

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России)

На правах рукописи

Борисенко Андрей Юрьевич

**Молекулярно-генетический и биоинформационный скрининг вирулентных
бактериофагов *Staphylococcus aureus* на основе анализа CRISPR/Cas-системы
бактерии**

Специальность: 03.02.03 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Заслуженный деятель науки Российской Федерации,
академик РАН, доктор медицинских наук, профессор
Злобин Владимир Игоревич

Иркутск - 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
ГЛАВА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	11
1.1. Таксономическое положение, морфология, биологические и физико- химические свойства, факторы патогенности бактерий рода <i>Staphylococcus</i>	11
1.2. Бактериофаги <i>Staphylococcus aureus</i> : морфология, биологические и физико- химические свойства, специфичность, препараты для лечения стафилококковой инфекции, ограничения в применении	24
ГЛАВА 2. CRISPR/CAS-СИСТЕМЫ БАКТЕРИЙ: СТРУКТУРА, ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ, ТЕХНОЛОГИИ АНАЛИЗА	29
2.2. CRISPR/Cas-система <i>Staphylococcus aureus</i> : формирование, генетическая структура, функции.....	42
2.3. Молекулярно-генетические и биоинформационные технологии анализа CRISPR/Cas- системы	43
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	49
3.1. Материалы	49
3.2. Микробиологические методы.....	52
3.3. Молекулярно-генетические методы исследования	57
3.3. Биоинформационные методы поиска и анализа CRISPR/Cas-систем.....	62
ГЛАВА 4. ХАРАКТЕРИСТИКА УСТОЙЧИВОСТИ ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ ШТАММОВ <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> К ДЕЙСТВИЮ АНТИБИОТИКОВ И БАКТЕРИОФАГОВ.....	66
4.1. Изучение чувствительности культур <i>S. aureus</i> к антибиотикам.....	66
4.2. Изучение чувствительности штаммов <i>S. aureus</i> к препаратам на основе бактериофагов	73

ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ И БИОИНФОРМАЦИОННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ CRISPR/CAS-СИСТЕМЫ В ШТАММАХ <i>S. AUREUS</i>	81
ГЛАВА 6. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ АПРОБАЦИЯ РАЗРАБОТАННОЙ МОДЕЛИ АЛГОРИТМА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО И БИОИНФОРМАЦИОННОГО СКРИНИНГА БАКТЕРИОФАГОВ НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ CRISPR-КАССЕТ В CRISPR/CAS-СИСТЕМАХ БАКТЕРИЙ	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	98
ВЫВОДЫ	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	105

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Несмотря на большое число научных исследований, наличие отечественных и зарубежных антибиотических препаратов для профилактики и лечения бактериальных инфекций, в последние годы отмечается существенный рост заболеваемости, вызванной золотистым стафилококком. *Staphylococcus aureus* способен вызывать широкий спектр заболеваний - от кожных инфекций до тяжелых септических состояний с возможным летальным исходом (Ефимова и др., 2011, Nguyen *et al.*, 2017; Giulieri *et al.*, 2020). Открытие и использование в практической медицине химиотерапевтических средств и антибиотиков сыграло определяющую роль как в борьбе с инфекционными заболеваниями в течение прошлого столетия, так и формировании резистентности к антибиотикам у бактерии (Alós, 2015; Adeoye-Isijola *et al.*, 2020). Повальное и не всегда рациональное применение химиопрепаратов в клинической практике способствовало распространению устойчивых к их действию штаммов. При этом сложилась ситуация, когда необходимо дозированно подбирать несколько разных типов антибиотиков, чтобы повлиять на бактериальную инфекцию, что в свою очередь создало условия для формирования и распространения штаммов с множественной устойчивостью к широко используемым антибиотикам и химиопрепаратам (Santajit, Indrawattan, 2016). В настоящее время, согласно данным литературы, происходит рост числа циркулирующих резистентных стафилококков, являющихся причиной развития вторичных иммунодефицитов, дисбактериозов и гнойно-воспалительных заболеваний (Кочетков, 2005; Дубовец, 2011; Никулина и др., 2016; Alvarez *et al.*, 2010; David *et al.*, 2017; Kadariya *et al.*, 2014; Park, Liu, 2020).

Анализ литературы показывает, что вопросы борьбы с возбудителем разработаны недостаточно, и единственным выходом из сложившейся ситуации является повышение доз и разработка новых поколений антибиотиков для лечения инфекций, вызванных *S. aureus*. На фоне этой проблемы вновь актуальной становится фаготерапия (Lin *et al.*, 2017; Azam, Y. Tanji, 2019; Petrovic Fabijan *et al.*, 2020). Как показывают исследования препараты бактериофагов -

альтернатива антибиотикам по ряду причин: фаги уничтожают бактерию, не повреждая клетки организма; прием бактериофагов не вызывает аллергии, не снижает функции иммунной системы организма; производство препаратов бактериофагов - экологически чистый процесс (Асланов, 2016, 2015; Бондаренко, 2013; Gordillo, Altamirano, 2019). Классическое определение чувствительности к бактериофагам - представляет собой длительный процесс. Перед назначением препарата бактериофага для решения вопроса о чувствительности к нему возбудителя необходимо проводить оценку литических свойств бактериофага в лабораторных условиях (Костюкевич, 2015). Современные геномные и биоинформационные технологии позволяют целенаправленно моделировать процесс отбора высокоспецифичных и вирулентных фагов против патогенных микроорганизмов на основе геномных структур CRISPR/Cas бактерий. Аббревиатура CRISPR/Cas переводится как «короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами». Посредством CRISPR-системы (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) бактерии распознают и эффективно расщепляют ДНК фагов, используя ферментную систему Cas (*CRISPR-associated*) (Barrangou *et al.*, 2015). Поиски и манипуляции с генами при помощи биоинформационных компьютерных программ открывают новый путь к изучению молекулярных процессов в генах и геномах бактерий. Такой путь имеет дополнительное преимущество при работе с микроорганизмами: он снижает вероятность развития резистентности в ходе эксперимента. Биоинформационные технологии позволяют целенаправленно моделировать процесс отбора высокоспецифичных и вирулентных фагов против микроорганизмов на основе взаимодействия CRISPR-системы (Cady *et al.*, 2012). Анализ литературы показывает, что CRISPR-система у золотистого стафилококка изучена недостаточно, поскольку в научных работах говорится о разном строении и даже отсутствии CRISPR-системы у этого вида (Cao *et al.*, 2016; Xihong *et al.*, 2018). Основываясь на строении данной системы в уже изученных бактериях известно, что любая CRISPR-система имеет в своем составе гены семейства *cas* и CRISPR-кассеты (Barrangou *et al.*, 2015; Xihong *et al.*, 2018). Предполагается, что наличие

определенных спейсерных последовательностей в CRISPR-кассете укажет на степень защиты бактерии от бактериофагов. Уточнение имеющихся и получение новых данных о CRISPR-системе *Staphylococcus aureus* способствовало бы решению проблем антибиотикотерапии и созданию персонализированной фаговой терапии.

Цель и задачи исследования

Целью данной диссертационной работы является разработка алгоритма отбора вирулентных бактериофагов *Staphylococcus aureus* на основе молекулярно-генетических и биоинформационных технологий анализа CRISPR-системы бактерии в качестве платформы для персонифицированной фаготерапии.

Задачи исследования

1. Разработать программный алгоритм анализа CRISPR/Cas- системы *S. aureus* на основе современных биоинформационных инструментов.
2. Установить тип CRISPR-Cas-системы *S. aureus* с обнаружением спейсеров и определением источника их происхождения.
3. Сформировать коллекцию *S. aureus* с оценкой антибиотико- и фагочувствительности штаммов.
4. Осуществить поиск маркерных последовательностей с целью разработки специфических фланкирующих праймеров для CRISPR-кассет и детекции генов *cas* на основе анализа штаммов из базы данных GenBank.
5. Провести экспериментальную апробацию разработанной модели скрининга фагов на основе анализа CRISPR-кассет *S. aureus*.

Научная новизна и практическая ценность работы

Проведено изучение и анализ CRISPR-системы в геномах *S. aureus* из базы данных Genbank и сформированной коллекции при помощи биоинформационного программного алгоритма. Установлена и продемонстрирована гетерогенность строения CRISPR-локусов у *S. aureus*. В результате, в геномах *S. aureus* идентифицированы гены CRISPR-систем: I-A, II-A, III-A, IV-A, I-B. Также

выявлено, участие плазмид *S. aureus* используемых в качестве дополнительных источников генов *cas* и CRISPR-кассет. Изучение степени защищенности бактерии позволило выявить CRISPR- кассеты содержащих от 1 до 15 спейсеров разделенных разными повторяющимися последовательностями. При помощи биоинформационных программ установлено, что наибольшее генетическое влияние на анализируемые штаммы *S. aureus* оказывали бактериофаги рода *Staphylococcus* - 70%, *Streptococcus* - 67%, *Mycobacterium* - 67%, *Bacillus* - 54%, *Gordonia* - 53%, *Arthrobacter* - 23%, *Streptomyces* - 12%.

Обнаруженные CRISPR-кассеты и гены *cas* в геномах *S. aureus* из базы NCBI данных при помощи биоинформационного программного алгоритма послужили платформой для синтеза детектирующих и фланкирующих праймеров. В результате удалось выявить наличие генов *cas* и выделить 45 CRISPR-кассет с последующим их секвенированием и оценкой устойчивости штаммов *S. aureus* к препаратам бактериофагов.

Используемый биоинформационный алгоритм, позволил расширить представления о проблеме устройства CRISPR-системы *S. aureus* и возможности применения его для изучения CRISPR-систем в других бактериях с целью создания персонализированной фаговой терапии.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования помогут обосновать новые подходы к анализу природы антагонистических взаимодействий бактерий и фагов, на основе которых могут быть получены новые знания о фундаментальной природе антагонизма между бактериями и фагами. Практическая значимость представляемого научного исследования будет особенно важна при разработке технологического алгоритма скрининга антибактериальных вирулентных фагов, которые могут стать основой создания новых высокоспецифичных и патогенных фаговых препаратов нового поколения для фаготерапии, заменив во многих случаях антибиотикотерапию в медицинской практике.

Ожидаемые результаты: впервые будет исследован и проанализирован механизм антагонистического взаимодействия бактерии *S. aureus* со

специфичными им бактериофагами через системы CRISPR/Cas бактерии и анти-CRISPR фагов; на основе установленных закономерностей антагонистических взаимоотношений бактерии *S. aureus* со специфичными им бактериофагами впервые будет разработан алгоритм скрининга маркерных высокоспецифичных и вирулентных бактериофагов к *S. aureus*; разработка лабораторного регламента алгоритма получения высокоспецифичных и вирулентных продуктов маркерных бактериофагов *S. aureus*.

Возможная область применения. Полученные данные о механизмах антагонистических взаимоотношений между бактериофагами и бактериями *S. aureus* на основе их CRISPR/Cas и анти-CRISPR-систем станут новой фундаментальной информацией в области молекулярной микробиологии. Разработанный алгоритм скрининга высокоспецифичных и вирулентных бактериофагов *S. aureus* позволит создавать новые высокоэффективные фаговые препараты антибактериального действия для практической медицины.

Медико-социальная и экономическая эффективность. Фундаментальные знания о закономерностях антагонистического взаимодействия между патогенными бактериями и их фаговыми детерминатами и разработанные на их основе технологии создания антибактериальных фаговых препаратов нового поколения (с заданными характеристиками преодоления «иммунной системы» бактерии) станут намного экономичнее и эффективнее ныне существующих антибактериальных препаратов. Возможность предсказывать патогенный антибактериальный потенциал бактериофагов в перспективе может стать определяющим в развитии защитных технологий по профилактике и лечению инфекционных заболеваний бактериальной этиологии.

Внедрение в практику

1. Разработаны специфичные праймеры для детекции cas-генов и выделения CRISPR-кассет *S. aureus*.

2. Последовательности CRISPR-кассет депонированы в международный компьютерный банк данных NCBI (Center for Biotechnology Information) GenBank №: MT542988.1; MT542987.1; MT542986.1; MT542985.1; MT542984.1.
3. Патент на базу данных «Спейсерные последовательности CRISPR-Cas систем штаммов *Staphylococcus aureus*» свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2021621294 от 18.06.2021 <https://www.fips.ru/iiss/document.xhtml?faces-redirect=true&id=7ff99aa70a0cb122ffeff5c0d022c339>
4. Новые данные, полученные в работе, могут быть применены для поиска и анализа CRISPR-систем у других видов бактерий.

Основные положения, выносимые на защиту

1. С помощью биоинформационного программного алгоритма изучена CRISPR-система *S. aureus* и выявлена гетерогенность строения системы у данного вида бактерий.
2. Разработаны специфичные праймеры для детекции *cas*-генов и выделения CRISPR-кассет *S. aureus*.
3. Выявлена тесная связь между антибиотикорезистентностью и устойчивостью к бактериофагам у штаммов *S. aureus*.
4. Установлено, что спейсерная последовательность CRISPR-кассеты способна защищать *S. aureus* от разных типов фагов.

Апробация работы

Основные материалы работы были доложены и обсуждены на следующих научных форумах: Научно-практической конференции «Экология и здоровье населения» (ФГБНУ Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований. Иркутск, 2015 г.); 82-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием, посвященной 95-летию ИГМУ и 170-летию со дня рождения И.И.Мечникова «Актуальные вопросы современной медицины» (Иркутск, 20-22

апреля 2015 г.); 17-ой Тихоокеанской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием. (ТГМУ, г. Владивосток, 21 апреля 2016 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Природно-очаговые и другие актуальные инфекции Сибири и Дальнего Востока» (16 - 18 сентября 2015 г., г. Иркутск); Российско-Китайской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии, XVIII Кашкинские чтения (9-11 июня 2015 г., г. С-Петербург); 83-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием, посвященной 140-летию со дня рождения профессора Н.Д. Бушмакина «Актуальные вопросы современной медицины» (Иркутск, 25-27 апреля 2016 г.); Межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Диагностика, профилактика и эпидемиологический надзор за природно-очаговыми и другими инфекционными болезнями» (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Иркутск, 2016 г.); II студенческой научно-практической конференции с международным участием «Информатизация и виртуализация экономической и социальной жизни» (г. Иркутск, 2017 г.); III Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии» (Иркутск, 25-26 октября 2018 г.); Четвертая сессия китайско-российского симпозиума по микробиологии и борьбе с инфекционными заболеваниями (Китай, Харбинский медицинский университет, 16 июля 2021 г.).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА *STAPHYLOCOCCUS*

1.1. Таксономическое положение, морфология, биологические и физико-химические свойства, факторы патогенности бактерий рода *Staphylococcus*

К отряду *Firmicutes* (от лат. *firmus* - крепкий, *cutes* - кожа) относят прокариотические микроорганизмы с грамположительным типом клеточной стенки. Изучение данных представителей осуществляется давно, и уже совершенно ясно, что этот отдел представлен разнообразными по свойствам бактериями, образующими группу аэробных грамположительных кокков. Особое медицинское значение представляют кокки семейств *Micrococcaceae* и *Streptococcaceae*. Представители семейства *Micrococcaceae*, способные вызвать заболевания у человека, относятся к родам *Staphylococcus*, *Micrococcus* и *Stomatococcus* (Taylor, Unakal, 2020).

Актуальность проблемы инфекций, вызванных грамположительными микроорганизмами, во всем мире возрастает (Абаев и др., 2016; Belkum, Dunne, 2013). Стафилококки, относительно других родов, входящих в семейство *Micrococcaceae*, являются возбудителями большей части внебольничных и нозокомиальных бактериемий, пневмоний, инфекций кожи и мягких тканей, органов, костей и суставов (Елистратова и др., 2018; Creech, Al-Zubeidi, 2015; Megged, 2014).

Стафилококки – это грамположительные, правильной геометрической формы шаровидные бактерии диаметром 0,5–1,5 мкм. Деление у данных бактерий осуществляется в нескольких плоскостях, причем, образуется характерная форма в виде грозди винограда. Пептидогликан и тейхоевая или глицериновые кислоты являются основой в строении клеточной стенки возбудителей. В состав клеточной стенки *S. aureus* также входит белок А, реагирующий с Fc-фрагментами IgG человека (Алешукина, 2003; Воробьев, Кривошеин, Широбоков, 2015; Holt *et al.*, 1977; Rehmatullah *et al.*, 2015).

На основе исследований данной группы бактерий, выяснено, что основными резервуаром для стафилококков являются кожные покровы, слизистые оболочки человека и животных, главным образом, сообщающихся как напрямую, так и косвенно с внешней средой (Широкова и др., 2013; Creech, Al-Zubeidi, 2015). У стафилококков отсутствуют процессы, связанные со спорообразованием, но они могут образовывать поверхностно расположенную капсулу, основным компонентом которой являются уреновые кислоты (Воробьев, 2015). Имеются сведения о существовании среди стафилококков покоящихся форм микроорганизмов. Это золотистые стафилококки, которые временно утратили способность к росту на питательных средах по причине неблагоприятного воздействия окружающей среды, а именно, связанной с ней факторов, как химических, так физических и биологических. Реверсия покоящихся *S. aureus* к вегетативному состоянию возможна при возникновении физиологически оптимальных условий существования, либо с использованием индуцирующих факторов (Николаев и др., 2020). *Staphylococcus aureus* – высокоадаптивный грамположительный, неподвижный, анаэробный кокк. Возбудитель отличается от других видов стафилококков каталазо- и коагулазо- положительностью. Вид был назван *aureus* из-за золотистого цвета колоний на твердых питательных средах (Алешукина, 2003).

В культивировании на питательных средах стафилококки неприхотливы, относятся к факультативным анаэробам, но активный рост наблюдается при наличии кислорода; содержат цитохромы, но обычно являются оксидазоотрицательными; хемоорганотрофы с окислительным метаболизмом, каталазоположительные; при выделении в аэробных условиях нуждаются в аминокислотах и витаминах, в анаэробных - требуют дополнительного введения урацила и ферментируемых источников углерода как основных компонентов (Воробьев и др., 2015; Шепелин и др., 2015).

Относятся к группе мезофилов, поскольку температурный оптимум роста составляет от 35 до 40°C. В химическом плане предпочитают нейтральные условия, оптимум pH 7,0–7,5 (Rehmatullah, 2015).

Элективными средами для выделения чистой культуры стафилококков являются желточно-солевой агар (ЖСА) или молочно-солевой агар (МСА), поскольку выдерживают повышенное осмотическое давление. При росте на ЖСА стафилококки образуют мутные круглые выпуклые ровные колонии 2–4 мм в диаметре, кремового, желтого или оранжевого цвета. За счет выработки фермента лецитиназы колонии окружены радужным венчиком. На кровяном агаре *S. aureus* образует колонии с зоной гемолиза. Рост в жидкой питательной среде сопровождается равномерным помутнением, со временем выпадающего в виде рыхлого осадка (Taylor, Unakal, 2020).

Исследования (Karmakar *et al.*, 2011; Chakraborty *et al.*, 2011); подчеркивают высокую биохимическую активность стафилококков, поскольку они вырабатывают различные ферменты: плазмокоагулазу, ДНКазу, гиалуронидазу, лизоцим, щелочную фосфатазу, протеиназу, желатиназу, супероксиддисмутазу и др. Ферментативная активность разнообразна: бактерии синтезируют каталазу, большинство штаммов образует ацетон на среде с глюкозой, выделяют аммиак при росте в аргининовом бульоне, восстанавливают нитраты до нитритов, активно гидролизуют белки, жиры, расщепляют многие углеводы в аэробных условиях до уксусной кислоты и углекислого газа. Отличительной чертой стафилококков от микрококков является расщепление глюкозы в анаэробных условиях с образованием молочной кислоты. Подчеркивается, что биохимическая активность возбудителей во многом определяет их патогенность (Liu, 2009).

Часть золотистых стафилококков, окружающих человека или животного, не способна вызывать заболевания, т. е. непатогенна (Hanssen *et al.*, 2017). Болезнетворные виды обладают определенным набором факторов патогенности, позволяющим бактериям успешно проникнуть в организм и существовать в нем длительное время, избегая иммунного ответа хозяина (Grissa *et al.*, 2007; Шамсутдинов и др., 2016;).

Среди не образующих спор бактерий стафилококки наиболее устойчивы к внешним факторам. Довольно устойчивы к нагреванию, погибают за 30 минут при 70-80°C, за 10 минут - при 150°C. Сухой жар убивает стафилококков за два

часа. Они способны переносить высыхание и остаются жизнеспособными и вирулентными до нескольких месяцев в сухой пыли, являясь источником пылевой инфекции. Прямой солнечный свет губительно влияет только через несколько часов прямого воздействия, рассеянный действует довольно слабо (Алещукина, 2003).

Чувствительность возбудителей к химическим дезинфектантам сильно варьирует, например, 3% раствор фенола убивает их в течение 15–30 минут, а 1% водный раствор хлорамина - за 2–5 минут, но эти данные постоянно изменяются, по причине приобретения устойчивости возбудителя (Дзябко, 2010; Гаврилова, 2013; Пономаренко и др., 2015; Шкарин, 2012).

Стафилококки являются представителями нормальной микрофлоры человека и животных. Они густо колонизируют различные биотопы организма человека: кожу, слизистую носа, зева, ротовой полости. Источником инфекции являются больные любой клинической формой стафилококковой инфекции, здоровые носители. У 20–30% здоровых людей золотистый стафилококк обнаруживается в носовых проходах (Lacey *et al.*, 2016; Guinan *et al.*, 1982; Edwards *et al.*, 2012).

Пути передачи инфекции многообразны, часто наблюдается воздушно-капельный путь передачи, переходящий в контактно-бытовой путь через предметы быта, руки, особенно среди медицинского персонала (Кнох *et al.*, 2015; Ногеа *et al.*, 2014). Реже наблюдается, но все же встречается алиментарный путь заражения – восприимчивость к стафилококковой инфекции в данном случае довольно высока. Заболевает от 90 до 100% людей, употреблявших зараженный продукт. Заболевания регистрируется на протяжении всего года, чаще в теплое время, так как в этот период труднее предоставить безукоризненное хранение приготовленных пищевых продуктов и осуществить достаточную дезинфекцию окружающей среды (Глазовская и др., 2011).

S. aureus не имеет органного тропизма, поэтому поражает различные органы и ткани больного. Входными воротами инфекции являются поврежденная кожа, слизистые оболочки ротовой полости, дыхательных путей и желудочно–

кишечного тракта, конъюнктивы и т. д. (Moreillon *et al.*, 2005; Kazimoto *et al.*, 2018). Носительство инфекции увеличивает риск передачи возбудителя здоровому человеку (Eggertso, 2007; Kluytmans, 1997). Больные ринитом, вызванным стафилококком, способны рассеивать бактерии в окружающую среду (2003). Руки играют ведущую роль в передаче *S. aureus* от загрязненных поверхностей к носу, а также и к другому участку тела и наоборот (Megged, 2014). Более того, увеличение шансов инфицирования *S. aureus* человека, напрямую зависит от места колонизации, нарушения иммунитета, и особенностей самого штамма, например способности к колонизации при низкой температуре, низкому рН, высокой осмолярности, размножения при малом содержании питательных веществ (Parker, 2018; Хараева и др., 2014; DeLeo, Diep, Otto, 2009).

По патогенезу и клинической картине стафилококки имеют ряд отличительных черт. Как и все грамположительные условно-патогенные микроорганизмы, они способны вызывать оппортунистическую инфекцию. Клиника гнойно-воспалительных процессов характеризуется различной локализацией и разной степенью тяжести - от местных до тяжелых генерализованных инфекций (Gouyon, 1990). При сепсисе наблюдается гнойный очаг, из которого в кровь поступает возбудитель и разносится по всему организму к любому органу, поражая ретикулоэндотелиальную систему, выделяя токсины и аллергены. Образование гнойных очагов в различных органах и тканях, приводит к септикопиемии (Tong *et al.*, 2015; Naber *et al.*, 2009; Verkaik *et al.*, 2009; Eells *et al.*, 2015; Yadav *et al.*, 2018).

В связи с этим, у стафилококков выделяют разнообразные формы инфекции:

- болезни кожи и подкожной клетчатки (Kazimoto *et al.*, 2018; Nakatsuji *et al.*, 2017; Lacey *et al.*, 2016);
- болезни органов дыхания (Карпов, Качанко, 2005; Ragle *et al.*, 2009; Иванченко, 2012; He, Wunderink, 2020);
- болезни нервной системы и органов чувств (Яшаров и др., 2015; O'Callaghan, 2018);

- болезни органов пищеварения (Абаев, 2014; Годовалов и др., 2016);
- болезни костно-мышечной системы и соединительной (Вишневский, Бабак, 2014);
- болезни системы кровообращения (Bamberger, 2007; Fernandez Guerrero, 2009);
- болезни мочеполовых органов (Murder *et al.*, 2006).

Постинфекционный иммунитет - клеточно-гуморальный, нестойкий, ненапряженный, узкоспецифический. По направленности - антитоксический, антиферментный, антибактериальный. Вследствие контактов с возбудителем у большинства взрослых людей вырабатываются антитела к стафилококку и его токсинам (Aislin *et al.*, 2014; Karauzum, Datta, 2017; Naghshbandi *et al.*, 2018).

Изучение вирулентных свойств бактерии через секвенирование генома *S. aureus* позволило получить новую информацию об устойчивости и молекулярной эпидемиологии возбудителя (Liu, 2009; Abaev *et al.*, 2018;). Размер генома *S. aureus* варьируется от 2,5 до 3,5 млн. п.н.о., имеет от 2400 до 2800 открытых рамок считывания (ORF). Геном *S. aureus* включает 80% основных структурных генов, состоящих из мобильных генетических элементов (МГЭ, англ. Mobile genetic elements, MGE) и 20% вспомогательных генов (Baba *et al.*, 2008). Основным геном консервативен среди разных клонов и состоит из генов регуляторов и генов, выполняющих вспомогательные рецепторные функции (Lindsay, 2009). *S. aureus* содержит специфичные гены вида, кодирующие поверхностные белки и их регуляторы, а также гены вирулентности. Они локализованы в ядре генома и составляют от 10 до 12% от генома стафилококка (Fitzgerald *et al.*, 2003, Герасимова и др., 2015).

Мобильные генетические элементы у *S. aureus* представлены бактериофагами, островами патогенности *S. aureus* (SaPI), плазмидами, транспозонами и стафилококковыми кассетными хромосомами (SCC) (Alibayov *et al.*, 2014; Koonin, K.S. Makarova, 2017; Krupovic *et al.*, 2017). MGE кодируют 50% факторов вирулентности и активно способствуют горизонтальному переносу ДНК среди изолятов *S. aureus* (Liu, 2009).

К факторам патогенности *S. aureus* относятся:

1. Факторы адгезии - прикрепление стафилококков к клеткам тканей обуславливается их гидрофобностью (чем она выше, тем сильнее адгезивные свойства), а также адгезивными свойствами полисахаридов, белка А, и способностью связывать фибронектин (рецептор клеток).

2. Ферменты, выполняющие роль факторов агрессии и защиты: плазмокоагулаза, гиалуронидаза, фибринолизин, ДНКаза, лецитиназа.

3. Антифагоцитарные факторы: могут ингибировать хемотаксис, защищать клетки от захвата их фагоцитами и обеспечивать выживание клеток внутри фагоцитов:

а) полисахаридная капсула механически защищает бактерии от фагоцитов, способствует агрегации клеток стафилококков, чем повышает их адгезию;

б) белок А располагается поверх пептидогликана и ковалентно с ним связан; реагирует с Fc-фрагментом Ig и способен окружать клетку стафилококка чехлом из Ig, чем подавляет опсоническую активность антител;

в) тейхоевые и липотейхоевые кислоты ингибируют поглотительную активность фагоцитов, способствуют активации комплемента по альтернативному пути;

г) пептидогликан клеточной стенки является хемоаттрактантом для лейкоцитов, активирует комплемент по классическому и альтернативному пути, оказывает пирогенный эффект, усиливает синтез ИЛ-1;

д) плазмокоагулаза предотвращает контакт фагоцита со стафилококком, обволакивая последний псевдокапсулой из нитей фибрина;

4. Комплекс секретируемых экзотоксинов:

а) мембраноповреждающие токсины, ранее описанные как гемолизины, некротоксины, лейкоцидины, летальные токсины и т. д. Выделяют α , β , γ и δ токсины.

б) эксфолиативные токсины А и В различаются по антигенным свойствам, температурной устойчивости (А - термостабилен, В - термолабилен), локализации генов, ответственных за их синтез (А контролируется хромосомным геном, В - плазмидным). С этими токсинами связана способность стафилококков поражать зернистый слой эпидермиса, приводя к отслойке рогового слоя.

в) лейкоцидин - избирательно действует на мембраны лейкоцитов, преимущественно на нейтрофилы, разрушая их.

г) экзотоксин, вызывающий синдром токсического шока (СТШ) - обладает свойствами суперантигена. Для СТШ характерно повышение температуры, снижение АД, кожные высыпания, рвота, иногда поражение почек.

5. Энтеротоксины (А, В, С1, С2, С3, D, Е) - характеризуются антигенной специфичностью, термостабильностью, устойчивостью к действию формалина и пищеварительных ферментов, а также устойчивостью в диапазоне рН 4,5–10. С синтезом энтеротоксинов связана способность стафилококков вызывать пищевые отравления по типу интоксикации. Чаще всего они вызываются энтеротоксинами А и D (Moreillon *et al.*, 2005; Nakatsuji *et al.*, 2017; Oliveira, 2018; Otto, 2014; Pinchuk, 2010; Eric, 2018; Kadariya *et al.*, 2014; Николаева, 2001; Летаров 2012; Бакшеева, 2012).

Регистрация случаев поражения и размножения *S. aureus* в организме человека или животного может происходить в разных отделах организма человека, как было описано ранее, но существуют данные о колонизации данной бактерией животных, например, собак (Tomlin, 1999), свиней (Jisun, 2015; Lewis *et al.*, 2008), обезьян (Senghore, 2016).

Между штаммами *S. aureus*, связанными с животными и людьми, существует обмен генами, кодирующими факторы вирулентности. Опасность представляют бактерии, адаптированные к определенному хозяину с приобретенными генами вирулентности, молниеносно позволяющими им колонизировать и с быстротой инфицировать новых хозяев (Malachowa, 2008). В исследованиях (Lewis H.C *et al.*, 2008) было продемонстрировано, что доминантный, ассоциированный с домашним скотом метициллинрезистентный *S. aureus* был адаптирован для людей путем приобретения дополнительного генетического материала. Интересно, что анализ всего генома данного штамма позволил выяснить, что этот штамм произошел от восприимчивого к метициллину *S. aureus* (MSSA). Данный штамм преодолевает специфичность («видовой барьер») от человека к домашнему скоту и адаптируется обратно к

людям посредством приобретения генов вирулентности. В настоящее время устойчивый к метициллину *S. aureus* (MRSA) вызывает большую тревогу в мире, поскольку его присутствие в животном мире, особенно у свиней, может служить резервуаром для инфекции человека (Aiello *et al.*, 2006; Pozzi, 2017).

На основе имеющихся данных среди возбудителей больничных инфекций стафилококки занимают второе по частоте место (Ansari 2019; Dsouza, 1997; Friedman, 2016). Среди них для человека особенно проблемными стали метициллин-резистентные штаммы (MRSA) и метициллин-чувствительные штаммы (MSSA) (Dhruba *et al.*, 2014; Alexis *et al.*, 2009). Недавно среди *S. aureus* стали выделять ванкомицин-резистентные (VRSA) и гликопептид-резистентные штаммы (GISA) (McGuinness *et al.*, 2017; Szymanek-Majchrzak, 2018). Такое разделение имеет важное значение и в прогностическом плане - у пациентов, инфицированных MRSA-штаммами *S. aureus* смертность достигает 30% (Foster 2017).

MRSA был идентифицирован в 1960-х годах как внутрибольничный патоген является серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире, ассоциирован с высокой заболеваемостью, смертностью и медикаментозными затратами (Mermel, 2011). Название метициллинрезистентный (MRSA) было введено, когда госпитальные штаммы *S. aureus* приобрели устойчивость к самому новому на тот момент представителю бета-лактамов – метициллину (Hartman *et al.*, 1984). На это бактериям потребовалось около двух лет: о первом случае появления MRSA сообщалось в 1961-м. Устойчивые к большинству антибиотиков штаммы золотистого стафилококка стали обитателями больниц и госпиталей (Antri *et al.*, 2018). В 2004 г. 40% случаев заражения крови в Европе было связано с MRSA (Dickmann *et al.*, 2017). Но примерно до 1990 года заболевания оставались редкостью, и метициллин продолжали применять, тем более что действующие на MRSA антибиотики других классов - гликопептиды или аминогликозиды имеют слишком много побочных эффектов или неудобны в применении (предусматривают только внутривенное введение и постоянный контроль состава крови во избежание передозировки) (Bart *et al.*, 2009).

Некоторое время последним действенным антибиотиком был ванкомицин - из группы гликопептидов, но уже начали появляться штаммы, устойчивые и к нему. В настоящее время также установлено, что при исследовании группы штаммов метициллинрезистентных стафилококков, около 15% из них оказываются резистентными и к ванкомицину (VRSA) (Smith, 1999; Adeoye-Isijola 2020; Ellis 2004).

Ранее MRSA-штаммы выделялись только при внутрибольничных инфекциях, теперь же эти штаммы получили широкое распространение среди населения. Чаще MRSA-штаммы вызывают поражение кожи и мягких тканей, реже – пневмонию (Wang, Ruan, 2017; Olearo *et al.*, 2016). В Соединенных Штатах Америки, примерно 20–30% здоровых людей являются носителями *S. aureus* в носоглотке, и только 0,8% из них являются носителями MRSA (Kavanagh *et al.*, 2017). Распространенность MRSA различается, сильно варьирует в разных странах, составляя, к примеру, менее 2,5% от всех стафилококков в Швейцарии (Olearo *et al.*, 2016). В Европе ежегодно регистрируется порядка 200 тыс. случаев MRSA-инфекций с 7% случаев летальных исходов (Borg *et al.*, 2021). В Индии в общей сложности из 70% случаев внутрибольничных инфекций 54% были связаны с MRSA (Archana *et al.*, 2020). В России частота встречаемости MRSA может колебаться от 0 до 80% в зависимости от стационара и географического региона (Baranovich *et al.*, 2007; Romanov и др., 2013; Гостев, Сидоренко, 2015; Gostev *et al.*, 2017; Belyhun *et al.*, 2018).

Все эти исследования неизменно показывают особую актуальность и проблемность роста рисков заболевания MRSA- и MSSA-типами *S. aureus* среди населения как в развитых, так и в развивающихся странах мира. В связи с этим, разработка новых подходов к борьбе с данным возбудителем приобретает особенно большое значение.

Современные противобактериальные препараты для лечения стафилококковых инфекций в своем составе содержат большей частью антибиотики (Lee, 2013). Ряд работ, показывает, что антибиотики являются безусловными лидерами среди всех созданных человеком лекарственных

препаратов по числу спасенных жизней (Anstead, 2007; Токаева, 2014; Allen, 2010). Однако, бактерии обладают высоким потенциалом приспособления к различным условиям среды, включая и антибактериальные препараты (Bengtsson, 2014). Кроме того, они гораздо интенсивнее, чем большинство эукариот, обмениваются генами с другими представителями своего и даже иных видов. Поэтому появление и широкое распространение антибиотикоустойчивых штаммов, в особенности среди возбудителей госпитальной инфекции, стало большой проблемой для современной медицины (Aminov, 2010; Vamberger, 2005).

В результате продолжающегося интенсивного применения антибактериальных средств бактерии с множественной устойчивостью практически полностью вытеснили штаммы, устойчивые только к одному виду антибиотика (Ayukekbong, 2017). Приобретенная устойчивость возникает в результате контакта микроорганизма с антимикробным средством за счет возникновения мутаций, либо благодаря горизонтальному переносу генов устойчивости (Martinez, 2017). Центральную роль в этом процессе играют различные мобильные генетические элементы - плазмиды, транспозоны, IS - элементы, интегроны. В настоящее время именно горизонтальный перенос различных генов (Millan, 2018; Bridget *et al.*, 2018), в том числе и резистентности является главной причиной быстрого возникновения множественной лекарственной устойчивости у бактерий (Lerminiaux NA, Cameron, 2019; Krupovic *et al.*, 2017).

Отмечено появление так называемых «мультирезистентных» штаммов, устойчивых абсолютно ко всем используемым ныне антибиотикам (Tzialla *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2018). Такая ситуация не только усложняет борьбу с инфекционными заболеваниями, но и ставит под угрозу применение многих жизненно важных медицинских процедур вроде трансплантации органов, имплантации протезов, передовой хирургии и химиотерапии раковых заболеваний. При всех этих процедурах повышается риск развития гнойно-септических инфекций (Cantas *et al.*, 2017; Hiramatsu *et al.*, 2014; Smith, 2015; Deguchi *et al.*, 2018).

Опасная ситуация, сложившаяся в борьбе с бактериальными инфекциями, напрямую связана с огромным количеством производимых препаратов, содержащих антибиотики. Большинство из них плохо усваивается человеком и животными, в результате часть потребляемых антибактериальных средств без изменений выводится из организма, попадая в окружающую среду, сталкивается с разными видами бактерий. Все это способствует распространению резистентности к антибиотикам: бактерии, живущие в естественной среде, после контакта с малыми дозами АБ из очистных сооружений приобретают к ним устойчивость. Подтверждением этому служит тот факт, что в местах слива сточных вод постоянно обнаруживаются бактерии с генами устойчивости к антибиотикам (Manyi-Loh *et al.*, 2018; McEwen *et al.*, 2018) или бактериофаги (Chan *et al.*, 2016).

