



УДК 579.61:616-078+575.112  
DOI <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2020.31.3>

## Структуры CRISPR/Cas-системы в геноме штамма *Staphylococcus aureus* ST228 и фаговых рас, детектируемых методами биоинформатики

А. Ю. Борисенко<sup>1</sup>, Ю. П. Джигоев<sup>1</sup>, Л. А. Степаненко<sup>1</sup>,  
Ю. М. Землянская<sup>1</sup>, Н. П. Перетолчина<sup>1</sup>, Н. А. Арефьева<sup>2</sup>,  
Ю. С. Букин<sup>2,3</sup>, Е. Б. Ракова<sup>1</sup>, Л. А. Кокорина<sup>1</sup>, Я. А. Портная<sup>1</sup>,  
О. Ф. Вятчина<sup>2</sup>, А. С. Мартынова<sup>2</sup>, Л. А. Францева<sup>2</sup>, В. В. Васильев<sup>4</sup>,  
Г. А. Тетерина<sup>2</sup>, В. П. Саловарова<sup>2</sup>, Е. В. Симонова<sup>1</sup>, В. И. Злобин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Иркутский государственный медицинский университет, г. Иркутск, Россия

<sup>2</sup>Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Россия

<sup>3</sup>Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск, Россия

<sup>4</sup>Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Иркутск, Россия

E-mail: 89500720225@mail.ru

**Аннотация.** Рассматривается разработка перспективной стратегии использования бактериофагов в борьбе с опасными патогенными «супербактериями» из группы ESKAPE, в частности *Staphylococcus aureus*. В качестве нового подхода в поиске таргетных (штаммоспецифичных) бактериофагов предлагается их скрининг через структуры CRISPR/Cas-систем бактерий с использованием разработанного алгоритма из поисковых программных методов биоинформатики. С его помощью исследована структура CRISPR/Cas-системы в геноме штамма *S. aureus* ST228. Разработанный программный алгоритм поиска локусов CRISPR/Cas-систем позволяет определять степень устойчивости бактерий к специфичным бактериофагам, что должно обеспечить эффективность таргетной фаговой терапии инфекций, вызываемых «супербактериями».

**Ключевые слова:** геном штамма *Staphylococcus aureus* ST228, программные методы биоинформатики, CRISPR/Cas-система, спейсеры, повторы, протоспейсеры, бактериофаги.

**Для цитирования:** Структуры CRISPR/Cas-системы в геноме штамма *Staphylococcus aureus* ST228 и фаговых рас, детектируемых методами биоинформатики / А. Ю. Борисенко, Ю. П. Джигоев, Л. А. Степаненко, Ю. М. Землянская, Н. П. Перетолчина, Н. А. Арефьева, Ю. С. Букин, Е. Б. Ракова, Л. А. Кокорина, Я. А. Портная, О. Ф. Вятчина, А. С. Мартынова, Л. А. Францева, В. В. Васильев, Г. А. Тетерина, В. П. Саловарова, Е. В. Симонова, В. И. Злобин // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2020. Т. 31. С. 3–18. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2020.31.3>

### Введение

Частота использования, а нередко и злоупотребления антибиотиками за прошлые несколько десятилетий заметно возросли в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве [Проблема резистентности ... , 2017] и вызвали появ-

ление патогенных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) ко многим современным антибактериальным препаратам [Землянко, Рогоза, Журавлева, 2018; Origin and proliferation ... , 2015]. Следствием этой практики стало возникновение «супербактерий» (superbugs), которые становятся ныне большой глобальной угрозой для общественного здравоохранения из-за развития инфекционных болезней с более тяжёлыми последствиями [Burki, 2018; Veeraraghavan, Walia, 2019]. С помощью специального исследования по определению наиболее устойчивых к используемым современным антибиотикам бактериальных патогенов была выделена группа «супербактерий», представленная следующими бактериальными патогенами: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp. – группа ESKAPE (по первым буквам названий) [Rice, 2008; Emerging strategies ... , 2019]. Патогены этой группы ответственны за большинство внутрибольничных инфекций и способны «избегать» биоцидного действия многих антимикробных агентов [Navidinia, 2016]. Установлено, что ESKAPE-бактерии связаны с самым высоким риском смертности [Founou, Founou, Essack, 2017]. *S. aureus* включён в эту группу с высоким приоритетом, что свидетельствует о его реальной опасности для здоровья человека и животных [Deurenberg, Stobberingh, 2008; High vancomycin minimum ... , 2013; Goldmann, Medina, 2018; de Jong, van Kessel, van Strijp, 2019]. *S. aureus* – «успешный» патоген, способный вызывать поражение практически любой ткани человеческого тела. Он может также вызвать множество инфекций, от целлюлита и поверхностных кожных заболеваний до абсцессов, бактериемии, сепсиса, эндокардита и пневмонии [Nasal carriage ... , 2001; Nasal carriage ... , 2012]. Сегодня штаммы *S. aureus* стали ведущей причиной внутрибольничных и внебольничных инфекций, их воздействия остаются одной из значимых проблем здравоохранения во всём мире [Goldmann, Medina, 2017; Revisiting bacterial ... , 2019]. Решение проблемы «супербактерий» делает актуальным поиск альтернативных методов борьбы с ними, среди которых большой интерес представляют подходы с использованием бактериофагов – терапевтических агентов, которые ранее широко использовались для лечения бактериальных инфекций, но со временем уступили первенство антибиотикам. После того, как резко возросла устойчивость микроорганизмов к противомикробным препаратам и возникли «супербактерии», интерес к фаговой терапии вновь возрождается [Domingo-Calap, Delgado-Martínez, 2018; The magistral phage, 2018].

