

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

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

ПРИМЕНЕНИЕ АЛГОРИТМА ДЕТЕКЦИИ И АНАЛИЗА CRISPR-КАССЕТ В ГЕНОМАХ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

¹ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 664003, Иркутск, Россия;

²ФГБун «Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского» СО РАН, 630090, Новосибирск, Россия

Klebsiella pneumoniae относится к группе ESKAPE патогенов и представляет крайне серьёзную проблему для здравоохранения, поскольку является причиной возникновения вспышек нозокомиальных инфекций из-за способности формирования множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Для решения данной проблемы необходима разработка новых подходов, основанная на знаниях фундаментальных свойств устойчивости к антимикробным препаратам (АМП) и к бактериофагам. Цель исследования: апробировать подходы поиска CRISPR-кассет в геномах клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с помощью молекулярно-генетических методов исследования для дальнейшей идентификации бактериофагов на основе биоинформатического анализа их спейсерного состава. На первом этапе проведён биоинформатический поиск и анализ разнообразия CRISPR/Cas-систем во всех полных нуклеотидных последовательностях геномов *Klebsiella pneumoniae* из базы NCBI, что составило 1311 штаммов. На основе полученных данных разработаны олигонуклеотидные праймеры для проведения ПЦР с целью выявления CRISPR-кассет в геномах 100 клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, полученных от детей, госпитализированных в областную инфекционную больницу г. Иркутска. В результате в 17,0% исследуемых штаммов выявлены и расшифрованы локусы, содержащие CRISPR-касеты. Из них в 73,3% случаев идентифицирована одна кассета, в 26,7% две. На основе выявленных спейсерных последовательностей CRISPR-кассет проведён скрининг бактериофагов. В 71,4% случаев отмечалось полное соответствие спейсеров протоспейсерам фагов из известных баз данных, характерных для бактерий рода *Klebsiella*. Получен полный спектр бактериофагов с указанием их номера доступа в GenBank, к которым, предположительно, исследуемые клинические изоляты обладают устойчивостью. Данные методы исследования могут лечь в основу разработки персонализированных подходов в диагностике и лечении сложных инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*; спейсер; антибиотикорезистентность; CRISPR/Cas-система; бактериофаг; таргетный.

Для цитирования: Степаненко Л.А., Сухов Б.Г., Конькова Т.В., Бединская В.В., Клушина Н.В., Злобин В.И. Применение алгоритма детекции и анализа CRISPR-кассет в геномах клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2024; 69 (1): 45-51. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-1-45-51>

Для корреспонденции: Степаненко Лилия Александровна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. молекулярной вирусологии и биотехнологии НИИ биомедицинских технологий ИГМУ; e-mail: steplia@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Поступила 21.09.2023

Принята к печати 15.01.2024

Опубликовано 17.01.2024

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

APPLICATION OF AN ALGORITHM FOR DETECTION AND ANALYSIS OF CRISPR CASSETTES IN THE GENOMES OF CLINICAL ISOLATES OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Irkutsk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the RF, 664003, Irkutsk, Russia;

²Federal State Budgetary Institution of Science «Institute of Chemical Kinetics and Combustion named after. V.V. Voivodship» Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090, Novosibirsk, Russia

Klebsiella pneumoniae belongs to the ESKAPE group. It poses a serious problem for global health, as it is capable of developing multidrug resistance and causes outbreaks of nosocomial infections. To solve this problem, it is necessary to develop new approaches based on knowledge of the fundamental properties of resistance to antibacterial drugs and bacteriophages. Purpose of the study: to test approaches to searching for CRISPR cassettes in the genomes of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* using developed locus-specific primers for identifying bacteriophages based on bioinformatics analysis of their spacer composition. At the first stage, a bioinformatic search and analysis of the diversity of CRISPR/Cas - systems was carried out in all full genome sequences of *Klebsiella pneumoniae* from the NCBI database, which amounted to 1311 strains. Further, based on the data obtained, oligonucleotide primers were developed for PCR to detect CRISPR - cassettes in the genomes of 100 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* obtained from children who were treated at the regional infectious diseases hospital in Irkutsk. As a result, in 17.0% of the studied strains, loci containing CRISPR - cassettes were identified and deciphered. Of these, in 73.3% of cases one cassette was identified, in 26.7% two.