Отчасти, распространению устойчивости к антибиотикам способствует животноводство, а именно создание крупных ферм с большим поголовьем скота (Xiong *et al.*, 2018). Плазмиды с генами устойчивости моментально распространяются в закрытом участке с животными. Гены устойчивости передаются как животным, так и людям, работающим или живущим на данной территории. Немаловажное значение для распространения устойчивости к антибиотическим препаратам оказывает принятое сегодня за правило применение субтерапевтических доз антибиотиков в животноводстве в качестве ростовых факторов (Chattopadhyay, 2014)

Еще одной ключевой причиной распространения антибиотикорезистентности стало необоснованное назначение их врачами, а также самолечение (Naque *et al.*, 2019; Nepal *et al.*, 2018).

Для лечения инфекций, вызванных золотистым стафилококком, могут применяться: цефалоспорины с первого по четвертое поколения, полусинтетические пенициллины, устойчивые к пенициллиназам (метициллин, оксациллин), аминопенициллины в сочетании с ингибиторами бета-лактамаз (амоксциллин, ампициллин), гликопептиды, фторхинолоны, аминогликозиды, макролиды, миноциклин, триметоприм (Charan *et al.*, 2015; Dąbrowska *et al.*, 2014).

Химиотерапевтический спектр воздействия на метициллиноустойчивые стафилококки очень узок и включает: гликопептиды (ванкомицин, тейкопланин) и фузидиевую кислоту (Geriak *et al.*, 2019; Hassoun *et al.*, 2017). В связи с множественной устойчивостью штаммов золотистого стафилококка к химиотерапевтическим препаратам перед началом действенной терапии необходимо определение чувствительности к антибиотикам каждого штамма (Chakraborty *et al.*, 2011).

При хронических формах стафилококковых инфекций рекомендуют аутовакцину, представляющую собой инактивированную взвесь чистой культуры штамма, выделенного от данного пациента, а также стафилококковую инактивированную поливалентную вакцину из взвеси коагулазоположительных штаммов стафилококка (Aisling *et al.*, 2014; Ansari *et al.*, 2019; Giersing *et al.*, 2016; Missiakas *et al.*, 2016; Parker *et al.*, 2018).

Для лечения и терапии хронических стафилококковых инфекций рекомендуют применять также и стафилококковые бактериофаги (Abatangelo, 2017). Для борьбы со стафилококковой инфекцией и ее профилактики у беременных, новорожденных и больных с иммунодефицитом используется очищенный, адсорбированный при помощи гидроксида алюминия стафилококковый анатоксин (Venkatasubramaniam *et al.*, 2019). В случаях тяжелых интоксикаций и сепсиса показано применение человеческого антистафилококкового иммуноглобулина из крови доноров, иммунизированных стафилококковым анатоксином (Deresinski *et al.*, 2006; Aisling *et al.*, 2014). На фоне возрастающей антибиотикорезистентности патогенных бактерий многие исследователи (Edgar *et al.*, 2012; Kimberley *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2017; Oechslin *et al.*, 2018) придают первостепенное значение работам, направленным на поиск возможностей более широкого применения бактериофагов для лечения различной патологии, вызванной, в том числе, стафилококками.

1.2. Бактериофаги *Staphylococcus aureus*: морфология, биологические и физико-химические свойства, специфичность, препараты для лечения стафилококковой инфекции, ограничения в применении

Бактериофаги впервые были обнаружены микробиологами Ф. Туортом в Великобритании 1915 и Ф. Д'Эрелем во Франции 1917 (Лазарева, Д.Д. Меньшиков, 2014). Использование бактериофагов для лечения инфекций, вызываемых бактериями, является главной стратегией специфической противобактериальной терапии сегодня (Каттер, 2012). Но правильное, а именно успешное применение фагов остается сложной задачей, в отличие от применения антибиотиков. Работы, посвященные изучению взаимодействия бактериофагов и бактерий не всегда давали положительные результаты. С начала 1940-х гг. фаговая терапия начала применяться в основном в странах Европы и США, препараты бактериофагов получили миллиарды пациентов, однако результаты лечения оказались противоречивыми и невоспроизводимыми (Wittebol *et al.*, 2014). Бактерии обитают в природе с фагами миллиарды лет и выработали многочисленные стратегии взаимодействия, вплоть до симбиоза с ними. Но все же, в ряде случаев фаги оказываются эффективным и более безопасным средством для лечения бактериальных инфекций, чем известные антибиотики (Oechslin, 2018; Каттер, 2012)³⁴.

В конце 1880-х стало известно, что бактериофаги живые объекты, относящиеся к вирусам, имеющие собственный наследственный материал и ферменты (Graham, 2015). Позднее, у фагов были установлены наследственные изменения, а именно, мутации и эволюционирование (Tong *et al.*, 2015).

Бактериофаги состоят из белка – капсида, защищающего нуклеиновую кислоту (одно- или двухнитевая ДНК, либо РНК) (Аксыук, 2011). Выделяют бактериофаги, имеющие длинный отросток с сокращающимся или несокращающимся чехлом, а также бактериофаги с короткими отростками, псевдоотростками, без отростков и даже нитевидные (Moon, *et al.*, 2015). Размеры бактериофагов разнообразны и колеблются от 20 до 800 нм. (Ackermann *et al.*, 2012).

По механизму действия различают вирулентные (литические) и умеренные фаги (Aksyuk, 2011). Вирулентные фаги увеличивают свою численность посредством литического цикла в клетке бактерии. Первоначально бактериофаги прикрепляются к фагоспецифическим рецепторам на поверхности бактериальной клетки. Хвост фага или оболочка капсида (у без отростковых фагов) с помощью ферментов, местно растворяют оболочку клетки, и содержащаяся в головке НК инъецируется в клетку, при этом белковая оболочка фага остается снаружи. Инъецированная НК вызывает полную перестройку метаболизма клетки: прекращается синтез бактериальной ДНК, РНК и белков. ДНК фага начинает транскрибироваться с помощью собственного фермента транскриптазы, которая после попадания в бактериальную клетку активируется. После синтеза белков и завершения репликации ДНК наступает заключительный процесс – созревание фаговых частиц или соединение фаговой ДНК с белком оболочки и образование зрелых инфекционных фаговых частиц. После происходит лизис клетки, высвобождающий новые зрелые фаги (Bebeasua, Tremblay, 2013; Taylor *et al.*, 2016; Roos *et al.*, 2007; Karlsson *et al.*, 2003; Rakonjac *et al.*, 2017).

Фаги, относящиеся к умеренным, они же лизогенные, могут использовать два способа развития: первый - литический, сходный с развитием вирулентных фагов, и второй - свойственный умеренным фагам (Goldberg *et al.*, 2014). Во втором случае фаг подавляет активность своего генома, синтезируя особый белок – репрессор. Белок – репрессор, соединяясь со специфическим участком в ДНК фага, препятствует ферменту РНК-полимеразе начать транскрипцию. Неактивный геном фага называется профагом и у разных фагов может встраиваться в бактериальную хромосому или оставаться в свободном состоянии, в виде плазмид. Бактерия, имеющая профаг в своем геноме, называется лизогенной. Она устойчива к действию собственного фага, а иногда и к действию других фагов за счет генов приобретённого фага. Спонтанно или под действием индуцирующих агентов, например, ультрафиолетовых лучей, химических веществ, профаги могут высвободиться из хромосомы бактерии. Этот процесс заканчивается продукцией

новых фагов, приводящих к лизису бактерий (Abatangelo *et al.*, 2017; Ingmer *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2019).

Бактериофаги, отнесенные к третьей группе (сем. *Inoviridae*), однажды заразив бактерию, становятся ее постоянными обитателями, но не обладают способностью к профагообразованию (Harper, 2020). Они постоянно реплицируются в клетке и выделяются в окружающую среду через специфическую пору, не вызывая лизиса бактериальной клетки (Knezevic, 2021).

Повышение интереса к использованию бактериофагов связано с проблемами лечения инфекций, вызываемых антибиотикорезистентными штаммами (Kimberley *et al.*, 2009).

Преимущества фагов перед антибактериальными препаратами достаточно очевидны и заключаются в следующем: безопасны, в т. ч. не токсичны для человека; высокостабильны при длительном хранении; обладают строгой специфичностью действия; не вызывают побочных эффектов; не подавляют рост нормофлоры, не ослабляют иммунитет; сочетаются с любыми лекарственными препаратами и оказывают иммуностимулирующее действие (Golkar *et al.*, 2014; Drulis-Kawa *et al.*, 2012; Oechslin, 2018).

Выявлено, что, несмотря на способ применения (местное или общее), фаги проникают в кровь и лимфу, попадают в очаг воспаления, оказывая положительное влияние на иммунный статус, а выводятся через почки с мочой (Катер, Сулаквелидзе, 2012; Бехтерева, Иванова, 2014; Иванова и др., 2019). Доказано (Габриэлян, Горская, Цирульникова, 2012) применение препаратов бактериофагов в хирургии при лечении инфицированных ран и перитонита у пациентов.

В работах Лазаревой и Меньщикова, Górski *et al.*, 2012 показано, что под воздействием фага в первую очередь происходит активация фагоцитоза, повышается активность нейтрофилов и их метаболическая активность, что препятствует рецидивированию инфекции и хронизации воспалительного процесса. Также отмечается снижение числа лейкоцитов и нейтрофилов, а уровень лимфоцитов повышается преимущественно за счет Т-лимфоцитов.

Активность препаратов лечебно-профилактических фагов в отношении *S. aureus* достаточно высока, также и в отношении штаммов госпитального происхождения, характеризующихся множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам (Kimberley *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2017; Abatangelo *et al.*, 2017; Дубовец, 2012;).

К недостаткам бактериофагов при лечении бактериальных инфекций относят высокую специфичность фагов, приводящую в ряд случаев к неспособности лизировать разные штаммы того или иного вида бактерий (Костюкевич и др., 2015; Golkar *et al.*, 2014).

Немаловажная проблема кроется в биологической природе фагов. Для поддержания жизнеспособности препаратов требуются особые индивидуальные условия хранения и транспортировки (Fortier, Moineau, 2009). Биологическая природа не только сказывается на условиях хранения, но и на доставке фагов в организм больного. Эти ограничения связаны, с большими, по сравнению с низкомолекулярными лекарствами, размерами и адресной доставкой фагов. Если микробная инфекция развивается там, где фаг можно нанести напрямую в виде жидкости либо спрея, либо клизмы, то проблем не возникает. Ситуация осложняется, если заражение происходит во внутренних органах (Loh *et al.*, 2020).

Каждый бактериофаг, применяемый в медицинских целях, должен отвечать определенным требованиям. Первым из них является специфическая литическая активность, которая определяется по методу Аппельмана с использованием соответствующих бактериальных тест-штаммов (штаммов контроля). Тест-штаммов должно быть не менее десяти, причем, типичных по своим морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам. Штаммы, не должны быть использованы при изготовлении препарата. Активность бактериофага, определяемая по методу Аппельмана, выражается отрицательным десятичным логарифмом, показывающим последнее разведение бактериофага в жидкой питательной среде, в которой рост бактериальной культуры визуально не наблюдается (Ven *et al.*, 2019). Второе требование относится к количеству видов бактериальных возбудителей инфекций, на которые действует изучаемый

препарат (Deghorain *et al.*, 2012). Третье требование относится к стабильности препарата. Активность препаратов бактериофагов должна сохраняться в течение всего заявленного срока годности при регламентированной температуре хранения (Fortier LC, Moineau, 2009).

Многие ученые рекомендуют не противопоставлять применение бактериофагов и антибиотиков в медицинских целях. В ряде работ (Torres-Barcelo *et al.* 2018; David *et al.* 2017; Lin *et al.* 2017; Abatangelo *et al.* 2017) показано, что при совместном действии бактериофага и антибиотиков наблюдается взаимное усиление противобактериального эффекта. Это открывает новый путь в отношении возможности снижения доз антибиотиков до концентраций, не вызывающих явных побочных эффектов у макроорганизма. Кроме этого, возникновение у бактерий устойчивости к препаратам фагов и антибиотиков в виде комбинированных лекарств маловероятно, хотя этот вопрос требует дополнительных исследований.

ГЛАВА 2. CRISPR/CAS-СИСТЕМЫ БАКТЕРИЙ: СТРУКТУРА, ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ, ТЕХНОЛОГИИ АНАЛИЗА

Простое строение прокариотических микроорганизмов, как считалось ранее, обуславливало отсутствие молекулярных механизмов защиты бактериального генома, в связи с этим исследователи считали их беззащитными в отношении бактериофагов и чужеродных генетических элементов (Великов, 2013; Wittebole *et al*, 2014). В 1978 исследование Werner Arber, Dan Nathans and Hamilton Smith, 1979 подтвердила наличие защиты в геноме бактерии в результате обнаружения ферментов рестриктаз (Raju, 1979). С 1981 г. использование рестриктаз и других ферментов для процессов выделения генов, получения из них различных цепей был уже автоматизирован в генной инженерии и показывал успешные результаты (Rupp *et al*, 2017; Hwang *et al*, 2013). На сегодняшний день известны сотни рестриктаз, способных узнавать, разрезать участок ДНК, состоящий даже из 4–6 пар нуклеотидов, либо разрывать ДНК в разных точках, деля ее на различные фрагменты (Якупов, 2016). Исследования, проводившиеся с 1990 г. в области регуляции активности генов, привели к обнаружению (Dsouza, *et al*, 1997) РНК-интерференции, которая позволяла эукариотическим организмам подавлять экспрессию генов многих вирусов.

Генная инженерия подкреплялась новыми знаниями, получаемыми от ряда наук, главным образом, от микробиологии (Великов, 2013; Hatoum-Aslan *et al*, 2017). Одной из задач медицинской микробиологии является разработка методов микробиологической диагностики (распознавания), специфического лечения и профилактики инфекционных болезней человека (Алешукина, 2003). Специфическое лечение предусматривает, как один из вариантов в современной медицине, применение лекарственных средств. Применение препаратов, обычно химической природы, не всегда позволяет устранить инфекционный агент из организма больного (Дерябин, Фот, 2005). В связи с этим ученые искали альтернативные методы лечения, основываясь на природе возбудителей и межвидовых взаимодействиях (Burrowes *et al*, 2019; Baidara *et al*, 2018).

Изучение состава и функционирования генома возбудителя позволяет сегодня получить подробную информацию от происхождения до вирулентности возбудителя (Richardson *et al*, 2015).

В результате расшифровки последовательностей геномов бактерий (Mojica *et al*, 2000; Achaz *et al*, 2002; Bao *et al*, 2002) обнаруживались участки равной длины с одинаковыми последовательностями, природа которых была неизвестна. Одни из первых работ (Gur-Arie *et al*, 2000), характеризующих данные образования в геноме *E. coli*, были сформированы в 1990-е и позднее подтверждены в 2000-е годы (Moch, 2017). Аналогичные структуры были обнаружены в геномах многих видов прокариот (Beloglazova *et al*, 2008; Hargreaves *et al*, 2014). На сегодняшний день известны повторы, широко распространенные в геномах архей и бактерий (Vestergaard *et al*, 2014; Mojica *et al*, 2005; Katti *et al*, 2000; Kunin *et al*, 2007; Koskela, *et al*, 2015). Данные последовательности были названы CRISPR (от англ. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) (Karauzum *et al*, 2017).

2.1. Структура и механизмы взаимодействия систем CRISPR-Cas бактерий и анти-CRISPR-фагов

Активное исследование CRISPR-локусов бактериального генома началось в начале 2002 г. (Koonin *et al*, 2017). Было выявлено, что для повторов характерна частичная диадная симметрия, то есть часть последовательности в начале повтора обратно комплементарна участку последовательности соответствующей длины в конце повтора (Makarova *et al*, 2017). При транскрипции CRISPR-кассет концы повторов могут взаимодействовать между собой с образованием устойчивых вторичных структур, прежде всего, различных шпилек. Шпильки необходимы для взаимодействия с *cas*-белками (Kondrateva *et al*, 2021). Длина и нуклеотидный состав повторов хорошо сохраняются в локусе CRISPR, но могут варьироваться между CRISPR-кассетами в одном и том же или разных геномах. Повторяющиеся последовательности находятся в диапазоне от 21 до 48 пар оснований, а

разделяющие последовательности (так называемые спейсеры, от англ. *Spacer* – «распорка») в диапазоне от 26 и до 52 п.о. (Shmakov *et al*, 2014; Bolotin *et al*, 2005; Garrett *et al*, 2021). Геномы бактерий могут иметь одну или несколько CRISPR-кассет, разных размеров и разного состава (Krupovic *et al*, 2014; Makarova KS, Koonin, 2015).

Исследования спейсерных последовательностей, продемонстрированные (Bolotin *et al*, 2005; Barrangou *et al*, 2007) показали, что данные последовательности происходят из чужеродных плазмид и фагов. Бактерии, выжившие после воздействия бактериофага, пополняют свою CRISPR-кассету за счет спейсеров, идентичных небольшим захваченным участкам ДНК-фага (Bao *et al*, 2015; Diez-Villasenor *et al*, 2013).

Работа (Makarova *et al*, 2011), описывающей действие системы CRISPR-Cas, показал, что если бактериальную клетку неизвестным им фагом, то лишь 1–3% выживших бактерий удлиняют свою CRISPR-кассету на один спейсер, соответствующий комплементарному участку вирусной ДНК - протоспейсеру. Выжившие популяции пополняют свои CRISPR-касеты участками генома этого фага, и выживаемость штаммов возрастает в десятки раз. С течением времени, как продемонстрировано (Martynov, Severinov, Ispolatov, 2017) между спейсером и протоспейсером накапливаются отличия, в силу мутагенеза. Бактерии становятся менее устойчивыми к последующим воздействиям одного фага (Burrowes *et al*, 2019).

В работе (Martynov, Severinov, Ispolatov, 2019) посвященной изучению деятельности и функции CRISPR-систем, доказываемая прямая зависимость между числом спейсеров в CRISPR-кассетах и устойчивостью к фаговым инфекциям, а также подтверждаются данные о том, что данные образования являются активными компонентами генома, поскольку CRISPR-касеты транскрибируются с образованием малых РНК.

Главной особенностью, описанной в первых работах по изучению CRISPR-системы у бактерий, являлось наличие консервативной последовательности, которую в последствии назвали лидерной, т. е. располагающейся впереди

относительно направления транскрипции CRISPR-кассет (Alkhnbashi *et al*, 2016). Наличие лидерных последовательностей первоначально обнаружено у *Archaeoglobus profundus* (Mathias von Jan *et al*, 2010). Длина лидерной последовательности значительно больше длины повторов и спейсеров, и составляет в среднем 400 пар оснований. Лидерная последовательность задает направление транскрипции кассеты. Установлено, что лидерные последовательности не содержат открытых рамок считывания и состоят в основном из аденина и тимина – такая топология служит характерным местом посадки для многих белков, взаимодействующих с ДНК (Van Orden *et al*, 2017). Лидерная последовательность регулирует транскрипцию CRISPR-кассет и функционирование всей системы (Alkhnbashi *et al*, 2016). Продемонстрирован (Wright, Doudna 2016) характерный принцип работы CRISPR: новые спейсеры встраиваются в кассеты только рядом с лидерной последовательностью.

Вторая особенность CRISPR-систем заключена в наличии повторов и спейсеров (Kunin *et al*, 2007). Длина всех спейсеров практически всегда одинакова в пределах кассеты и чаще всего все спейсеры в кассете имеют различную последовательность (Garrett *et al*, 2021). Благодаря высокой вариабельности CRISPR-локусы используются для быстрого типирования бактериальных штаммов, например, *Mycobacterium tuberculosis* (Sola *et al*, 2015), *Yersinia pestis* (Vergnaud *et al*, 2007).

Важным компонентом CRISPR-системы, кроме CRISPR-кассет и лидера, считают *cas*- гены (от англ. CRISPR- *associated proteins*), кодирующие *cas* белки (Makarova *et al*, 2011). Гены локуса CRISPR в большинстве случаев располагаются в непосредственной близости от повторяющихся последовательностей, но могут и располагаться в любом месте генома (Vestergaard *et al*, 2014; Cady *et al*, 2012). Группа кодируемых белков *cas* насчитывает более 40 семейств разнообразных ферментов (Koonin *et al*, 2018).

Известно, что последовательности большинства *cas*-белков, за редким исключением, таких как *cas1* и *cas3*, сильно различаются, предположительно из-за быстрой эволюции, характерной для защитных молекулярных систем (Makarova,

Е.В. Koonin, 2013). По этой причине классификация генов *cas* на основе анализа кодируемых ими белковых последовательностей является трудной задачей, которая требует тщательного применения наиболее чувствительных доступных молекулярных методов анализа последовательностей (Makarova, E.V. Koonin, 2018). Классификация типов и подтипов CRISPR-Cas систем в настоящее время трудна, по причине малой изученности семейства белков *cas*. Наилучшим подходом для обеспечения правильной классификации является объединение нескольких источников информации (Koonin, K.S. Makarova, F. Zhang, 2017). Первоначальный биоинформационный анализ (Jansen *et al*, 2002) позволил предложить четыре названия для наиболее консервативных и распространенных генов *cas* и их продуктов: *cas1*, *cas2*, *cas3* и *cas4*. Последующий анализ, показал, что гены *cas* кодируют большое количество различных наборов гомологичных белков (Makarova *et al*, 2016).

Классификация CRISPR-генов будет расширяться по мере описания новых *cas*-белков, поскольку CRISPR-Cas система у разных видов бактерий остается малоизученной (Makarova *et al*, 2015; Agarwal *et al* 2021; Liu *et al* 2020).

В соответствии со структурой и функцией белка Cas системы CRISPR / Cas можно разделить на два класса (класс I, класс II), которые далее подразделяются на шесть типов (тип I–VI) (Mohanraju *et al* 2016; Liu *et al* 2020).

Самыми распространёнными генами CRISPR являются гены, кодирующие белки *cas1* и *cas2*. Для белка *cas1* характерен выраженный положительный заряд, который может способствовать электростатическому взаимодействию с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК. *Cas1* представляет собой ионно-зависимую ДНК-специфическую эндонуклеазу, которая редуцирует двухцепочечные фрагменты ДНК. Белки *Cas2* обладают эндорибонуклеазной или эндодезоксирибонуклеазной активностью, в зависимости от системы, к которой принадлежит *cas2* (Fagerlund *et al*, 2017; He *et al*, 2018; Moch *et al*, 2017). Современные работы по изучению данной системы позволили смоделировать работу некоторых CRISPR-белков и систематизировать существующие знания об *cas*-генах (табл. 1) (He *et al*, 2018; Hochstrasser *et al*, 2014; Ao *et al*, 2018; Carte *et al*,

2010; Hynes *et al*, 2018; Jain *et al*, 2018; Kato-Inui *et al*, 2018; Kieper *et al*, 2018; Lemak *et al*, 2016; Palermo *et al*, 2017; Wang *et al*, 2017).

Таблица 1.

Структуры, доменные архитектуры и функции основных компонентов систем
CRISPR-Cas

Семейство	Биохимические особенности
Cas 1	Дезоксирибонуклеазы
Cas 2	РНКаза. Двухцепочечная ДНКаза
Cas3	Одноцепочечная ДНК-нуклеаза и АТФ-зависимая геликаза
Cas3 "	Ионн-зависимая дезоксирибонуклеаза, специфичная для двухцепочечных олигонуклеотидов
Cas 4	Нуклеаза с трехцистеиновым С-концевым кластером; обладает 5'-экзодезоксинуклеазной активностью
Cas5	Субъединица каскадного комплекса взаимодействует с большой субъединицей и субъединицей Cas7 и связывает 5'-дескриптор кРНК. В системе IC подтипа Cas5 является рибонуклеазой, замещающей функцию Cas6.
Cas6	Металл-независимая эндорибонуклеаза, которая генерирует кРНК
CAS7	Субъединица каскадных комплексов, связывающих кРНК, присутствует в каскадных комплексах в нескольких экземплярах.
Cas8abcef	Субъединица каскадного комплекса, участвующая в распознавании PAM (Protospaceradjacentmotif - представляет собой последовательность ДНК из 2–6 пар оснований, непосредственно следующую за последовательностью ДНК, на которую нацелена нуклеаза Cas
Cas10	Субъединица каскадного Cmr комплекса (Комплекс Cmr расщепляет эндогенную комплементарную РНК)

Малая субъединица	Небольшой, преимущественно альфа-спиральный белок
Cas 9	В системах CRISPR-Cas типа II Cas9 достаточно как для генерации кРНК, так и для расщепления ДНК-мишени.
Cse1, Cse2	Cse1 взаимодействует с Cas3 и доставляет к эффекторному комплексу. Cse2 — малая субъединица эффекторного комплекса
Csy1, Csy2, Csy3	Csy участвуют в образовании crРНК.

Из-за огромного разнообразия CRISPR-Cas генов, классификация целых систем и характеристика *cas*-белков являются серьезными проблемами. Необходимо учитывать сложность состава и архитектуры систем CRISPR-Cas, и невозможность применения единого критерия классификации.

Выделяют (Makarova *et al*, 2016; Liu *et al*, 2020) шесть филогенетических типов CRISPR - систем, поскольку они легко различимы, благодаря наличию уникальных структурных генов: *Cas3*-ген характерен для систем типа I, *cas9* - типа II, *Csm*, *Cmr*, *cas10* - типа III, ген *csf1*- для типа IV, *cas12* - для типа V и *cas13* - для типа VI.

Системы первого класса являются наиболее распространёнными CRISPR-Cas-системами. Их мишенями служат ДНК, содержащие уникальный протоспейсерный смежный мотив (PAM), а разрушение осуществляет эффекторный мультибелковый комплекс *Cascade*, связанный с белком *cas3*. *Cas3* кодирует большой белок с геликазой активностью к одноцепочечной ДНК (ssDNA). Геликаза является АТФ-зависимым ферментом, поскольку осуществляет расплетение дуплексов ДНК-ДНК и РНК-ДНК (Fagerlund *et al*, 2017; He *et al*, 2017). В работе Mulepati, Bailey (2011) доказывается слияние геликазы (*cas3*) с доменом HD для участия в расщеплении чужеродной ДНК. Домен HD расположен на N-конце белков *cas3* или кодируется отдельным геном в том же локусе, что и *cas3*, и обладает той же ферментативной активностью (Mulepati, Bailey 2011). В подсистемах I-F типа ген

cas3 дополнительно слит с геном *cas2* (Fagerlund *et al*, 2017). Почти все системы типа I кодируются одним опероном, содержащим гены *cas1* и *cas2*, гены для субъединиц каскадного или эффекторного комплекса, включая большую субъединицу, небольшую субъединицу, гены *cas5*, *cas7* и ген *cas6*, который отвечает за процессинг транскрипта пре-кРНК. Системы типа I в настоящее время разделены на семь подтипов, от I-A до I-F, каждый из которых имеет свои особенности в организации оперона, в механизмах процессинга crRNA и в способах идентификации чужеродных нуклеиновых кислот (Plagens *et al*, 2010; Hidalgo-Cantabrana *et al*, 2020).

Системы, отнесенные ко второй группе, имеют единственный эффекторный белок. К этому классу относятся типы II и V. Системы типа II активно используются в генной инженерии; для них характерно наличие эндонуклеазы *cas9* (Mitsumi *et al*, 2017). *Cas9* кодирует мультидоменный белок, который сочетает в себе все функции эффекторных комплексов для расщепления ДНК-мишени и созревания кРНК (Mir *et al*, 2018). В системах этого типа направляющей РНК выступает не одна crРНК, а дуплекс crРНК и дополнительная РНК – tracrРНК (дуплекс crРНК-tracrРНК направляет домены *cas9* для внесения разрывов с образованием тупых концов в ДНК-мишени) (Nishimasu *et al*, 2014). Каждый локус CRISPR-Cas этого подтипа, помимо гена *cas9*, также содержит гены *cas1* и *cas2*. В дополнение к этим трем кодирующим генам включают один или два гена для tracrRNA. Эти системы используют клеточную (не закодированную в локусах CRISPR-Cas) РНКазу III и тракрРНК для процессинга пре-кРНК (Chylinski *et al*, 2014). Системы CRISPR-Cas типа II в настоящее время классифицируются на три подтипа: II-A, II-B и II-C. Системы типа II-A включают дополнительный ген *csn2*, транскрибируемый белок которого участвует, как продемонстрировано (Ellinger *et al*. 2012; Ka *et al*. 2018; Коо *et al*. 2012) в интеграции спейсера, но молекулярный механизм работы до сих пор остается пока неизвестным. Системы типа II-B не кодируют ген *csn2*, но обладают четвертым геном, принадлежащим семейству *cas4*, который также связан с подтипами I-A по I-D (но не I-E и I-F) (Diez-Villasenor *et al*, 2013;

Chylinski *et al.*, 2014). Белки *cas4*, обладают 5'-одноцепочечной ДНК-экзонуклеазной активностью и относятся к семейству нуклеаз (Lemak *et al.*, 2014). Фактическая роль белков *cas4* в системах CRISPR-Cas остается также неизвестной, поскольку тип II-C состоит только из трех белково-кодирующих генов (*cas1*, *cas2* и *cas9*) (Chylinski *et al.*, 2014).

Системы типа III обладают специфичным геном *cas10*, который кодирует мультидоменный полифункциональный белок с активностью РНКазы и Cascade (Pyenson *et al.*, 2017). Локус типа III также кодирует ген для малой субъединицы, ген *cas5* и обычно несколько генов для белков *cas7*. Системы CRISPR-Cas типа III часто не кодируют свои собственные гены *cas1* и *cas2*, но используют кРНК, полученные из массивов CRISPR, связанных с системами типа I или типа II (Chou-Zheng *et al.*, 2017; Tamulaitis *et al.*, 2014). Тем не менее, во многих геномах с системой типа III для большей функциональности имеются гены *cas1*, *cas2* и *cas6* (Cao *et al.*, 2016; Samai *et al.*, 2015). Разнообразие типа III достигается за счет дупликации и рекомбинации генов (Liu *et al.*, 2018). Комплексов *csm2* и *cmr5* соответственно. Системы типа III подразделяются на четыре подтипа от А до D. Мишенью интерференции типа III-A является мРНК (Hrle *et al.*, 2013; Ichikawa *et al.*, 2017), тогда как мишенью интерференции типа III-B такая же, как у систем CRISPR / Cas типа I и II, то есть ДНК (Han *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017). Однако мишени типов III-C и D пока неясны. (Rouillon *et al.*, 2013, 2018; Liu *et al.*, 2020).

Системы CRISPR-Cas типа IV, обнаруженные в некоторых бактериальных геномах, чаще всего в плаزمидах, подобны подтипу III-A так как могут отсутствовать гены *cas1* и *cas2* (Pinilla-Redondo *et al.*, 2020). Системы типа IV обладают эффекторным комплексом, который состоит из большой субъединицы (*csf1*), двух генов Cas5 (*csf3*) и Cas7 (*csf2*) (Özcan *et al.*, 2019). Ген *csf1* считается маркером (Pausch *et al.*, 2019) для типирования этой системы. В системах типа IV существует два подтипа, один из которых отличается наличием геликазы семейства *DinG/csf4* принципа работы которой является малоизученным, как и самой системы (Taylor *et al.*, 2019). На данный момент времени (Crowley *et al.*, 2019)

доказана NTP-зависимая геликазная активность *DinG/csf4* против плазмиды *in vivo* у *Pseudomonas aeruginosa*.

Системы CRISPR-Cas типа V отличаются одним crRNA эффектором, содержащим домен RuvC, Cas12 (Yan *at al.*, 2019). Белки Cas12 имеют гомологию с нуклеазами Cas9, которые широко используются для редактирования генома и обнаружения ДНК, однако активность расщепления ДНК и встраивание в геном при помощи Cas12 напрямую не наблюдалась (Harrington *at al.*, 2020).

Система CRISPR VI типа, как и описываемая ранее система являются малоизученными и база данных генного состава постоянно обновляется. На данный момент времени выяснено (Smargon *at al.*, 2017), что в составе данного типа имеются Cas1 и Cas2 гены, которые включают один большой эффекторный белок Cas13b и связанных белков Csx27 и Csx28. Csx27 репрессирует, тогда как Csx28 усиливает Cas13b-опосредованную РНК-интерференцию (Yan *at al.*, 2018).

В функционирующих CRISPR-cas-системах разных типов, выделяют три основные рабочие стадии:

- 1) адаптация, то есть приобретение новых спейсеров;
- 2) созревание эффекторных комплексов;
- 3) иммунный ответ - разрушение чужеродной ДНК или РНК (Barrangou *at al.*, 2015).

В ходе адаптации при заражении бактерии фрагмент генома вируса встраивается в кассету в качестве спейсера (Childs *at al.*, 2014). При повторных заражениях тем же агентом данный спейсер повышает вероятность приобретения дополнительных спейсеров против этого агента. Увеличение числа спейсеров повышает шансы справиться с инфицирующим агентом, даже при неполном совпадении последовательностей спейсеров и их протоспейсеров (Makarova, *at al.*, 2013). Белки *cas* выполняют ключевую роль на этапе адаптации (Majumdar *at al.*, 2015). Белковый комплекс *cas* сканирует последовательность инфицирующей ДНК/РНК. После обнаружения PAM-мотива, происходит выщепление преспейсера - участка, содержащего протоспейсер, а также фрагмент PAM-мотива (Gleditsch *at al.*, 2018; Leenay *at al.*, 2016; Wang *at al.*, 2015). Белковый комплекс

распознает лидерную последовательность и осуществляет встраивание нового спейсера (Landsberger *at al.*, 2018; Wang *at al.*, 2016).

В ходе защиты от вирусной инфекции происходит перевод пассивной иммунной памяти в активный ответ (Cady *at al.*, 2012). Запуск экспрессии происходит с использованием промоторной области вблизи кассет. Одновременно начинается экспрессия *cas*-генов, продукты которых впоследствии входят в состав эффекторного комплекса (например *Cascade*). *Cas*-белки, обладающие эндорибонуклеазной активностью, разрезают длинный первичный РНК-предшественник, транскрибированный с CRISPR-кассеты. В результате работы *cas*-эндорибонуклеазы образуется более короткая РНК (crРНК) длиной менее 100 н.о., соответствующая последовательности спейсера с двумя фланкирующими последовательностями разной длины. Фланкирующие последовательности являются участками повторов. Эффекторный комплекс содержит спиральную бороздку, в нее помещается зрелая молекула crРНК. 5'-конец crРНК непосредственно связан с *cas* белками. Более длинный 3'-фланк за счёт частично палиндромной природы последовательности повтора формирует шпильку, которая помещается в выемку на поверхности *cas*-эндорибонуклеазы. Таким образом, процесс созревания эффекторных комплексов заканчивается формированием *Cascade* (или *Cascade*-подобного) комплекса, содержащего короткую crРНК. Данными комплексами происходит узнавание и уничтожение чужеродной ДНК (или РНК). CrРНК в составе эффекторного комплекса может комплементарно взаимодействовать со своим прототипом (протоспейсером), расположенным в вирусной или плазмидной ДНК. Рибонуклеопротеиновый комплекс (*Cascade* + crРНК) сканирует чужеродную ДНК в поисках РАМ-мотивов и якорных областей. Для узнавания протоспейсера необходимо наличие РАМ-мотивов. Такой регион спейсера/протоспейсера называют якорной областью. *Cas* вносит одноцепочечные разрывы в двухцепочечную ДНК-мишень, одновременно с этим средство *Cascade*-комплекса к ДНК снижается. Через некоторое время комплекс распадается на субъединицы. *Cas* белок вносит большое число разрывов в чужеродную ДНК до полного её уничтожения.

Фрагменты чужеродной ДНК могут быть впоследствии использованы в качестве новых спейсеров. Наличие циклов в работе CRISPR-Cas-систем объясняется эффектом праймирования, то есть ускоренного включения нескольких спейсеров против одного и того же чужеродного репликона (Louwen *at al.*, 2014; Terns *at al.*, 2014; Fu *at al.*, 2014; Childs *at al.*, 2014; Beloglazova *at al.*, 2008; Hille *at al.*, 2016; Shmakov *at al.*, 2015).

Изучение взаимодействия бактерий и бактериофагов в экспериментах не всегда было закономерным, так, например, изучаемые (Hynes *at al.*, 2018) бактериофаги подавляли CRISPR-гены неизвестными белковыми комплексами. До открытия анти-CRISPR был известен только один способ, с помощью которого фагам удавалось ускользнуть от CRISPR - приобретение точечных мутаций. Они практически не сказываются на жизнеспособности фага, но нарушают комплементарность спаривания фаговой ДНК с направляющей РНК, из-за чего CRISPR-Cas система не может распознать вирусный генетический материал (Borges *at al.*, 2017; Kupczok *at al.*, 2015).

Первые белки анти-CRISPR были открыты в 2012 году у нескольких фагов, поражающих бактерию *Pseudomonas aeruginosa* (Cady *at al.*, 2012). Последовательности белков анти-CRISPR различаются (Maxwell *at al.*, 2017). Расположение генов анти-CRISPR схоже: после данных генов располагается регуляторный ген, кодирующий транскрипционный фактор *Acal* (от англ. *anti-CRISPR associated 1*) (Pawluk *at al.*, 2016)¹³⁷. Выяснено (Borges *et al.* 2017), что фаги, у которых отсутствуют гены анти-CRISPR, не имеют и гена *acal*. Гены анти-CRISPR и ген *Acal* образуют единый оперон, а белок *Acal*, доказано (Pawluk *et al.* 2018) регулирует экспрессию анти-CRISPR, поскольку белок *Acal* имеет структурный мотив в виде спирали, часто встречающийся среди транскрипционных факторов. Благодаря обнаружению гена *Acal*, были впервые идентифицированы белки анти-CRISPR, действующие против систем I и II типа (Pawluk, Davidson, Maxwell, 2016).

