть использован при проведении эпидемиологического анализа вспышек заболеваний, вызванных антибиотикорезистентными штаммами *Klebsiella pneumoniae*.

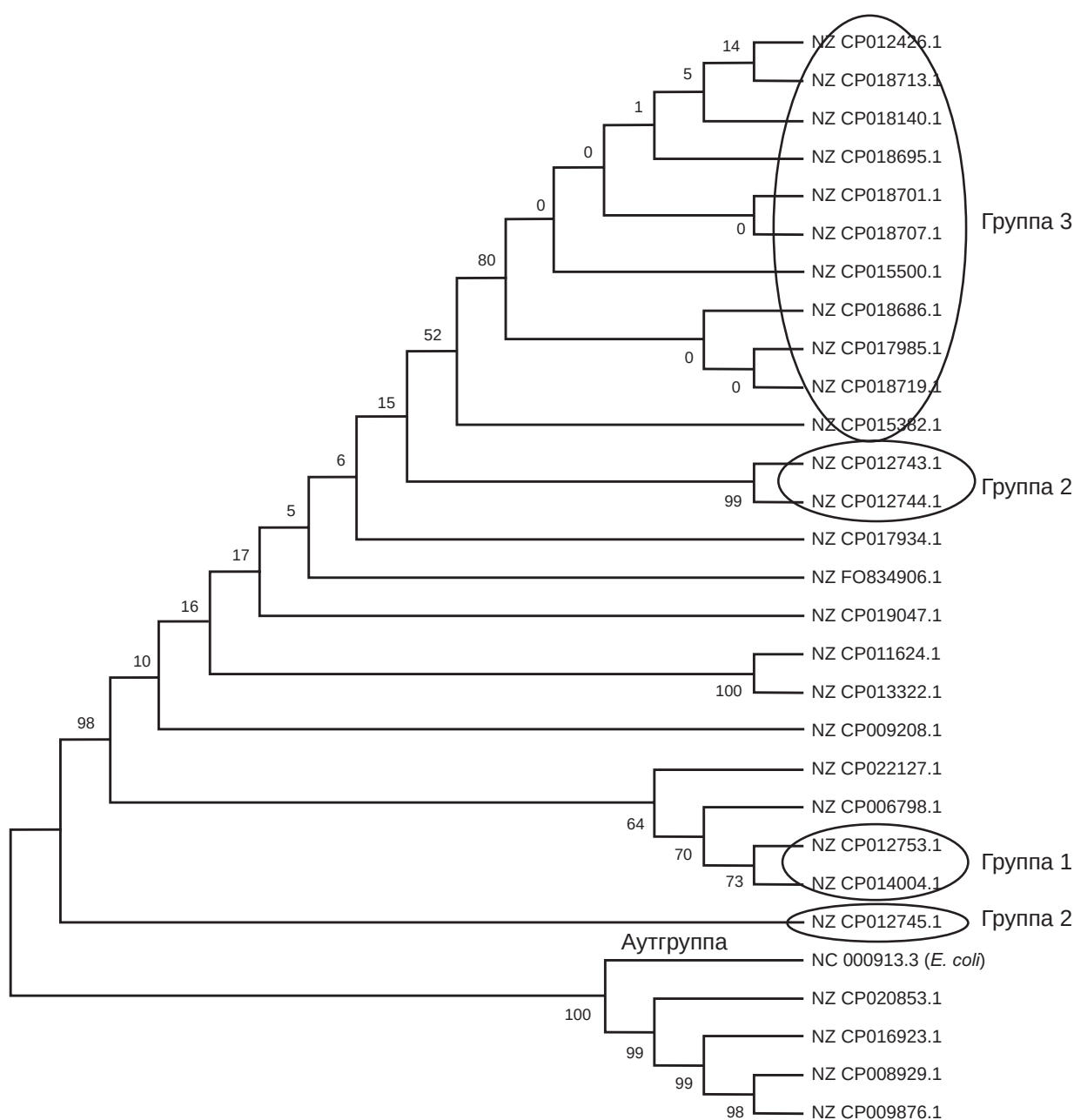


РИС. 4.
Филогенетическое дерево на основе маркера 16S rRNA антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* (использована модель генетических дистанций Maximum Composite Likelihood)