За последние 20 лет, благодаря накопленным базам данных геномов бактерий и вирусов (бактериофагов), появилась возможность проводить аналитические исследования с этими данными, используя методы биоинформатики. Посредством биоинформационных компьютерных программ уже можно проводить моделирование процессов эволюции, изменчивости, патогенности, устойчивости и адаптации бактерий и вирусов к условиям существования. Резкий рост интереса к моделированию и редактированию геномов бактерий и вирусов возник после открытия механизма действия

CRISPR/Cas-систем бактерий и архей против бактериофагов и плазмид. CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated proteins, или короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами с CRISPR-ассоциированными белками) является самой древней системой «адаптивного иммунитета» у бактерий и архей [Bhaya, Davison, Barrangou, 2011; Gasiunas, Sinkunas, Siksnys, 2014]. Эта система позволяет интегрировать в определённые области генома бактерий ДНК-фрагменты бактериофагов и плазмид (спейсеры), что придаёт в последующем бактериям устойчивость к данным фагам и плазмидам при повторном заражении [Multiple mechanisms ... , 2015]. Можно предположить, что использование структурных особенностей CRISPR/Cas-систем и программных методов биоинформатики позволит проводить скрининговые исследования по выявлению фагов, специфичных для каждого штамма бактерий по типу и степени их антагонизма.

Целью настоящего исследования является демонстрация разработанного на основе методов биоинформатики программного алгоритма для поиска локусов структур CRISPR/Cas-систем в геноме метицилин-резистентного штамма *S. aureus* ST228 из базы данных GenBank и оценка возможностей идентификации фаговых рас через спейсерные последовательности выявленной CRISPR-кассеты.

### **Материалы и методы**

Материалом для исследования являлся геном штамма *S. aureus* ST228 (№ в базе данных GenBank: NC\_020537). Исследуемый штамм выделен в 2008 г. от больных в госпитале г. Лозанны (Швейцария). Он является эпидемическим клоном метицилин-резистентного штамма *S. aureus* (ST228-MRSA-I) и распространён в нескольких странах Центральной Европы, включая Германию, Италию, Венгрию, Словению, Австрию и Швейцарию. В течение 2008 г. наблюдалось необычное распространение этого штамма в больницах Швейцарии, от которого заболели более пятисот пациентов [Short term evolution ... , 2012]. Для поиска локуса CRISPR/Cas-системы применяли методы программного моделирования MacSyFinder, v.1.0 [MacSyFinder ... , 2014]. Поиск точной гомологии последовательностей проводили при помощи установленных вспомогательных пакетов makeblastdb (v.2.2.28) и HMMER (v.3.0), а также определяли структурно-функциональные характеристики обнаруженных cas-генов в анализируемом геноме штамма *S. aureus* [CRISPR Target..., 2013; Grissa, Vergnaud, Pourcel, 2007]. Расшифровку структур CRISPR-кассеты производили при помощи алгоритмов поиска, включающих следующие программы: CRISPR Recognition Tool (<http://www.room220.com/crt/>); CRISPI: a CRISPR Interactive database (<http://crispi.genouest.org>) [CRISPI: a ... , 2009]; CRISPRFinder (<http://crispr.u-psud.fr/Server>); CRISPRDetect ([http://brownlabtools.otago.ac.nz/CRISPRDetect/predict\\_crispr\\_array.html](http://brownlabtools.otago.ac.nz/CRISPRDetect/predict_crispr_array.html)). Для идентификации фагов через расшифрованные спейсерные последовательности с помощью алгоритма поиска BLASTn по базе данных GenBank-Phage были использованы онлайн-приложения CRIS-

PRTarget ([http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr\\_analysis.html](http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crispr_analysis.html)) и Mycobacteriophage Database (<http://phagesdb.org/blast/>).