На сегодняшний день известны 22 семейства белков анти-CRISPR, занесенных в базу данных белков antiCRISPRdb (<http://cefg.uestc.cn/anti->

CRISPRdb) (Dong *et al.* 2018; Peng *et al.* 2020). Обобщающей характеристикой данных белков является малый размер (от 50 до 150 аминокислотных остатков), белки не имеют общего мотива и не похожи по строению ни на одни из известных белков (Chaudhary, Chattopadhyay, Pratap, 2018). По этим причинам выявление механизма действия анти-CRISPR с помощью биоинформатики остается пока на стадии разработок. На данный момент времени удалось установить механизм действия белков анти-CRISPR с использованием генетического, биохимического и структурного подходов. Данные работы (Landsberger *et al.* 2018; Basgall *et al.* 2018; Ka *et al.* 2018; Maxwell *et al.* 2016) утверждают, что белки анти-CRISPR препятствуют вставке новых фрагментов чужеродной ДНК в геном бактерий, а также нарушают синтез белков *cas*, либо блокируют образование направляющей РНК. Например, белки *AcrIIA2* и *AcrIIA4* препятствуют сборке активного комплекса белков *cas* с РНК, а также блокируют связь эффекторного комплекса для разрезания ДНК-мишени (Basgall *et al.* 2018).

Продемонстрировано (Chowdhury *et al.* 2017) блокировочное действие белков *AcrF1* и *AcrF2*, которые присоединяются к комплексу белков *cas* и РНК, не давая им связываться с чужеродной ДНК. Белок *AcrF3* блокирует присоединение *cas3*, обладающего хеликазной и нуклеазной активностями (Wang *et al.* 2016). *AcrIIC1* блокирует рестрикционную функцию белка *cas9* (единственного белка Cas в системах II типа) (Mathony *et al.* 2020).

Белки анти-CRISPR служат важными факторами эволюции микроорганизмов, например, встраивание мобильных генетических элементов с генами таких белков в геном бактерии приводит к постоянной инактивации систем CRISPR-Cas из-за стабильной экспрессии анти-CRISPR. Находящаяся в таком состоянии клетка не может сопротивляться проникновению других мобильных генетических элементов и горизонтальному переносу генов (Mahendra *et al.* 2020). При долговременной инактивации CRISPR-Cas-системы бактерия может совсем потерять гены *cas* или накопить мутации, приводящие к деградации системы. Многие бактериальные патогены человека имеют активные системы CRISPR-Cas, и применение белков анти-CRISPR может значительно повысить

эффективность фаговой терапии. Белки анти-CRISPR могут найти широкое применение в биотехнологии, генной инженерии и медицине (Sampson *et al.*, 2014; Marino *et al.*, 2020; Marino *et al.*, 2018; Osuna *et al.*, 2020).

2.2. CRISPR/Cas-система *Staphylococcus aureus*: формирование, генетическая структура, функции

В настоящее время *Staphylococcus aureus*, являясь патогенным микроорганизмом, обладающим выраженной резистентностью к антибиотикам, вызывает плохо поддающиеся лечению заболевания у людей во всем мире (Dickmann *et al.*, 2014; Otto, *et al.*, 2013; Khamash *et al.*, 2019; Nguyen, *et al.*, 2017; Asgeirsson *et al.*, 2018). Проводимые исследования (Mahe, Tournoud, 2018) продемонстрировали возможность прогнозирования фенотипов бактерий с устойчивостью к антибиотикам при помощи детального анализа геномов. Расшифровка нуклеотидных последовательностей геномов *S. aureus* позволила выявить (Cha *et al.*, 2019; Kuroda *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2015) принадлежность штаммов к «гетерогенным» и «полиморфным» видам, у которых не только гены антибиотикорезистентности, но и многие гены патогенности присутствуют в составе геномных островов различных типов: островов «патогенности», стафилококковых хромосомных каскадов (SCC), профагов. Генетическое разнообразие внутри вида является следствием горизонтального переноса генов, расположенных на мобильных генетических элементах (Alibayov *et al.*, 2014; Malachowa *et al.*, 2010). Для поиска новых способов борьбы с возбудителем перспективно изучение работы его CRISPR/Cas-системы.

В работах (Cao *et al.*, 2016; Makarova *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2018; Javed *et al.*, 2018; Guan *et al.*, 2017; Mo *et al.*, 2021) утверждается, что ряд штаммов *S. aureus* имеют в своем геноме систему CRISPR-Cas типа III-A, включающую белки *cas1*, *cas2*, *casM1*, *casM2*, *casM3*, *casM4*, *casM5*, *casM6* и *cas6*. Существуют результаты биоинформационного исследования (Zhao *et al.*, 2018) утверждающие, что CRISPR-система у разных штаммов *S. aureus* может принадлежать к разным типам по причине горизонтального переноса генов.

Основываясь на данных результатах обнаружения *cas*-генов, Zhao et al., отнесли CRISPR-систему 1 штамма *S. aureus* к подтипу IC, (состав: гены *cas1*, интегразы *cas2*, геликазы *cas3*, белок *cas4*, белок *cas5* и белок *cas7*), 2 штамма отнесли к типу III (*cas9*, эндонуклеаза *cas1*, интегразы *cas2* и белок *csn2*), а третьего к подтипу III-A (*cas6*, белок *cas10*, белок *csm10*, белок *csm4*, эндонуклеаза *cas1* и интегразы *cas2*). Принадлежность CRISPR-системы *Staphylococcus aureus* к типу III подтверждается разнообразием генов в ее составе, поскольку данный тип формируется за счет дупликации и делеции генов, вставок доменов и дополнительных слабоизученных генов (Pyenson et al., 2017). Вследствие того, что система CRISPR-Cas стафилококков изучена недостаточно, не известно является ли присутствие этой системы в CRISPR-положительных штаммах *Staphylococcus aureus* наследственным или недавно приобретенным явлением.

2.3. Молекулярно-генетические и биоинформационные технологии анализа CRISPR/Cas- системы

Биоинформатика сыграла важную роль в обнаружении и анализе систем CRISPR (Alkhnabashi et al., 2019). Ученые - биоинформатики во всем мире не упускают возможности использовать новые революционные инструменты для поиска и анализа CRISPR- системы бактерий. Разрабатываются программы для моделирования и редактирования генов при помощи CRISPR (Cong et al., 2013; Jacquin et al., 2019). По мнению ряда авторов (Staals et al., 2014; Yin, et al., 2016) главными являются биоинформационные программы с функцией поиска и анализа CRISPR и анти-CRISPR систем. Необходимость появления новых инструментов поиска объясняется (Alkhnabashi et al. 2019) увеличением объема данных с появлением новых чувствительных методов секвенирования и эволюцией *cas*-генов. Современные программы предлагают удобные для пользователя интерфейсы, замещая ввод скриптов через командную строку. Основу любой биоинформационной программы составляет индивидуальный алгоритм поиска и сравнения (Biswas et al., 2014).

Повторяющиеся последовательности составляют около 5% от размера всего генома в геномах бактерий и архей, как было описано ранее. Научные исследования (Delihias *et al.*, 2011; Achaz *et al.*, 2012; Avershina, Rudi, 2015; Achaz Delihias *et al.*, 2002) утверждают необходимость идентификации повторов и спейсеров для понимания экологии и эволюции организмов. Найденные (Mojic *et al.* 2000) повторы в CRISPR-системах побудили биоинформатиков к разработке математических алгоритмов поиска разнообразных геномных структур. По причине того, что внимание к элементам CRISPR уделяется сравнительно недавно, для их автоматического обнаружения рекомендуется использовать разнообразные программные инструменты CRISPR.

Существующие программы, такие как CRISPR RecognitionTool (Bland *et al.*, 2007), PILER-CR (Edgar *et al.*, 2007), CRISPRstrand (Alkhnbashi *et al.*, 2016) и ряд других используют простой метод поиска, обнаруживающий повторы непосредственно анализируемой последовательности ДНК. В отличие от большинства методов обнаружения повторов, не относящихся к CRISPR-поиску, алгоритмы не основаны на использовании филогенетики или матриц выравнивания в качестве главных структурных данных. Вместо этого используются алгоритмы, которые начинают поиск повторов со сканирования последовательности, в большинстве случаев, слева направо с использованием небольшого скользящего окна поиска. Параметры для окна поиска вводятся вручную или устанавливаются по умолчанию. Каждый раз, когда окно считывает фрагмент за фрагментом, происходит сравнение нуклеотидных совпадений.

Многие из программ поиска CRISPR, сталкиваются с неподходящими повторениями и повторениями с далекими позициями (Avershina, Rudi, 2015). Для фильтрации нежелательных повторяющихся последовательностей применяются дополнительные параметры поиска (ограничение количества спейсеров, диапазон длин нуклеотидных фрагментов и т. д.). В некоторых программах фильтрация быстра по причине проверки только нескольких первых повторов CRISPR. Другие программы, например, PILER-CR проверяют левый и правый фланги CRISPR на случай, если повторы были пропущены из-за слишком большого количества

несовпадений нуклеотидов по причине мутаций. Проверка флангов менее строгая, чем первоначальный поиск повторов, поскольку не направлена на точные совпадения (Edgar *et al.*, 2007). Это важно, поскольку вероятность пропущенных повторов с несовпадениями увеличивается при продвижении окна поиска в интервалах, содержащих замены нуклеотидов (Bondy-Denomy *et al.* 2014). Поиск повторов в последовательности ДНК может быть выполнен с использованием любого быстрого алгоритма анализа, например алгоритма сравнения Бойера-Мура (Boyer, Moore, 1977), используемого в программе CRISPR RecognitionTool (Bland *et al.*, 2007).

Родоначальником программ для поиска CRISPR считается программа PatScan (Dsouza *et al.*, 1997) которая позволила обнаружить 101 предполагаемую CRISPR-кассету по соответствующему введенному образцу. Затем для облегчения прогнозирования и анализа был разработан ряд других инструментов с поддержкой командной строки и веб-приложений (Biswas *et al.*, 2016).

Проводимое сравнение (Bland *et al.*, 2007) производительности таких программ как CRT (версия 1.0), PILER-CR (версия 1.0) и Patscan позволила выделить разницу в результатах по поиску CRISPR у бактерий и непосредственного лидера – CRT у которого позже были обнаружены (Grissa *et al.*, 2007) недочеты: срабатывает на все повторы; один и тот же CRISPR локус иногда обнаруживается более одного раза с разными согласованными повторами. У PILER-CR также присутствовали недостатки, поскольку он часто неверно определял границы повтора и пропускал короткие фрагменты. Распространенной ошибкой считается обнаружение неполных CRISPR, либо ложных. Эти несоответствия возникают по причине того, что повторы в геномах не всегда относятся к CRISPR-системе. Между Patscan, CRT и Pilercr было выявлено в общей сложности 83 различных CRISPR. В связи с вышеизложенным, утверждается (Li *et al.*, 2021), что качество и точность обнаружения должно базироваться на результатах исследования разных алгоритмов.

Современные алгоритмы обнаружения применяемые, например, в программах CRISPRdigger (Ge *et al.*, 2016); CRISPRdb (Grissa *et al.*, 2006); CRF

(CRISPRFinderbyRandomForest) (Wang *et al.*, 2017); CRISPRdisco (Crawley *et al.*, 2018) преобразуют последовательности в виртуальное представление для более эффективного анализа – дерево суффиксов (Gusfield *et al.*, 1997). В данном методе последовательность ДНК преобразуется в древовидную структуру, исходная последовательность разделяется на суффиксы (фрагменты), которым присваиваются индексы. Используя дерево, алгоритм способен находить все структуры с одинаковыми индексами, например повторы в ДНК.

Другие программы, например CRISPRTarget (Biswas *et al.*, 2013), применяют метод, включающий вычисление матриц выравнивания из ряда последовательностей ДНК, составленная матрица используется для поиска повторяющихся областей в последовательности простым алгоритмом.

Обнаружение повторяющихся последовательностей, относящихся к CRISPR, важно, но большие размеры многих геномов усложняют этот процесс. Немаловажно, что обнаруженные повторы могут не всегда относиться к CRISPR-кассетам. В связи с этим для обнаружения молекулярных систем в геномах, рекомендуется (Abby *et al.* 2014) использовать программу под названием Macromolecular System Finder (MacSyFinder). Данная программа позволяет обнаружить непосредственно сами гены *cas*. Поиск компонентов систем осуществляется через профили белков, закодированных как скрытые модели Маркова (HMM), доступных в базах данных: PFAM (El-Gebali *et al.* 2019), TIGRFAM (Haft *et al.* 2003) или PRODOM (Servant *et al.* 2002). Белковые профили обеспечивают точный поиск в базах данных гомологичных последовательностей, обеспечивая повышенную специфичность. MacSyFinder используется для анализа геномных или метагеномных проектов. Сопутствующая программа MacSyView позволяет визуализировать результаты MacSyFinder в виде графиков и сводных таблиц. Недостатком программ офлайн по мнению разработчиков онлайн сервисов (Biswas *et al.* 2016; Couvin *et al.* 2018) является то, что гены постоянно мутируют и изменяются, а следовательно, и информация доступная в базах *cas*-генов на момент поиска может быть недостоверной. В связи с этим рекомендуются к использованию программы, доступные онлайн, такие как

CRISPRDetect (Biswas *et al.* 2016), CRISPRStudio (Dion *et al.* 2018), CRISPRCasFinder (Couvin *et al.* 2018). Программы доступные в режиме онлайн используют разные и в то же время заимствованные алгоритмы поиска с разной степенью усовершенствования. Например, Biswas *et al.* создали алгоритм поиска, представленный в программе CRISPRDetect, который использует библиотеку эталонных повторов (часть CRISPRBank) для автоматического сравнения с уже известными повторами. Предложенная программа CRISPRCasFinder и протестированная Couvin *et al.* в 2018 вбирает в себя несколько алгоритмов из разных программ, например, для идентификации массивов CRISPR использует CRISPRFinder версии 4.2, а для идентификации повторов CRISPR-Vmatch (<http://www.vmatch.de/>). Кроме того, чтобы помочь пользователю отличить ложные CRISPR-подобные элементы от настоящих CRISPR, CRISPRCasFinder идентифицирует и типизирует *cas*-гены на основе алгоритма, используемого в MacSyFinder.

Исследования, проводимые для анализа производительности той или иной программы подтверждают тот факт, что ни один из пакетов программного обеспечения на данный момент времени, не появился и вряд ли появится в качестве лидера по причине частых рекомбинаций и изменчивости CRISPR (Heigwer *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020).

Возвращаясь к медицинским аспектам рассматриваемого вопроса, отметим, что главное значение в лечении и профилактике инфекционных заболеваний принадлежит химиотерапии и химиопрофилактике, эффективность которых в значительной степени зависит от чувствительности микроорганизма к антимикробным препаратам. Применение современных методов биоинформатики является необходимым на фоне появления вирулентных и устойчивым к разным типам антибиотиков штаммов *S. aureus*. Решение сложных и временами нерешаемых проблем терапии стафилококковых инфекций подразумевает применение современных методов анализа генома возбудителя и оценки его CRISPR-системы. Поскольку штаммы *S. aureus* содержат в основном один сайт CRISPR, скрининг спейсеров с помощью биоинформационных методов

позволяет определить степень устойчивости бактерий к специфичным фагам и плазмидам в каждом штамме золотистого стафилококка. По причине отсутствия детальной информации о работе CRISPR-Cas системы у *S. aureus* первостепенной задачей является поиск новых подходов борьбы с возбудителем с привлечением современных методов биоинформатики. Биоинформационные программные алгоритмы поиска и анализа позволяют получать новую фундаментальную информацию как о структуре CRISPR-систем, так и смоделировать их взаимоотношения с фаговыми и плазмидными комплексами. Такой подход в перспективе позволит создать платформу, направленную на предотвращение распространения устойчивых генов между штаммами *S. aureus*, а также устранения генов устойчивости к лекарственным препаратам в штаммах, либо разработки технологии таргетной фаговой терапии.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Материалы

Бактерии. В работе использовано 398 полногеномных последовательностей ДНК *S. aureus* из базы данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и 100 штамма *S. aureus*, выделенных из различных биотопов (кишечник, зев, нос, эякулят) больных, обратившихся за медицинской помощью в лечебные учреждения г. Иркутска в 2015 – 2016 гг.

Антибактериальные препараты. С целью определения чувствительности штаммов к антибиотикам в работе использовались диски, пропитанные антибиотиками (производство ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера):

Бензилпенициллин – 10 мкг;

Оксациллин – 1 мкг;

Гентамицин – 10 мкг;

Эритромицин – 15 мкг;

Ципрофлоксацин – 5 мкг;

Клиндамицин – 2 мкг;

Офлоксацин – 5 мкг;

Ванкомицин – 30 мкг.

Препараты бактериофагов. У выделенных штаммов золотистого стафилококка определяли чувствительность к фаговым препаратам:

1) Пиобактериофаг поливалентный очищенный. Производитель: ФГУП «НПО» Микроген», Россия (г. Уфа);

2) Пиобактериофаг комплексный. Производитель: ФГУП «НПО» Микроген», Россия (г. Нижний Новгород);

3) Бактериофаг стафилококковый. Производитель: ФГУП «НПО» Микроген», Россия (г. Нижний Новгород);

4) Интести-бактериофаг. Производитель: ФГУП «НПО» Микроген», Россия (г. Нижний Новгород).

Праймеры. Используемые в работе олигонуклеотидные праймеры синтезировали в компании ООО «Биосинтез» г. Новосибирск. Представленные в таблице 2 праймеры для ПЦР были наработаны и отобраны из 27 пар праймеров на основе проведенного нами анализа фланкирующих последовательностей CRISPR-кассет, обнаруженных в геномах *S. aureus* из базы GenBank, методами биоинформатики при помощи программы *PrimerBlast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Таблица 2.

Нуклеотидные последовательности, использованные в качестве фланкирующих праймеров CRISPR-кассет

Название пар праймеров	Структура праймера (5'→3')
Primer pair 1	F- AATCGGGTTGTTCAAGACCT R- GTTGCGTTAATGGAGAGTGCT
Primer pair 2	F- TGTCACAGTTTTTGACAGCCA R- СТАТТАССГТТСТСГТСССС
Primer pair 3	F- AATCGGGTTGTTCAAGACCT R- GTTGCGTTAATGGAGAGTGCT
Primer pair 4	F- TTTAGGAAGTATTTTACATG R- ССAGAAAАТТССАССААСТТСА
Primer pair 5	F- САССТААСТСАСТАТСААТ R- ССАТССССТАААААТААТС

Локализация праймеров и полученных фрагментов CRISPR-кассет показана на рисунке 1.

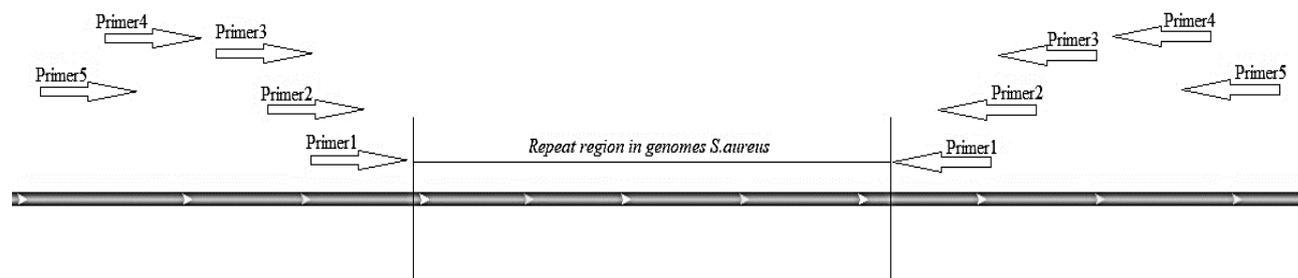


Рисунок 1. Стратегия получения фрагментов CRISPR-кассет золотистого стафилококка. Направление и расположение праймеров обозначены стрелками, а получаемые анализируемые участки – горизонтальными линиями.

Для детекции в геномах CRISPR-системы, были синтезированы праймеры на основные cas-генов в геномах *S. aureus*; данные праймеры представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Нуклеотидные последовательности, использованные в качестве праймеров cas-генов *S. aureus*

Название праймеров	Структура праймера (5'->3')
<i>Cas1</i>	F - АСТСАТТТСГААТССАТГТАААГС R – АААСГТГГАСГГАТАСААТГА F- АГСАСТСТССАТТААСГСААС R- ТТСТТГСАГССТГТГСТТСТ
<i>Cas2</i>	F - СГАГАГГАТГТСАГСАТГТ R – ТСГСАСААСААССТТААССТСТ F- АСГАГАГГАТГТСАГСАТ R- ТСГСАСААСААССТТААССТС
<i>Cas 6</i>	F – АГГААГТАТТТТАСАТГГАТГТ R – ААССТГААААТТСГССАААС

	F – AGATAGCCGAGCTATTCACCTTCT R – TCGATTCAATTCCTCTGTTTCTAAG
--	---

Секвенирование фрагментов CRISPR-кассет осуществляли на базе Государственного Бюджетного Учреждения Здравоохранения "Иркутский областной онкологический диспансер" по методу Сенгера на капиллярном секвенаторе Applied Biosystems 3500.

3.2. Микробиологические методы

Культуральный метод. Выделение и идентификация *S. aureus*

Выделение и идентификация *S. aureus* проводились в соответствии с Приказом Минздрава СССР от 22.04.1985 № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», с использованием метода посева биологического материала по Голду.

Для исследования были использованы питательные среды, представленные в таблице 4.

Таблица 4.

Список питательных сред, использованных для выделения и идентификации *S. aureus*

Питательная среда	Состав	Производитель
ЖСА	Пептон сухой ферментативный, панкреатический гидролизат казеина, панкреатический гидролизат рыбной муки, дрожжевой экстракт, натрий хлористый, натрий фосфорнокислый 2-зам, натрий	ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Россия (г. Оболенск).

	углекислый, агар, эмульсия яичного желтка.	
Эндо	Панкретаический гидролизат рыбной муки, дрожжевой экстракт, натрия хлорид, Д-(+)-лактоза, натрия сульфат безводный, натрия фосфат 2-зам. 12-водный, фуксин основной, агар.	ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Россия (г. Оболенск).
Плоскирева	Панкреатический гидролизат рыбной муки с тиосульфатом и цитратом натрия, дрожжевой экстракт, натрий фосфорнокислый двузамещенный, лактоза, желчь очищенная сухая, натрий хлористый, йод, нейтральный красный, бриллиантовый зеленый, агар.	ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Россия (г. Оболенск).
Кровяной агар	Пептон сухой ферментативный, гидролизат казеина ферментативный, экстракт кормовых дрожжей, натрий фосфорнокислый двузамещенный, натрия хлорид, агар, цельная кровь.	ОАО «Биомед» им. И. И. Мечникова, Россия (с. Петрово-Дальнее).
Лактобактагар	Панкреатический гидролизат рыбной муки с твином сухой, дрожжевой экстракт, экстракт мясной или пептон сухой ферментативный, Д-глюкоза,	ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Россия (г.

	калий фосфорнокислый однозамещенный, натрий уксуснокислый 3-водный, аммоний лимоннокислый однозамещенный, магний сернокислый 7-водный, марганец хлористый 4-водный, агар.	Оболенск).
Энтерококкагар	Панкреатический гидролизат рыбной муки с твином сухой, дрожжевой экстракт, глюкоза, калий фосфорнокислый однозамещенный, натрий углекислый, натрия азид, 2,3,5- трифенилтетразолий хлорид, кристаллический фиолетовый, агар.	ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Россия (г. Оболенск).
Сабуро	Панкреатический гидролизат рыбной муки, панкреатический гидролизат казеина, дрожжевой экстракт, натрий фосфат однозамещенный, Д-глюкоза, агар.	ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Россия (г. Оболенск).
Бифидумагар	Панкреатический гидролизат казеина, дрожжевой экстракт, глюкоза, лактоза, цистеин, натрий хлористый, магний сернокислый, кислота аскорбиновая, натрий уксуснокислый, агар.	ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Россия (г. Оболенск).
Вильсона –	ГМФ-основа, натрия хлорид,	Научно-

Блера	натрий серноокислый, железа сульфат семиводный, глюкоза, мальтоза, агар.	исследовательский центр Фармакотерапии, Россия (г. Санкт-Петербург).
Магниевая	Пептон, хлорид магния гексагидрат, хлорид натрия, гидрофосфат калия однозамещенный, дигидрофосфат калия двузамещенный, малахитовый зеленый.	Биотехновация, Россия (г. Москва).
Мюллера – Хинтон	Вытяжка из говядины, кислотный гидролизат казеина, крахмал, агар.	HiMedia Laboratories Pvt. Lbd., India.

Определение чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом (ДДМ)

Определение чувствительности к антибиотикам проводили в соответствии с МУК 4.2.1890-04. ДДМ определения чувствительности основан на способности антибиотиков диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара Мюллера-Хинтон.

При определении чувствительности ДДМ используют стандартный инокулюм, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащий примерно $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Для приготовления инокулюма используют чистую суточную культуру микроорганизмов, выросших на плотных питательных средах. Отбирают несколько однотипных, четко изолированных колоний, выросших на неселективных плотных питательных средах. Петлей переносят незначительное количество материала с вершечек колоний в пробирку со стерильным физиологическим раствором, доводя плотность инокулюма точно до 0,5 по стандарту МакФарланда. Инокулюм следует использовать в течение 15 мин после приготовления. Стандартный инокулюм наносят пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 1 мл, после чего

равномерно распределяют по поверхности с помощью стерильного ватного тампона. Не позднее чем через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды наносят диски с антибиотиками с помощью стерильного пинцета и плотно прижимают к поверхности агара. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 15–20 мм. Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара.

Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри помещают в термостат кверху дном и инкубируют при температуре 35 °С в течение 18–24 ч. После окончания инкубации производят учет результатов с помощью специальной линейки. При измерении зон задержки роста следует ориентироваться на зону полного подавления видимого роста (Таблица 5). Не следует обращать внимания на очень мелкие колонии, выявляемые в пределах зоны задержки роста только при особых условиях освещения или увеличении, и едва заметный налет у края зоны.

Таблица 5.

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности штаммов к антибиотикам

Антибиотик	Содержание в диске (мкг)	Диаметр зон подавления роста (мм)		
		Р	П	Ч
Бензилпенициллин	10	≤ 28	–	≥ 29
Оксациллин	1	≤ 10	11 – 12	≥ 13
Гентамицин	10	≤ 12	13 – 14	≥ 15
Эритромицин	15	≤ 13	14 – 22	≥ 23
Клиндамицин	2	≤ 14	15 – 20	≥ 21
Ципрофлоксацин	5	≤ 15	16 – 20	≥ 21
Офлоксацин	5	≤ 12	13 – 15	≥ 16
Ванкомицин	30	–	–	≥ 15

Примечание: Р- резистентные; П- с промежуточной- резистентностью; Ч- чувствительные

Определение чувствительности *S. aureus* к фагам

Определение чувствительности к фагам проводилось в соответствии с МУК 4.2.1890-04. Готовый стандартный инокулум в количестве 1 мл наносился пипеткой на поверхность среды Мюллера-Хинтон, после чего равномерно распределялся по поверхности среды с помощью стерильного ватного тампона. Поверхность агара подсушивали, после чего с помощью дозатора наносили по 20 мкл каждого из исследуемых фагов на поверхность агара. Чашки Петри, не переворачивая, помещали в термостат и инкубировали при температуре 35°C в течение 18–24 ч. Учет результатов производился по наличию зон лизиса на поверхности агара.

3.3. Молекулярно-генетические методы исследования

Молекулярно-генетические исследования проводили на базе НИИ Биомедицинских технологий Иркутского государственного медицинского университета. Материалом для исследования служили выделенные и идентифицированные штаммы *Staphylococcus aureus*.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для определения принадлежности выделенных бактерий к виду *Staphylococcus aureus* использовали набор реагентов «АмплиСенс □ MRSA-скрин-титр-FL», предназначенный для выявления ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *S. aureus*, в биологическом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

ПЦР-исследование включало следующие этапы:

- Экстракция ДНК из исследуемых образцов,
- Амплификация с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».
- Анализ и интерпретация результатов.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов.

Для экстракции ДНК использовали комплект реагентов «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия), рекомендованный ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии

Роспотребнадзора, в соответствии с инструкцией. Выделение ДНК проводили в присутствии внутреннего контрольного образца – ВКО STI-87, что позволило контролировать процедуру анализа каждого образца.

Пробирки, содержащие транспортную среду и штаммы *S. aureus*, тщательно перемешивали, а затем коротко осаждали на вортексе (FVL-2400N “BioSan”, Латвия). В пробирки, объемом 1,5 мл, вносили по 20 мкл ВКО и по 100 мкл исследуемых образцов в соответствии с маркировкой. К исследуемым пробам добавляли 300 мкл раствора для лизиса, тщательно перемешивали и прогревали в термостате («ТЕРМО-48», Россия) в течение 5 мин при 65 °С. К смеси добавляли по 400 мкл раствора для преципитации, перемешивали и центрифугировали на микроцентрифуге («MINISPIN», Германия) в течение 5 мин при 12 тыс об/мин. Аккуратно отбирали надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель («ОМ-01», Россия) и отдельные наконечники для каждой пробы. Промывали осадок трижды отмывочными растворами. Затем отбирали надосадочную жидкость и полученный осадок подсушивали при 65°С в течение 5 минут. К высушенному осадку добавляли по 50 мкл РНК-буфера, прогревали при температуре 65°С в течение 5 мин. интенсивно перемешивая. Затем центрифугировали пробирки при 12 тыс. об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Выделенную ДНК хранили при -70°С до использования.

Проведение амплификации с детекцией в режиме «реального времени».

Выделенную ДНК непосредственно использовали для постановки ПЦР с детекцией в реальном времени на амплификаторе Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия). Выявление ДНК основано на амплификации участка ДНК микроорганизма при помощи смеси олигонуклеотидных зондов, меченных флуоресцентными красителями, и специфичных к данному участку ДНК праймеров. Для амплификации использовали комплект реагентов «MRSA-скрин-титр-FL» (АмплиСенс, Россия). Приготовление реакционных смесей проводили согласно инструкции к набору реагентов. Реакция ПЦР-РВ проводилась в объеме 25 мкл. Для амплификации готовили две реакционные смеси: №1 - ПЦР-смесь-2-

FRT и полимеразы (TaqF), 600мкл и 60мкл соответственно; №2 - ПЦР-смесь-1-FRT MRSA и смесь №3 из расчета на каждую постановку: 10 мкл ПЦР-смеси-1-FRT MRSA, 5 мкл смеси №2. В каждую пробирку вносили по 15 мкл подготовленной реакционной смеси и добавляли по 10 мкл проб ДНК.

Программа амплификации включала этапы: удерживание температуры - 95°C 15 мин, циклирование 1 - 95°C 15 с, 60°C – 30 с, 72°C – 15 с – число циклов – 5; циклирование 2 - 95°C 15 с, 55°C 30 с, 72°C – 15 с – число циклов – 40.

Анализ и интерпретация результатов

Результаты интерпретировались на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяло наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК. Анализировали кривые накопления флуоресцентного сигнала по трем каналам:

- по каналу для FAM регистрировался сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК *S. aureus*;
- по каналу для Yellow регистрировался сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК гена *mecA*, расположенного на хромосоме *S. aureus* и ряда других стафилококков, в специфической области, обнаруживаемой только у метициллин-резистентных штаммов;
- по каналу для ROX регистрировался сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации ДНК ВКО (STI-87);
- ДНК метициллин-чувствительного *S. aureus* считали обнаруженной, если для данной пробы по каналам для FAM было определено значение порогового цикла C_t , а по каналу для Yellow не определено (отсутствовало);
- ДНК метициллин-резистентного коагулазонегативного *Staphylococcus spp.* считали обнаруженной, если для данной пробы по каналам для Yellow определено значение порогового цикла C_t (общее обозначение характеристической точки кривой флуоресценции), а по каналу для FAM не определено (отсутствовало),

- ДНК метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* считали обнаруженной, если для данной пробы по каналам для FAM и Yellow определялось значение порогового цикла Ct.

Результат считался достоверным, если были получены правильные результаты для отрицательного контроля амплификации и положительного и отрицательного контролей экстракции ДНК, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций, данных в инструкции.

Пример теста на определение ДНК *S. aureus* представлен на рис. 2, 3, 4.

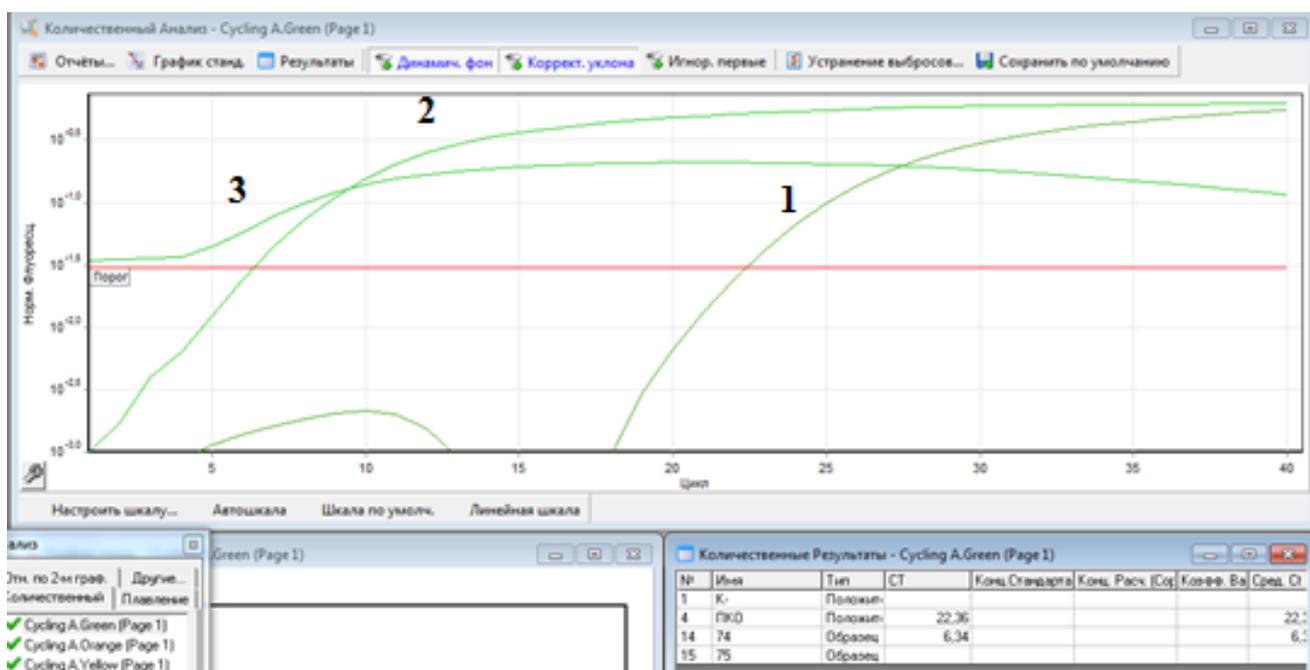


Рисунок 2. Анализ образцов на определение ДНК *S. aureus* по каналу Green (FAM) (амплификатор Rotor-Gene Q) (ПКО -1 (положительный контрольный образец), ДНК *S. aureus* - 2, отсутствие ДНК *S. aureus* -3)

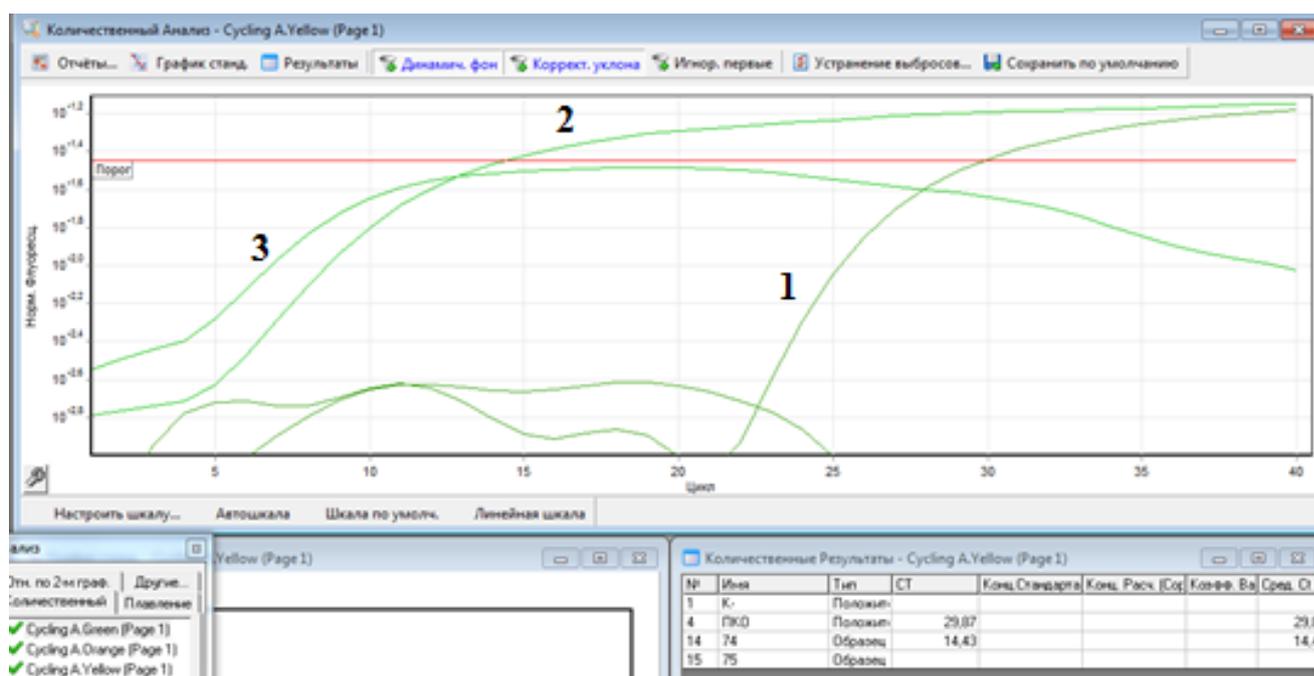


Рисунок 3. Анализ образцов на определение ДНК метициллин-резистентного коагулазонегативного *Staphylococcus spp.* по каналу Yellow (амплификатор Rotor-Gene Q) (ПКО – 1, метициллин-резистентный коагулазонегативный *S. aureus* - 2, отсутствие ДНК метициллин-резистентного коагулазонегативного *Staphylococcus spp.* - 3)

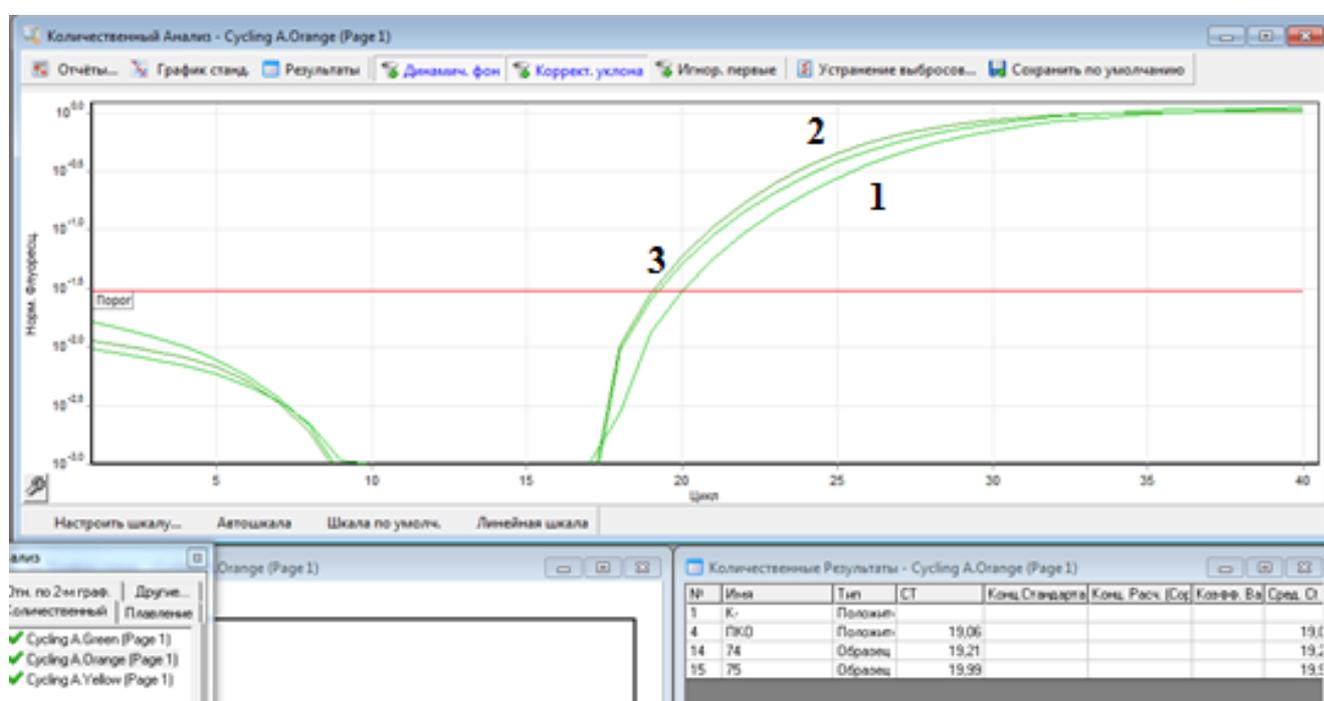


Рисунок 4. Анализ образцов на определение ДНК ВКО (внутренний контрольный образец STI-87) по каналу ROX (амплификатор Rotor-Gene Q).