FIG. 4.
Phylogenetic tree based on the 16S rRNA marker of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains (Maximum Composite Likelihood model of genetic distances was used)

Скрининг бактериофагов по спейсерным последовательностям CRISPR-кассет штаммов из вышеперечисленных групп представлен в таблице 1, за исключением двух пан-резистентных штаммов из первой группы (NZ_CP014004.1 и NZ_CP012753.1), так как не было выявлено полного соответствия спейсеров в составе их кассет протоспейсерам из известных баз данных. Однако проведенный анализ спейсерных последовательностей позволил установить наибольшее их соответствие протоспейсерам фагов бактерий рода *Klebsiella*, *Salmonella*, относящихся к одному семейству Enterobacteriaceae (табл. 4).

Важно отметить, что в CRISPR-кассетах исследуемых штаммов отмечалось соответствие одного из спейсеров протоспейсерам нескольких фагов бактерий, относящихся к одному семейству. Это может указывать на консервативность приобретаемых новых спейсеров из участков ДНК фагов. Таким образом, бактерия «одним спейсером» защищается от нескольких фагов. Наличие данного механизма повышает эффективность защитного действия систем CRISPR/Cas.

Изучение выявленных бактериофагов показало, что все *Klebsiella* phage являются профагами бактерий *Klebsiella pneumoniae*, относящихся к изолятам, принадлежащим к клональной группе ST 307 (по данным NCBI), продуцирующих карбапенемазу (табл. 5). Показано, что геном ST 307 кодирует генетические особенности, которые могут обеспечить преимущество в адаптации к больничной среде и человеку-хозяину. Все изоляты ST 307 являются капсу-

лированными и, следовательно, обладают более высокой устойчивостью к уничтожению, опосредованному комплексом. Всё это обеспечивает распространение и преобладание штаммов с данной генетической последовательностью по всему миру [24]. Как известно, профаги остаются латентными в геноме в течение нескольких клеточных делений, но под воздействием внешних факторов переходят в вирулентные формы и лизируют бактериальную клетку. Таким образом, исследуемые нами антибиотикорезистентные штаммы имеют генетическую память о данных бактериофагах в виде спейсеров их CRISPR-кассет.

Данный анализ исследуемых штаммов показал достаточно широкий спейсерный состав их CRISPR-кассет, разнообразие бактериофагов, выявленных через спейсерные последовательности, что позволяет предположить, что они обладают не только антибиотикорезистентностью, но и устойчивостью ко многим бактериофагам. Следовательно, персонифицированный подход к комплексному подбору антибиотиков и бактериофагов в перспективе поможет решить вопрос о лечении заболеваний, вызванных данными штаммами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований позволили получить информацию о строении CRISPR/Cas-систем в геномах антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella*

ТАБЛИЦА 4
РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИОФАГОВ,
СООТВЕТСТВУЮЩИХ ИДЕНТИЧНЫМ
СПЕЙСерам В ПЕРВОЙ ГРУППЕ ШТАММОВ
***KLEBSIELLA PNEUMONIAE* С МНОЖЕСТВЕННОЙ**
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ

Номер доступа штамма GenBank	Нуклеотидная последовательность спейсера	Бактериофаг	Номер доступа бактериофага GenBank	Количество нуклеотидных замен
NZ_CP014004.1 NZ_CP012753.1	TTCATCACGTGTGAGCGGATTGGCTCTATCCT	<i>Klebsiella</i> phage 6 LV-2017	KY271400	2
NZ_CP014004.1 NZ_CP012753.1	TGCCTCCAATGCAATCACCGGCTGCTAACCGG	<i>Klebsiella</i> phage ST101-KPC2phi6.1	MK448231	1
NZ_CP014004.1 NZ_CP012753.1	CGTCATCAGCGCCTTGTTCCAGCGGCGACCACC	<i>Salmonella</i> phage FSL SP-062	KC139634	2
		<i>Klebsiella</i> phage ST512-KPC3phi13.1	MK448235	1
		<i>Klebsiella</i> phage ST11-VIM1phi8.1	MK448233	1
NZ_CP014004.1 NZ_CP012753.1	TCCAGTCGTCGTAGTCCTCGGTAATGTCCTCGA	<i>Klebsiella</i> phage ST101-KPC2phi6.1	MK448231	1
		<i>Klebsiella</i> phage 2b LV-2017	KY271395	1
		<i>Klebsiella</i> phage 2 LV-2017	KY271396	2

ТАБЛИЦА 5

ПЕРЕЧЕНЬ ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ
БАКТЕРИОФАГОВ В ПЕРВОЙ ГРУППЕ ШТАММОВ
KLEBSIELLA PNEUMONIAE С МНОЖЕСТВЕННОЙ
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ

Бактериофаг	Номер доступа бактериофага (GenBank)	Источник выделения бактериофага	Место выделения бактериофага
<i>Klebsiella</i> phage 6 LV-2017	KY271400	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ST307	Италия, Рим
<i>Klebsiella</i> phage ST101-KPC2phi6.1	MK448231	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ST101-KPC2	Испания, Ла-Корунья
<i>Salmonella</i> phage FSL SP-062	KC139634	Молочная ферма	Нью-Йорк, США
<i>Klebsiella</i> phage ST512-KPC3phi13.1	MK448235	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ST512-KPC3	Испания, Ла-Корунья
<i>Klebsiella</i> phage ST11-VIM1phi8.1	MK448233	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ST11-VIM1	Испания, Ла-Корунья
<i>Klebsiella</i> phage ST101-KPC2phi6.1	MK448231	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ST101-KPC2	Испания, Ла-Корунья
<i>Klebsiella</i> phage 2b LV-2017	KY271395	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KH43 – клон <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST307	Италия, Рим
<i>Klebsiella</i> phage 2b LV-2017	KY271396	<i>Klebsiella pneumoniae</i> H151440672 – клон <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST307	Италия, Рим

TABLE 5

LIST OF IDENTIFIED BACTERIOPHAGES
IN THE FIRST GROUP OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
STRAINS WITH MULTIPLE ANTIBIOTIC RESISTANCE

pneumoniae и об их функциональных особенностях. Выявленное разнообразие спейсерных последовательностей свидетельствует об эволюционной истории и адаптационных возможностях данных штаммов. При этом обнаружение схожих спейсеров в CRISPR-кассетах различных штаммов может указывать на филогенетические связи между штаммами. Изучение структуры взаимодействия фагов и бактерий, основанное на спейсерных и протоспейсерных последовательностях, позволяет определить резистентность и чувствительность штаммов к специфицированным бактериофагам. Таким образом, была определена предполагаемая устойчивость антибиотикорезистентных штаммов к конкретным фагам. Применение механизмов изучения CRISPR/Cas-систем в геномах бактерий с помощью биоинформационного анализа в перспективе даст возможность получать более полные сведения о свойствах возбудителя, об их эволюции и выполнять подбор высокоспецифичных бактериофагов.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-25-00449 (<https://rscf.ru/project/22-25-00449>).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. World Health Organization. *Global action plan on antimicrobial resistance*. Geneva: WHO; 2015.
2. Webale MK, Wanjala C, Guyah B, Shaviya N, Munyekenye GO, Nyanga PL, et al. Epidemiological patterns and antimicrobial

resistance of bacterial diarrhea among children in Nairobi City, Kenya. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2020; 13(3): 238-246.