Based on the deciphered spacer sequences of CRISPR - cassettes, bacteriophages were screened. As a result, in 71.4% of cases, there was complete correspondence of spacers to phage protospacers from known databases specific to bacteria of the genus *Klebsiella*. Thus, a complete spectrum of bacteriophages was obtained, indicating their GenBank accession number, to which the studied clinical isolates were presumably resistant. These research methods can form the basis for the development of personalized approaches to the diagnosis and treatment of complex infectious diseases.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; spacer; antibiotic resistance; CRISPR/Cas-system; bacteriophage; targeted.

For citation: Stepanenko L. A., Sukhov B. G., Kon'kova T. V., Bedinskaya V. V., Klushina N. V., Zlobin V. I. Application of an algorithm for detection and analysis of crisper cassettes in the genomes of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (1): 45-51. (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-1-45-51>

For correspondence: Stepanenko L.A., Cand. Sci. (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Virology and Biotechnology, Research Institute of Biomedical Technologies, Irkutsk State Medical University; e-mail: steplia@mail.ru

Information about authors:

Stepanenko L. A., <https://orcid.org/0000-0002-5792-7283>;

Sukhov B. G., <https://orcid.org/0000-0002-9751-6454>;

Kon'kova T.V., <https://orcid.org/0009-0002-0706-8692>;

Bedinskaya V.V., <https://orcid.org/0009-0000-9536-4795>;

Klushina N.V., <https://orcid.org/0009-0008-7776-2931>;

Zlobin V. I., <https://orcid.org/0000-0002-0164-5113>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-25-00449, <https://rscf.ru/project/22-25-00449/>.

Received 21.09.2023

Accepted 15.01.2024

Published 17.01.2024

Введение. *Klebsiella pneumoniae* - вид грамотрицательных бактерий, являющихся симбионтами животных и человека, колонизирующих слизистые оболочки дыхательных путей, преимущественно носоглотки, и кишечника. Жизнеспособные *Klebsiella pneumoniae* распространены повсеместно, их можно обнаружить в почве, в естественных водоёмах, на дикорастущих и культурных растениях [1,2]. В доантибиотическую эру *Klebsiella pneumoniae* являлась одним из приоритетных возбудителей внебольничных пневмоний, особенно тяжело протекающих на фоне иммунодефицитных состояний. В эру антибиотиков она стала основной причиной внутрибольничных инфекций [1,3] и фактором риска тяжёлых инфекций мочевыводящих и дыхательных путей, кожи, мягких тканей, ЖКТ, септицемии и т. д. [4,5]. Показатели смертности от заболеваний, вызванных *Klebsiella pneumoniae* в разных странах колеблются от 9 до 50% [6-9]. В особую группу риска по развитию нозокомиальной клебсиеллезной инфекции входят новорожденные дети, особенно недоношенные, и дети первых лет жизни [10-12]. Всемирная организация здравоохранения отнесла *Klebsiella pneumoniae* к возбудителям, представляющим значительную угрозу общественному здоровью в связи со способностью формировать множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) и передавать её другим бактериям. Для решения глобальной проблемы необходима разработка новых подходов в борьбе с данным возбудителем, основанная на знаниях фундаментальных свойств его устойчивости к современным антимикробным препаратам (АМП) и, в том числе, к бактериофагам. Одним из реальных способов эффективной борьбы является недавно открытая у бактерий система CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats /CRISPR - associated proteins или короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами с CRISPR-ассоциированными белками) [13-16]. Она

представляет собой аналог «адаптивного иммунитета» эукариот, направленного против чужеродной ДНК или РНК. При взаимодействии с бактериофагом данная система способна вырезать и встраивать фрагменты ДНК в геном бактерий в виде спейсеров, разделённых палиндромными повторами, формируя CRISPR-касеты. При запуске процесса иммунного ответа на повторное внедрение бактериофага на спейсерах реплицируются молекулы РНК, которые по принципу комплементарности образуют молекулы с одной из нитей фаговой ДНК. Данные комплексы распознаются белковыми компонентами Cas, которые их расщепляют. Так можно охарактеризовать один из многочисленных процессов формирования защитных механизмов у бактерий в отношении чужеродного генетического материала в виде CRISPR-кассет со спейсерами [17-20]. Продemonстрировано участие CRISPR/Cas-систем бактерий в обеспечении устойчивости к вирулентным фагам [21,22]. Анализ в данных работах строился на исследовании полногеномных последовательностей бактерий. Данный метод дорогостоящий и продолжительный по времени. Поэтому поиск способов и подходов быстрого обнаружения и анализа структурных компонентов CRISPR/Cas-систем в геноме бактерий для идентификации бактериофагов, способных с высокой долей результативности уничтожать тот или иной штамм, выделенный от конкретного человека, становится актуальным.