Электрофорез продуктов амплификации ДНК. Результат ПЦР-реакций с наработанными праймерами для получения фрагментов CRISPR-кассет и детекции *cas*-генов подтверждали стандартным методом электрофореза в агарозном геле [10].

3.3. Биоинформационные методы поиска и анализа CRISPR/Cas-систем

Поиск генов CRISPR-систем, повторяющихся последовательностей и спейсеров в расшифрованных геномных последовательностях *S. aureus* осуществляли при помощи ряда биоинформационных программ. Отбор нужных софтов проводили на основании доступности программного компонента и достоверности получаемых результатов. В итоге был сформирован программный алгоритм поиска и анализа CRISPR, состоящий из ряда программ. Для поиска *cas*-генов, определения их функциональных и структурных характеристик использовали два программных моделирования: Macromolecular System Finder (MacSyF, ver. 1.0.2), с вспомогательными пакетами makeblastDB (ver. 3.0) и HMMER (ver. 2.2.28), и онлайн доступные софты CRISPRCasFinder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>); CRISPROne (<https://omics.informatics.indiana.edu/CRISPRone/>). Схема идентификации CRISPR-генов, основанная на обнаружении консенсусного варианта *cas*-генов в геномах золотистого стафилококка, представлена на рисунке 5.

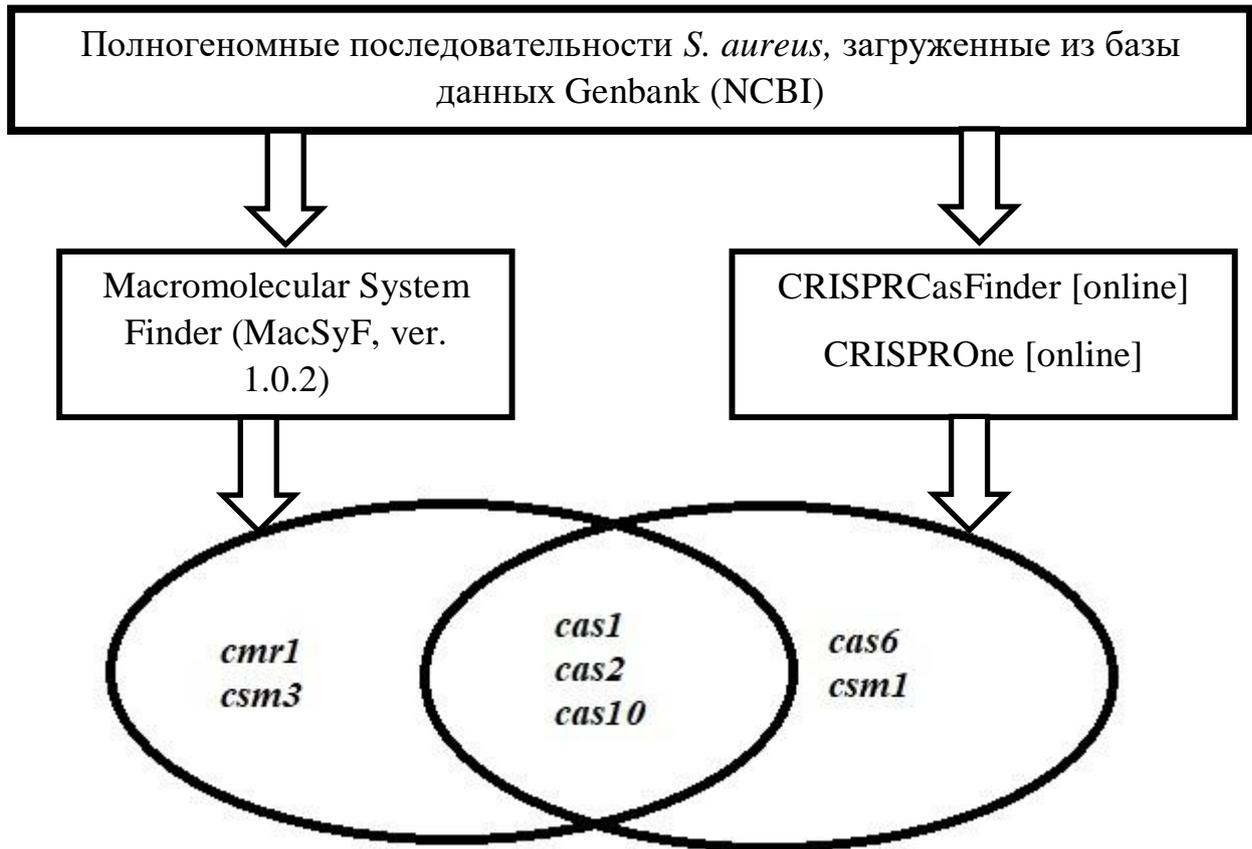


Рисунок 5. Обнаружение консенсусного варианта *cas*-генов в геномах *S. aureus*.

Обнаружение повторяющихся последовательностей (CRISPR-кассет) осуществляли при помощи ряда программ: *CRISPR RT* (<http://www.room220.com/crt/>); *CRISPI: CRISPR-interactive database* (<http://crispi.genouest.org/>); *CRISPRsFinder* (<http://crispr.u-psud.fr/>); *CRISPRDetect: A flexible algorithm to define CRISPR arrays* (http://brownlabtools.otago.ac.nz/CRISPRDetect/predict_crispr_array.html), онлайн доступный софт *CRISPRCasFinder* (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>). Результаты обнаружения считались достоверными только при совпадении повторов и спейсеров в ряде программ. Для детекции бактериофагов и плазмид в обнаруженных спейсерных участках посредством биоинформационных алгоритмов BLASTn по молекулярным базам Gen_Bank-Phage использовали программы *CRISPRTarget* (<http://>

bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html)

и

MycobacteriophageDatabase (<http://phagesdb.org/blast/>) (рис. 6).

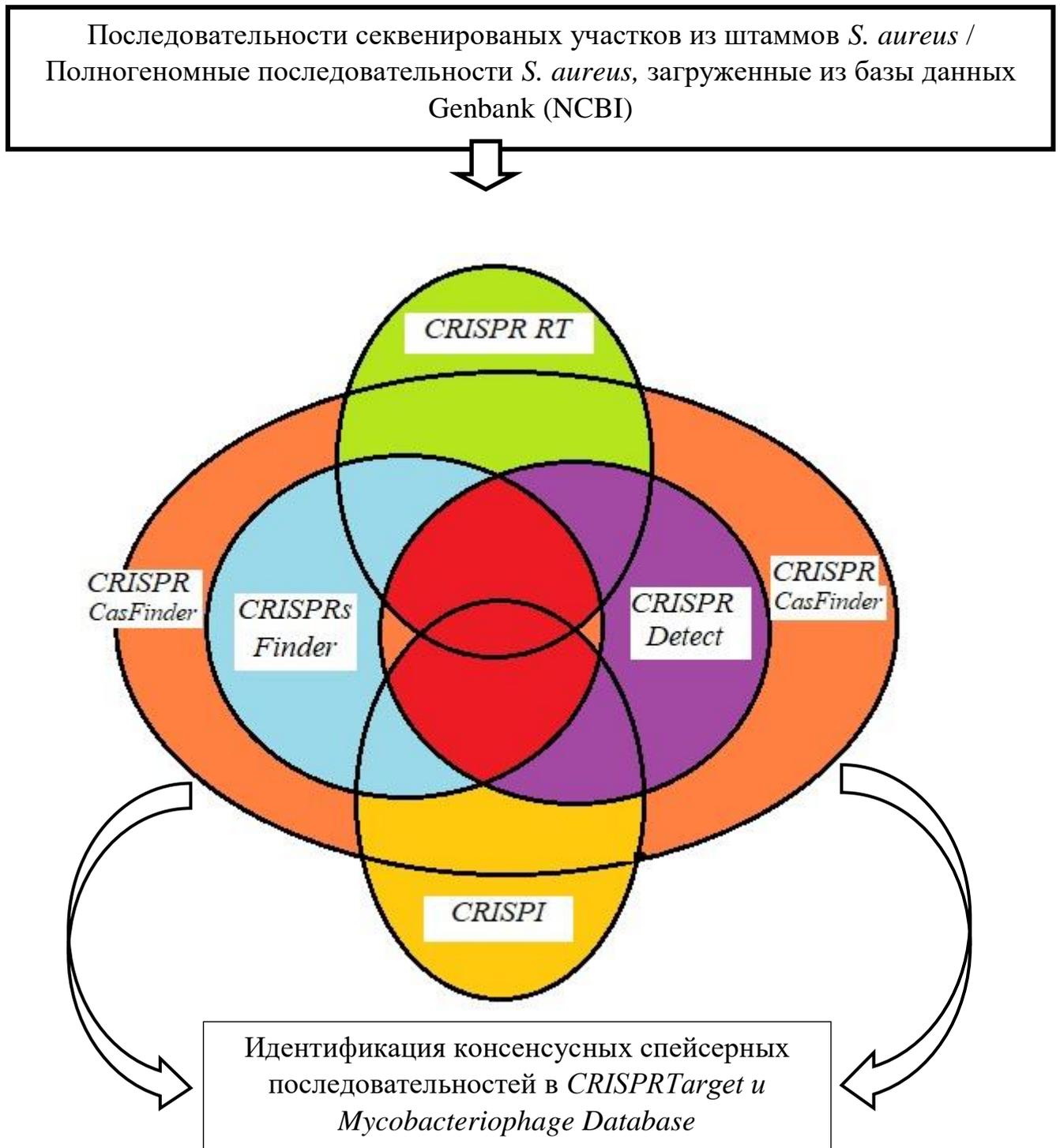


Рисунок 6. Идентификация повторяющихся и спейсерных последовательностей при помощи биоинформационных программ. Красным выделена область результатов совпадений программных компонентов.

Анализ секвенированных фрагментов CRISPR-кассет осуществляли при помощи программ BioEdit v7.0.4, Applied Biosystems Sequencing Analysis Software v5.3.1, Genius prime 2019, версия 2.1. Статистическую обработку и анализ математических данных производили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel, версия 7.0, STATISTICA, версия 7.0. Вычисляли средние арифметические значения, ошибки средних величин и доверительные интервалы. Достоверность различий между статистическими параметрами определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Корреляционный анализ с целью изучения связи между чувствительностью/устойчивостью к антибиотикам и бактериофагам проведен с применением коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

ГЛАВА 4. ХАРАКТЕРИСТИКА УСТОЙЧИВОСТИ ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* К ДЕЙСТВИЮ АНТИБИОТИКОВ И БАКТЕРИОФАГОВ

За 2015–2016 гг. у 450 больных, обратившихся за медицинской помощью в различные лечебные учреждения г. Иркутска, было выделено из различных биотопов (кишечник, зев, нос, эякулят) и накоплено 106 штаммов *S. aureus*. Выделение и идентификацию *S. aureus* проводили в соответствии с Приказом Минздрава СССР от 22.04.1985 № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», с использованием метода посева биологического материала по Голду. Определение принадлежности выделенных бактерий к виду *Staphylococcus aureus* осуществляли набором реагентов «АмплиСенс MRSA-скрин-титр-FL», предназначенным для выявления ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *S. aureus* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно- флуоресцентной детекцией. Результаты определения принадлежности к виду *S. aureus* представлены в таблице 6.

Таблица 6.

Результаты полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией ДНК *S. aureus*, метициллин-чувствительных и метициллин-резистентных штаммов

Количество исследованных штаммов	Установлен метициллин-чувствительный <i>S. aureus</i>
100	81

4.1. Изучение чувствительности культур *S. aureus* к антибиотикам

Проведенная ранее амплификация участков ДНК бактерии при помощи ПЦР с применением специфичных праймеров на выявление MRSA-штаммов

позволила установить, что из 104 исследуемых образцов ДНК 85 относились к метициллин-чувствительным *S. aureus*, 19 - к метициллин-резистентным штаммам *S. aureus*.

Дальнейшее исследование чувствительности штаммов *S. aureus* к подобранному ряду антибиотиков диско-диффузионным методом позволило выявить как устойчивые, так и неустойчивые штаммы. Результаты чувствительности представлены в таблице 7.

Таблица 7.

Результаты изучения антибиотикорезистентности *S. aureus*

№	Антибиотики							
	окс	ван	пен	ген	эри	Цип	кл	офл
1	S = 16	S=17	R=25	S=16	S=23	S=24	S=21	S=19
2	S = 16	S=18	R=20	S=17	S=26	S=30	S=29	S=27
3	R = 10	R=10	R=24	S=20	R=1	S=21	S=29	S=27
4	S = 20	R=3	S=32	S=21	S=29	S=28	S=24	S=20
5	R = 9	S=20	S=35	S=16	R=8	S=22	S=25	S=30
6	S = 15	R=6	R=27	S=17	S=27	S=27	S=22	S=26
7	S = 22	S=16	R=20	S=15	S=29	S=32	S=27	R=1
8	S = 15	S=20	S=30	S=20	S=31	S=28	S=31	S=30
9	S=26	S=15	S=31	S=22	S=32	S=27	S=21	S=19
10	S = 21	S=17	R=25	S=21	S=25	S=21	S=26	S=30
11	R = 10	S=22	R=26	S=19	R=10	S=24	S=30	S=26
12	S = 14	S=23	R=27	S=17	R=2	S=28	S=21	S=30
13	S = 14	S=16	R=20	S=15	S=24	S=26	S=29	S=30
14	R = 8	S=18	R=15	R=8	S=25	S=22	R=3	S=23
15	S = 15	S=17	R=21	S=16	S=23	S=23	S=33	S=18
16	R = 8	R=4	R=23	S=20	R=4	S=27	R=10	S=27
17	S=20	S=16	S=29	S=21	S=28	S=24	S=27	S=26
18	S=19	S=15	S=30	S=18	S=26	S=29	S=31	S=19

19	S=15	S=15	R=14	S=17	S=25	S=32	S=26	S=29
20	S=16	S=17	S=32	S=20	S=26	S=29	S=21	S=26
21	R=10	S=20	R=20	S=21	S=32	R=5	S=21	S=22
22	S=16	S=19	S=34	S=16	S=23	S=30	S=29	S=19
23	R=8	S=18	R=10	S=15	S=23	S=28	S=21	S=25
24	R=5	S=18	R=17	S=17	S=31	S=25	S=22	S=24
25	S=15	S=20	S=30	S=16	S=25	S=27	S=31	S=28
26	S=21	S=22	R=17	S=21	S=25	S=28	S=28	S=30
27	R=3	S=15	R=20	S=19	S=29	S=25	S=28	S=24
28	S=16	S=16	R=25	S=18	S=30	S=22	S=28	S=27
29	R=5	S=18	R=9	S=22	S=24	S=30	S=29	S=25
30	R=9	S=19	R=15	S=20	R=12	R=2	S=30	R=5
31	S=15	S=20	S=30	S=16	S=29	S=25	S=32	S=20
32	S=17	S=21	S=35	S=18	R=2	S=28	S=26	S=29
33	S=19	S=19	S=31	S=19	S=32	S=23	S=26	S=18
34	S=21	S=20	R=16	S=20	R=1	S=29	S=32	S=21
35	S=16	S=17	S=31	S=21	S=28	S=28	S=22	S=27
36	S=15	S=19	S=32	S=20	S=27	S=23	S=26	S=27
37	S=14	S=18	S=30	S=15	S=29	S=31	S=27	S=21
38	S=21	S=15	S=35	S=16	S=31	S=31	S=27	S=19
39	S=22	S=16	S=34	S=18	S=29	S=31	S=23	S=24
40	S=16	S=20	S=29	S=19	S=26	S=26	S=27	S=20
41	S=19	S=21	S=30	S=21	S=31	S=32	S=24	S=18
42	S=23	S=22	S=36	S=23	S=32	S=24	S=26	S=27
43	S=13	S=20	S=35	S=18	S=30	S=30	S=32	S=32
44	S=14	S=15	S=30	S=15	S=25	S=30	S=28	S=31
45	S=16	S=16	S=29	S=18	S=23	S=29	S=29	S=17
46	S=14	S=23	S=29	S=16	S=26	S=26	S=28	S=25
47	S=20	S=17	S=31	S=21	S=27	S=29	S=21	S=19

48	S=29	S=18	S=34	S=15	S=24	S=28	S=28	S=24
49	S=15	S=20	R=14	S=17	S=23	S=30	S=31	S=28
50	S=24	S=22	S=31	S=21	S=23	S=25	S=26	S=31
51	S=16	S=15	S=32	S=23	S=26	S=23	S=32	S=25
52	R=8	S=19	R=10	S=16	S=29	S=21	S=30	S=30
53	S=18	S=16	S=34	S=18	S=26	S=31	S=26	S=23
54	S=17	S=17	S=29	S=20	S=28	S=27	S=21	S=32
55	S=20	S=16	S=30	S=20	S=27	S=29	S=22	S=19
56	S=21	S=21	S=36	S=24	S=31	S=31	S=23	S=30
57	S=14	S=23	S=34	S=18	S=23	S=24	S=26	S=23
58	S=15	S=19	S=29	S=24	S=26	S=31	S=29	S=25
59	S=15	S=18	S=31	S=21	S=30	S=31	S=29	S=26
60	S=14	S=15	R=10	S=21	S=30	S=21	S=25	S=17
61	S=16	S=16	S=30	S=17	S=32	S=23	S=26	S=18
62	S=19	S=17	R=11	S=17	S=24	S=28	S=31	S=32
63	S=15	S=20	S=30	S=25	S=24	S=26	S=25	S=29
64	S=14	S=23	S=30	S=15	S=31	S=31	S=24	S=21
65	S=17	S=15	S=35	S=21	S=30	S=30	S=30	S=23
66	S=13	S=16	S=36	S=18	S=30	S=27	S=27	S=17
67	S=20	S=18	S=34	S=16	S=27	S=23	S=25	S=19
68	S=19	S=20	R=16	S=16	R=8	R=8	S=21	S=31
69	S=18	S=21	R=3	S=25	S=23	S=32	S=24	S=32
70	S=16	S=20	R=5	S=22	S=23	S=31	S=30	S=21
71	S=15	S=16	S=29	S=30	S=25	S=21	S=28	S=18
72	S=17	S=15	S=29	S=24	R=1	S=32	S=24	S=31
73	S=16	S=18	S=30	S=16	S=23	S=22	S=25	S=24
74	S=20	S=17	S=31	S=22	S=26	S=30	S=25	S=25
75	S=19	S=20	S=35	S=20	S=27	S=32	S=32	S=20
76	S=16	S=15	S=30	S=21	S=29	S=24	S=23	S=29

77	S=18	S=18	S=30	S=23	S=26	S=28	S=24	S=21
78	S=16	S=15	S=29	S=25	S=30	S=24	S=23	S=31
79	S=15	S=20	S=32	S=18	S=23	S=31	S=25	S=27
80	S=17	S=21	S=34	S=15	R=10	S=29	S=21	S=21
81	S=16	S=20	S=33	S=25	S=30	S=31	S=23	S=22
82	S=14	S=16	R=3	S=20	S=28	S=31	S=32	S=25
83	S=18	S=16	S=29	S=19	R=3	S=26	S=21	S=30
84	S=16	S=18	S=31	S=19	S=25	S=26	S=32	S=27
85	S=20	S=15	R=10	S=24	S=26	S=32	S=29	S=22
86	S=22	S=16	S=31	S=19	R=5	S=27	S=31	S=21
87	S=23	S=20	R=5	S=24	S=26	S=28	S=23	S=32
88	S=19	S=16	S=30	S=16	S=26	S=23	S=29	S=28
89	S=16	S=18	S=31	S=22	S=25	S=29	S=25	S=18
90	S=15	S=18	S=32	S=18	S=28	S=23	S=32	S=27
91	S=14	S=19	S=30	S=17	S=23	S=27	S=30	S=22
92	S=15	S=21	R=5	S=22	S=27	S=23	S=27	S=20
93	S=19	S=16	S=31	S=21	S=32	S=24	S=32	S=29
94	S=17	S=17	S=30	S=19	S=23	S=25	S=21	S=26
95	S=21	S=20	S=32	S=18	S=31	S=25	S=21	S=27
96	S=23	S=16	S=35	S=15	S=23	S=21	S=22	S=32
97	S=21	S=18	S=36	S=15	S=23	S=24	S=31	S=19
98	S=19	S=19	S=30	S=22	S=26	S=24	S=29	S=32
99	S=15	S=21	S=32	S=19	S=23	S=28	S=21	S=26
100	S=14	S=16	S=31	S=24	S=25	S=26	S=31	S=28
101	S=13	S=19	S=29	S=22	S=30	S=28	S=30	S=20
102	S=15	S=15	S=30	S=17	R=1	S=23	S=32	S=32
103	S=17	S=18	R=4	S=33	R=8	S=30	S=25	S=27
104	S=18	S=20	S=30	S=22	R=3	S=29	S=32	S=19
105	S=15	S=17	S=36	S=15	S=30	S=31	S=26	S=17

106	R=2	S=15	S=29	S=29	S=30	S=29	S=22	S=30
S	93	102	72	105	90	103	104	104
R	13	4	34	1	16	3	2	2

Примечание: *S* (*susceptible*) - чувствительные микроорганизмы; *R* (*resistant*) - резистентные микроорганизмы; *I* (*intermediate*) - микроорганизмы с промежуточной резистентностью; Антибиотики: окс- оксациллин, ван- ванкомицин, пен- бензилпенициллин ген- гентамицин, эри- эритромицин, цип- ципрофлоксацин, кл-клиндамицин, офл- офлоксацин

При учете зон задержки роста были определены следующие усредненные показатели и рассчитаны их доверительные интервалы (Табл. 8).

Таблица 8.

Характеристика зон роста / подавления роста исследованных штаммов *S. aureus*

Антибиотик	Диаметр зоны роста/подавления роста, мм	
	R	S
Бензилпенициллин	32,1 ± 4,5	67,9 ± 4,5
Эритромицин	15 ± 3,5	85 ± 3,5
Оксациллин	12,3 ± 3,2	87,7 ± 3,2
Ванкомицин	3,8 ± 1,9	96,2 ± 1,9
Ципрофлоксацин	2,8 ± 1,6	97,2 ± 1,6
Клиндамицин	1,9 ± 1,3	98,1 ± 1,3
Офлоксацин	1,9 ± 1,3	98,1 ± 1,3
Гентамицин	0,9 ± 0,9	99,1 ± 0,9

Исследование антибиотикорезистентности позволило выявить высокий удельный вес резистентных культур для исследуемых антибиотиков. Результаты исследования показали, что к антибиотикам группы пенициллинов – бензилпенициллину и его полусинтетическому аналогу оксациллину, резистентность *S. aureus* составила 32,1±4,5% и 12,3 ± 3,2% соответственно. Чуть

выше оказалась резистентность к представителю первого поколения ряда макролидов - эритромицину, которая составила $15 \pm 3,5\%$. Анализ резистентности штаммов к препарату группы гликопептидов – ванкомицину показал, что устойчивыми оказались $3,8 \pm 1,9\%$ исследованных изолятов. К препаратам фторхинолонов второго поколения отмечается столь же высокий уровень чувствительности: для ципрофлоксацина резистентность оказалась равна $2,8 \pm 1,6\%$, а для офлоксацина – $1,9 \pm 1,3\%$. Точно такой же уровень резистентности показал анализ и для линкозамидов, а именно клиндамицина – $1,9 \pm 1,3\%$. Наименьший уровень резистентности наблюдался для представителя группы аминогликозидов гентамицина, к которому оказались нечувствительны лишь $0,9 \pm 0,9\%$ исследованных штаммов, что дает возможность рекомендовать данный антибиотик для терапии заболеваний, вызванных *S. aureus* (Рис. 7).

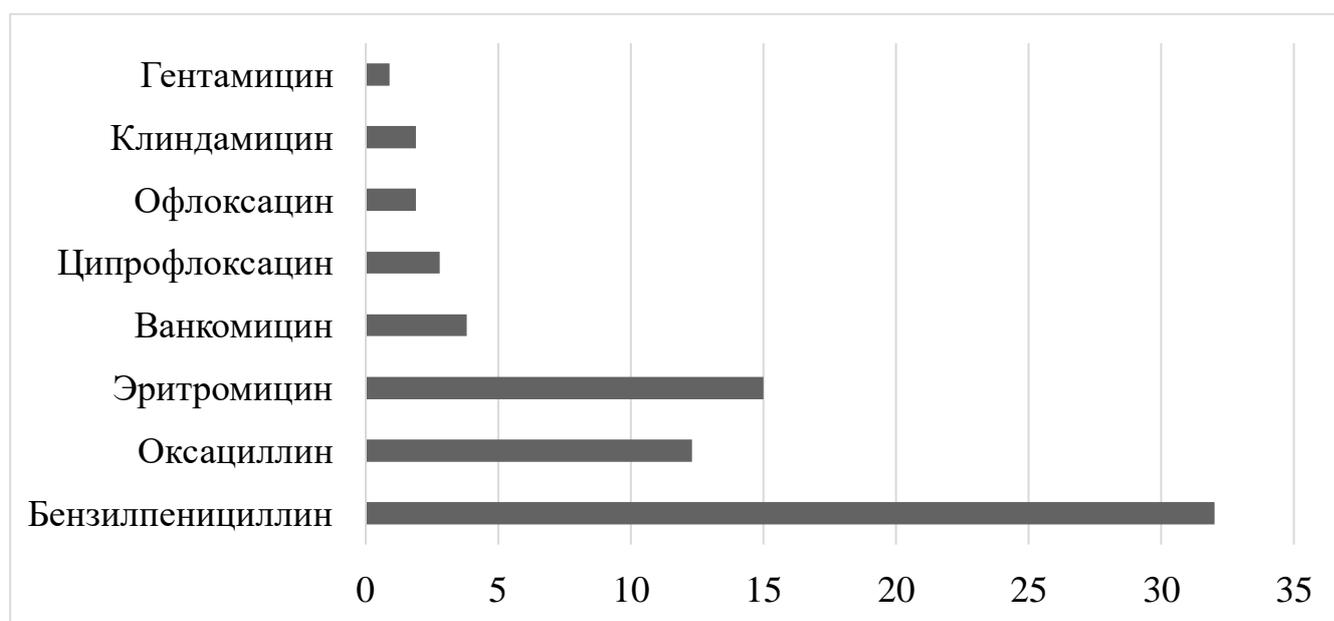


Рисунок 7. Доля антибиотикорезистентных штаммов золотистого стафилококка (%)

4.2. Изучение чувствительности штаммов *S. aureus* к препаратам на основе бактериофагов

Исследование устойчивости штаммов золотистого стафилококка к препаратам бактериофагов проводили в соответствии с МУК 4.2.1890-04. Результаты определения чувствительности представлены в таблице 9.

Таблица 9.

Характеристика чувствительности / устойчивости исследованных изолятов *S. aureus* к препаратам бактериофагов

№	Фаги			
	Пиобактериофаг Поливалентный очищенный	Пиобактериофаг комплексный	Бактериофаг стафилококковый	Интести- бактериофаг
1	S	S	S	S
2	S	S	S	S
3	R	R	R	R
4	R	R	R	R
5	S	R	R	R
6	S	S	S	S
7	S	R	S	S
8	S	S	S	S
9	R	S	S	S
10	S	S	S	S
11	R	R	R	R
12	R	S	R	S
13	R	S	R	S
14	R	S	R	R
15	S	S	S	S
16	S	R	R	R
17	R	R	R	R

18	R	R	R	S
19	R	R	R	R
20	R	R	R	R
21	S	S	S	S
22	S	S	S	R
23	S	S	R	S
24	R	R	R	R
25	S	S	S	S
26	R	R	R	R
27	R	R	R	R
28	R	R	R	R
29	R	R	R	R
30	R	R	R	R
31	S	R	S	R
32	S	S	S	S
33	R	R	R	R
34	S	R	R	S
35	R	R	R	R
36	S	S	S	R
37	S	S	S	S
38	S	R	R	S
39	S	R	R	R
40	S	S	S	S
41	S	R	R	R
42	S	R	R	S
43	R	R	R	R
44	S	S	S	S
45	R	R	R	R
46	S	S	S	S

47	R	R	S	S
48	S	R	S	S
49	R	R	R	R
50	S	S	S	S
51	R	R	S	S
52	S	S	S	S
53	S	S	S	S
54	S	S	S	S
55	S	S	S	S
56	R	R	R	R
57	S	S	S	S
58	R	R	R	R
59	S	S	S	S
60	S	S	S	S
61	S	R	S	S
62	R	R	R	R
63	S	S	R	R
64	R	R	R	R
65	S	S	S	S
66	S	R	S	R
67	S	S	S	R
68	R	R	R	S
69	S	S	S	S
70	S	S	S	S
71	S	S	S	S
72	S	S	S	S
73	S	S	S	S
74	R	R	R	R
75	S	S	S	S

76	S	R	S	S
77	S	R	S	S
78	R	R	S	S
79	S	S	S	S
80	R	R	R	R
81	S	S	S	S
82	R	R	R	R
83	R	R	R	R
84	S	S	S	S
85	S	R	S	R
86	S	R	S	S
87	S	S	S	S
88	S	S	S	S
89	S	R	S	S
90	R	R	S	R
91	S	R	R	R
92	S	R	S	S
93	R	R	R	R
94	S	S	S	S
95	S	R	S	R
96	S	R	S	S
97	R	R	R	R
98	R	S	S	S
99	R	R	R	S
100	S	S	S	S
101	R	R	R	R
102	S	S	S	S
103	S	R	S	S
104	R	R	R	R

105	R	R	R	R
106	S	S	S	S

Среди изолятов максимальный уровень резистентности наблюдался для стафилококкового бактериофага – $55,6 \pm 4,8\%$. Резистентность к интести-бактериофагу составила $43,4 \pm 4,8\%$, к пиобактериофагу поливалентному очищенному – $42,5 \pm 4,8\%$. Наименьшую резистентность изоляты показали к пиобактериофагу комплексному, к которому устойчивыми оказалась равной $39,6 \pm 4,7\%$ штаммов (Рисунок 8).

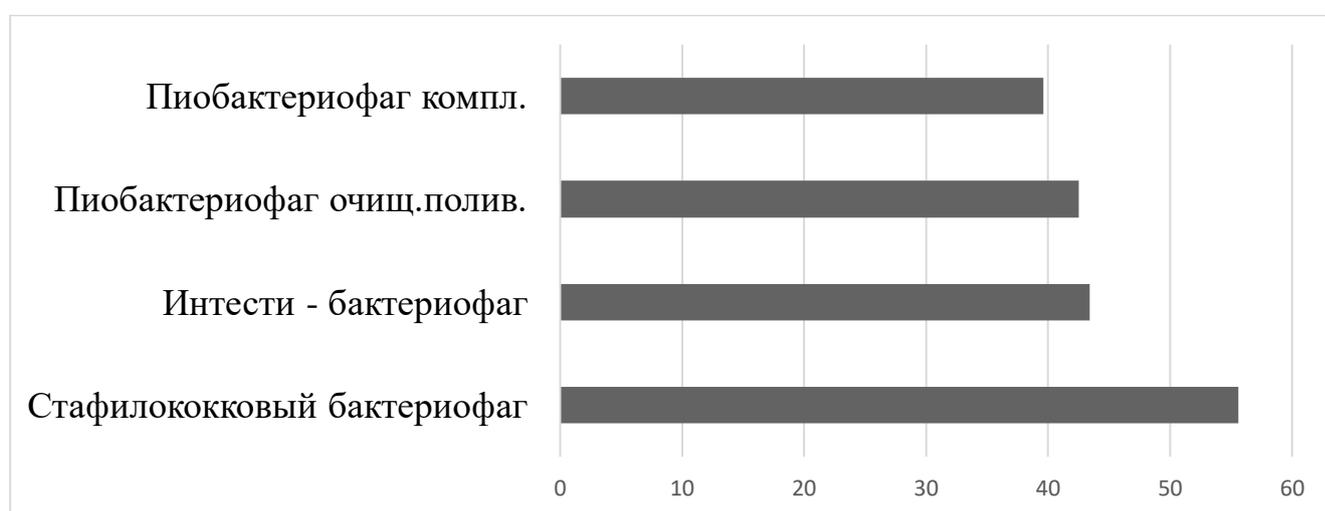


Рисунок 8. Доля резистентных/устойчивых штаммов золотистого стафилококка к бактериофагам (%)

С целью изучения тесноты связи между антибиотикорезистентностью и устойчивостью к бактериофагам была проведена сравнительная оценка штаммов по выборочному линейному коэффициенту корреляции. Отсутствие взаимосвязи между множественной устойчивостью к бактериофагам и антибиотикорезистентностью подтверждается отсутствием статистически достоверной корреляции ($p > 0,05$). Однако при анализе показателей чувствительности стафилококков в отношении отдельных антибиотиков и бактериофагов была выявлена связь у анализируемых штаммов (Таблица 10).

Таблица 10.