### Результаты и обсуждение

В результате биоинформационного поиска в геноме штамма *S. aureus* ST228 была выявлена одна структура CRISPR/Cas-системы, отнесённая к III-A типу. Были обнаружены и визуализированы гены, кодирующие Cas-белки и полностью совпадающие с определённым III-A типом CRISPR/Cas-системы (табл. 1). CRISPR-кассета штамма *S. aureus* ST228 содержит межспейсерные повторы размером 35 н. о. (консенсусный повтор, рис. 1) и 11 последовательностей спейсеров (табл. 2). Выявленная CRISPR/Cas-система в геноме штамма *S. aureus* ST228 расположена приблизительно в позициях между 2 614000 и 2 636000 н. о., и размер её локуса равен 22 000 н. о. (рис. 2). Однако, как видно из рисунка, структуры cas-генов и CRISPR-касеты разделены семью генами, относящимися, возможно, к неизвестным cas-генам. Такая конструкция CRISPR/Cas-системы может свидетельствовать о возможной роли этих генов в функциональной активности выявленной CRISPR-касеты.

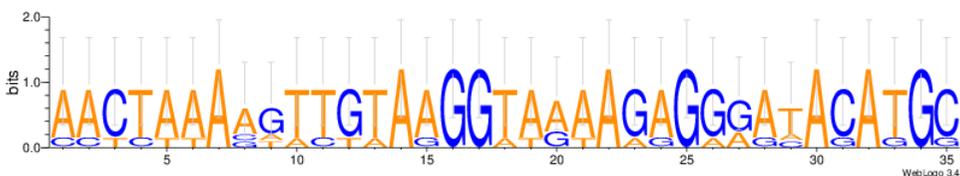


Рис. 1. Консенсусная структура повторов в геноме штамма *S. aureus* ST228

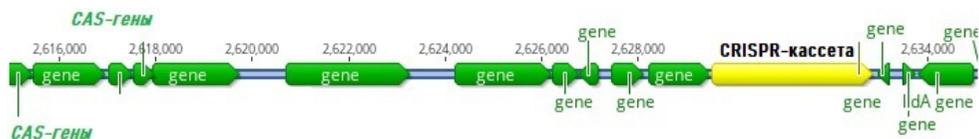


Рис. 2. Позиция и структуры cas-генов и CRISPR-касеты в геноме исследуемого штамма *S. aureus* ST228

Выявленные семь cas-генов относились к следующим типам: cas1-Типу II, cas2-Типу I-II-III, cas10-Типу III-A, csm2-Типу III-A, csm3-Типу III-A, csm4-Типу III-A, csm5-Типу III-A (см. табл. 1). Как известно, CRISPR/Cas-системы III типа подразделяются на два подтипа: III-A и III-B. Для них характерно наличие белка Cas10 – самой крупной субъединицы эффекторного комплекса Csm (в случае подтипа III-A) и Cmr (в случае подтипа III-B). Кроме того, все системы III типа кодируют один белок Cas5 и, как правило, несколько паралогичных белков Cas7. Было показано, что система III-A работает как с ДНК, так и с РНК-мишенями и, соответственно, может разрушать как ДНК, так и РНК-структуры. Для успешного распознавания мише-

ней системе III-A не требуется наличие мотива PAM. Дальнейшее изучение систем III типа обнаружило новые свойства субстратной специфичности подтипа III-A. Так, выяснилось, что система III-A *S. epidermidis* может работать только с транскрибирующимися протоспейсерами. Кроме того, оказалось, что комплексы Csm *S. thermophilus* и *Thermus thermophilus* имеют скрытую РНК-деградирующую активность, причём они вносят разрывы в РНК через каждые 6 нуклеотидов. Такая же активность была показана и для комплексов Cmr. Система III-A *S. epidermidis* не только разрушает синтезирующиеся транскрипты, но и разрезает ДНК-мишень зависимым от транскрипции образом за счёт специфических аминокислотных остатков Cas10, которые не связаны с распознаванием мишени. Гидролиз РНК, опосредуемый комплексами Csm и Cmr, катализируется не белком Cas10, а субъединицами Csm3 и Cmr4 соответственно [Sontheimer, Barrangou, 2015].