Цель исследования: апробировать подходы поиска CRISPR-кассет в геномах клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с помощью молекулярно-генетических методов исследования для дальнейшей идентификации бактериофагов на основе биоинформатического анализа их спейсерного состава.

Материал и методы. Для реализации исследования использован молекулярно-генетический и биоинформатический методы. Для поиска и анализа разнообразия

CRISPR/Cas-систем в геномных структурах штаммов *Klebsiella pneumoniae* из базы данных NCBI отобраны все полногеномные последовательности, что составило 1311 штаммов. Использован разработанный алгоритм поиска сайтов CRISPR/Cas-систем и детектируемых ими фаговых рас посредством программных методов биоинформатики [23]. Для поиска локусов CRISPR/Cas-систем и генов Cas, определения их функциональных и структурных характеристик использованы три программных метода моделирования: MacromolecularSystemFinder (MacSyF, ver. 1.0.2), с вспомогательными пакетами makeblastDB (ver.3.0) и HMMER (ver. 2.2.28), и онлайн доступных софтов: CRISPRCasFinder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>) и CRISPROne (<https://omics.informatics.indiana.edu/CRISPRone/>). Для детекции бактериофагов в обнаруженных спейсерных участках использована программа CRISPRTarget (http://crispr.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html). Результаты считались достоверными при совпадении повторов и спейсеров в ряде программ. На основе полученных данных разработаны олигонуклеотидные праймеры для проведения ПЦР с целью определения и дальнейшего анализа генетического состава CRISPR-кассет исследуемых клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*. Проведено выравнивание всех локусов, содержащих CRISPR-кассеты, в программе MEGAX64.exe, и по геномным последовательностям консенсусных участков выполнено конструирование праймеров с использованием онлайн-блока Primer-BLAST. В результате анализа произведён дизайн 21 пары праймеров, из них 19 пар на первую по расположению кассету, и две пары на вторую. Апробация праймеров проведена на клинических изолятах чистой культуры *Klebsiella pneumoniae*, полученных от детей, госпитализированных в областную инфекционную больницу г. Иркутска, с различными нозологическими формами с января по май 2022 года. Выделение чистой культуры и идентификация *Klebsiella pneumoniae* выполнены на базе бактериологической лаборатории Иркутской областной инфекционной больницы. Всего получено 100 штаммов. Материал был собран от детей в возрасте от 1 месяца до 7,5 лет, и одного подростка 17-ти лет. Была создана база данных, представляющая собой совокупность следующих информационных сведений: пол, возраст, материал, анти-

биотикограмма, фагочувствительность. Все клинические изоляты находились в криохранилище (-74 °С) до и после проведения исследований. Молекулярные методы включали ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации, которые выполнялись на базе НИИ биомедицинских технологий ИГМУ. Экстракция ДНК проводилась с использованием отечественных коммерческих наборов «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия). Процесс амплификации с использованием прибора «Терцик» производства ООО «ДНК Технология» (Москва). Реакция амплификации осуществлялась в объёме 25 мкл. Для амплификации готовили 2-х реакционную смесь. Условия проведения реакции: 95 °С - 15 минут; 45 циклов: плавление 95 °С - 15 с, отжиг праймеров °С - 20 с и элонгация 72 °С - 15 секунд. Температура отжига рассчитывалась для каждой пары праймеров. Разделение фрагментов проведено в агарозном геле с концентрацией агарозы 1,8 %. В каждом ряду дорожек геля обязательно присутствовал отрицательный контроль ПЦР (К-) и маркер молекулярных масс ДНК.