Сводная таблица частоты устойчивых (R) и чувствительных (S) к антибиотикам стафилококков и устойчивых (R) и чувствительных (S) к бактериофагам штаммов стафилококков и корреляции (r) между чувствительностью - устойчивостью к антибиотикам и бактериофагам (%).

Бактериофаги			Антибиотики																
			Пен		Окс		Эри		Ван		Цип		Офл		Кл			Ген	
			S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R			
		%	67,9	32,1	87,7	12,3	85	15	96,2	3,8	97,2	2,8	98,1	1,9	98,1	1,9	99,1	0,9	%
1	S	63,1	0,9		0,88		0,89		0,83		0,82		0,82		0,82		0,81		Коэффициент корреляции, r
	R	39,6	0,73		0,44		0,47		0,35		0,35		0,34		0,34		0,33		
2	S	44,4	0,9		0,77		0,64		0,71		0,53		0,52		0,52		0,52		
	R	55,6	0,9		0,78		0,81		0,73		0,72		0,71		0,71		0,70		
3	S	56,6	0,9		0,77		0,64		0,71		0,53		0,52		0,52		0,52		
	R	43,4	0,9		0,78		0,81		0,73		0,72		0,71		0,71		0,70		
4	S	57,2	0,9		0,78		0,81		0,73		0,72		0,71		0,71		0,70		
	R	42,5	0,9		0,78		0,81		0,73		0,72		0,71		0,71		0,70		

Примечание: S (susceptible) - чувствительные микроорганизмы; R (resistant) - резистентные микроорганизмы; окс - оксациллин, ван - ванкомицин, пен - бензилпенициллин ген - гентамицин, эри - эритромицин, цип - ципрофлоксацин, кл - клиндамицин, офл - офлоксацин, 1 - комплексный тиобактериофаг, 2 - стафилококковый бактериофаг, 3 - интести-бактериофаг, 4 - поливалентный очищенный бактериофаг.

Полученные коэффициенты, сопоставленные со шкалой Чеддока, указали на высокую ($0,7 < r < 0,9$) тесноту связи между стафилококковым бактериофагом и пенициллином ($r=0,73$) и на умеренную ($0,3 < r < 0,5$) тесноту связи между стафилококковым бактериофагом (№ 2) и остальными антибиотиками. В большинстве случаев полученный коэффициент свидетельствует о высокой связи исследуемых признаков. Так, среди всех стафилококков, чувствительных к комплексному фиобактериофагу (№ 1) и анализируемым антибиотикам, выявлена прямая статистически значимая корреляционная связь высокой силы $r=0,9$ (для пенициллина и остальных), $p < 0,05$. Для интести-бактериофага (№3) высокая статистически значимая связь определена для пенициллина ($r=0,9$), заметная теснота связи ($0,5 < r < 0,7$) оказалась характерной для всех остальных антибиотиков. Для поливалентного очищенного бактериофага (№ 4) также оказалась характерной высокая либо заметная связь для большинства антибиотиков. На основании полученных результатов выявлена прямая тесная связь между антибиотикорезистентностью и устойчивостью к бактериофагам у анализируемых штаммов.

Таким образом, нами за 2015–2016 гг. у больных, обратившихся за медицинской помощью в различные ЛПУ г. Иркутска, из различных биотопов было выделено и накоплено 100 штаммов *S. aureus*. Принадлежность штаммов к виду *S. aureus* была подтверждена бактериологическим и молекулярно-генетическим методами. Первоначально проведенная амплификация фрагмента ДНК гена *mecA*, расположенного на хромосоме *S. aureus* и ряда других стафилококков, позволила обнаружить 19 MRSA штаммов. Результаты анализа чувствительности золотистого стафилококка к антибиотикам, позволили выявить максимальную устойчивость в отношении антибиотика ряда пенициллинов - бензилпенициллину, уровень которой составил $31,2 \pm 4,5\%$ ($p < 0,05$). Наиболее высокий уровень устойчивости исследованных культур *S. aureus* к бактериофагам отмечен по отношению к стафилококковому бактериофагу, резистентность к которому оказалось равной $55,6 \pm 4,8\%$ ($p < 0,05$). При анализе результатов устойчивости штаммов к антибиотикам и бактериофагам выявлена прямая

статистически значимая связь весьма высокой величины для комплексного пиобактериофага и пенициллина ($r=0,9$), для остальных антибиотиков показатель характеризовался высокой степенью связи. Для стафилококкового бактериофага и пенициллина характерна заметная связь ($r=0,73$). При сравнении изолятов стафилококков, чувствительных к действию интести-бактериофага и к пенициллину ($r=0,9$) также выявлена статистически значимая ($p<0,05$) корреляционная связь высокой величины, для оксациллина, ванкомицина и эритромицина - заметной величины ($r=0,77$, $r=0,71$ и $r=0,64$ соответственно). При сравнении исследованных штаммов стафилококка, чувствительных к поливалентному очищенному пиобактериофагу, высокая степень корреляционной связи оказалась характерной для пенициллина ($r=0,9$) и эритромицина ($r=0,81$). Результаты изучения устойчивости штаммов к антибиотическим и бактериофаговым препаратам показали высокую комплексную резистентность и приспособляемость золотистого стафилококка. Это обстоятельство еще раз подчеркивает существующие сложности борьбы со стафилококковыми инфекциями и настоятельную необходимость поиска новых эффективных подходов к профилактике и лечению данных заболеваний. В упомянутом аспекте значительный интерес представляет собой разработка методов быстрого поиска и анализа CRISPR/Cas-систем в культурах стафилококков с целью создания персонифицированной фаговой терапии. Исследованиям данной проблемы посвящены последующие разделы диссертационной работы (главы 5 и 6).

ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ И БИОИНФОРМАЦИОННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ CRISPR/CAS-СИСТЕМЫ В ШТАММАХ *S. AUREUS*

Основой для исследования послужили работы, направленные на изучение CRISPR/Cas-системы в разных бактериях, например, *Escherichia coli* (Diez-Villasenor *et al.*, 2013), *Yersinia pestis* (Vergnaud *et al.*, 2007), *Yersinia pseudotuberculosis* (Koskela *et al.*, 2015), *Streptococcus pyogenes* (Koo *et al.*, 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (Cady *et al.*, 2012). Впервые возможность использования нескольких биоинформационных программных инструментов для поиска и анализа CRISPR-системы была показана в 2018 году на 38 штаммах *S. aureus* (Zhao *et al.*, 2018).

Из большого количества доступных биоинформационных программ поиска CRISPR-кассет и генов *cas* в данной работе нами отобрано несколько программ (глава 3). К сожалению, обнаружение генов *cas*, является затруднительным из-за сходства генов внутри семейств *cas*, на данный момент времени классификация генов CRISPR изменяется и пополняется. Данный поиск приводит к большому количеству ложных срабатываний, например такие белки, как *cas3*, *cas10*, *cas4* и *cas9*, могут проявлять сходство с родственными белками или доменами, которые не связаны с системой CRISPR. Сходны с различными геликазами клетки белки *cas3* – семейства, а *cas10* – с полимеразами и циклазами. Кроме того, многие белки, содержащие мотив распознавания РНК, функционирующих как субъединица *cas*-эффекторного комплекса похожи друг на друга даже если присутствуют в локусах различных подтипов CRISPR. Напротив, структура малых и больших субъединиц *cas*-эффекторного комплекса затрудняет обнаружение белков из-за их крайнего разнообразия в пределах одного подтипа (Makarova *et al.*, 2017). Учитывая приведенные выше обстоятельства, было принято решение использовать в работе следующие программы поиска *cas*-генов: MacromolecularSystemFinder (MacSyF, ver. 1.0.2), работающей с белковыми последовательностями и онлайн-софты CRISPRCasFinder и CRISPRONE, анализирующие полногеномные нуклеотидные последовательности.

В результате поиска генов *cas* в 398 штаммах *S. aureus* из базы данных GenBank была получена информация о неоднородности CRISPR-системы внутри вида. Разнообразие строения CRISPR у *S. aureus* подтверждена обнаружением разных классов генов *cas*. На основе результатов исследования все штаммы были разделены на 5 групп с разным типом строения CRISPR-локуса.

В первую группу вошли 2 штамма (CP030403.1; AP020315.1) с обнаруженной CRISPR - системой типа III-A. Вторую группу дополнили интересные, на наш взгляд 7 штаммов, причем 5 штаммов (CP029653.1; CP058615.1; CP060491.1; CP012756.1; CP029649.1; CP029681.1; CP003808.1), содержащих два типа CRISPR-системы с собственными кассетами, расположенными на расстоянии друг от друга. Пример обнаружения двух типов CRISPR представлен на рис. 9, 10.

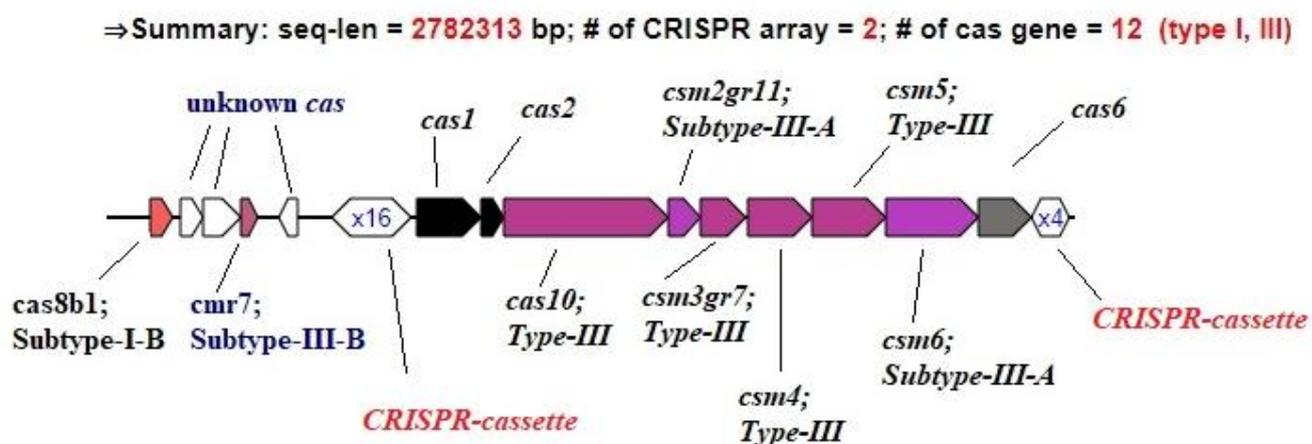


Рисунок 9. Строение CRISPR-системы в геноме *S. aureus* 08BA02176 (CP003808.1), обнаруженное при помощи онлайн софта *CRISPRone* и *MacromolecularSystemFinder* (ver. 1.0.2).

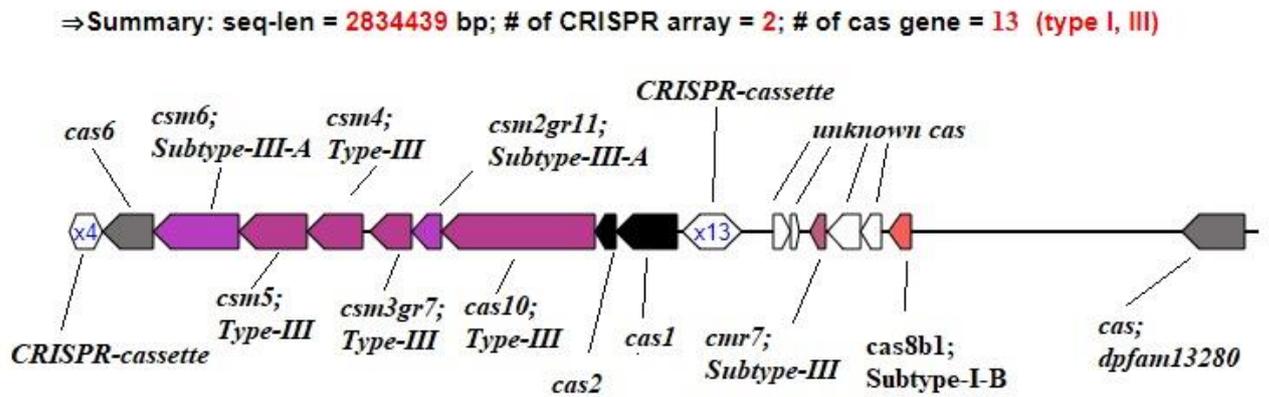


Рисунок 10. Структура CRISPR-системы в геноме *S. aureus* (CP029649.1) обнаруженное при помощи онлайн софта *CRISPRone* и *MacSyFinder* (ver. 1.0.2).

В результате были идентифицированы гены типа III-A, включающие *cas1*, *cas2*, *cas10*, *csm2*, *csm3*, *csm4*, *csm5*, *csm6* и гены, характерные для I-B типа *cas8b1* и *cmr7*. И два штамма (CP058615.1; CP029653.1) содержащих помимо вышеперечисленных генов, еще *casR* и *csa3* – I-A типа (Рис. 11).

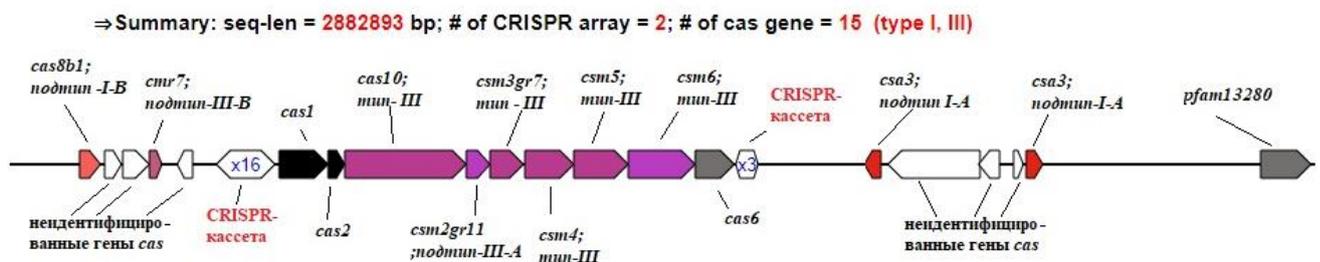


Рисунок 11. Структура CRISPR-системы в геноме *S. aureus* (CP058615.1) обнаруженное при помощи онлайн софта *CRISPRone* и *MacSyFinder* (ver. 1.0.2).

По всей видимости, наличие двух и более разных систем в геноме штамма стафилококка является результатом многочисленных перекрестов генов, увеличением давления профагов и учащенного плазмидного обмена между бактериями (Crowley *et al.*, 2019). Процесс трансдукции у бактерий продемонстрирован (Watson *et al.*, 2018) между штаммами *Pectobacterium*

atrosepticum, где бактериофаги переносили всю хромосомную систему CRISPR, включая гены *cas* и фаг-нацеленные спейсеры. По всей видимости, процессы трансдукции затронули и штаммы, которые были отнесены нами к третьей группе, включающей 5 штаммов (AP019751.1; CP013621.1; CP053354.1; CP031673.1; CP047799.1), по причине обнаружения в геномах фрагментов *casR* и *casA* - I типа. Причем, генов *cas* типа III-A и I-B в группе 2 не было обнаружено. Пример идентифицированного I - типа CRISPR представлен на рисунке 12.



Рисунок 12. Строение I - типа CRISPR в геноме *S. aureus* RIVM3897 (CP013621.1), идентифицированное при помощи онлайн софта *CRISPRone* и *MacSyFinder* (ver. 1.0.2).

В четвертую группу вошли 3 штамма золотистого стафилококка (CP065857.1; CP023500.1; CP006706.1) содержащих от 4 до 5 генов I- типа и подтипа IV-A и один штамм под номером № CP030138.1 содержащий 7 генов (III и II-A типа): *csx1*, *casA* и ген *cas9*, не встречающийся в других штаммах (рис. 13).

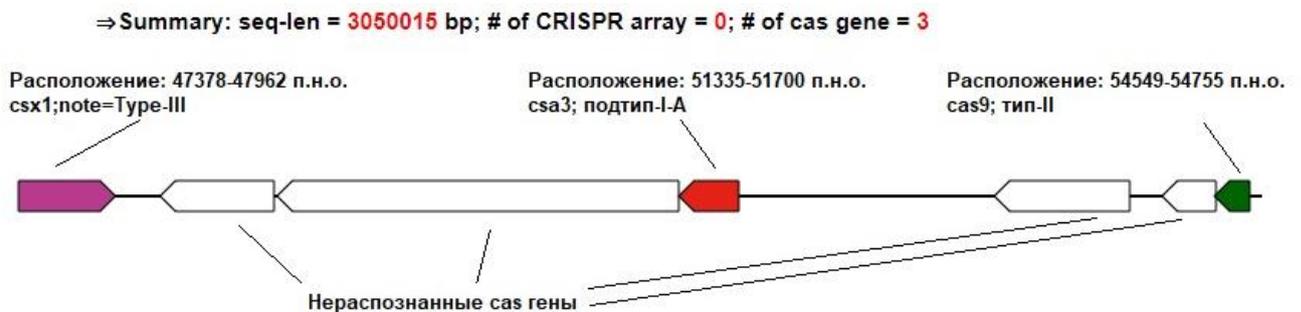


Рисунок 13. Строение CRISPR-системы II-A типа CRISPR в геноме *S. aureus* M48 (CP030138.1), идентифицированное при помощи онлайн софта *CRISPRone* и *MacromolecularSystemFinder* (ver. 1.0.2).

И в пятую группу были отнесены 206 штаммов либо не содержащих генов *cas*, либо имеющих остаточные фрагменты локусов CRISPR. Сформированные группы геномов по типу CRISPR-системы представлены в Приложении 1. В связи с обнаружением генов *cas* в ряде штаммов с отсутствующими кассетами в геномах было принято решение поиска локусов CRISPR в плаزمидах *S. aureus*, нуклеотидные последовательности которых доступны в базе NCBI.

В результате анализа плазмидного профиля золотистого стафилококка было выяснено, что плазмиды также могут содержать гены *cas*, как полные, так и фрагменты. Единственным отличием являлось их расположение в плазмиде и окружение неизвестными профилями других генов, которых программы характеризовали как «неизвестные *cas*». По всей видимости, идентификация подобных генов на сегодняшний день затруднена по причине малой изученности. Всего было проанализировано 442 плазмиды, гены субтипа I-A присутствовали в 21 плазмиде из которых 8 программы идентифицировали, как полнолокусными типа I-A (табл.11).

Таблица 11.

Строение CRISPR-локуса плазмид *S. aureus*

№ плазмиды в GenBank	Начало гена (н.о.)	Конец гена (н.о.)	Cas-ген
CP002389.1	13110	13478	тип I-A;
	13848	14426	<i>casR</i> ; тип-I;
	14557	15165	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	15356	15751	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	15769	17058	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	17058	17372	<i>csa3</i> ; тип I-A;
	17433	17807	<i>casR</i> ; тип-I;
CP007177.1	5136	5483	<i>csa3</i> ; тип I-A;
	5904	6875	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	6999	7418	<i>casR</i> ; тип-I;

	7944	8789	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	8896	10653	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	10643	11023	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	11287	11865	<i>casR</i> ; тип-I;
	12088	12273	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	12535	13209	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	13378	13743	pfam13280:WYL;
CP017095.2	6408	6623	pfam13280:WYL
	6792	7466	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	8136	8714	<i>casR</i> ; тип-I;
	12583	13002	<i>casR</i> ; тип-I;
	13126	14097	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	14518	14865	<i>csa3</i> ; тип I-A
CP018767.1	6258	6623	pfam13280
	6792	7466	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	8136	8714	<i>casR</i> ; тип-I
	8978	14326	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	14391	9358	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	9348	11147	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	11170	12057	<i>casR</i> ; тип-I
	12583	13002	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	13126	14097	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	14518	14865	<i>csa3</i> ; тип I-A
CP020021.1	24599	24913	<i>csa3</i> ; тип I-A
	24974	25309	<i>casR</i> ; тип I
	25629	25841	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	25876	26550	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	26645	27022	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	27260	27616	<i>csa3</i> ; тип I-A

CP029079.1	19029	19343	csa3; тип I-A;
	19404	19841	casR; тип-I
	20155	21597	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	21569	22162	casR; тип I;
CP029677.1	11845	12192	csa3; тип I-A;
	17995	18573	casR; тип I;
	19243	19917	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	20086	20451	pfam13280:WYL;
CP029665.1	13100	13447	csa3; тип I-A;
	19251	19829	casR; тип I;
	20499	21173	неидентифицированный ген <i>cas</i> ;
	21342	21707	pfam13280:WYL;

В результате биоинформационного анализа генов нами была выявлена и продемонстрирована гетерогенность строения CRISPR-локусов у *S. aureus*. В результате в геномах *S. aureus* идентифицированы гены CRISPR-систем: I-A, II-A, III-A, IV-A, I-B. На основании вышеизложенных результатов мы можем констатировать, что CRISPR-система у *S. aureus* была изучена недостаточно, а в результате проведенного анализа с помощью современных биоинформационных программ удалось констатировать неоднородность строения данной системы в геноме бактерии и выявить наличие разных типов генов *cas*.

Обнаружение повторяющихся последовательностей как маркеров CRISPR-кассет осуществляли при помощи ряда программ: *CRISPR RT*; *CRISPI: CRISPR-interactive database*; *CRISPRsFinder*; *CRISPRDetect: A flexible algorithm to define CRISPR arrays*. Результаты обнаружения считались достоверными только при совпадении повторов и спейсеров в ряде программ. Как показано в таблице приложения 1 из 398 проанализированных штаммов *S. aureus* 19 штаммов содержали как гены *cas*, так и CRISPR-кассеты.

Число обнаруженных нами спейсерных последовательностей в каждом локусе CRISPR было между 1 и 15. Длина спейсерных последовательностей была

сконцентрирована в 26-35 п.н.о., а длина повторяющихся последовательностей была сконцентрирована в пределе 25-32 п.н.о. Выяснено, что нуклеотидная последовательность повторов CRISPR-кассет была разной, это явление мы объясняем наличием разных типов CRISPR, для которых характерна собственная присущая им последовательность (Приложение 2).

Интересными на наш взгляд, являются полученные результаты анализа генома штаммов золотистого стафилококка с выделенными плазмидами. Выяснено, что плазмиды с обнаруженными нами генами *cas* по всей видимости способны формировать CRISPR-касеты в собственном геноме бактерии и наоборот формировать CRISPR-касеты в плазмидах, минуя геном. Так, например, в плазмиде штамма *S. aureus* ATCC 6538 (CP020021.1), представленного на рисунке 14, обнаружены гены *cas* подтипа I-A, а в геноме бактерии (CP020020.1) была обнаружена CRISPR-кассета (табл.12)

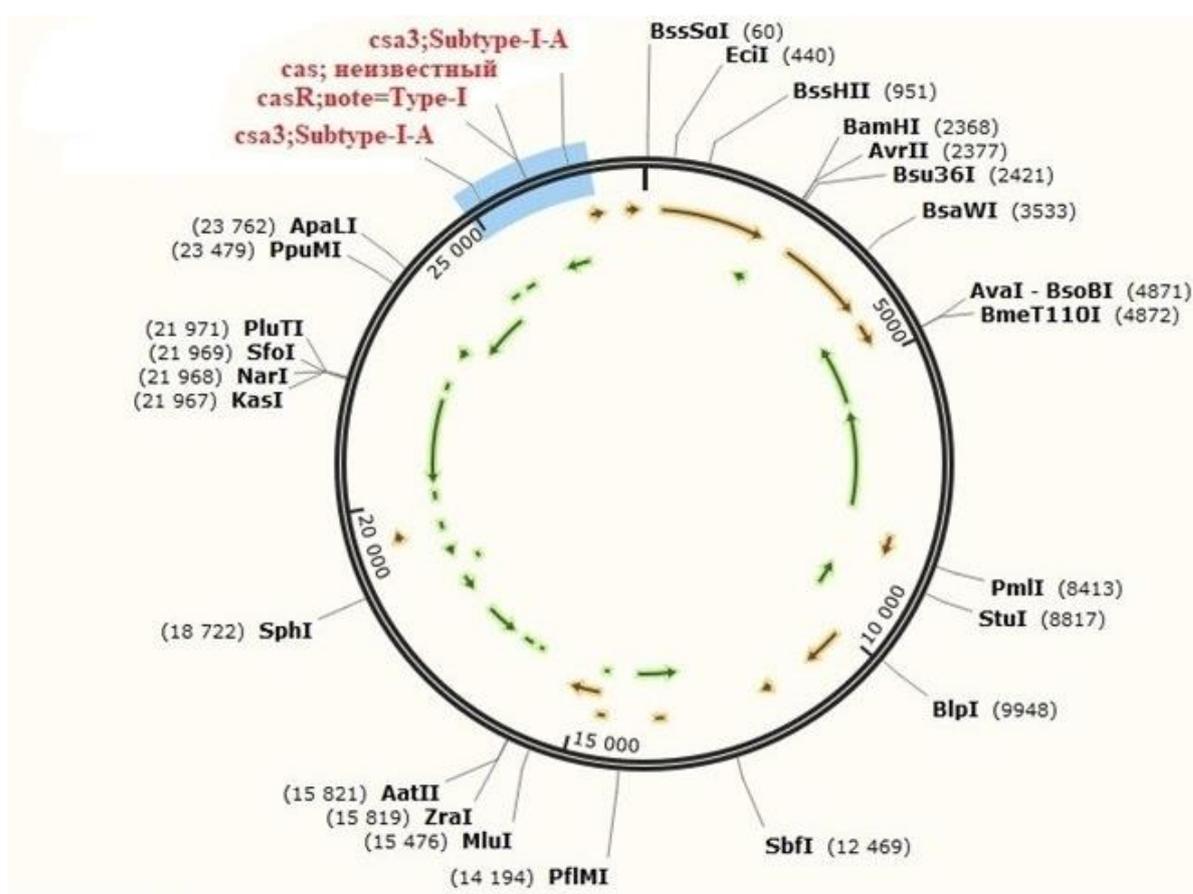


Рисунок 14. Плазмида штамма *S. aureus* ATCC 6538 (CP020021.1), визуализированная в SnapGene Viewer (ver. 4.3.8)

Строение CRISPR-кассеты в геноме *S. aureus* ATCC 6538 (CP020020.1)

Позиция в геноме CP020020.1	Повторяющаяся последовательность	Спейсерная последовательность
2176946	TTACAACSTTTAGTTGTTAGGG GCTCTTATGCA	GTTGATGCGTAGCATCCAAC TGTATTCCTCTATT
2177012	TTACAACSTTTAGTTGTTAGGG GCTCTTATGCA	TGCGCTTAGCGCAGGCGCTC СТАСТ
2177069	TTACAACSTTTAGTTGTTAGGG GCTCTTATGCA	

Для детекции бактериофагов и плазмид в обнаруженных спейсерных участках посредством биоинформационных алгоритмов BLASTn по молекулярным базам GenBank-Phage использовали программы CRISPRTarget (http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html) и MycobacteriophageDatabase (<http://phagesdb.org/blast/>). Идентификация спейсерных участков, соответствующих протоспейсерам бактериофагов, позволила определить и выявить видовую устойчивость штаммов к специфичным бактериофагам в анализируемых штаммах *S. aureus* из базы Genbank и выявить, что наибольшее генетическое влияние на штаммы оказывали бактериофаги рода *Staphylococcus* - 70%, *Streptococcus* - 67%, *Mycobacterium* - 67%, *Bacillus* - 54%, *Gordonia* - 53%, *Arthrobacter* - 23%, *Streptomyces* - 12%.

Таким образом, при помощи разработанного биоинформационного программного алгоритма была получена новая информация о строении CRISPR-системы *S. aureus*. В результате, в геномах золотистого стафилококка идентифицировано присутствие генов CRISPR: I-A, II-A, III-A, IV-A, I-B. Были обнаружены *cas*-гены, получены их структурные и функциональные

характеристики, идентифицированы CRISPR-кассеты и проанализирована фаговая устойчивость каждого штамма. В связи с возникающими трудностями анализа геномов из-за накапливающихся ограничений и несоответствий в классификации и номенклатуре CRISPR-систем нами выдвинуто предложение о необходимости периодического мониторинга данной системы у бактерий. Вынуждено отметить, что прогресс понимания молекулярных механизмов CRISPR и структуры эффекторных комплексов ассоциируется с растущим числом выявленных геномов с многочисленными новыми вариантами систем CRISPR-Cas. Поэтому на данный момент времени необходимо всестороннее изучение *cas*-генов и пополнение новых баз данных. С точки зрения борьбы с возбудителями бактериальных инфекций с целью формирования эффективной фаговой терапии, проведенная биоинформационная работа позволила наработать праймеры для идентификации CRISPR-кассет с последующим их секвенированием, результаты практической работы которой представлены в главе 6.

ГЛАВА 6. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ АПРОБАЦИЯ РАЗРАБОТАННОЙ МОДЕЛИ АЛГОРИТМА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО И БИОИНФОРМАЦИОННОГО СКРИНИНГА БАКТЕРИОФАГОВ НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ CRISPR-КАССЕТ В CRISPR/CAS-СИСТЕМАХ БАКТЕРИЙ

Благодаря прогрессу методов молекулярной биологии и биоинформатики и их применению в изучении генома бактерий удается получать новую информацию о строении CRISPR-систем. Недостаточная изученность CRISPR-систем обуславливает сложности их поиска, так как механизмы поиска опираются только на известные гены, повторы, лидерные последовательности и т. д. Несмотря на это, нами было продемонстрировано в главе 5 биоинформационное исследование, в результате которого были получены новые данные о разнородности системы у стафилококка. Установлено, что уровень развития CRISPR-систем у одного вида бактерии чрезвычайно высок, о чем свидетельствует обнаружение разных типов CRISPR. Дальнейшие наши исследования были направлены на получение специфических праймеров к обнаруженным CRISPR-кассетам, поскольку данная работа посвящена разработке персонализированной фаговой терапии заболеваний вызываемых *S. aureus*.

С целью выделения фрагментов CRISPR-кассет и детекции *cas1*, *cas2* и *cas6* генов осуществляли ПЦР реакции с наработанными праймерами (глава 3) и подтверждали стандартным методом электрофореза в агарозном геле. Пример детекции CRISPR-генов представлен на рисунке 15.

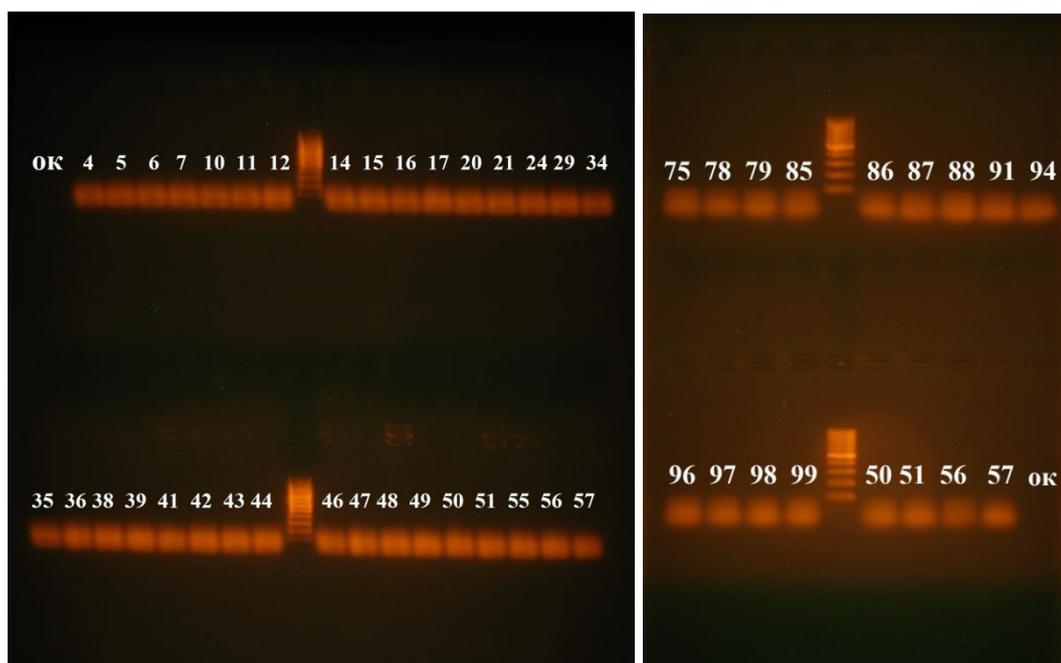


Рисунок 15. Агарозный гель-электрофорез образцов ДНК CRISPR-генов *S. aureus*.

Слева – *cas1*. Справа – *cas2*.

Результаты секвенирования 208 фрагментов ДНК, предположительно относящихся к CRISPR-кассетам, анализировали при помощи разработанного биоинформационного алгоритма. Параметры поиска повторов и спейсера выбирали стандартные, за исключением количественного состава спейсеров. На основании результатов исследования в главе 5 было принято решение осуществлять поиск одной и более спейсерных последовательностей в кассете. Всего было получено 45 CRISPR-кассет. Повторяющаяся последовательность длиной 27 п.н.о. представлена на рисунке 16.

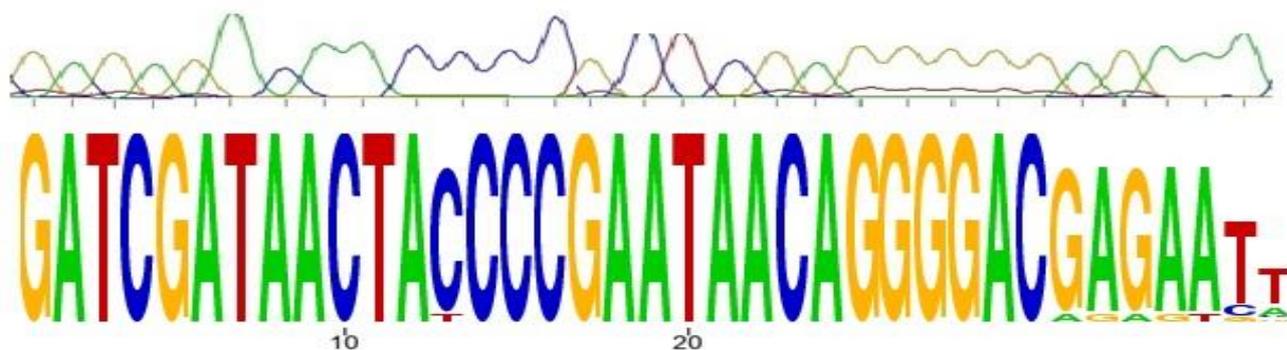


Рисунок 16. Хроматограмма расшифрованной повторяющейся последовательности в CRISPR-кассетах *S. aureus*, визуализированная в программе *Genius prime 2019, версия 2.1*

CRISPR-кассеты, обнаруженные в геноме *S. aureus*, были небольших размеров и содержали от 1 до 5 спейсеров размером 34 п.н.о. Малое содержание спейсеров в кассетах стафилококка описывалось нами ранее в главе 5. В результате было выяснено, что 18 штаммов содержали 1 спейсерную последовательность, 10 штаммов включали лишь 2 спейсерные последовательности, 9 штаммов - три спейсера, у 6 штаммов обнаружено четыре спейсера и всего лишь 2 штамма отличились наличием 5-ти спейсерными последовательностями (табл. 13).

Таблица 13.

Спейсерные последовательности, обнаруженные в штаммах *S. aureus*

№ штамма	Спейсерная последовательность
5, 7, 9, 12, 14, 23, 38, 39, 41, 42, 47, 48, 51, 66, 77, 78, 85, 99	ААТАТАААСССГТТСААТТЦГТТАТСТТТАААТТСТТГ
56, 58, 62, 64, 74, 80, 82, 83, 97, 100	АТАААСССГТТСААТТЦГТТАТСТТТАААТТСТТГ АССАССГАТСТГСГССАГСТГГГТГАГАСГАТГАС
27, 28, 29, 30, 33, 35, 43, 45, 49	АТАААСССГТТСААТТЦГТТАТСТТТАААТТСТТГ АССАССГАТСТГСГССАГСТГГГТГАГАСГАТГАС АССГАСГГГГСАГГТТАСГТСТАСССГГГСАГГГ
3, 17, 19, 20, 24, 26	АТАААСССГТТСААТТЦГТТАТСТТТАААТТСТТГ АССАССГАТСТГСГССАГСТГГГТГАГАСГАТГАС АССГАСГГГГСАГГТТАСГТСТАСССГГГСАГГГ АССАТАССАГТСТСССГСССГГТЦГТАСТСААТАТ
4,11	АААСССГТТСААТТЦГТТАТСТТТАААТТСТТГ САССГАТСТГСГССАГСТГГГТГАГАСГАТГАС СГАСГГГГСАГГТТАСГТСТАСССГГГСАГГГ САТАССАГТСТСССГСССГГТЦГТАСТСААТАТ

TCCGCCGTTTAATCGCGGTGATGATATCCGGCA

Исследование нуклеотидного профиля спейсерных последовательностей с протоспейсерами бактериофагов в обнаруженных кассетах позволило выявить одинаковые CRISPR-кассеты отличающихся только добавлением нового спейсера. Часть спейсерных последовательностей, например 3 и 4 кодировали защиту от одного и того же фага, *Arthrobacter phage*. Подобные структуры спейсеров не позволят фагу преодолеть защиту бактерии с помощью точечных мутаций.

Усиление нашего внимания к оценке гомологии спейсеров и протоспейсерных последовательностей бактериофагов способствовало обнаружению разных протоспейсеров в каждой анализируемой спейсерной последовательности. Так, например, спейсерная последовательность: ACCACCGATCTGCGCCAGCTGGGTGAGACGATGAC всех штаммов совпадала с разными последовательностями протоспейсеров фагов: *Mycobacterium phage*, *Gordonia phage*, *Streptomyces phage* и т. д. (рис. 17).