3. Yangzom T, Tsering DC, Kar S, Kapil J. Antimicrobial susceptibility trends among pathogens isolated from blood: A 6-year retrospective study from a tertiary care hospital in East Sikkim, India. *J Lab Physicians*. 2020; 12(01): 3-9. doi: 10.1055/s-0040-1712814

4. Zalewska A, Wilson J, Kennedy S, Lockhart M, MacLeod M, Malcolm W. Epidemiological analysis of antimicrobial resistance in *Staphylococcus epidermidis* in Scotland, 2014–2018. *Microbial Drug Resistance*. 2021; 27(4): 485-491. doi: 10.1089/mdr.2019.0502

5. Mouiche MMM, Moffo F, Akoachere J-FTK, Okah-Nnane NH, Mapiefou NP, Ndze VN, et al. Antimicrobial resistance from a one health perspective in Cameroon: A systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2019; 19(1): 1135. doi: 10.1186/s12889-019-7450-5

6. Melese A, Genet C, Andualem T. Prevalence of Vancomycin resistant enterococci (VRE) in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2020; 20(1): 124. doi: 10.1186/s12879-020-4833-2

7. Cassini A, Plachouras D, Monnet D. Attributable deaths caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in France – Authors' reply. *Lancet Infect Dis*. 2019; 19(2): 129-130. doi: 10.1016/s1473-3099(19)30004-0

8. Phodha T, Riewpaiboon A, Malathum K, Coyte P. Annual relative increased in inpatient mortality from antimicrobial resistant nosocomial infections in Thailand. *Epidemiol Infect*. 2019; 147: 133. doi: 10.1017/s0950268818003436

9. Pessoa e Costa T, Duarte B, João AL, Coelho M, Formiga A, Pinto M, et al. Multidrug-resistant bacteria in diabetic foot infections: Experience from a Portuguese tertiary centre. *Int Wound J*. 2020; 17: 1835-1839. doi: 10.1111/iwj.13473

10. World Health Organization. *Report on surveillance of antibiotic consumption: 2016–2018 early implementation*. Geneva: WHO; 2018.

11. Shrestha P, Cooper B, Coast J, Oppong R, Do Thi Thuy N, Phodha T, et al. Enumerating the economic cost of antimicrobial resistance per antibiotic consumed to inform the evaluation of in-

interventions affecting their use. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018; 7(1): 98. doi: 10.1186/s13756-018-0384-3

12. Brauberg CA, Palacios M, Miller VL. Klebsiella: A long way to go towards understanding this enigmatic jetsetter. *F1000Prime Reports*. 2014; 6: 64. doi: 10.12703/P6-64

13. Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Николаева И.В., Семенова Д.Р., Любин С.А., и др. Клебсиеллезный неонатальный сепсис. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2016; 11(1): 82-86. [Khaertynov KhS, Anokhin VA, Nikolaeva IV, Semenova DR, Lyubin SA, et al. Klebsiella neonatal sepsis. *Medical Bulletin of the North Caucasus*. 2016; 11(1): 82-86. (In Russ.)]. doi: 10.21508/1027-4065-2019-64-5-176-182

14. Wyres KL, Holt KE. Klebsiella pneumonia population genomics and antimicrobial-resistant clones. *Trends Microbiol*. 2016; 24: 944-956. doi: 10.1016/j.tim.2016.09.007

15. Makabenta J, Nabawy A, Li C, Schmidt-Malan S, Patel R, Rotello V. Nanomaterial-based therapeutics for antibiotic-resistant bacterial infections. *Nature Reviews Microbiology*. 2021; 19: 23-26. doi: 10.1038/s41579-020-0420-1

16. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*. 2005; 60: 174-182. doi: 10.1007/s00239-004-0046-3