Секвенирование ПЦР-фрагментов проведено в ЗАО «Евроген» (Москва). Сиквенсную хроматограмму анализировали при помощи программы ChromasVersion 2.6.6.

Результаты. Из 1311 полногеномных последовательностей штаммов *Klebsiella pneumoniae*, полученных из базы данных NCBI, в 232 обнаружены CRISPR локусы, что составило 17,5%. При помощи биоинформатических механизмов поиска в выявленных CRISPR/Cas-системах в 51,7% случаев определено наличие одной CRISPR-кассеты, в 48,3% - две. По идентифицированным Cas-генам система отнесена к Type-I Subtype-I-E. На основе анализа полученных данных разработаны олигонуклеотидные праймеры для выполнения ПЦР с целью определения CRISPR-кассет в штаммах *Klebsiella pneumoniae*.

В геномах отобранных клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* удалось детектировать продукты амплификации с помощью разработанных праймеров. При работе с данными изолятами положительный результат получен при использовании пяти пар праймеров. В 17-ти из 100 образцов определены CRISPR-кассеты, что составило 17,0%, что коррелирует с вышеизложенными мировыми данными (рис. 1).

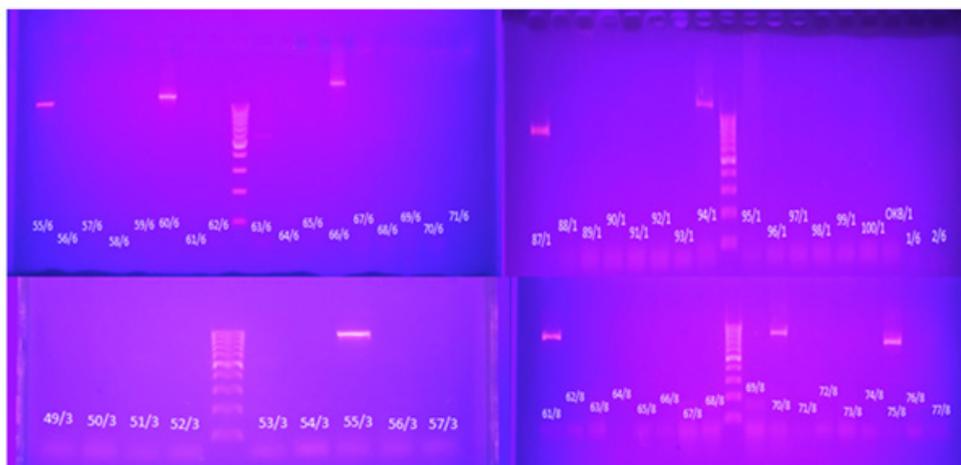


Рис. 1. Детекция продуктов амплификации в агарозном геле при определении CRISPR-кассет в клинических изолятах *Klebsiella pneumoniae* с использованием разработанных праймеров (числа над дорожками соответствуют № штамма/№ праймера).

Для подтверждения наличия CRISPR-кассет и их расшифровки, 31 положительный образец отправлен на секвенирование. Для идентификации CRISPR-кассет проведено не полное секвенирование генома бактерий, а только участков с ДНК продуктом, содержащим искомый локус. Это более быстрый и менее затратный метод по сравнению с полногеномным секвенированием и его даль-

нейшим анализом. После секвенирования в 27 из 31 локуса обнаружены и расшифрованы CRISPR-кассеты. Четыре локуса не отсеквенированы из-за формирования шпилек, возможно обусловленных наличием консенсусных повторов, после которых наблюдался обрыв синтеза ДНК цепи. Всего из 17 штаммов в 13 (73,3%) идентифицирована одна кассета, в 4 (26,7%) - две (табл. 1).