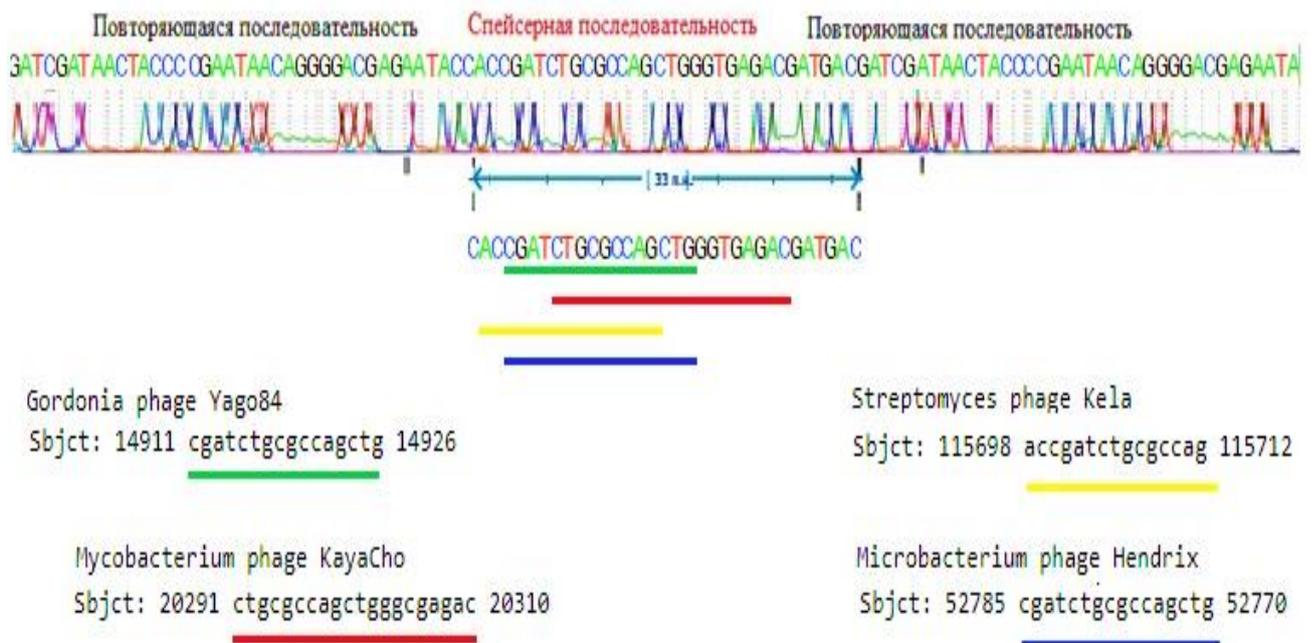


Рисунок 17. Биоинформационный анализ спейсерной последовательности

Данная информация была получена для каждого спейсера (табл. 14).

Таблица 14.

Нуклеотидное совпадение спейсерных последовательностей с протоспейсерами бактериофагов

Спейсерная последовательность	Совпадение н.о.	Бактериофаг из баз данных
ААТАТАААСССГТТСААТТСГ ТТАТСТТТАААТТСТТГ	-	Не идентифицированный бактериофаг
АСАССГАТСТГСГССАГСТГ GGTGAGACGATGAC	16	<i>Gordonia phage Yago84</i>
	19	<i>Mycobacterium phage KayaCho</i>
	16	<i>Microbacterium phage Hendrix</i>
	15	<i>Streptomyces phage Whatever</i>
АССГАСГСССГССАГСТТТАСГ ТСТАСССГСССАГССГ	15	<i>Arthrobacter phage Yeezus</i>
	11	<i>Gordonia phage Tangerine</i>
АССАТАССАГТСТССГСССГС GGTCGТАСТСААТАТ	16	<i>Microbacterium phage Kozie</i>
	15	<i>Arthrobacter phage Wilde</i>
	15	<i>Microbacterium phage Tyrumbra</i>
	15	<i>Propionibacterium phage SKKY</i>
	15	<i>Corynebacterium phage Juicebox</i>
ТССГСССГТТТААТСГСГСТГА TGATATСССГССА	16	<i>Microbacterium phage Neferthena</i>
	15	<i>Mycobacterium phage Waterfoul</i>
	15	<i>Gordonia phage Morrissey</i>
	15	<i>Gordonia phage Gustav</i>

Должно полагать, что полученный результат анализа спейсерных последовательностей CRISPR-кассет является доказательством того, что протоспейсерами выступают не случайные последовательности, а участки, отобранные в результате эволюционных взаимодействий CRISPR-системы *S. aureus* с бактериофагами, поскольку, как видно из таблицы 15 отличия в 1–2

нуклеотида в спейсерах определяются программами протоспейсеров разных бактериофагов. В связи с этим мы считаем, что подбор препаратов бактериофагов необходимо осуществлять с учетом филогенетических методов анализа генома бактериофагов совместно со спейсерными последовательностями бактерии. Обращает на себя внимание тот факт, что использование препаратов бактериофагов с протоспейсерами, комплементарными спейсерам, способствует некомпетентному лечению и выработке у штаммов дополнительных спейсеров.

Таким образом, в результате сопоставления показателей чувствительности к препаратам бактериофагов данных штаммов к полученным наборам CRISPR-кассет, выявлено, что штаммы с CRISPR-кассетами проявляют разную степень устойчивости к препаратам бактериофагов. В таблице № 9 (глава 4.2) демонстрируется устойчивость штаммов к лизатам препаратов фагов. Отмечается, что штаммы с большим содержанием спейсерных последовательностей (4,5 спейсера) проявляли устойчивость ко всем 4 препаратам бактериофагов, штаммы с 1 и 2 спейсерными последовательностями проявляли резистентность к одному или двум препаратам. В работе Cooper *et al.* в 2018 году было продемонстрировано, что для связывания комплекса Cascade с ДНК-мишенью достаточно всего 5 н.о. системе I-E типа в геноме *Escherichia coli*. В связи с этим на данный момент времени трудно определить конкретное число пар нуклеотидов, необходимое для узнавания чужеродной ДНК в CRISPR-системе у *S. aureus*, этот факт, безусловно, затрудняет определение источника спейсера. На основании вышеизложенного, подбор лечебного фага необходимо осуществлять, основываясь на полном отсутствии комплементарности между нуклеотидами спейсерных последовательностей и геномом бактериофагов.

Уникальное строение CRISPR-системы *S. aureus*, отмеченное и продемонстрированное в геномах из базы GenBank нами и Xihong Zhao *et al.*, было практически доказано и в данной работе. Полученные данные свидетельствуют о разнообразии генов и кассет входящих в состав CRISPR-системы возбудителя. Генетические отличия в защитной системе внутри одного

вида являются весьма существенными. Вполне возможно уникальное строение CRISPR-системы объясняет приспособленность *S. aureus* к внутривидовым и межвидовым отношениям. Имеющиеся на данный момент времени косвенные данные позволяют предположить, что штаммы, в которых не содержится CRISPR-система, могут быть ассоциированы с более быстрым лечением вызванного ими заболеваниями в связи с отсутствием защитных механизмов. Дальнейший поиск и всестороннее изучение CRISPR-системы как внутри генома, так и в плазмидах золотистого стафилококка с совершенствованием биоинформационных инструментов и алгоритмов представляется чрезвычайно важным с точки зрения определения течения заболевания и выбора тактики лечения больного.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение CRISPR-системы бактерий, в том числе золотистого стафилококка, представляет одну из наиболее важных проблем микробиологии, связанной с решением фундаментальных вопросов межвидовых взаимодействий и классификаций CRISPR-системы и *cas*-генов. Это особенно актуально в настоящее время, когда по всему миру наблюдается существенный и стабильный рост числа штаммов с множественной резистентностью к антибиотикам.

Как показывает анализ литературы, являясь представителем нормальной микрофлоры человека *S. aureus*, по всему миру вызывает различные заболевания: инфекции кожи и мягких тканей, остеомиелиты, пневмонии, бактериемии и т.д. Учитывая значение генетических особенностей штаммов, нам предоставляется важным подтвердить данные о наличии CRISPR-системы у данного представителя с помощью современных методов биоинформационного анализа с последующей разработкой диагностики, профилактики, лечения и получения дополнительных сведений.

Для получения данных, связанных со строением CRISPR-системы стафилококка, нами был сформирован алгоритм, состоящий из ряда биоинформационных программ. Программы, используемые в данном алгоритме, позволяли получать информацию о наличии в геноме *cas*-генов, CRISPR-кассет и определять принадлежность спейсерных последовательностей к протоспейсерным последовательностям фагов. При помощи биоинформационного алгоритма в 398 геномах штаммов *S. aureus* из базы данных GenBank нами была выявлена и продемонстрирована гетерогенность строения CRISPR-локусов у золотистого стафилококка. В результате, в геномах *S. aureus* идентифицировано присутствие генов CRISPR-систем: I-A, II-A, III-A, IV-A, I-B. Полученные результаты были близки к характеристике CRISPR, полученной Xihong Zhao с соавторами. В связи с обнаружением разных типов генов *cas* в анализируемых геномах и, основываясь на данных литературы о трансдукции, было принято решение поиска генов и кассет CRISPR в плазмидах *S. aureus*, нуклеотидные последовательности которых также доступны в базе NCBI. На основании анализа плазмидного профиля

золотистого стафилококка было выяснено, что плазмиды также могут содержать гены *cas* и кассеты. Установлено, что 160 штаммов *S. aureus* содержали только одну CRISPR-кассету, а 46 штаммов включали по 2 CRISPR-кассеты. С большой долей вероятности можно предположить, что плазмиды с обнаруженными нами генами *cas* способны формировать CRISPR-кассеты в собственном геноме бактерии. В то же время CRISPR-кассеты могут формироваться в плазмидах, минуя геном. Число обнаруженных нами спейсерных последовательностей в каждом локусе CRISPR было между 1 и 15. Причем, повторяющиеся последовательности нуклеотидов были разными. Это явление мы объясняем наличием разных типов CRISPR, для которых характерна собственная присущая им последовательность. Идентификация спейсерных участков, соответствующих протоспейсерам бактериофагов, позволила определить и выявить видовую устойчивость штаммов к специфичным бактериофагам в анализируемых штаммах *S. aureus* и установить, что наибольшее генетическое влияние на штаммы оказывали бактериофаги рода *Staphylococcus* - 70%, *Streptococcus* - 67%, *Mycobacterium* - 67%, *Bacillus* - 54%, *Gordonia* - 53%, *Arthrobacter* - 23%, *Streptomyces* - 12%. Таким образом, в результате проведенного анализа с помощью современных биоинформационных программ удалось получить новые данные о CRISPR-системах у *S. aureus* и констатировать неоднородность строения данной системы в геноме бактерии и плазмидах.

За 2015–2016 гг. у больных, обратившихся за медицинской помощью в лечебные учреждения г. Иркутска, из различных биотопов нами было выделено и накоплено 106 штаммов *S. aureus*. Принадлежность штаммов к виду *S. aureus* была подтверждена бактериологическим и молекулярно-генетическим методами. Первоначально проведенная амплификация фрагмента ДНК гена *mecA* позволила обнаружить 19 MRSA штаммов. Результаты анализа чувствительности золотистого стафилококка к антибиотикам, позволили выявить максимальную устойчивость в отношении антибиотика ряда пенициллинов - бензилпенициллину, уровень которой составил $31,2 \pm 4,5\%$ ($p < 0,05$).

Наиболее высокий уровень устойчивости исследованных культур *S. aureus* к бактериофагам отмечен по отношению к стафилококковому бактериофагу, резистентность к которому оказалось равной $55,6 \pm 4,8\%$ ($p < 0,05$). При анализе результатов устойчивости штаммов к антибиотикам и бактериофагам выявлена прямая статистически значимая связь весьма высокой величины для комплексного пиобактериофага и пенициллина ($r=0,9$), для остальных антибиотиков показатель характеризовался высокой степенью связи. Для стафилококкового бактериофага и пенициллина характерна заметная связь ($r=0,73$). При сравнении изолятов стафилококков, чувствительных к действию интести-бактериофага и пенициллина ($r=0,9$), также выявлена статистически значимая ($p < 0,05$) корреляционная связь высокой величины, а для оксациллина, ванкомицина и эритромицина – заметной величины ($r=0,77$, $r=0,71$ и $r=0,64$ соответственно). При сравнении исследованных штаммов стафилококка, чувствительных к поливалентному очищенному пиобактериофагу высокая степень корреляционной связи оказалась характерной для пенициллина ($r=0,9$) и эритромицина ($r=0,81$). Результаты изучения устойчивости штаммов к антибиотическим и бактериофаговым препаратам показали высокую комплексную резистентность и приспособляемость золотистого стафилококка. Это обстоятельство еще раз подчеркивало существующие сложности борьбы со стафилококковыми инфекциями и настоятельную необходимость поиска новых эффективных подходов к профилактике и лечению данных заболеваний. В упомянутом аспекте значительный интерес представляет собой разработка персонифицированной фаговой терапии.

Обнаруженные ранее CRISPR-кассеты послужили платформой для синтеза фланкирующих праймеров, апрабация которых осуществлялась на сформированной нами коллекции штаммов. В результате было выделено и расшифровано 45 CRISPR-кассет небольших размеров, содержащих от 1 до 5 спейсеров размером 34 п.н.о. Усиление нашего внимания к оценке гомологии спейсеров и протоспейсерных последовательностей бактериофагов способствовало обнаружению нескольких протоспейсеров в спейсерных

последовательностях *S. aureus*. На наш взгляд, полученный результат анализа спейсерных последовательностей CRISPR-кассет, является доказательством того, что протоспейсерами выступали не случайные последовательности, а участки, отобранные в результате эволюционных взаимодействий CRISPR-системы *S. aureus* с бактериофагами. Поскольку, разница в 1–2 нуклеотида в спейсерах определялись программами протоспейсеров разных бактериофагов. Этот факт, безусловно, затрудняет определение источника спейсера. Таким образом, в результате сопоставления показателей чувствительности к препаратам бактериофагов данных штаммов к полученным наборам CRISPR-кассет, выявлено, что все штаммы с CRISPR-кассетами проявляют разную степень устойчивости к препаратам бактериофагов. Отмечено, что штаммы с большим содержанием спейсерных последовательностей (4, 5 спейсеров) проявляли устойчивость ко всем 4 препаратам бактериофагов, штаммы с 1 и 2 спейсерными последовательностями проявляли резистентность к одному или двум препаратам. На основании вышеизложенного, мы полагаем, что подбор лечебного фага необходимо осуществлять, основываясь на отсутствии комплементарности между нуклеотидами спейсерных последовательностей и геномами бактериофагов.

Таким образом, разработанный и продемонстрированный биоинформационный алгоритм, позволил расширить наши представления о проблеме устройства CRISPR-системы *S. aureus* и возможности применения его для изучения CRISPR-систем в других бактериях. Используя данные, полученные на представителях рода *Staphylococcus* в качестве модели, в будущем может быть сформирована платформа для таргетной фаговой терапии других инфекционных заболеваний. Новая система высокоинформативной генетической лабораторной диагностики фагорезистентности бактерий будет сформирована на основе наличия или отсутствия у них той или иной CRISPR-системы. В дальнейшем по данным этих исследований будет создаваться банк данных структурного разнообразия сайтов CRISPR/Cas-систем стафилококков и баз данных разнообразия бактериофагов, что даст новые возможности эффективной терапии

бактериальных инфекций в условиях нарастания антибиотикоустойчивости микроорганизмов.

ВЫВОДЫ

1. Сформирован алгоритм для поиска и анализа CRISPR/Cas-систем в геномах бактерий из биоинформационных молекулярно-генетических программ.
2. Обнаружено присутствие генов CRISPR- систем: I-A, II-A, III-A, IV-A, I-B в геномах *S. aureus*. Плазмиды бактерии также могут содержать гены *cas* и CRISPR-кассеты.
3. Выявлена межвидовая устойчивость штаммов к бактериофагам на основе анализа спейсерных последовательностей.
4. Разработаны специфичные праймеры для детекции генов *cas* и фланкирования CRISPR-кассет *S. aureus* на основе результатов анализа геномов бактерии, полученных при помощи биоинформационного программного алгоритма.
5. Анализ CRISPR-кассет коллекционных штаммов *S. aureus*, полученных благодаря разработанным праймерам, совместно с определением чувствительности штаммов к препаратам бактериофагов, показал, что одна спейсерная последовательность способна защищать бактерию от разных видов фагов.
6. У штаммов *S. aureus* из сформированной коллекции выявлена прямая статистически значимая связь весьма высокой величины между антибиотикорезистентностью и устойчивостью к препаратам бактериофагов.
7. Разработанный биоинформационный алгоритм, расширяет представления о проблеме устройства CRISPR-системы *S. aureus* и может служить платформой для создания персонифицированной фаготерапии стафилококковых и других видов возбудителей бактериальных инфекций.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКза	- Дезоксирибонуклеаза
ИЛ-1	- интерлейкин 1
МГЭ / MGE	- мобильные генетические элементы / Mobile Genetic Elements
п.н.о.	- пары нуклотидных оснований
СТШ	- синдром токсического шока
IgG	- иммуноглобулин G
LA-MRSA	- метициллин-резистентный <i>Staphylococcus aureus</i> , выделенный от домашнего скота
MRSA	- метициллин-резистентный <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	- метициллин-чувствительных <i>Staphylococcus aureus</i>
ORF	- открытые рамки считывания
PAM	- протоспейсер смежный мотив
RNP	- рибонуклеиновый комплекс
SaPI	- острова патогенности <i>S. aureus</i>
SCC	- стафилококковые кассетные хромосомы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаев, И.В. Алгоритм расследования вспышек стафилококковой пищевой токсикоинфекции и стафилодермии новорожденных / И.В. Абаев [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т. 6. – № 3. – 238 С.
2. Абаев, И.В. Генотипирование изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных при эксфолиативном дерматите новорожденных / И.В. Абаев [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т. 16. – № 1. – С. 70–77.
3. Алешукина, А.В. Медицинская микробиология: учебное пособие / А. В. Алешукина. – Ростов н/Д : Феникс, 2003. – 472 с.
4. Асланов, Б.И. Бактериофаги - эффективные антибактериальные средства в условиях глобальной устойчивости к антибиотикам / Б.И. Асланов // Медицинский совет. – 2016. – № 13. – С. 106–111.
5. Асланов, Б.И. Бактериофаги: аспекты применения в акушерстве и гинекологии / Б.И. Асланов // Медицинский совет. – 2015. – № 20. – С. 78–81.
6. Бакшеева, С.С. Факторы патогенности *S. aureus*, выделенных от бактерионосителей, проживающих в условиях техногенного прессинга / С. С. Бакшеева, И.В. Сергеева // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 4. – С. 76–76.
7. Белобородов, В.Б. Стафилококковые инфекции / В.Б. Белобородов, С.Д. Митрохин // Инфекции и антимикробная терапия. – 2003. – Т. 5. – № 1. – С. 12–18.
8. Бехтерева, М.К. Место бактериофагов в терапии инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта *Consilium medicum* / М.К. Бехтерева, В.В. Иванова // Педиатрия. – 2014. – № 2. – С. 24–29.
9. Бондаренко, В.М. Новые горизонты бактериофаготерапии / В.М. Бондаренко // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). – 2013. – №4. – 10 с.
10. Великов, В.А. Молекулярная биология. Практическое руководство. Учеб. пособие для студ. биол. фак. и фак. нано- и биомед. технол., обучающихся по

- напр. «Биология (020400)», «Биоинженерия и биоинформатика (020501)» / В.А. Великов // Саратовский источник, 2013. – 84 с. – ISBN 978-5-91879-250-6.
11. Вишневский, А.А. Неспецифический остеомиелит позвоночника, вызванный метициллин-резистентным стафилококком: рациональная антибиотикотерапия / А.А. Вишневский, С.В. Бабак // Трудный пациент. – 2014. – Т.12. – № 3. – С.39–43.
 12. Воробьев, А.А. Медицинская и санитарная микробиология / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин, В.П. Ширококов. – М.: Академия, 2015. – 464 с.
 13. Габриэлян, Н.И. Возможности использования бактериофагов в хирургии и трансплантологии / Н.И. Габриэлян, Е.М. Горская, О.М. Цирульникова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2012. – Т 14. – № 1. – С. 106–113.
 14. Гаврилова, И.А. Сравнительная характеристика и взаимосвязь чувствительности/резистентности клинических изолятов бактерий рода *Staphylococcus* к антибиотикам и дезинфектантам / И.А. Гаврилова, Л.П. Титов // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб.науч.тр. – 2013. – №.6. – С.134–140.
 15. Герасимова, Н.А. Профиль генов вирулентности при полногеномном секвенировании урогенитального метициллин-резистентного штамма *Staphylococcus aureus* / Н.А. Герасимова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 1 (ч. 9) – С. 1795–1800.
 16. Глазовская, Л.С. Распространенность эпидемически значимых штаммов золотистого стафилококка на территории Кемеровской области / Л.С. Глазовская, Т.В. [и др.] // Инфекционные болезни. – 2011. – Т. 9. – С. 21–22.
 17. Годовалов, А.П. Выявление *Staphylococcus aureus* при изменении микробиоценоза толстой кишки / А.П. Годовалов [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2016. – Т. 12. – № 136. – С. 36–38.
 18. Гостев, В.В. Метициллинрезистентные золотистые стафилококки: проблема распространения в мире и России / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко / Фарматека. – 2015. – № 6. – С. 30–38.

19. Дерябин, Д.Г. Видовое разнообразие стафилококков в воздушной среде и организме носителей в условиях техногенного химического воздействия / Д.Г. Дерябин, Н.П. Фот // Гигиена и санитария. – 2005. – № 5. – С. 36–39.
20. Дзябко, А.Н. Преимущества многокомпонентных дезинфицирующих препаратов / А.Н. Дзябко // Медицинский альманах. – 2010. – Т 2. – № 11. – С. 280–283.
21. Дубовец, К. Н. Антибактериальная терапия инфекций, вызванных *Staphylococcus aureus* / К. Н. Дубовец // Военная медицина. – 2011. – №3. – С.111–124.
22. Дубовец, К.Н. Инфекции, вызванные *Staphylococcus aureus*: обзор рекомендаций по антибактериальной терапии / К.Н. Дубовец. // Клиническая инфектология и паразитология . – 2012 . – №2 . – С. 46–61 .
23. Елисеева И.И., Юзбашев М.М. Общая теория статистики: Учебник под ред. И. И. Елисеевой. 4-е издание, переработанное и дополненное / И.И. Елисеева, М.М. Юзбашев. – Москва: Финансы и Статистика, 2002. – 480 с.
24. Елистратова, Т. А. Пневмококковый менингит у взрослых: клинико-эпидемиологические и диагностические аспекты / Т. А. Елистратова [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2018. – Т. 17. – № 3. –С. 63–67.
25. Ефимова, Т.В. Эпидемиологические особенности инфекций, вызванных метициллинрезистентными *Staphylococcus aureus* в Кемеровской области / Т.В. Ефимова, Л.С. Глазовская, Е.Б. Брусина, А.Е. Гончаров // Мед. альманах. – 2011. – № 5. – С. 204–207.
26. Иванова , И. А. Бактериофаги и иммунная система макроорганизма / И. А. Иванова и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – № 6. – С. 79–84.
27. Иванченко, О.А. Хронический риносинусит: эпидемиология, классификация, этиология, патогенез. Современный взгляд на проблему / О.А. Иванченко, А.С. Лопатин // Вестник оториноларингологии. – 2012. – № 2. – С. 91–96.

28. Карпов А., Качанко Е. Стафилококковая инфекция: клинические аспекты и перспективы терапии / И.А. Карпов, Е.Ф. Качанко // Медицинские новости. – 2005. – №9. – 134 с.
29. Катер, Э. Бактериофаги: биология и практическое применение. – М.: Научный мир, 2012. – 640 с.
30. Каттер, Э. Бактериофаги: биология и практическое применение. Пер. с английского, коллектив переводчиков; науч. ред. А.В. Летаров / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. – М.: Научный мир, 2012. – 640 С.
31. Костюкевич, О.И. Применение бактериофагов в клинической практике: эпоха Возрождения / О.И. Костюкевич // РМЖ. – 2015. – № 21. – С. 1258–1262.
32. Кочетков, П.А. Ангина и острый фарингит/ П.А. Кочетков, А.С. Лопатин // Атмосфера. Пульмонология и аллергология: журнал для практикующих врачей. – 2005. – № 3. – С. 8–14.
33. Лазарева, Е.Б. Бактериофаги – история вопроса и современное состояние фаготерапии / Е.Б. Лазарева, Д.Д. Меньшиков // Медицинский алфавит. – 2014. – Т. 1. – № 4. – С. 43–48.
34. Летаров, А. 10 фактов о бактериальных инфекциях / А. Летаров / Троицкий вариант. – 2012. – Т.12. – № 106. – С. 7.
35. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. – М.: Минздрав России, 2005. – 62 с.
36. Николаев Ю. А. ОБРАЗОВАНИЕ И СВОЙСТВА КЛЕТОК-ПЕРСИСТЕРОВ БАКТЕРИЙ – ОБИТАТЕЛЕЙ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА, *STAPHYLOCOCCUS CAPITIS* И *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* / Ю. А. Николаев и др. // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – № 4. – стр. 432–443
37. Николаева, И.В. Лекарственная устойчивость штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных у детей с дисбактериозом кишечника / И.В. Николаева [и др.] // Журн. микробиол. – 2001. – №1. – С. 9–13.
38. Никулина, Е.А. Изменение микробиоценоза толстого кишечника при воспалительных заболеваниях, вызванных *Staphylococcus aureus* / Никулина, Е.А. [и др.] // Сборник научных статей участников Всероссийской научно-

практической конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты современной инфектологии». – 2016. – Т. 2. – С. 70–73.

39. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: Приказ № 535 МЗ СССР. - М., - 22.04.1985 г. - С. 15.

40. Пономаренко, С. В. Изучение чувствительности госпитальных штаммов *S. aureus* к действию дезинфектантов [Электронный ресурс] / С. В. Пономаренко [и др.] // Живые и биокосные системы. – 2015. – № 13. – Режим доступа: <http://www.jbks.ru/archive/issue-13/article-11>.

41. Токаева, Б.Т. Анализ чувствительности золотистого стафилококка к антибиотикам / Б.Т. Токаева [и др.] // Наука и здравоохранение. – 2014. – № 2. – 45с.

42. Хараева, З.Ф. Особенности внутрибольничных штаммов *Staphylococcus aureus* / З.Ф. Хараева [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 11 (часть 6). – С. 1316–1318.

43. Шамсутдинов, А.Ф. Распространенность токсигенных штаммов *Staphylococcus aureus* при атопическом дерматите / А.Ф. Шамсутдинов [и др.] // Практическая медицина. Аллергология Иммунология. Пульмонология – 2016. – №3.– С.68–72.

44. Шепелин А.П. Питательные среды для выявления стафилококков в клинической и санитарной микробиологии / А.П. Шепелин и др. // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2015.– № 4. – С.39-43.

45. Широкова, И.Ю. Распространенность и характеристика носительства *Staphylococcus aureus* у студентов медицинских вузов (двухцентровое исследование) / И.Ю. Широкова, Г.А. Шишкин, Т.В. Ефимова // Медицина в Кузбассе. – 2013. – № 2. – С. 79–83.

46. Шкарин, В.В. Региональный мониторинг устойчивости микроорганизмов к дезинфектантам / В.В. Шкарин // Ремедиум. – Приволжье. – 2012. – №6. – С.40–41.
47. Якупов, Т.Р. Молекулярная биотехнология. Биоинженерия. Учебное пособие / Т.Р. Якупов. – Казань: ФГБОУ ВО КГАВМ, 2016. – 138 с.
48. Яшаров, Ю.А. Абсцесс головного мозга: анализ 242 клинических наблюдений / Ю.А. Яшаров, В.И. Цымбалюк, И.П. Ткачик // Украинский нейрохирургический журнал. – 2015. – № 4. – С. 51–55.
49. Abaev, I. Draft Genome Sequences of Eight *Staphylococcus aureus* Strains Isolated during Foodborne Outbreaks / I. Abaev [et.al.] // Genome Announc. – V. 6. – N. 5. – P. e01557-17. – Doi: 10.1128/genomeA.01557-17.
50. Abatangelo, V. Broad-range lytic bacteriophages that kill *Staphylococcus aureus* local field strains / V. Abatangelo [et al.] // PLoS One. – 2017. – V.12. – № 7. – P. e0181671.
51. Abby, S.S. MacSyFinder: a program to mine genomes for molecular systems with an application to CRISPR-Cas systems / S.S. Abby [et al.] // PLoSOne. – 2014. –V.9. – № 10. – P. e110726.
52. Achaz, G. Origin and fate of repeats in bacteria / G. Achaz, E.P. Rocha, P. Netter, E. Coissac // Nucleic Acids Res. – 2002. – V. 30. – № 13. – P.2987–2994.
53. Ackermann, H.W. Bacteriophage electron microscopy / H.W. Ackermann // Adv Virus Res. – 2012. – N. 82. – P. 1-32. – Doi: 10.1016/B978-0-12-394621-8.00017-0.
54. Adeoye-Isijola, M. Vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus* in the nasal cavity of asymptomatic individuals: a potential public health challenge / M. Adeoye-Isijola [et al.] // Afr Health Sci. – 2020. – V. 20. – N. 3. – P. 1109-1117. Doi: 10.4314/ahs.v20i3.12.
55. Agarwal, N. History, evolution and classification of CRISPR-Cas associated systems / N. Agarwal, R. Gupta // Prog Mol Biol Transl Sci. – 2021. – N. 179. –P. 11-76. – Doi: 10.1016/bs.pmbts.2020.12.012.

56. Aiello, A.E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among US prisoners and military personnel: review and recommendations for future studies / Aiello A.E. [et al.] // *Lancet Infect. Dis.* – 2006. – N. 6. – P. 335 – 341.
57. Aisling, F. Brown. *Staphylococcus aureus* Colonization: Modulation of Host Immune Response and Impact on Human Vaccine Design / Aisling, F. Brown [et al.] // *TherAdv Infect Dis.* – 2014. Vol. 2 – N. 4. – P. 79–90.
58. Aksyuk, A.A. Bacteriophage Assembly / Aksyuk A. Anastasia, Michael G. Rossmann // *Viruses.* – 2011. – V3. – N. 3. – P. 172–203.
59. Alexis, M. Elward. Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Preventing Surgical Site Infections Following Plastic Surgery / Alexis M. Elward [et al.] // *Aesthetic Surgery Journal.* –2009. – V. 29. – N. 3. P. 232–244.
60. Alibayov, B. *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements / B. Alibayov [et al.] // *MolBiol Rep.* – 2014. – V. 41. – N. 8. – P. 5005-5018.
61. Alkhnabshi, O.S. Characterizing leader sequences of CRISPR loci / OS Alkhnabshi [et al.] // *Bioinformatics.* – 2016. – V. / 32. – № 17. – P. i576-i585.
62. Alkhnabshi, O.S. CRISPR-Cas bioinformatics / O.S. Alkhnabshi [et.al.] // *Methods.* – 2020. – N. 172. – P. 3–11. – Doi: 10.1016/j.ymeth.2019.07.013.
63. Alkhnabshi, O.S. CRISPRstrand: predicting repeat orientations to determine the crRNA-encoding strand at CRISPR loci / O.S. Alkhnabshi [et al.] // *Bioinformatics.* – 2014. – N. 30. – P. i489–i496.
64. Allen, H.K. Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments / H.K. Allen [et al.] // *Nature Reviews Microbiology.* – 2010. – N. 8. – P. 251–259.
65. Alós, J.I. Antibiotic resistance: A global crisis / J.I. Alós // *Enferm Infecc Microbiol Clin.* – 2015. – V. 33. – N. 10. – P. 692–699. – Doi: 10.1016/j.eimc.2014.10.004.
66. Alvarez, C.A. Nosocomial infections caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Colombia / C.A. Alvarez [et al.] // *Am J Infect Control.* – 2010. – V.38. – N. 4. – P. 315-318.

67. Aminov, R.I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future / R.I. Aminov [et al.] // *Front Microbiol.* – 2010. – N. 1. – P. 134.
68. Ansari, S. Recent advances in *Staphylococcus aureus* infection: focus on vaccine development / S. Ansari [et al.] // *Infect Drug Resist.* – 2019. – N. 12. – P. 1243–1255.
69. Anstead, G.M. Treatment of infections caused by resistant *Staphylococcus aureus* / G.M. Anstead [et al.] // *Methods Mol Biol.* – 2007. – N. 391. – P. 227-58.
70. Antri, K. High levels of *Staphylococcus aureus* and MRSA carriage in healthy population of algiers revealed by additional enrichment and multisite screening / K. Antri [et al.] // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* – 2018. – V. 37. – N. 8. – P. 1521–1529.
71. Ao, X. A Multiplex Genome Editing Method for *Escherichia coli* Based on CRISPR-Cas12a / Ao X. [et al.] // *Front Microbiol.* – 2018. – V. 9. – N. 9. – P. 2307.
72. Archana, G.J. Molecular characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients at a tertiary care hospital in Hyderabad, South India / Archana G.J. [et.al.] // *Indian J Med Microbiol.* – 2020. – V. 38. – N. 2. – P. 183-191. – Doi: 10.4103/ijmm.IJMM_20_151.
73. Asgeirsson, H. *Staphylococcus aureus* bacteraemia and endocarditis - epidemiology and outcome: a review / H. Asgeirsson, A. Thalme, O. Weiland // *Infect Dis (Lond).* – 2018. – V. 50. – N. 3. – P. 175-192. – Doi: 10.1080/23744235.2017.1392039.
74. Avershina, E. Dominant short repeated sequences in bacterial genomes / E. Avershina, K. Rudi // *Genomics.* – 2015. – V. 105. – N. 3. – P. 175–181. – Doi: 10.1016/j.ygeno.2014.12.009.
75. Ayukekbong, J.A. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies / J.A. Ayukekbong, M. Ntemgwa, A.N. Atabe // *Antimicrob Resist Infect Control.* – 2017. – N. 6. – P. 47.
76. Azam A.H. Peculiarities of *Staphylococcus aureus* phages and their possible application in phage therapy / A.H. Azam, Y. Tanji // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2019. – V.103. – 11. – P. 4279–4289. doi: 10.1007/s00253-019-09810-2.
77. Baba, T. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two

- major pathogenicity islands / T. Baba [et.al.] // J Bacteriol. – 2008. – V. 190. – N. 1. – P. 300-10. – Doi: 10.1128/JB.01000-07.
78. Baidara, P. Bacteriocins: perspective for the development of novel anticancer drugs / P. Baidara, S. Korpole, V. Grover // Appl Microbiol Biotechnol. – 2018. – V. 102. – N. 24. – P. 10393-10408. – Doi: 10.1007/s00253-018-9420-8.
79. Bamberger D.M. Bacteremia and endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the potential role of daptomycin / D.M. Bamberger // TherClin Risk Manag. – 2007. – V. 3. – N. 4. – P. 675–684.
80. Bao, Zhirong. Automated De Novo Identification of Repeat Sequence Families in Sequenced Genomes / Zhirong Bao, Sean R. Eddy // Genome Res. – 2002. – V. 12. – N. 8. – P. 1269–1276.
81. Baranovich, T. The first isolation of Panton-Valentine leukocidin (PVL) positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) in Russia / T. Baranovich, V. Potapov, T. Yamamoto // Euro Surveill. – 2007. – V. 12. – N. 3. – P. E0703154.
82. Barrangou, R. The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond / R. Barrangou [et al.] // Current Opinion in Immunology. – 2015. – N. 32. – P. 36–41.
83. Barrangou, R. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes / R. Barrangou // Science. – 2007. – V. 315. – N. 5819. – P. 1709–1712.
84. Bart, N. G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview for manual therapists / N.G. Bart [et al.] // J Chiropr Med. – 2009. – V. 11. – N. 1. – P 64–76.
85. Basgall, E.M. Gene drive inhibition by the anti-CRISPR proteins AcrIIA2 and AcrIIA4 in *Saccharomyces cerevisiae* / Basgall E.M. [et al.] // Microbiology. – 2018. – V. 164. – N. 4.: – P. 464–474.
86. Bebeacua, C. Structure, Adsorption to Host, and Infection Mechanism of Virulent Lactococcal Phage p2 / C. Bebeacua, D. Tremblay // J Virol. – 2013. – V. 87. – N. 22. – P. 12302–12312.
87. Belkum, A. Next-Generation Antimicrobial Susceptibility Testing / A. Belkum, W.M. Dunne // J ClinMicrobiol. – 2013. – V. 51. – N. 7. – P. 2018–2024.