17. Nuñez JK, Kranzusch PJ, Noeske J, Wright AV, Davies CW, Doudna JA. Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nat Struct Mol Biol*. 2014; 21: 528-534. doi: 10.1038/nsmb.2820

18. Nuñez JK, Harrington LB, Kranzusch PJ, Engelman AN, Doudna JA. Foreign DNA capture during CRISPR-Cas adap-

tive immunity. *Nature*. 2015; 527: 535-538. doi: 10.1038/nature15760

19. Jackson SA, McKenzie RE, Fagerlund RD, Kieper SN, Fineran PC, Brouns SJJ. CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science*. 2017; 356: eaal5056. doi: 10.1126/science.aal5056

20. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009; 155: 733-740. doi: 10.1099/mic.0.023960-0

21. Степаненко Л.А., Джиоев Ю.П., Злобин В.И., Борисенко А.Ю., Саловарова В.П., Арефьева Н.А., и др. Разработка подходов скрининга высокоспецифичных бактериофагов на основе биоинформационного анализа структур CRISPR-Cas систем *Corynebacterium diphtheriae*. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021; 11(2): 216-227. [Stepanenko LA, Dzhioev YuP, Zlobin VI, Borisenko AY, Salovarova VP, Arefieva NA, et al. Development of screening approaches of highly specific bacteriophages based on bioinformatic analysis of CRISPR-Cas structures of *Corynebacterium diphtheriae* systems. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021; 11(2): 216-227. (In Russ.)]. doi: 10.21285/2227-2925-2021-11-2-216-227

22. CRISPRCasFinder. URL: <https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index> [date of access: 22.08.2023].

23. CRISPRone. URL: <https://omics.informatics.indiana.edu/CRISPRone/> [date of access: 22.08.2023].

24. Villa L, Feudi C, Fortini D, Brisse S, Passet V, Bonura C, et al. Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. *Microbial Genomics*. 2017; 3. doi: 10.1099/mgen.0.000110

Сведения об авторах

Степаненко Лилия Александровна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии и биотехнологии, Научно-исследовательский институт биомедицинских технологий, ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: steplia@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5792-7283>

Сухов Борис Геннадьевич – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории наночастиц, ФГБУН Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, e-mail: boris_sukhov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9751-6454>

Конькова Татьяна Владимировна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории наночастиц, ФГБУН Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, e-mail: konbuivol_2@yahoo.com, <https://orcid.org/0009-0002-0706-8692>

Бединская Виктория Владимировна – аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: vika-2801@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0000-9536-4795>

Клушина Надежда Владимировна – аспирант, ведущий инженер лаборатории наночастиц, ФГБУН Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, e-mail: klusinanadezda677@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0008-7776-2931>

Злобин Владимир Игоревич – доктор медицинских наук, академик РАН, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: vizlobin@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0164-5113>

Information about the authors

Lilia A. Stepanenko – Cand. Sc. (Med.), Senior Research Officer at the Laboratory of Molecular Virology and Biotechnology, Research Institute of Biomedical Technologies, Irkutsk State Medical University, e-mail: steplia@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5792-7283>

Boris G. Sukhov – Cand. Sc. (Chem.), Leading Research Officer at the Laboratory of Nanoparticles, Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: boris_sukhov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9751-6454>

Tatyana V. Kon'kova – Cand. Sc. (Chem.), Senior Research Officer at the Laboratory of Nanoparticles, Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: konbuivol_2@yahoo.com, <https://orcid.org/0009-0002-0706-8692>

Victoria V. Bedinskaya – Postgraduate at the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Irkutsk State Medical University, e-mail: vika-2801@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0000-9536-4795>

Nadezhda V. Klushina – Postgraduate, Leading Engineer at the Laboratory of Nanoparticles, Voevodsky Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, e-mail: klusinanadezda677@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0008-7776-2931>

Vladimir I. Zlobin – Dr. Sc. (Med.), Member of the RAS, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Irkutsk State Medical University, e-mail: vizlobin@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0164-5113>