Таблица 1

Схема расположения CRISPR-кассет в геномах клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с указанием количества спейсеров

Штамм	CRISPR-кассета 1	CRISPR-кассета 2
1	12	9
5	11	
11		4
26		7
27	15	
38		5
55	9	
60	13	
61	9	8
70	10	7
75		7
76	9	
79	16	
87	7	5
90	9	
94	14	8
100		7

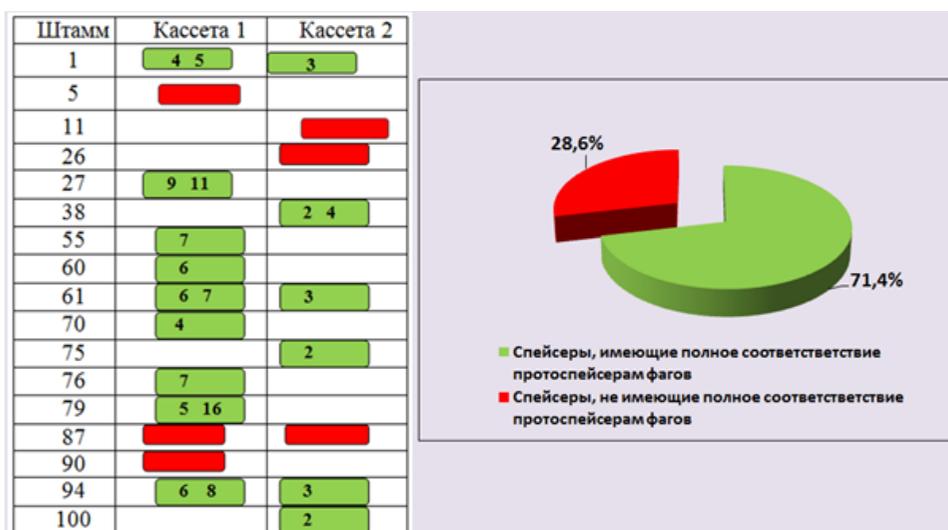


Рис. 2. Наличие и расположение CRISPR-кассет с указанием номеров спейсеров, имеющих полное соответствие протоспейсерам фагов в геномах клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*.

В пяти клинических штаммах с использованием двух различных пар праймеров выявлены идентичные CRISPR-кассеты. Это позволило отобрать более точные

олигонуклеотиды, которые определили полный состав кассет с достаточно длинными (130-150 н.о.) фланкирующими их участками. Количество спейсеров в кассетах со-

Таблица 2

Спейсеры и соответствующие им протоспейсеры фагов в геномах клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*

Штамм	№ кассеты / № спейсера	Бактериофаг	Номер доступа в GenBank
1	1/5	Klebsiella phage ST13-OXA48phi12.5.	МК714353
	1/4	Klebsiella phage Kp4862-1	ОК490415
	1/4	Klebsiella phage Kp4856-1	ОК490410
	1/4	Klebsiella phage 2b LV-2017	КУ271395
	1/4	Klebsiella phage ST101-KPC2phi6.1.	МК448231
	1/4	Klebsiella phage ST405-OXA48phi1.2.	МК416007
	1/4	Klebsiella phage ST13-OXA48phi12.5.	МК714353
	1/4	Klebsiella phage ST15-VIM1phi2.1.	МК448228
1	2/8	KlebsiellaphagevB_KpnS-Carvaje	ОЛ604152
27	1/11	KlebsiellaphagevB_KpnS-Carvaje	ОЛ604152
	1/9	Klebsiella phage vB_Kpn_Chronis	МН013086
38	2/2	Klebsiella phage Kp4862-1	ОК490415
	2/2	Klebsiella phage ST16-OXA48phi5.2.	МК448230
	2/2	Klebsiella phage 2b LV-2017.	КУ271395
	2/2	Klebsiella phage Kp4856-1	ОК490410
	2/2	Klebsiella phage Mulock.	МН098327
	2/2	Klebsiella phage Kp4864-1	ОК490416
	2/2	Klebsiella phage ST11-OXA245phi3.2.	МК416010
	2/2	Klebsiella phage Kp4865-1	ОК490417
55	1/7	Klebsiella phage vB_KpnP_ZX1	МВ722080
	1/7	Klebsiella phage vB_Kpn_Chronis.	МН013086
	1/7	Klebsiella phage ST16-OXA48phi5.2.	МК448230
	1/7	Klebsiella phage ST512-KPC3phi13.3	МК422448
60	1/6	Klebsiella phage Kp4864-1	ОК490416
	1/6	Klebsiella phage ST846-OXA48phi 9.2	МК416022
61	1/6	Klebsiella phage Kp4856-1	ОК490410
	1/6	Klebsiella phage Kp4862-1	ОК490415
	1/6	Klebsiella phage 2 LV-2017	КУ271396
	1/7	Klebsiella phage ST16-OXA48phi5.2.	МК448230
61	2/3	KlebsiellaphagevB_KpnS-Carvaje	ОЛ604152
70	1/4	Klebsiella phage Kp4856-1	ОК490410
	1/4	Klebsiella phage ST405-OXA48phi1.2.	МК416007
	1/4	Klebsiella phage ST13-OXA48phi12.5.	МК714353
	1/4	Klebsiella phage ST101-KPC2phi6.1.	МК448231
	1/4	Klebsiella phage Kp4862-1	ОК490415
	1/4	Klebsiella phage ST15-VIM1phi2.1.	МК448228
	1/4	Klebsiella phage 2b LV-2017.	КУ271395
75	2/2	Klebsiella phage vB_Kpn_Chronis	МН013086
76	1/7	Klebsiella phage vB_KpnP_ZX1	МВ722080
	1/7	Klebsiella phage vB_Kpn_Chronis	МН013086
	1/7	Klebsiella phage ST16-OXA48phi5.2.	МК448230
	1/7	Klebsiella phage ST512-KPC3phi13.3.	МК422448
79	1/16	Klebsiella phage vB_Kpn_Chronis.	МН013086
	1/5	Klebsiella phage ST11-OXA245phi3.2.	МК416010
94	1/6	Klebsiella phage Kp4862-1	ОК490415
	1/6	Klebsiella phage 2 LV-2017	КУ271396
	1/6	Klebsiella phage Kp4856-1	ОК490410
	1/8	Klebsiella phage ST13-OXA48phi12.5.	МК714353
94	2/3	KlebsiellaphagevB_KpnS-Carvaje	ОЛ604152
100	2/2	Klebsiella phage ST13-OXA48phi12.2.	МК422452