88. Beloglazova, N. A novel family of sequence-specific endoribonucleases associated with the clustered regularly interspaced short palindromic repeats / N. Beloglazova [et al.] // *J Biol Chem.* – 2008. – V. 283. – № 29. – P.20361-71.
89. Belyhun, Y. Ocular bacterial infections and antibiotic resistance patterns in patients attending Gondar teaching hospital, Northwest Ethiopia / Y. Belyhun [et al.] // *BMC Res Notes.* – 2018. – N. 11. – P. 597.
90. Ben H. Burrowes. Directed in Vitro Evolution of Therapeutic Bacteriophages: The Appelmans Protocol / H. Burrowes. Ben [et al.] // *Viruses.* – 2019. – V.11. – N. 3.–P. 241.
91. Bengtsson, B. Antibiotic resistance–consequences for animal health, welfare, and food production / B. Bengtsson, C. Greko // *Ups J Med Sci.* – 2014. – V. 119. – N. 2. – P. 96–102.
92. Biswas, A. Accurate computational prediction of the transcribed strand of CRISPR non-coding RNAs / A. Biswas, P.C. Fineran, C.M. Brown // *Bioinformatics.* – 2014. – V. 30. – N. 13. – P. 1805–1813.
93. Biswas, A. Biswas A, Staals RH, Morales SE, Fineran PC, Brown CM. CRISPRDetect: A flexible algorithm to define CRISPR arrays. *BMC Genomics.* 2016 May 17;17:356. doi: 10.1186/s12864-016-2627-0.
94. Biswas, A. CRISPRTarget: bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets / A. Biswas [et al.] // *RNA Biol.* – 2013. – V. 10. – N. 5. – P. 817-827.
95. Bland, C. CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats / C. Bland [et al.] // *BMC Bioinformatics.* – 2007. – V. 18. – N. 8. – P. 209.
96. Bolotin, A. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin / A. Bolotin [et al.] // *Microbiology.* – 2005. – V. 151. – № 8. – P 2551–2561.
97. Bondy-Denomy, J. To acquire or resist: the complex biological effects of CRISPR-Cas systems / J. Bondy-Denomy, A.R. Davidson / *Trends Microbiol.* –2014. – V. 22. – N. 4. – P. 218–225. – Doi: 10.1016/j.tim.2014.01.007.

98. Borg, M.A. What Is Driving the Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Europe? / M.A. Borg, L. Camilleri // *Microb Drug Resist.* – 2021. – V. 27. – N. 7. – P. 889-894. – Doi: 10.1089/mdr.2020.0259. Epub 2020 Dec 18. PMID: 33337277.
99. Borges, A.L. The Discovery, Mechanisms, and Evolutionary Impact of Anti-CRISPRs / Borges A.L. [et al.] // *Annu Rev Virol.* – 2017. – V. 4. – N. 1. – P. 37-59
100. Boyer, R.S. A fast string searching algorithm / R.S. Boyer, J.S. Moore // *Communications of the ACM.* – 1977. – V. 20. – N. 10. – P. 762-772.
101. Bubeck, F. Engineered anti-CRISPR proteins for optogenetic control of CRISPR-Cas9 / F. Bubeck [et.al.] // *Nat Methods.* – 2018. – V. 15. – N. 11. – P. 924-927. – Doi: 10.1038/s41592-018-0178-9.
102. Bamberger, D.M. Management of *Staphylococcus aureus* Infections / D.M. Bamberger, S.E. Boyd // *Am Fam Physician.* – 2005. – V. 72. – N. 12. – P. 2474-2481.
103. Cady, K.C. The CRISPR/Cas Adaptive Immune System of *Pseudomonas aeruginosa* Mediates Resistance to Naturally Occurring and Engineered Phages / K.C. Cady [et al.] // *J Bacteriol.* – 2012. – V. 194. – N. 21. – P. 5728-5738.
104. Cantas, L. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota / L. Cantas [et al.] // *Front Microbiol.* – 2013. – V. 14. – N. 4. – P. 96.
105. Cao, L. Identification and functional study of type III-A CRISPR-Cas systems in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* / L. Cao [et al.] // *Int J Med Microbiol.* – 2016. – V. 306. – N. 8. – P. 686-696.
106. Carte, J. Binding and cleavage of CRISPR RNA by Cas6 / J. Carte [et al.] // *RNA.* – 2010. – V. 16. – N. 11. – P. 2181–2188.
107. Cha, Y. Characterization and Genome Analysis of *Staphylococcus aureus* Podovirus CSA13 and Its Anti-Biofilm Capacity / Y. Cha, J. Chun, B. Son, S. Ryu // *Viruses.* – 2019. – V. 11. – N. 1. – P. 54. – Doi: 10.3390/v11010054.
108. Chakraborty, S.P. Biochemical characters and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates / S.P. Chakraborty [et al.] // *Asian Pac J Trop Biomed.* – 2011. - V. 1. – N. 3. – P 212–216.

109. Chan, B.K. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa* / B.K. Chan [et al.] // *Sci Rep.* – 2016. – N. 6. – P. 26717.
110. Charan, D. Study of Antibiotic Resistance Pattern in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* with Special Reference to Newer Antibiotic / D. Charan [et al.] // *J Glob Infect Dis.* – 2015. – V. 7. – N. 2. – P. 78–84.
111. Chattopadhyay, M.K. Use of antibiotics as feed additives: a burning question / M.K. Chattopadhyay // *Front Microbiol.* – 2014. – N. 5. – P. 334.
112. Chaudhary, K. Anti-CRISPR proteins: Counterattack of phages on bacterial defense (CRISPR/Cas) system / K. Chaudhary, A. Chattopadhyay, D. Pratap // *J Cell Physiol.* – 2018. – V. 233. – N. 1. – P. 57-59.
113. Childs, L.M. CRISPR-induced distributed immunity in microbial populations / L.M. Childs [et al.] // *PLoS ONE.* – 2014. – N. 9. – P. e101710.
114. Chou-Zheng, L. A Type III-A CRISPR-Cas system employs degradosome nucleases to ensure robust immunity / L. Chou-Zheng, A. Hatoum-Aslan // *eLife.* – 2019. – N. 8. – P. e45393.
115. Chou-Zheng, L. Expression and Purification of the Cas10-Csm Complex from *Staphylococci* / L. Chou-Zheng, A. Hatoum-Aslan // *Bio Protoc.* – 2017. – V. 7. – N. 11. – P. e2353.
116. Chowdhury, S. Structure Reveals Mechanisms of Viral Suppressors that Intercept a CRISPR RNA-Guided Surveillance Complex / S. Chowdhury [et al.] // *Cell.* – 2017. – V. 169. – N. 1. – P. 47–57.
117. Chylinski, K. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems / K. Chylinski, K.S. Makarova, E. Charpentier, E.V. Koonin // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – N. 42. – P. 6091–6105.
118. Cong, L. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems / L. Cong [et al.] // *Science.* – 2013. – N. 339. – P. 819–823.
119. Cooper, LA. Determining the Specificity of Cascade Binding, Interference, and Primed Adaptation *In Vivo* in the *Escherichia coli* Type I-E CRISPR-Cas System / L.A. Cooper, A.M. Stringer, J.T. Wade // *mBio.* – 2018. – V. 9. – No. 2. – P. e02100-17. doi: 10.1128/mBio.02100-17.

120. Couvin, D. CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins / D. Couvin [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – V. 46. – N. W1. – P. W246–W251.
121. Couvin, D. CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins / D. Couvin [et.al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – V. 46. – N. W1. – P. W246-W251.
122. Crawley, A. CRISPRdisco: an automated pipeline for the discovery and analysis of CRISPR-Cas systems / A. Crawley, J.R. Henriksen, R. Barrangou // *CRISPR J.* – 2018. – V. 1. – N. 2. – P. 171-181.
123. Creech, C.B. Prevention of Recurrent *Staphylococcal* Skin Infections / C.B. Creech, D.N. Al-Zubeidi, S.A. Fritz // *Infect Dis Clin North Am.* – 2015. – V. 29. – N. 3. – P 429–464.
124. Crowley, V.M. A Type IV-A CRISPR-Cas System in *Pseudomonas aeruginosa* Mediates RNA-Guided Plasmid Interference *In Vivo* / V.M. Crowley [et.al.] // *CRISPR J.* – 2019. – V. 2. – N. 6. – N. 434-440. – Doi: 10.1089/crispr.2019.0048.
125. D. Gusfield. Algorithms on Strings, Trees and Sequences: Computer Science and Computational Biology, by D. Gusfield; Cambridge University Press, 1997. – P. 326. ISBN 0-521-58519-8
126. Dąbrowska, K. Facing Antibiotic Resistance: *Staphylococcus aureus* Phages as a Medical Tool / K. Dąbrowska [et al.] // *Viruses.* – 2014. – V. 6. – N. 7. – P. 2551–2570.
127. David, M.Z. Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections / M.Z. David [et al.] // *Curr Top MicrobiolImmunol.* – 2017. – N. 409. – P. 325–383.
128. Deghorain, M. The *Staphylococci* Phages Family: An Overview / M. Deghorain, L.V. Melderren // *Viruses.* – 2012. – V. 4. – N. 12. – P. 3316–3335.
129. Deguchi, H. The trend of resistance to antibiotics for ocular infection of *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative *staphylococci*, and *corynebacterium* compared with 10-years previous: a retrospective observational study / H. Deguchi [et al.] // *PLoS One.* – 2018. – V. 13. – N. 9. – P. e0203705.

130. DeLeo, F.R. Host Defense and Pathogenesis in *Staphylococcus aureus* Infections / F.R. DeLeo, B.A. Diep, M. Otto // *Infect Dis Clin North Am.* – 2009. – V. 23. – N 1. – P. 17–34.
131. Delihias, N. Impact of small repeat sequences on bacterial genome evolution / N. Delihias // *Genome Biol Evol.* – 2011. – N. 3. – P. 959–973. – Doi: 10.1093/gbe/evr077. Epub 2011 Jul 29.
132. Deresinski, S. Antistaphylococcal vaccines and immunoglobulins: current status and future prospects / S. Deresinski // *Drugs.* – 2006. – V. 66. – N. 14. –P. 1797-806. – Doi: 10.2165/00003495-200666140-00002.
133. Dhruva, J. Sengupta. Whole-Genome Sequencing for High-Resolution Investigation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Epidemiology and Genome Plasticity / J. Sengupta Dhruva [et al.] // *J ClinMicrobiol.* – 2014. – V. 52. – N. 8. – P 2787–2796.
134. Dickmann, P. Communicating the Risk of MRSA: The Role of Clinical Practice, Regulation and Other Policies in Five European Countries / P. Dickmann [et al.] // *Front Public Health.* – 2017. – N. 5. – P. 44.
135. Diez-Villasenor, C. CRISPR-spacer integration reporter plasmids reveal distinct genuine acquisition specificities among CRISPR-Cas I-E variants of *Escherichia coli* / C. Diez-Villasenor [et al.] // *RNA Biology.* – 2013. – V. 10. – N. 5. – P.792–802.
136. Dion, M.B. CRISPRStudio: A User-Friendly Software for Rapid CRISPR Array Visualization / M.B. Dion [et.al.] // *Viruses.* – 2018. – V. 10. – N. 11. – P. 602.
137. Dong, Chuan. Anti-CRISPRdb: a comprehensive online resource for anti-CRISPR proteins / Chuan Dong [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – N. 46. – P. D393–D398.
138. Drulis-Kawa, Z. Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications / Z. Drulis-Kawa // *Curr Protein Pept Sci.* – 2012. – V. 13. – N. 8. – P. 699-722. – Doi: 10.2174/138920312804871193.
139. Dsouza, M. Searching for patterns in genomic data / M. Dsouza, N. Larsen, R. Overbeek // *Trends Genet.* – 1997. – V. 13. – N. 12. – P. 497–498.

140. Dsouza, M. Searching for patterns in genomic data / M. Dsouza, N. Larsen, R. Overbeek // Trends Genet. – 1997. – V. 13. – N. 12. – P. 497-498. – Doi: 10.1016/s0168-9525(97)01347-4. PMID: 9433140.
141. Edgar, R. PILER-CR: fast and accurate identification of CRISPR repeats / R. Edgar // BMC Bioinformatics. – 2007. – N. 8. – P. 18.
142. Edgar, R. Reversing Bacterial Resistance to Antibiotics by Phage-Mediated Delivery of Dominant Sensitive Genes / R. Edgar [et al.] // Appl Environ Microbiol. – 2012. – V. 78. – N. 3. – P. 744–751.
143. Edwards, A.M. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization / A.M. Edwards, R.C. Massey, S.R. Clarke // MolOralMicrobiol. – 2012. – V. 7. – N. 1. – P1–10.
144. Eells, S.J. Body site *Staphylococcus aureus* colonization among maintenance hemodialysis patients / S.J. Eells [et al.] // Nephron. – 2015. – V. 129. – V 2. – P 79-83.
145. Eggertson, L. Hospitals to report C. difficile and MRSA / L. Eggertson // CMAJ. – 2007. – V.176. – N. 10. – P. 1402–1403.
146. El-Gebali, S. The Pfam protein families database in 2019 / S. El-Gebali [et.al.] // Nucleic Acids Res. – 2019. – V. 47. – N. D1. – P. D427-D432. – Doi: 10.1093/nar/gky995.
147. Ellinger, P. The crystal structure of the CRISPR-associated protein Csn2 from *Streptococcus agalactiae* / P. Ellinger [et al.] // J Struct Biol. – 2012. – V. 178. – N. 3. – P. 350-362.
148. Ellis, M. W. Natural History of Community Acquired Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization and Infection in Soldiers / M. W. Ellis // Clinical Infectious Diseases. – 2004. – N. 39. – P. 971 – 979.
149. Eric, J. G. Pollitt. *Staphylococcus aureus* infection dynamics / J. G. Pollitt Eric // PLoS Pathog. – 2018. – V. 14. – N. 6. – P. e1007112.
150. Fagerlund, R.D. Spacer capture and integration by a type I-F Cas1-Cas2-3 CRISPR adaptation complex / R.D. Fagerlund [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2017. – V. 114. – N. 26. – P. E5122–E5128.

151. Fernandez Guerrero, M.L. Endocarditis Caused by *Staphylococcus aureus*: A Reappraisal of the Epidemiologic, Clinical, and Pathologic Manifestations with Analysis of Factors Determining Outcome / M.L. Fernandez Guerrero // *Medicine*. – 2009. – V. 88. – N. 1. – P. 1-22.
152. Fitzgerald, J.R. Genome diversification in *Staphylococcus aureus*: Molecular evolution of a highly variable chromosomal region encoding the Staphylococcal exotoxin-like family of proteins / J.R. Fitzgerald [et.al.] *Infect Immun*. // – V. 71. – N. 5. – P. 2827-38. – Doi: 10.1128/IAI.71.5.2827-2838.2003.
153. Fortier L.C. Phage production and maintenance of stocks, including expected stock lifetimes / L.C. Fortier, S. Moineau // *Methods Mol Biol*. – 2009. –N. 501. – P. 203-19. – Doi: 10.1007/978-1-60327-164-6_19.
154. Foster, T.J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects / T.J. Foster [et al.] // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2017. – V. 41. – N. 3. – P. 430–449.
155. Friedman, N.D. The negative impact of antibiotic resistance / N.D. Friedman // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2016 – V. 22. – N. 5. – P. 416-422.
156. Fu, Y. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs / Y. Fu [et al.] // *Nat. Biotechnol*. – 2014. – N. 32. – P. 279–284.
157. Garrett, S.C. Pruning and Tending Immune Memories: Spacer Dynamics in the CRISPR Array / S.C. Garrett // *Front Microbiol*. – 2021. – N. 12. – P. 664299.
158. Ge, R. CRISPRdigger: detecting CRISPRs with better direct repeat annotations / R. Ge [et al.] // *Sci Rep*. – 2016. – N. 6. – P. 32942.
159. Geriak, M. Clinical Data on Daptomycin plus Ceftaroline versus Standard of Care Monotherapy in the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia / Geriak, M. [et.al.] // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2019. – 63. – N. 5. – P. e02483-18. – Doi: 10.1128/AAC.02483-18.
160. Giersing, B.K. Status of vaccine research and development of vaccines for *Staphylococcus aureus* / B.K. Giersing [et al.] // *Vaccine*. – 2016. – V. 34. – N. 26. – P. 2962-2966.

161. Giulieri, S.G. Using genomics to understand meticillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infections / S.G. Giulieri, S.Y.C. Tong, D.A. Williamson // *Microb Genom.* – 2020. – V. 6. – N. 1. – doi: 10.1099/mgen.0.000324.
162. Gleditsch, D. PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures / D. Gleditsch [et al.] // *RNA Biol.* – 2018. – N. 18. – P. 1-14.
163. Goldberg, G.W. Conditional tolerance of temperate phages via transcription-dependent CRISPR-Cas targeting / G.W. Goldberg [et al.] // *Nature.* – 2014. – N. 514. – P. 633-637.
164. Golkar, Z. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis / Z. Golkar, O. Bagasra, D.G. Pace // *J Infect Dev Ctries.* – 2014. – V. 8. – N. 2. – P. 129-36. – Doi: 10.3855/jidc.3573.
165. Gonzalez-Menendez, E. Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of *Staphylococcus* phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products / E. Gonzalez-Menendez [et al.] // *PLoS One.* – 2018. – V. 13. – N. 10. – P. e0205728.
166. Gordillo, Altamirano F.L. Phage Therapy in the Postantibiotic Era / F.L. Gordillo, J.J. Altamirano // *Barr Clin Microbiol Rev.* – 2019. – V. 32. – N. 2. – P. e00066-18. – Doi: 10.1128/CMR.00066-18.
167. Górski A. Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy / A. Górski [et.al.] // *Adv. Virus Res.* – 2012. – N. 83. – P. 41–71.
168. Gostev V. Molecular epidemiology and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation / V. Gostev [et.al.] // *Infect Genet Evol.* – 2017. – N. 53. – P. 189-194. – Doi: 10.1016/j.meegid.2017.06.006.
169. Gouyon, J.B. Nosocomial *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* septicemias in neonates / J.B. Gouyon [et al.] // *Ann Pediatr (Paris).* – 1990. – V. 37. – N. 1. – P 21–25.

170. Grissa, I. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats / I. Grissa, G. Vergnaud, C. Pourcel // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – N. 35. – P. W52–57. – Doi: 10.1093/nar/gkm360.
171. Grissa, I. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats / I. Grissa, G. Vergnaud, C. Pourcel // *BMC bioinformatics.* – 2007. – N. 8. – P. 172.
172. Guan, J. Chromosomal Targeting by the Type III-A CRISPR-Cas System Can Reshape Genomes in *Staphylococcus aureus* / J. Guan, W. Wang, B. Sun // *mSphere.* – 2017. – V. 2. – N. 6. – P. e00403-17. – Doi: 10.1128/mSphere.00403-17.
173. Guinan, M.E. Vaginal colonization with *Staphylococcus aureus* in healthy women: a review of four studies / M.E. Guinan [et al.] // – 1982. – V. 96. – N. 6. – P. 944–947.
174. Gur-Arie Riva. Simple Sequence Repeats in *Escherichia coli*: Abundance, Distribution, Composition, and Polymorphism / Gur-Arie Riva [et al.] // *Genome Res.* – 2000. – V. 10. – N. 1. – P. 62–71.
175. Haft, D.H. The TIGRFAMs database of protein families/ D.H. Haft, J.D. Selengut, O. White // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31. – N. 1. – P. 371–373.
176. Han, W. A type III-B CRISPR-Cas effector complex mediating massive target DNA destruction / W. Han [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45. – N. 4. – P. 1983–1993.
177. Hanssen, A.M. Localization of *Staphylococcus aureus* in tissue from the nasal vestibule in healthy carriers / A.M. Hanssen [et al.] // *BMC Microbiol.* – 2017. – V. 17. – N. 1. – P. 89.
178. Haque, M. Self-medication of antibiotics: investigating practice among university students at the Malaysian National Defence University / M. Haque [et.al.] // *Infect Drug Resist.* – 2019. – N. 12. – P. 1333-1351. – Doi: 10.2147/IDR.S203364.
179. Hargreaves, K.R. Abundant and Diverse Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat Spacers in *Clostridium difficile* Strains and Prophages Target Multiple Phage Types within This Pathogen / K.R. Hargreaves [et al.] // *mBio.* – 2014. – V. 5. – N. 5. – P. e01045–13–e01045–13.

180. Harper, D.R. Introduction to Bacteriophages / D.R. Harper // Bacteriophages. – Cham: Springer. – 2020. – Doi:10.1007/978-3-319-40598-8_48-2.
181. Harrington, L.B. A scoutRNA Is Required for Some Type V CRISPR-Cas Systems / L.B. Harrington [et.al.] // Mol Cell. – 2020. – V. 79. – N.3. – P. 416-424.e5. – Doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.022.
182. Hartman, B.J. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* / B.J. Hartman, A. Tomasz // J. Bacteriol. – 1984. – V. 158. – N. 2. – P. 513–516.
183. Hassoun, A. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment / A. Hassoun, P. Linden, B. Friedman // Crit Care. – 2017. – N. 21. – P. 211.
184. Hatoum-Aslan, A. Phage Genetic Engineering Using CRISPR–Cas Systems / A. Hatoum-Aslan // Viruses. – 2018. – V. 10. – N. 6. – P. 335.
185. He, F. CRISPR-Cas type I-A Cascade complex couples viral infection surveillance to host transcriptional regulation in the dependence of Csa3b / F. He [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2017. – V. 45. – N. 4. – P. 1902–1913.
186. He, H. *Staphylococcus aureus* Pneumonia in the Community / H. He, R.G. Wunderink // Semin Respir Crit Care Med. – 2020. – V. 41. – N. 4. – P. 470-479. – Doi: 10.1055/s-0040-1709992.
187. He, Y. Cas1 and Cas2 From the Type II-C CRISPR-Cas System of *Riemerella anatipestifer* Are Required for Spacer Acquisition / He Y. [et al.] // Front Cell Infect Microbiol. – 2018. – N. 8. – P. 195.
188. Heigwer, F. E-CRISP: fast CRISPR target site identification / F. Heigwer, G. Kerr, M. Boutros // Nat Methods. – 2014. – V. 11. – N. 2. – P. 122–123. – Doi: 10.1038/nmeth.2812. PMID: 24481216.
189. Hidalgo-Cantabrana, C. Characterization and applications of Type I CRISPR-Cas systems / C. Hidalgo-Cantabrana, R. Barrangou // Biochem Soc Trans. – 2020. – V. 48. – N. 1. – P. 15-23. – Doi: 10.1042/BST20190119.

190. Hille, F. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance / F. Hille, E. Charpentier // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2016. – V. 371. – N. 1707. – P. 20150496.
191. Hiramatsu, K. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy / K. Hiramatsu [et.al.] // *J Infect Chemother.* – 2014. – V. 20. – N. 10. – P. 593-601. – Doi: 10.1016/j.jiac.2014.08.001.
192. Hochstrasser, M.L. CasA mediates Cas3-catalyzed target degradation during CRISPR RNA-guided interference / M.L. Hochstrasser [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2014. – V. 111. – N. 18. – P. 6618–6623.
193. Hoge, C. A basic dynamic transmission model of *Staphylococcus aureus* in the US population / C. Hoge, T. van Effelterre, C.J. Acosta // *Epidemiol Infect.* – 2014. – V. 142. – N. 3. – P. 668–78. – Doi: 10.1017/S0950268813001106.
194. Holt, D.C. A very early-branching *Staphylococcus aureus* lineage lacking the carotenoid pigment staphyloxanthin / D.C. Holt [et al.] // *Genome Biol. Evol.* – 2011. – N. 3. – P. 881–895.
195. Hoover, D.G. Function of cell wall teichoic acid in thermally injured *Staphylococcus aureus* / D.G. Hoover, R.J. Gray // *J Bacteriol.* – 1977. – V. 131. – N. 2. – P 477–485.
196. Hrle, A. Structure and RNA-binding properties of the type III-A CRISPR-associated protein Csm3 / A. Hrle [et al.] // *RNA Biol.* – 2013. – V. 10. – N. 11. – P. 1670-1678.
197. Hwang, W.Y. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR–Cas system / W.Y. Hwang [et al.] // *Nat Biotechnol.* – 2013. – N. 31. – P. 227–229.
198. Hynes, A.P. Widespread anti-CRISPR proteins in virulent bacteriophages inhibit a range of Cas9 proteins / Hynes A.P. [et al.] // *Nat Commun.* – 2018. – V. 9. – N. 1. – P. 2919.
199. Ichikawa, H.T. Programmable type III-A CRISPR-Cas DNA targeting modules / H.T. Ichikawa [et al.] // *PLoS One.* – 2017. – V. 12. – N. 4. – P. e0176221.

200. Ingmer H. Temperate Phages of *Staphylococcus aureus* / H. Ingmer, D. Gerlach, C. Wolz // Microbiol Spectr. – 2019. – V. 7. – N. 5. – Doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0058-2018.
201. Jacquin, A.L.S. Crisflash: open-source software to generate CRISPR guide RNAs against genomes annotated with individual variation / A.L.S. Jacquin, D.T. Odom, M. Lukk // Bioinformatics. – 2019. – V. 35. – N. 17. – P. 3146-3147. – Doi: 10.1093/bioinformatics/btz019.
202. Jain, I. Defining the seed sequence of the Cas12b CRISPR-Cas effector complex / I. Jain [et al.] // RNA Biol. – 2018. – N. 17. – P. 1-10.
203. Jansen, R. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes / R. Jansen, J.D. Embden, W. Gaastra, L.M. Schouls // MolMicrobiol. – 2002. – N. 43. – P. 1565–1575.
204. Javed, M.R. CRISPR-Cas System: History and Prospects as a Genome Editing Tool in Microorganisms / M.R. Javed [et.al.] // Curr Microbiol. – 2018. – V. 75. – N. 12. – P. 1675-1683. – Doi: 10.1007/s00284-018-1547-4.
205. Jia, H. Characterization and complete genome sequence analysis of *Staphylococcus aureus* bacteriophage JS01 / H. Jia [et.al.] // Virus Genes. – 2015. – V. 50. – N. 2. – P. 345-348. – Doi: 10.1007/s11262-015-1168-y.
206. Jisun, Sun. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* in Growing Pigs in the USA / Sun Jisun [et al.] // PLoS One. – 2015. – V. 10. – N 11. – P. e0143670.
207. Ka, D. Crystal structure of an anti-CRISPR protein, AcrIIA1 / D. Ka, S.Y. An, J.Y. Suh, E. Bae // Nucleic Acids Res. – 2018. – V. 46. – N. 1. – P. 485-492.
208. Ka, D. Molecular organization of the type II-A CRISPR adaptation module and its interaction with Cas9 via Csn2 / D. Ka, S.Y. An, J.Y. Suh, E. Bae // Nucleic Acids Res. – 2018. – V. 46. – N. 18. – P. 9805-9815.
209. Kadariya, J. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health [Электронный ресурс] / Kadariya J. [et al.] // Biomed Res Int. – 2014. – Режим доступа: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/827965/>

210. Karauzum, H. Adaptive Immunity Against *Staphylococcus aureus* / H. Karauzum, S.K. Datta // Curr Top Microbiol Immunol. – 2017. – N. 409. – P. 419-439.
211. Karlsson, F. The Mechanism of Bacterial Infection by Filamentous Phages Involves Molecular Interactions between TolA and Phage Protein 3 Domains / Karlsson F. [et al.] // J Bacteriol. – 2003. – V. 185. – N. 8. – P. 2628–2634.
212. Karmakar, A. Biochemical and Molecular Analysis of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates from Hospitalized Patients / A. Karmakar, P. Dua, C. Ghosh // Asian Pac J Trop Biomed. – 2011. – V. 1. – N. 3. – P. 212–216.
213. Kato-Inui, T. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 with improved proof-reading enhances homology-directed repair / T. Kato-Inui, G. Takahashi, S. Hsu, Y. Miyaoka // Nucleic Acids Res. – 2018. – V. 46. – N. 9. – P. 4677–4688.
214. Katti, M.V. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences / M.V. Katti, P.K. Ranjekar, V.S. Gupta // MolBiolEvol. – 2001. – N. 18. – P. 1161–1167.
215. Kavanagh, K.T. The incidence of MRSA infections in the United States: is a more comprehensive tracking system needed? / K.T. Kavanagh, S. Abusalem, L.E. Calderon // Antimicrob Resist Infect Control. – 2017. – N. 6. – P. 34. – Doi: 10.1186/s13756-017-0193-0.
216. Kazimoto, T. Causative agents and antimicrobial resistance patterns of human skin and soft tissue infections in Bagamoyo, Tanzania / T. Kazimoto [et al.] // Acta Trop. – 2018. – N. 186. – P. 102–106.
217. Khamash, D.F. Increasing clindamycin and trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in pediatric *Staphylococcus aureus* infections / Khamash D.F. [et al.] // J Pediatric Infect Dis Soc. – 2019. – V. 8. – N. 4. – P. 351-353.
218. Kieper, S.N. Cas4 Facilitates PAM-Compatible Spacer Selection during CRISPR Adaptation / S.N. Kieper [et al.] // Cell Rep. – 2018. – V. 22. – N. 13. –P. 3377-3384.
219. Kimberley, D.S. Experimental Bacteriophage Therapy Increases Survival of *Galleria mellonella* Larvae Infected with Clinically Relevant Strains of the

- Burkholderia cepacia* Complex / D.S Kimberley, J.D. Jonathan // ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY. – 2009. –V. 53. – N. 5. –P. 2205–2208.
220. Kluytmans, J. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks / J. Kluytmans, A. van Belkum, H. Verbrugh // Clin. Microbiol. Rev. – 1997. – V. 10. – N. 3. – P. 505–520.
221. Knezevic, P. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Inoviridae* / P. Knezevic, E.M. Adriaenssens // J Gen Virol. – 2021. – V. 102. – N. 7. – Doi: 10.1099/jgv.0.001614.
222. Knox, J. *Staphylococcus aureus* infections: transmission within households and the community / J. Knox, A.C. Uhlemann, F.D. Lowy // Trends Microbiol. –2015. – 23. – 7. – P. 437-44. – Doi: 10.1016/j.tim.2015.03.007.
223. Kondrateva, E. An overview of currently available molecular Cas-tools for precise genome modification / E.Kondrateva [et.al.] // Gene. – 2021. – N. 769. –P. 145225. – Doi: 10.1016/j.gene.2020.145225.
224. Koo, Y. Crystal structure of *Streptococcus pyogenes* Csn2 reveals calcium-dependent conformational changes in its tertiary and quaternary structure / Y. Koo, D.K. Jung, E. Bae // PLoS One. – 2012. – N. 7. – P. e33401.
225. Koonin, E.V. CRISPR- Cas: evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes // E.V. Koonin, K.S. Makarova // RNA Biol. – 2013. – N. 10. – P. 679–686.
226. Koonin, E.V. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems / E.V. Koonin, K.S. Makarova, F. Zhang // CurrOpinMicrobiol. – 2017. – N. 37. – P. 67–78.
227. Koonin, E.V. Mobile Genetic Elements and Evolution of CRISPR-Cas Systems: All the Way There and Back / E.V. Koonin, K.S. Makarova // Genome Biol Evol. – 2017. – V. 9. – N. 10. – P. 2812-2825.
228. Koskela, K.A. Generation of a CRISPR database for *Yersinia pseudotuberculosis* complex and role of CRISPRbased immunity in conjugation / K.A. Koskela [et al.] // Environmental Microbiology, Wiley-Blackwell. – 2015. – V. 17. – N. 11. – P. 4306-4321.

229. Krupovic, M. Casposons: a new superfamily of self-synthesizing DNA transposons at the origin of prokaryotic CRISPR-Cas immunity / Krupovic M. [et al.] // *BMC Biology*. – 2014. – N. 12. – P.36.
230. Krupovic, M. Casposons: mobile genetic elements that gave rise to the CRISPR-Cas adaptation machinery / M. Krupovic, P. Beguin, E.V. Koonin // *Curr Opin Microbiol*. – 2017. – N. 38. – P. 36–43.
231. Kunin, V. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats / V. Kunin, R. Sorek, P. Hugenholtz // *Genome Biol*. – 2007. – V. 8. – N. 4. – P. R61.
232. Kupczok, A. The Contribution of Genetic Recombination to CRISPR Array Evolution / A. Kupczok, G. Landan, T. Dagan // *Genome BiolEvol*. – 2015. – V. 7. – N. 7. – P. 1925–1939.
233. Kuroda, M. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* / M. Kuroda [et.al.] // *Lancet*. – 2001. – V. 357. – N. 9264. – P. 1225-40. – Doi: 10.1016/s0140-6736(00)04403-2.
234. Lacey, K.A. The Role of *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in Skin Infection and Their Potential as Vaccine Antigens / K.A. Lacey, J.A. Geoghegan, R.M. McLoughlin // *Pathogens*. – 2016. – V. 5. – N. 1. – P. 22.
235. Landsberger, M. Anti-CRISPR Phages Cooperate to Overcome CRISPR-Cas Immunity / Landsberger M. [et al.] // *Cell*. – 2018. – V. 174. – N. 4. – P. 908-916.
236. Lee C.R. Strategies to Minimize Antibiotic Resistance / C.R. Lee, H. Cho, B.J. Chul, S.H. Lee // *Int J Environ Res Public Health*. – 2013. – V. 10. – N. 9. – P. 4274–4305.
237. Lee, A.C. Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST235 in cystic fibrosis / A.C. Lee, A.L. Jones // *Paediatr Respir Rev*. – 2018. – N. 27. – P. 18-20. – Doi: 10.1016/j.prrv.2018.05.009.
238. Leenay, R.T. Identifying and visualizing functional PAM diversity across CRISPR-Cas systems / R.T. Leenay [et al.] // *Mol Cell*. – 2016. – N. 62. – P. 137–147.

239. Lemak, S. The CRISPR-associated Cas4 protein Pcal_0546 from *Pyrobaculum calidifontis* contains a [2Fe-2S] cluster: crystal structure and nuclease activity / S. Lemak [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – N. 42. – P. 11144–11155.
240. Lerminiaux, N.A. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments / N.A. Lerminiaux, A.D.S. Cameron // *Can J Microbiol.* – 2019. – V. 65. – N. 1. – P. 34-44. – Doi: 10.1139/cjm-2018-0275.
241. Lewis K. Antibiotics right under our nose / K. Lewis, P. Strandwitz // *Nature.* – 2016. – N. 535. – P. 501–502.
242. Lewis, H.C. Pigs as Source of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC398 Infections in Humans, Denmark / Lewis H.C. [et al.] // *Emerg Infect Dis.* – 2008. – V. 14. – N. 9. – P. 1383–1389.
243. Li, B. CRISPR-SE: a brute force search engine for CRISPR design / B. Li, P.B. Chen, Y. Diao // *NAR Genom Bioinform.* – 2021. – V. 3. – N. 1. – P. lqab013. – Doi: 10.1093/nargab/lqab013.
244. Li, Y. Cmr1 enables efficient RNA and DNA interference of a III-B CRISPR-Cas system by binding to target RNA and crRNA / Li, Y. [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45. – N. 19. – P. 11305-11314.
245. Lin D.M. A theoretical model of temperate phages as mediators of gut microbiome dysbiosis / D.M. Lin, H.C. Lin // *F1000Res.* – 2019. – N. 8. – P. F1000. – Doi: 10.12688/f1000research.18480.1.
246. Lin D.M. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance / D.M. Lin, B. Koskella, H.C. Lin // *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* – 2017. – V. 8. – N. 3. – P. 162-173. doi: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162.
247. Lin, D.M. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance / D.M. Lin, B. Koskella, H.C. Lin // *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* – 2017. – V. 8. – N. 3. – P. 162–173.
248. Lindsay, J.A. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus* // J.A. Lindsay // *J Med Microbiol.* – 2010. – V. 300. – N. 2. – P. 98-103. – Doi: 10.1016/j.ijmm.2009.08.013. Epub 2009 Oct 7. PMID: 19811948.

249. Liu, G.Y. Molecular Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Infection / G.Y. Liu // *Pediatr Res.* – 2009. – V. 65. – N. 5. – P.71–77.
250. Liu, T. Type III CRISPR-Cas System: Introduction And Its Application for Genetic Manipulations / Liu T. [et.al.] // *Curr Issues Mol Biol.* – 2018. – N. 26 – P. 1-14. – Doi: 10.21775/cimb.026.001.
251. Liu, Z. Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria / Z. Liu [et.al.] // *Microb Cell Fact.* – 2020. – V. 19. – N. 1. – P. 172. – Doi: 10.1186/s12934-020-01431-z.
252. Loh B. Encapsulation and Delivery of Therapeutic Phages / B. Loh [et.al.] // *Appl Environ Microbiol.* – 2020. – V. 87. – N. 5. – P. e01979-20. – Doi: 10.1128/AEM.01979-20.
253. Louwen R. The Role of CRISPR-Cas Systems in Virulence of Pathogenic Bacteria / Louwen R. [et al.] // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2014. – V. 78. – N. 1. – P. 74–88.
254. Mahendra, C. Broad-spectrum anti-CRISPR proteins facilitate horizontal gene transfer / C. Mahendra [et al.] // *Nat Microbiol.* – 2020. – V. 5. – N. 6. – P. 620-629.
255. Majumdar, S. Three CRISPR-Cas immune effector complexes coexist in *Pyrococcus furiosus* / S. Majumdar [et al.] // *RNA.* – 2015. – V. 21. – N. 6. – P. 1147–1158.
256. Makarova, K.S. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems / K.S. Makarova [et al.] // *Nat Rev Microbiol.* – 2015. – V. 13. – N. 11. – P. 722-736.
257. Makarova, K.S. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems / K.S. Makarova, E.V. Koonin // *Methods Mol Biol.* – 2015. – N 1311. – P. 47–75.
258. Makarova, K.S. Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here? / K.S. Makarova, Y.I. Wolf, E.V. Koonin // *CRISPR J.* – 2018. – V. 1. – N. 5. – P. 325-336.
259. Makarova, K.S. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems / K.S. Makarova [et al.] // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2011. – N. 9. – P. 467-477.

260. Makarova, K.S. The basic building blocks and evolution of CRISPR–Cas systems / K.S. Makarova, Y.I. Wolf, E.V. Koonin // *BiochemSoc Trans.* – 2013. – V. 41. – N. 6. – P. 1392–1400.
261. Makarova, K.S. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems / K.S. Makarova [et al.] // *Biol Direct.* – 2011. – N. 6. – P. 38.
262. Malachowa, N. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus* / N. Malachowa, R. Frank // *Cell Mol Life Sci.* – 2010. – V. 67. – N. 18. – P. 3057–3071.
263. Manyi-Loh, C. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications / C. Manyi-Loh [et.al.] // *Molecules.* – 2018. – V. 23. – N. 4. – P. 795. – Doi: 10.3390/molecules23040795.
264. Marino, N.D. Anti-CRISPR protein applications: natural brakes for CRISPR-Cas technologies / N.D. Marino [et.al.] // *Nat Methods.* – 2020. – V. 17. – N. 5. – P. 471–479. – Doi: 10.1038/s41592-020-0771-6.
265. Marraffini L.A. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA / L.A. Marraffini, E.J. Sontheimer // *Science.* – 2008. – N. 322. – P. 1843–1845.
266. Martinez, J.L. Effect of antibiotics on bacterial populations: a multi-hierarchical selection process / J.L. Martinez // *F1000Res.* – 2017. – N. 6. – P. 51.
267. Martynov, A. Optimal number of spacers in CRISPR arrays / A. Martynov, K. Severinov, I. Ispolatov // *PLoS Comput Biol.* – 2017. – V. 13. – N. 12. – P. 1005891. – Doi: 10.1371/journal.pcbi.1005891.
268. Mathias von Jan. Complete genome sequence of *Archaeoglobus profundus* type strain (AV18T) / Mathias von Jan [et al.] // *Stand Genomic Sci.* – 2010. – V. 2. – N. 3. – P. 327–346.
269. Mathony, J. Computational design of anti-CRISPR proteins with improved inhibition potency / J. Mathony [et.al.] // *Nat Chem Biol.* – 2020. – V. 16. – N. 7. – P. 725–730. – Doi: 10.1038/s41589-020-0518-9.
270. Maxwell, Karen L. The Anti-CRISPR Story: A Battle for Survival / Karen L. Maxwell // *Molecular Cell.* – 2017. – N. 68. – P. 8–14.

271. Maxwell, K.L. The solution structure of an anti-CRISPR protein / K.L. Maxwell [et al.] // Nat Commun. – 2016. – N. 7. – P. 13134.
272. McEwen, S.A. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective / S.A. McEwen, P.J. Collignon // Microbiol Spectr. – 2018. – V. 6. – N. 2. – Doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.
273. McGuinness, W.A. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus* / McGuinness WA [et.al.] // Yale J Biol Med. – 2017. – V. 90. – N. 2. – P. 269-281.
274. Megged, O. *Staphylococcus aureus* urinary tract infections in children are associated with urinary tract abnormalities and vesico-ureteral reflux / O. Megged // PediatrNephrol. – 2014. – V 29. – N. 2. – P 269-272.
275. Mermel, L.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at different body sites: a prospective, quantitative analysis / Mermel L.A. [et al.] // J Clin Microbiol. – 2011. –V. 49. – N. 3. – P. 1119–1121.
276. Michael, Otto. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection / Otto Michael // Bioessays. – 2013. – V. 35. – N. 1. - P 4–11.
277. Millan, A.S. Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context / A.S. Millan // Trends in Microbiology. – 2018. – V. 26. – N. 12. – P. 978-985.
278. Mir, A. Type II-C CRISPR-Cas9 Biology, Mechanism, and Application / A. Mir, A. Edraki, J. Lee, E.J. Sontheimer // ACS Chem Biol. – 2018. – V. 13. – N. 2. – P. 357-365.
279. Missiakas, D. *Staphylococcus aureus* vaccines: Deviating from the carol / D. Missiakas, O. Schneewind // J Exp Med. – 2016. – V. 13. – N. 9. – P. 1645-1653.
280. Mitsumi, I. Correction of a Disease Mutation using CRISPR/Cas9-assisted Genome Editing in Japanese Black Cattle / Mitsumi I. [et al.] // Sci Rep. – 2017. – N. 7. – P. 17827.
281. Mo, C.Y. Type III-A CRISPR immunity promotes mutagenesis of *staphylococci* / C.Y. Mo [et.al.] // Nature. – 2021. – V. 592. – N. 7855. – P. 611-615. – Doi: 10.1038/s41586-021-03440-3.

282. Moch C. DNA binding specificities of *Escherichia coli* Cas1-Cas2 integrase drive its recruitment at the CRISPR locus / C. Moch, M. Fromant, S. Blanquet, P. Plateau // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45. – N. 5. – P. 2714-2723.
283. Mohanraju, P. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems / P. Mohanraju [et.al.] // *Science.* – 2016. – V. 353. – N. 6299. – P. aad5147. – Doi: 10.1126/science.aad5147.
284. Mojica F. J. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements / Mojica F. J. [et al.] // *Journal of Molecular Evolution.* – 2005. – V. 60, N. 2. – P. 174–182.
285. Mojica, F.J. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria / F.J. Mojica, C. Diez-Villasenor, E. Soria, G. Juez // *Mol Microbiol.* – 2000. – V. 36. – N. 1. – P. 244-246.
286. Moon, Jong-Sik. M13 Bacteriophage-Based Self-Assembly Structures and Their Functional Capabilities / Jong-Sik Moon [et al.] // *Mini Rev Org Chem.* – 2015. – V. 12. – N. 3. – P. 271–281.
287. Moreillon, P. *Staphylococcus aureus* (Including *Staphylococcal* Toxic Shock). In: Principles and practice of infectious disease / P. Moreillon [et al.] // Churchill Livingstone, Philadelphia: PA. – 2005. – V. 11. – N. 4. – P. 636–637.
288. Mulepati, S. Structural and biochemical analysis of nuclease domain of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated protein 3 (Cas3) / S. Mulepati, S. Bailey // *J Biol Chem.* – 2011. – N. 286. – P. 31896–31903.
289. Murder, R.R. Isolation of *Staphylococcus aureus* from the urinary tract: association of isolation with symptomatic urinary tract infection and subsequent *staphylococcal* bacteremia / R.R. Murder [et al.] // *Clin Infect Dis.* – 2006. – V. 42. – N. 1. – P 46-50.
290. Naber, C.K. *Staphylococcus aureus* bacteremia: epidemiology, pathophysiology, and management strategies / C.K. Naber // *Clin. Infect. Dis.* –2009. – N. 48. – P. 231–237.
291. Naghshbandi, R.Z. Passive immunization against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* recombinant PBP2a in sepsis model of mice:

- comparable results with antibiotic therapy / R.Z. Naghshbandi, S. Haghghat, M. Mahdavi // *Int Immunopharmacol.* – 2018. – N. 56. – P. 186–192.
292. Nakatsuji, T. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis / T. Nakatsuji [et al.] // *SciTransl Med.* – 2017. – V. 22. – N. 9. – P 378.
293. Nepal, G. Self-medication with Antibiotics in WHO Southeast Asian Region: A Systematic Review / G. Nepal, S. Bhatta // *Cureus.* – 2018. – V. 10. – N. 4. – P. e2428. – Doi: 10.7759/cureus.2428.
294. Nguyen, T.H. Host Response to *Staphylococcus epidermidis* Colonization and Infections / T.H. Nguyen, M.D. Park, M. Otto // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2017. – N. 7. – P. 90. – Doi: 10.3389/fcimb.2017.00090.
295. Nishimasu, H. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA / H. Nishimasu [et al.] // *Cell.* – 2014. – V. 156. – N. 5. – P. 935–949.
296. O'Callaghan, R.J. The Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Eye Infections / R.J. O'Callaghan // *Pathogens.* – 2018. – V. 7. – N.1. – P. 9. doi: 10.3390/pathogens7010009.
297. Oechslin, F. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy / F. Oechslin // – *Viruses.* – 2018. – V. 10. – N. 7. – P. 351.
298. Oechslin, F. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy / F. Oechslin // *Viruses.* – 2018. – V. 10. – N. 7. – P. 351. – Doi: 10.3390/v10070351.
299. Olearo, F. *Staphylococcus aureus* and methicillin resistance in Switzerland: regional differences and trends from 2004 to 2014 / F. Olearo [et al.] // *Swiss Med Wkly.* – 2016. – N. 146. – P. w14339.
300. Olearo, F. Swiss Centre For Antibiotic Resistance Anresis. *Staphylococcus aureus* and methicillin resistance in Switzerland: regional differences and trends from 2004 to 2014 / F. Olearo [et.al.] // *Swiss Med Wkly.* – 2016. – N. 146. –P. w14339. – Doi: 10.4414/smw.2016.14339.
301. Oliveira, D. *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases / D. Oliveira // *Toxins (Basel).* – 2018. – V. 10. – N. 6. – P. 252.

302. Osuna, B.A. Critical Anti-CRISPR Locus Repression by a Bi-functional Cas9 Inhibitor / B.A. Osuna [et.al.] // *Cell Host Microbe*. – 2020. – V. 28. – N 1. – P. 23-30.e5. – Doi: 10.1016/j.chom.2020.04.002.
303. Otto, M. *Staphylococcus aureus* toxins / M. Otto // *Curr Opin Microbiol*. – 2014. – N. 17. – P 32–37.
304. Özcan, A. Type IV CRISPR RNA processing and effector complex formation in *Aromatoleum aromaticum* / A. Özcan [et.al.] // *Nat Microbiol*. – 2019. – V. 4. – N. 1. – P. 89-96. – Doi: 10.1038/s41564-018-0274-8.
305. Palermo, G. Protospacer Adjacent Motif-Induced Allostery Activates CRISPR-Cas9 / G. Palermo [et al.] // *J Am Chem Soc*. – 2017. – V. 139. – N. 45. –P. 16028-16031.
306. Park, B, Liu GY. *Staphylococcus aureus* and Hyper-IgE Syndrome / B. Park, G.Y. Liu // *Int J Mol Sci*. – 2020. – V. 21. – N. 23. – P. 9152. doi: 10.3390/ijms21239152.
307. Parker, D. A live vaccine to *Staphylococcus aureus* infection / D. Parker // *Virulence*. – 2018. – V. 9. – N. 1. – P. 700–702.
308. Pausch, P. Type IV CRISPR RNA processing and effector complex formation in *Aromatoleumaromaticum* / P. Pausch [et al.] // *Nat Microbiol*. – 2019. – V. 4. – N. 1. – P. 89-96.
309. Pawluk, A. Anti-CRISPR: discovery, mechanism and function / A. Pawluk, A.R. Davidson, K.L. Maxwell // *Nat Rev Microbiol*. – 2018. – V. 16. – N. 1. – P. 12-17.
310. Pawluk, A. Inactivation of CRISPR-Cas systems by anti-CRISPR proteins in diverse bacterial species / A. Pawluk [et al.] // *Nat. Microbiol*. – 2016. – N. 1. – P. 16085.
311. Peng, X. Anti-CRISPR Proteins in Archaea / X. Peng // *Trends Microbiol*. – 2020. – V. 28. – N. 11. – P. 913-921. – Doi: 10.1016/j.tim.2020.05.007.
312. Petrovic Fabijan A. Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection / A. Petrovic Fabijan [et al.] // *Nat Microbiol*. – 2020. – V. 5. – N. 3. – P. 465-472. doi: 10.1038/s41564-019-0634-z.

313. Pinchuk, I.V. *Staphylococcal Enterotoxins* / I.V. Pinchuk, E.J. Beswick, V.E. Reyes // *Toxins* (Basel). – 2010. – V. 2. – N.8. – P. 2177–2197.
314. Pinilla-Redondo, R. Type IV CRISPR-Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids / R. Pinilla-Redondo [et.al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – V. 48. – N. 4. – P. 2000-2012.
315. Plagens, A. In vitro assembly and activity of an archaeal CRISPR-Cas type I-A Cascade interference complex / A. Plagens [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – N. 42. – P. 5125–5138.
316. Pozzi, C. Vaccines for *Staphylococcus aureus* and Target Populations / C. Pozzi, R. Olaniyi // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2017. – N. 409. – P. 491-528.
317. Pyenson, N.C. Broad targeting specificity during bacterial type III CRISPR-Cas immunity constrains viral escape / N.C. Pyenson [et al.] // *Cell Host Microbe.* – 2017. – V. 22. – N. 3. – P. 343–353.e3.
318. Ragle, B.E. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* pneumonia with a beta-cyclodextrin derivative / B.E. Ragle, V.A. Karginov, J. Bubeck Wardenburg // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – V. 54. – N. 1. – P. 298-304. – Doi: 10.1128/AAC.00973-09.
319. Raju, T.N. The Nobel chronicles. 1978: Werner Arber (b 1929); Hamilton O Smith (b 1931); Daniel Nathans (b 1928) / T.N. Raju // *Lancet.* – 1999. – V. 354. – N. 9189. – P. 1567. – Doi: 10.1016/s0140-6736(05)76606-x.
320. Rakonjac, J. Filamentous Phage: Structure and Biology / Rakonjac J. [et.al.] // *Adv Exp Med Biol.* – 2017. – N. 1053. – P.1-20. – Doi: 10.1007/978-3-319-72077-7_1.
321. Ratner, H.K. Overview of CRISPR-Cas9 Biology / H.K. Ratner, T.R. Sampson, D.S. Weiss // *Cold Spring Harb Protoc.* – 2016. – V. 2016. – N. 12. – P. pdb.top088849. – Doi: 10.1101/pdb.top088849.
322. Rehmatullah, Rind. Morphological and Cultural Characterization of *Staphylococcus aureus* / Rind Rehmatullah [et al.] // *J. Appl. Environ. Biol. Sci.* – 2015. – V. 5. – N. 2. – P. 15-26.

323. Richardson, E.J. Gene exchange drives the ecological success of a multi-host bacterial pathogen / Richardson E.J. [et al.] // Nature Ecology & Evolution. – 2018. – V. 2. – P.1468–1478.
324. Romanov, A.V. Molecular epidemiology of nosocomial *Staphylococcus aureus* in hospitals in different regions of Russia / A.V. Romanov, E.A. Chernov, M.V. Edelstein // Mol. Med. – 2013. – N. 4. – P. 55–64.
325. Roos, W.H. Viral capsids: Mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms / Roos W.H. [et al.] // Cell Mol Life Sci. – 2007. – V. 64. – N. 12. – P. 1484–1497.
326. Rouillon, C. Structure of the CRISPR interference complex CSM reveals key similarities with cascade / C. Rouillon [et al.] // Mol Cell. – 2013. – V. 52. – N. 1. – P. 124-134.
327. Rouillon, Christophe. Control of cyclic oligoadenylate synthesis in a type III CRISPR system [Электронный ресурс] / Christophe Rouillon [et al.] // eLife. – 2018. – N. 7. – P. e36734. – Режим доступа: <https://elifesciences.org/articles/36734>
328. Rupp, L.J. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells / Rupp L.J. [et al.] // Sci. Rep. – 2017. – N. 7. – P. 737.
329. Samai, P. Cotranscriptional DNA and RNA cleavage during type III CRISPR-Cas immunity / P. Samai [et al.] // Cell. – 2015. – V. 161. – N.5. – P. 1164-1174.
330. Sampson, T.R. Exploiting CRISPR/Cas systems for biotechnology / T.R. Sampson, D.S. Weiss // Bioessays. – 2014. – V. 36. – N 1. – P. 34– 38.
331. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens / S. Santajit, N. Indrawattana // Biomed Res Int. –2016. – N. 2016. – P. 16:2475067. – Doi: 10.1155/2016/2475067.
332. Seil, J.T. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature / J.T. Seil, T.J. Webster // Int J Nanomedicine. – 2012. – N. 7. – P. 2767–2781.
333. Senghore M. Transmission of *Staphylococcus aureus* from Humans to Green Monkeys in The Gambia as Revealed by Whole-Genome Sequencing / M. Senghore // Appl Environ Microbiol. – 2016. – V. 82. – N. 19. – P. 5910–5917.

334. Servant, F. ProDom: automated clustering of homologous domains / F. Servant [et.al.] // *Brief Bioinform.* – 2002. – V. 3. – N. 3. – P. 246–251. – Doi: 10.1093/bib/3.3.246.
335. Shmakov, S. Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems / Shmakov S. [et al.] // *Molecular Cell.* – 2015. – N. 60. – P. 385–397.
336. Shmakov, S. Pervasive generation of oppositely oriented spacers during CRISPR adaptation / Shmakov S. [et al.] // *Nucleic Acids Research.* – 2014. – N. 42. – P. 5907–5916.
337. Smargon, A.A. Cas13b Is a Type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase Differentially Regulated by Accessory Proteins Csx27 and Csx28 / A.A. Smargon [et.al.] // *Mol Cell.* – 2017. – V. 65. – N. 4. – P. 618-630.e7. – Doi: 10.1016/j.molcel.2016.12.023.
338. Smith, R.A. Antibiotic resistance: A primer and call to action / R.A. Smith [et al.] // *Health Commun.* – 2015. – V.30. – N. 3. – P. 309–314.
339. Smith, T.C. Preparing for Antibiotic Resistance Campaigns: A Person-centered Approach to Audience Segmentation / T.C. Smith [et al.] // *J Health Commun.* – 2015. – V. 20. – N. 12. – P. 1433–1440.
340. Smith, T.L. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group / T.L. Smith [et al.] // *N Engl J Med.* – 1999. – V.340. – N. 7. – P. 493-501.
341. Sola, C. High-Throughput CRISPR Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and *Salmonella enterica* Serotype *Typhimurium* / Sola C. [et al.] // *Methods Mol Biol.* – 2015. – N. 1311. – P. 91-109.
342. Szymanek-Majchrzak, K, Mlynarczyk A, Mlynarczyk G. Characteristics of glycopeptide-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients of three teaching hospitals in Warsaw, Poland / K. Szymanek-Majchrzak, A. Mlynarczyk, G. Mlynarczyk // *Antimicrob Resist Infect Control.* – 2018. – N. 7. – P. 105. – Doi: 10.1186/s13756-018-0397-y.

343. Tamulaitis G. Programmable RNA shredding by the type III-A CRISPR-Cas system of *Streptococcus thermophilus* / G. Tamulaitis [et al.] // *MolecularCell*. –2014. – N. 56. – P. 506–517.
344. Taylor, H.N. Structural basis of Type IV CRISPR RNA biogenesis by a Cas6 endoribonuclease / H.N. Taylor [et.al.] // *RNA Biol*. – 2019. – V. 16. – N. 10. – P. 1438-1447. – Doi: 10.1080/15476286.2019.1634965.
345. Taylor, N.M. Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction / Taylor N.M. [et al.] // *Nature*. – 2016. – V. 533 – N. 7603. – P. 346–352.
346. Taylor, T.A. *Staphylococcus aureus* [Электронный ресурс] / Т.А. Taylor, С.Г. Unakal // *StatPearls*. – 2020. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
347. Terns, M.P. CRISPR-based adaptive immune systems / M.P. Terns, R.M. Terns // *Curr Opin Microbiol*. – 2011. – V. 14. –N.3. – P. 321-327.
348. Tomlin J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in 11 dogs / J. Tomlin [et al.] // *Vet Rec*. – 1999. – V. 144. – N. 3. – P. 60-64.
349. Tong, S.Y. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management / Tong S.Y. [et al.] // *Clin Microbiol Rev*. – 2015. – V. 28. – N. 3. – P. 603–661.
350. Torres-Barcelo C. Phage Therapy Faces Evolutionary Challenges / C. Torres-Barcelo // *Viruses*. – 2018. – V. 10. – N. 6. – P. 323.
351. Tzialla, C. Neonatal infections due to multi-resistant strains: Epidemiology, current treatment, emerging therapeutic approaches and prevention / Tzialla C. [et.al.] // *Clin Chim Acta*. – 2015. – V. 451. – N. Pt A. – P. 71-77. – Doi: 10.1016/j.cca.2015.02.038.
352. Van Orden M.J. Conserved DNA motifs in the type II-A CRISPR leader region / M.J. Van Orden [et al.] // *Peer J*. – 2017. – N. 5. – P. e3161.
353. Venkatasubramaniam, A. TBA225, a fusion toxoid vaccine for protection and broad neutralization of *staphylococcal* superantigens / A. Venkatasubramaniam [et.al.] // *Sci Rep*. – 2019. – V. 9. – N. 1. – P. 3279. – Doi: 10.1038/s41598-019-39890-z.

354. Vergnaud G. Analysis of the three *Yersinia pestis* CRISPR loci provides new tools for phylogenetic studies and possibly for the investigation of ancient DNA / G. Vergnaud [et al.] // AdvExp Med Biol. – 2007. – N. 603. – P. 327-338.
355. Verkaik N.J. Anti-staphylococcal humoral immune response in persistent nasal carriers and noncarriers of *Staphylococcus aureus* / N.J. Verkaik, C.P. Vogel, H.A. Boelens, D. Grumann // J Infect Dis. – 2009. – V. 199. – N. 5. – P. 625-632.
356. Vestergaard, G. CRISPR adaptive immune systems of Archaea / G. Vestergaard, R.A. Garrett, S.A. Shah // RNA Biol. – 2014. – N. 11. – P. 156–167.
357. Wang L. Modeling Nosocomial Infections of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Environment Contamination / L. Wang , S. Ruan // Sci Rep. – 2017. – N. 7. – P. 580.
358. Wang, J. A CRISPR evolutionary arms race: structural insights into viral antiCRISPR-Cas responses / J. Wang [et al.] // Cell Res. – 2016. – N 26. – P. 1165–1168.
359. Wang, J. Structural and mechanistic basis of PAM-dependent spacer acquisition in CRISPR-Cas systems / Wang J. [et al.] // Cell. – 2015. – N. 163. – P. 840-853.
360. Wang, K. CRF: detection of CRISPR arrays using random forest / K. Wang, C. Liang // Peer J. – 2017. – N. 5. – P. e3219.
361. Wang, S. Structural basis of CRISPR-SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein / S. Wang [et al.] // Nature. – 2017. – N. 546. – P.436–439.
362. Wang, X. Structural basis of Cas3 inhibition by the bacteriophage protein AcrF3 / X. Wang [et al.] // Mol. Biol. – 2016. – N. 23. – P. 868–870.
363. Watson, B.N.J. CRISPR-Cas-Mediated Phage Resistance Enhances Horizontal Gene Transfer by Transduction / B.N.J. Watson [et al.] // mBio. – 2018. – V. 9. – N. 1. – P. e02406-17.
364. Wittebole, X. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens / X. Wittebole, S. De Roock, S.M. Opal // Virulence. – 2014. – V. 5. – N. 1. – P. 226-35. – Doi: 10.4161/viru.25991.

365. Wright, A.V. Protecting genome integrity during CRISPR immune adaptation / A.V. Wright, J.A. Doudna // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2016. – N. 23. – P. 876–883. – Doi: 10.1038/nsmb.3289.
366. Xihong, Zhao. Study the Features of 57 Confirmed CRISPR Loci in 38 Strains of *Staphylococcus aureus* / Zhao Xihong, Yu Zhixue, Xu Zhenbo // *Front Microbiol*. – 2018. – N. 9. – P. 1591.
367. Xiong, W. Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals / W. Xiong, Y. Sun, Z. Zeng // *Environ Sci Pollut Res Int*. – 2018. – V. 25. – N. 19. – P. 18377-18384. – Doi: 10.1007/s11356-018-1852-2.
368. Yadav, N.S. Bacteriological profile of neonatal sepsis and antibiotic susceptibility pattern of isolates admitted at Kanti children's hospital, Kathmandu, Nepal / N.S. Yadav [et al.] // *BMC Res Notes*. – 2018. – N. 11, – P. 301.
369. Yan, W.X. Cas13d Is a Compact RNA-Targeting Type VI CRISPR Effector Positively Modulated by a WYL-Domain-Containing Accessory Protein / W.X. Yan [et.al.] // *Mol Cell*. – 2018. – V. 70. – N. 2. – P. 327-339.e5. – Doi: 10.1016/j.molcel.2018.02.028.
370. Yan, W.X. Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems / W.X. Yan [et.al.] // *Science*. – 2019. – V. 363. – N. 6422. – P. 88-91. – Doi: 10.1126/science.aav7271.
371. Yin, Y. Bioinformatics Identification of Anti-CRISPR Loci by Using Homology, Guilt-by-Association, and CRISPR Self-Targeting Spacer Approaches / Y. Yin, B. Yang, S. Entwistle // *mSystems*. – 2019. – V. 4. – N. 5. – P. e00455-19. – Doi: 10.1128/mSystems.00455-19.
372. Zhang, F. Anti-CRISPRs: The natural inhibitors for CRISPR-Cas systems / F. Zhang, G. Song, Y. Tian // *Animal Model Exp Med*. – 2019. – V. 2. – N. 2. – P. 69-75.
373. Zhang, Y. *In silico* Method in CRISPR/Cas System: An Expedite and Powerful Booster / Y. Zhang [et.al.] // *Front Oncol*. – 2020. – N. 10. – P. 584404. – Doi: 10.3389/fonc.2020.584404.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Штаммы *S. aureus* с обнаруженными CRISPR-участками

Группа	Название штамма в GenBank	№ GenBank	Cas гены	Количество спейсеров	Тип CRISPR системы
1	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ER03868.3	CP030403.1	<i>cas1, cas 2, cas 10, csm2, csm3, csm4, csm5, csm 6, cas 6</i>	15-3	III-A
	<i>Staphylococcus aureus</i> KUH140087	AP020315.1			
2	<i>Staphylococcus aureus</i> 08BA02176	CP003808.1	<i>cas1, cas 2, cas 10, csm2, csm3, csm4, csm5, csm 6, cas 6</i> / <i>cas8b1</i> и <i>cmr7</i> / 4 гена <i>casR (csa3), csx1</i>	16-4	III-A, I-A, I-B тип
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> strain JS395	CP012756.1			
	<i>Staphylococcus aureus</i> strain AR_0470	CP029653.1			
	<i>Staphylococcus aureus</i> strain AR_0472	CP029649.1			
	<i>Staphylococcus aureus</i> strain AR_0473	CP029681.1			
	<i>Staphylococcus aureus</i> strain 110900	CP058615.1			
<i>Staphylococcus aureus</i> strain WH39	CP060491.1				
3	<i>Staphylococcus aureus</i> JRA307	AP019751.1	4 гена <i>casR (csa3), csx1</i>	1-2	I; I-A
	<i>Staphylococcus aureus</i> strain RIVM3897	CP013621.1			
	<i>Staphylococcus aureus</i> strain 16405	CP053354.1			
	<i>Staphylococcus aureus</i> strain MOZ66	CP031673.1			
	<i>Staphylococcus aureus</i> strain UP_322	CP047799.1			
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> strain UCI62 chromosome	CP018766.1			
4	<i>Staphylococcus aureus</i> strain CC1153-MRSA	CP065857.1	<i>DinG, pfam:13280, casR</i> и 1-2 неизвестные гены <i>cas /</i> 5 генов + <i>csa3, cas9</i>	1-2	IV-A
	<i>Staphylococcus aureus</i> strain FDAARGOS_412	CP023500.1		1	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 6850	CP006706.1		1	
	<i>Staphylococcus aureus</i> strain M48	CP030138.1		1	
5	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> strain HC1335	CP012012.1	Не полные / не обнаружены	1-2	Не определен
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> strain MRSA252	VX571856.1		1	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> strain UCI 28	CP018768.1		1	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> str. JKD6008	CP002120.1		1-2	

<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus TW20	FN433596.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus Z172	CP006838.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 08S00974 chromosome	CP020019.1		3	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 144_S7 genome	CP010943.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 55-99-44 chromosome	CP024998.1		-	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 79_S10 genome	CP010944.1		-	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain BA01611 chromosome	CP019945.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain CFSAN018749 chromosome	CP028190.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain GD5 chromosome	CP019592.1		1-2-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain HZW450 chromosome	CP020741.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain M92 chromosome	CP015447.2		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MRSA107 chromosome	CP018629.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MS4	CP009828.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain NZ15MR0322 genome assembly	LT699704.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain RIVM1295	CP013616.1		3-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain RIVM1607	CP013619.1		3-2-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain XN108	CP007447.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus SA957	CP003603.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain Be62	CP012013.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain Gv69	CP009681.1		2-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain Gv88	CP012018.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain ISU926	CP017091.1		3-2-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain HC1340	CP012011.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> DNA JH4899	AP014921.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> DNA MI	AP017320.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> genome assembly NCTC13435	LN831036.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>aureus</i> ILRI_Eymole1/1	LN626917.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> isolate Sa_Newman_UoM	LT598688.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> isolate <i>Staphylococcus aureus</i> 171	AP017922.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> M1 complete genome	HF937103.1_6		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> O11 chromosome	CP024649.1		1	

<i>Staphylococcus aureus</i> O46 chromosome	CP025395.1_2		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> RF122 complete genome	AJ938182.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 08-02119	CP015645.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 08-02300	CP015646.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 2395 USA500	CP007499.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 25b_MRSA	JX453331.1_2		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 26b_MRSA	CP010299.1_7		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 27b_MRSA	CP010300.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 293G chromosome	JX453331.1_2		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 29b_MRSA	JX453331.1_2		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 31b_MRSA	CP010296.1_7		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 33b	CP010297.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 502A	CP007454.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 71A_S11 genome	CP010940.1			
<i>Staphylococcus aureus</i> strain 93b_S9 genome	CP010952.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain AR461 chromosome	CP029087.1		-	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain AR462 chromosome	CP029086.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain AR464 chromosome	CP029084.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain AR466 chromosome	CP029080.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain AUS0325 genome assembly	LT615218.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain BB155 genome assembly	LN854556.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain Bmb9393 plasmid	CP005288.1_9		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain C2406 chromosome	CP019590.1_7		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain CA12	CP007672.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain CA15	CP007674.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain CC5 chromosome	CP021105.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain CFSAN007835 chromosome	CP017685.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain CFSAN007847 chromosome	CP017684.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain CFSAN007850 chromosome	CP017682.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain CFSAN007851 chromosome	CP017680.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain CFSAN007883 chromosome	CP017679.1		1	

<i>Staphylococcus aureus</i> strain CFSAN007894 chromosome	CP017677.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain CFSAN007896 chromosome	CP020467.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain CFSAN018750 chromosome	CP028189.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain CFSAN064037 chromosome	CP028165.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain CFSAN064038 chromosome	CP028163.1		2-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain CR14-035 chromosome	CP020544.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FCFHV36	CP011147.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FDAARGOS_10 chromosome	CP026961.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FDAARGOS_140 chromosome	CP027101.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FDAARGOS_159 chromosome	CP014064.2		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FDAARGOS_15 chromosome	CP026960.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FDAARGOS_1 chromosome	CP026968.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FDAARGOS_2 chromosome	CP026964.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FDAARGOS_40 chromosome	CP026958.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FDAARGOS_43 chromosome	CP026957.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FDAARGOS_48 chromosome	CP026953.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FDAARGOS_6 chromosome	CP026962.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FORC_012	CP010998.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FORC_026	CP013132.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FORC_027	CP012692.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FORC_039	CP015817.1		3-4-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FORC_040 chromosome	CP016398.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FORC_045	CP017115.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain FORC59 chromosome	CP020354.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain GD1539 chromosome	CP019594.2		3-2-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain GD1677 chromosome	CP019595.2		3-2-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain GD705 chromosome	CP019593.2		3-2-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain HOU1444-VR	CP012593.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain HPV107 chromosome	CP026074.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain HUV05	CP007676.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain ISU935	CP017090.1		1	

<i>Staphylococcus aureus</i> strain JE2 chromosome	CP020619.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain K17 chromosome	CP020713.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain K18 chromosome	CP020714.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain K5 chromosome	CP020656.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain M121	CP007670.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MCRF184	CP014791.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain MSSA476	BX571857.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain Mw2 chromosome	CP026073.1		2-1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain NMR08 chromosome	CP023560.1		2-1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain NRS107 chromosome	CP026077.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain NRS120 chromosome	CP026072.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain NRS133 chromosome	CP026070.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain NRS137 chromosome	CP026080.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain NRS143 chromosome	CP026071.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain NRS146 chromosome	CP026068.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain NRS149 chromosome	CP026063.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain NRS153 chromosome	CP026067.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain NRS1 chromosome	CP026069.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain NRS271 chromosome	CP026064.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain NRS484 chromosome	CP026066.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain NZAK3 genome assembly	LT009691.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain PTDraP2 chromosome	CP029172.1		3-2-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain RIVM3897	CP013621.1		3-2-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain RIVM6519	CP015173.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain RKI4	CP011528.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain SA17_S6 genome	CP010941.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain SA40TW	CP013182.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain SA564	CP010890.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain Seattle 1945 isolate G477	CP021905.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain Seattle 1945 isolate G478	CP021907.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain SJTUF_J27 chromosome	CP019117.1		1	

<i>Staphylococcus aureus</i> strain SR434	CP019563.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain ST20130938	CP012972.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain ST20130939	CP012970.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain ST20130940	CP012979.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain ST20130941	CP012978.1		2-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain ST20130942	CP012976.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain ST20130943	CP012974.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain ST2594 isolate 004 chromosome	CP027486.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain SVH7513 chromosome	CP029166.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain TCH 959 chromosome	CP026076.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain UA-S391_USA300	CP007690.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA300-SUR10	CP014397.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA300-SUR11	CP014402.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA300-SUR12	CP014407.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA300-SUR13	CP014409.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA300-SUR14	CP014412.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA300-SUR15	CP014415.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA300-SUR16	CP014420.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA300-SUR17	CP014423.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA300-SUR18	CP014426.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA300-SUR19	CP014429.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA300-SUR20	CP014432.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA300-SUR21	CP014435.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA300-SUR22	CP014438.1		2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA300-SUR23	CP014441.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA300-SUR24	CP014444.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA300-SUR9	CP014392.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain USA400-0051 chromosome	CP019574.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain UTSW MRSA 55	CP013231.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain V2200	CP007657.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> strain XQ	CP013137.1		2	

<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus 6850	CP006706.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus 71193 genome	CP003045.1		3-2-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus CN1	CP003981.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus DNA TMUS2126	AP014652.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus DNA TMUS2134	AP014653.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus ECT-R 2 complete genome	FR714927.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus ED133	CP001996.1		1-3	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus HO 5096 0412	HE681097.1		2-1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus JH1	CP000736.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus JKD6159	CP002114.2		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus M013	CP003166.2		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus MN8 chromosome	CM000952.1		2-1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus MW2 DNA	BA000033.2		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus NCTC 8325	GCF000013425		-	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus SA268	CP006630.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus SA40	CP003604.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain 1971.C01	CP016858.2			
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain 2148.C01	CP017094.2			
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain 2148.N chromosome	CP016856.2			
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain 3020.C01	CP025495.1		3	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain 5118.N chromosome	CP016855.2		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain ATCC 25923	CP009361.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain CAR chromosome	CP029030.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain CIT chromosome	CP029031.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain EDCC5458	CP022290.1		1-2	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain EDCC5464	CP022291.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain FDAARGOS_5	CP007539.3		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain FORC_001	CP009554.1		1	
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain GR2	CP010402.1		1	

	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain Gv51	CP012015.1		1-2	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain H-EMRSA-15	CP007659.1		1	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain HG001	CP018205.1		1	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain Newman_D2C	CP023391.1		1	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain OXLIM chromosome	CP029032.1		1-2	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain USA300_2014.C01	CP012119.2		1	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain USA300_2014.C02	CP012120.2		1-2	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain USA300_SUR1	CP009423.1		1-2	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus str. Newman DNA	CP023390.1		1	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus str. Newman strain	CP023390.1		1	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus T0131	CP002643.1		1-2	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus Tager 104	CP012409.1		1	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus USA300_FPR3757	CP000255.1		1-2	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus USA300 strain NRS384	CP027476.1		1-2	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus VC40	CP003033.1		1	
	<i>Staphylococcus aureus</i> USA300-ISMMS1	CP007176.1		1-2	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain 1971.C01	CP016858.2		1-2	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain 2148.C01	CP017094.2		1-2	
Плазмиды	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus 55/2053 plasmid	CP002389.1	<i>casR</i> ; <i>csa3</i> ; <i>csx1</i> ; <i>pfam13280</i> ; неидентифицированный <i>cas (1-3)</i>	-	I-A
	<i>Staphylococcus aureus</i> USA300-ISMMS1 plasmid pUSA01-ISMMS	CP007177.1		-	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain 2148.C01 plasmid p2148.CO1_B	CP017095.2		-	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain UCI62 plasmid pUCI62	CP018767.1		-	
	<i>Staphylococcus aureus</i> strain AR466 plasmid unnamed1	CP029079.1		-	
	<i>Staphylococcus aureus</i> strain AR_0216 plasmid unnamed2	CP029677.1		-	
	<i>Staphylococcus aureus</i> strain AR_0226 plasmid unnamed1	CP029665.1		-	
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus strain ATCC 6538 plasmid	CP020020.1		-	

Разнообразие повторяющихся последовательностей в CRISPR-кассетах *S. aureus* (в %)