Примечание. Цветом выделены идентичные бактериофаги.

ставило от 4 до 16. Определялось два вида последовательностей консенсусных повторов длиной 29 и 28 н.о. идентичных повторов штаммов из базы NCBI. Спейсерный состав всех выявленных CRISPR-кассет расшифрован.

Через спейсерные последовательности выявленных

кассет проведён скрининг фагов. Он показал полную аналогию спейсеров протоспейсерам фагов, специфичных для бактерий рода *Klebsiella* в 15 из 21 CRISPR-кассет, т. е. в 71,4% случаев (рис. 2).

Остальные спейсеры не имели полного совпадения с

протоспейсерами бактериофагов из известных баз данных. Наличие данных спейсерных последовательностей в CRISPR-кассетах исследуемых бактерий указывает на их взаимодействие с различными фагами в процессе эволюции.

Получена полная информация о бактериофагах, к которым, предположительно, данные штаммы обладают устойчивостью, с определением их номера доступа в GenBank, т.е. доступ к их полному геному (табл. 2).

В CRISPR-кассетах исследуемых штаммов регистрировалось явление праймированной адаптации, т.е. соответствие нескольких спейсеров протоспейсерам одного и того же фага. В штамме № 1 пятый и четвертый спейсеры соответствовали протоспейсерам *Klebsiella phage* ST13-OXA48phi12.5. В процессе эволюции в геномах бактериофагов появляются замены, которые снижают эффективность его обнаружения эффекторным комплексом бактерий. Можно предположить, что бактериям при частом взаимодействии с одним и тем же фагом, необходимо приобретать дополнительные спейсеры из его ДНК для повышения эффективности защитного действия систем CRISPR-Cas [24].

Наблюдалась комплементарность нуклеотидной последовательности локуса одного спейсера протоспейсерам нескольких фагов. В штамме № 1 участок четвертого спейсера соответствовал протоспейсерам семи *Klebsiella phage*, в штамме № 38 второй спейсер протоспейсерам восьми бактериофагов и т.д. Это может демонстрировать способность бактерий целенаправленно приобретать спейсеры из участков ДНК, консервативных для фагов бактерий одного семейства, что обеспечивает им защиту одним спейсером от нескольких бактериофагов.

Обсуждение. На первом этапе с помощью биоинформатических методов проанализированы все полногеномные последовательности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, взятых из базы данных NCBI, на наличие CRISPR локусов в геноме. В 17,5% случаев определены CRISPR/Cas-системы с наличием не более двух CRISPR-кассет и полным набором Cas генов, которые позволили отнести их к Type-I Subtype-I-E. Проведённый анализ позволил утверждать об активности CRISPR/Cas-систем исследуемых штаммов, то есть об их способности приобретать новые спейсеры и транскрибировать CRISPR-касеты, распознавать и уничтожать чужую ДНК. Геномы данных штаммов использованы в качестве матрицы для подбора и разработки локуспецифичных праймеров с целью дальнейшего поиска CRISPR-кассет в геномах клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*. В 17 из 100 (17,0%) клинических изолятов выявлены и расшифрованы фрагменты ДНК, содержащие локусы CRISPR-кассет. На основе определения спейсерного состава всех выявленных CRISPR-кассет дана их структурная характеристика. Определён полный спектр бактериофагов, детектируемых через спейсерные последовательности CRISPR-кассет, с номерами их доступа в GenBank. Выявленные бактериофаги относились к умеренным фагам. Бактерия, содержащая профаг, лизогенна до тех пор, пока при определённых условиях профаг не активируется и не вступит в литический цикл, поэтому учитывая принцип работы CRISPR/Cas-систем бактерий, можно предполагать, что даже при встрече с умеренным фагом в результате репликации он будет уничтожен Cas нукле-

азами при условии соответствия участка его генома последовательности спейсера в CRISPR-кассете [25]. Данный подход в дальнейшем может быть использован как основа создания персонифицированной фаготерапии.

В результате проведённых исследований выявлены CRISPR-касеты в геномах клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с помощью разработанных праймеров, расшифрован их спейсерный состав, определены бактериофаги, с которыми данные возбудители встречались в процессе эволюции и, возможно, приобрели к ним устойчивость.

Заключение. Апробированный алгоритм, с использованием биоинформатических и молекулярно-генетических методов исследования в перспективе даёт возможность разработки диагностических тестов, основанных на выявлении бактериофагов через спейсерные структуры CRISPR-кассет в геномах клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, что может стать основой создания технологий персонифицированной фаготерапии.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 4, 7-11, 13-22, 24, 25 с.м. REFERENCES)

3. Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильном стационаре. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8 (1): 79–84. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-1-79-84.
5. Белоцерковский Б.З., Проценко Д.Н., Гельфанд Е.Б. Антибактериальная терапия нозокомиальной пневмонии в эпоху роста резистентности к карбапенемам. *Анестезиология и реаниматология*. 2018; 5: 22-35. DOI: 10.17116/anesthesiology201805122.
12. Яковлева Е.Е., Белецкая Ю.А., Яковлев А.В., Шабанов П.Д. Антибактериальная резистентность *Klebsiella pneumoniae* и современные подходы к терапии нозокомиальных инфекций у новорожденных. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2022; 21 (2): 54-60. DOI: 10.37903/vsgma.2022.2.8.
23. 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): 216-27. DOI: 10.21285/2227-2925-2021-11-2-216-227.

REFERENCES

1. Podschun R., Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998; 11(4): 589603. DOI: 10.1128/CMR.11.4.589.
2. Podschun R., Pietsch S., Höller C., Ullmann U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001; 67: 33257. DOI: 10.1128/AEM.67.7.33253327.2001.
3. Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Barantsevich E.P. Antibiotic sensitivity of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a multidisciplinary hospital. *Infektsiya i immunitet*. 2018; 8 (1): 79–84. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-1-79-84. (in Russian)
4. Holt K.E., Wertheim H., Zadoks R.N., Baker S., Whitehouse C.A., Dance D. et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015; 112 (27): 3574–81. DOI: 10.1073/pnas.1501049112.
5. Belotserkovskiy B.Z., Protsenko D.N., Gelfand E.B. Antibacterial therapy of nosocomial pneumonia in the era of growing resistance to carbapenems. *Anesteziologiya i reanimatologiya*. 2018; 5: 22-35.

- DOI: 10.17116/anesthesiology201805122. (in Russian)
6. Magill S.S., Edwards J.R., Bamberg W., Beldavs Z.G., Dumyati G., Kainer M.A. et al. Multistate point prevalence survey of health care-associated infections. *The New England Journal of Medicine*. 2014; 370: 1198-1208. DOI: 10.1056/NEJMoa1306801.
 7. Cubero M., Grau I., Tubau F., Pallares R., Dominguez M.A., Linares J. et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains causing bloodstream infections in adults. *Microb. Drug Resist.* 2018; 24(7): 949-57. DOI: 10.1089/mdr.2017.0107.
 8. Martin R.M., Bachman M.A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2018; 8: 4. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00004.
 9. Murray C.J., Ikuta K.S., Sharara F., Swetschinski L., Robles A.G., Gray A. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022; 399(10325): 629–55. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
 10. Ayan M., Kuzucu C., Durmaz R. Analysis of three outbreaks due to *Klebsiella* species in a neonatal intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2003; 24 (7): 495-500. DOI: 10.1086/502245.
 11. Ghotaslou R., Ghorashi Z., Nahaei M. *Klebsiella pneumoniae* in neonatal sepsis: a 3-year-study in the pediatric hospital of Tabriz, Iran. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2007; 60 (2): 126-8. PMID: 17515647.
 12. Yakovleva E.E., Beletskaya Yu.A., Yakovlev A.V., Shabanov P.D. Antibacterial resistance *Klebsiella pneumoniae* and modern approaches to the treatment of nosocomial infections in newborns. *Vestnik Smolenskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii*. 2022; 21 (2): 54-60. DOI: 10.37903/vsgma.2022.2.8. (in Russian)
 13. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007; 315(5819):1709-12. DOI: 10.1126/science.1138140.
 14. John van der Oost, Matthijs M. Jore, Edze R. Westra, Magnus Lundgren, Stan J.J. Brouns. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 2009; 34(8): 401-7. DOI: 10.1016/j.tibs.2009.05.002.
 15. Mojica F.J.M., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* (Reading). 2009; 155(3): 733-40. DOI: 10.1099/mic.0.023960-0.
 16. Marraffini L. A., Sontheimer E. J. Self vs. non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*. 2010; 463: 568-71. DOI: 10.1038/nature08703.
 17. Kira S. Makarova, Yuri I. Wolf, Eugene V. Koonin, Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Research*. 2013; 41 (8): 4360–77. DOI: 10.1093/nar/gkt157.
 18. Van der Oost J., Westra E.R., Jackson R.N., Wiedenheft B. Unraveling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 2014; 12(7): 479-92. DOI: 10.1038/nrmicro3279.
 19. Rollins M. F., Chowdhury S., Carter J., Golden S. M., Miettinen H. M., Santiago-Frangos A. et al. Structure reveals a mechanism of CRISPR-RNA-guided nuclease recruitment and anti-CRISPR viral mimicry. *Molecular. Cell*. 2019; 74 (1): 132-42. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.02.001.
 20. Shmakov S.A., Makarova K.S., Wolf Y. I., Severinov K.V., Koonin E.V. Systematic prediction of genes functionally linked to CRISPR-Cas systems by gene neighborhood analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018; 115(23): 5307–16. DOI: 10.1073/pnas.1803440115.
 21. Barrangou R., Fremaux C., Boyaval P., Richards M., Deveau H., Moineau S. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007; 315 (5819): 1709-12. DOI: 10.1126/science.1138140.
 22. Deveau H., Barrangou R., Garneau J.E., Labonté J., Fremaux C., Boyaval P. et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 2008; 190(4): 1390-1400. DOI: 10.1128/JB.01412-07.
 23. Stepanenko L.A., Dzhioev Yu.P., Zlobin V.I., Borisenko A.Yu., Salovarova V.P., Aref'eva N.A. et al. Development of approaches for screening highly specific bacteriophages based on bioinformatic analysis of the structures of CRISPR-Cas systems of *Corynebacterium diphtheriae*. *Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya*. 2021; 11(2): 216-27. DOI: 10.21285/2227-2925-2021-11-2-216-227. (in Russian)
 24. Datsenko K.A., Pougach K., Tikhonov A., Wanner B.L., Severinov K., Semenova E. Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nat. Commun.* 2012; 3: 945. DOI: 10.1038/ncomms1937.
 25. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007; 315 (5819): 1709-12. DOI: 10.1126/science.1138140.