В ходе исследований также был проведён анализ разнообразия фаговых ассоциаций, выявленных через структуры спейсеров в CRISPR-кассете исследуемого штамма по эколого-географическим характеристикам и спектру их бактериальных хозяев (табл. 3). Как видно из таблицы, экологическое и географическое разнообразие выявленных фаговых рас и их бактериальных хозяев очень широко. Здесь представлен большой диапазон размеров геномов этих фагов (от 31 147 до 162 486 н. о.), отнесённых к девяти фаговым родам. Это также может свидетельствовать о том, что CRISPR/Cas-система штамма *S. aureus* ST228 функционально активна, что позволяет ему сохранять свой адаптивный потенциал. Представительство такого разнообразия фаговых ассоциаций может свидетельствовать и об экспрессионной активности спейсерных структур его CRISPR-кассеты. Так, в ряде работ было показано, что наличие в геноме бактерий функциональной CRISPR/Cas-системы потенциально мешает приобретению плазмид или фагов (профагов), несущих гены устойчивости к антибиотикам, тем самым поддерживая высокую чувствительность этих бактерий к антибактериальным препаратам [CRISPR-Cas influences ... , 2019]. Например, у бактерии *S. epidermidis* может наблюдаться снижение устойчивости к антибиотикам, обусловленное возможным уничтожением CRISPR-Cas-системой тех конъюгативных плазмид, которые обеспечивали эту устойчивость. Так, у *S. aureus* пониженное количество локусов CRISPR-Cas приводит к увеличению числа профагов, плазмид и мобильных генетических элементов в клетке, что усиливает вирулентность бактерии [Sontheimer, Barrangou, 2015]. Возможно, обладая этими свойствами, данный штамм, с одной стороны, потерял высокую устойчивость к антибиотическим агентам, а с другой – приобрёл высокую эпидемическую потенцию и вирулентные качества. Об этом может свидетельствовать его быстрое распространение в странах Центральной Европы. Являясь метицилин-резистентным клоном (ST228-MRSA-I) он также показал свой клинический потенциал, когда от него в больницах Швейцарии в течение 2008 г. тяжело заболели более 500 пациентов. Далее, возможно, вследствие антибиотикотерапии этот штамм и его варианты потеряли свою эпидемическую и патогенную мощь и стали циркулировать в ограниченной среде внутрибольничных инфекций [Short term evolution ... , 2012].

Таблица 1

Структурно-функциональные характеристики cas-, csm-генов в геноме штамма *S. aureus* ST228

Sequence Id NC 020537	Position	Profile Match	Gene status	System	Protein length (aa)	Score	i-evalue	Profile coverage	Sequence coverage
prot_ENN589125.1_1352	1352	cas1_TypeII	accessory	CAS-Type-IIIU	310	245	8.1e-84	0.60	1.00
prot_ENN589126.1_1353	1353	cas2_TypeI-II-III	accessory	CAS	104	87.9	1.1e-26	1.00	0.89
prot_ENN589127.1_1354	1354	cas10_TypeIIIA	mandatory	CAS-Type-III A	810	483	6.8e-206	1.00	0.78
prot_ENN589128.1_1355	1355	csm2_TypeIIIA	mandatory	CAS-Type-III A	149	83.4	2.2e-28	1.00	0.69
prot_ENN589129.1_1356	1356	csm3_TypeIIIA	accessory	CAS-Type-III A	209	253.1	3e-75	1.00	0.93
prot_ENN589130.1_1357	1357	csm4_TypeIIIA	mandatory	CAS-Type-III A	260	162.1	2.5e-41	1.00	0.92
prot_ENN589131.1_1358	1358	csm5_TypeIIIA	mandatory	CAS-Type-III A	311	40.8	1.2e-11	0.67	0.53

*Примечание.* Sequence Id – название белка в полногеномной последовательности, представленной в базах данных Gen Bank; Position – позиция исследуемого белка относительно других белков *S. aureus* Mu3; Profile Match – совпадение исследуемого белка с аминокислотным профилем cas-белков; Gene Status – статус гена; System – тип CRISPR/Cas-системы; Protein length – длина аминокислотной последовательности; Score – показатель совпадения профилей (hmmer); Profile coverage – процент перекрытия аминокислотных профилей cas-белков с исследуемой аминокислотной последовательностью; Sequence coverage – процент перекрытия исследуемой аминокислотной последовательности с аминокислотным профилем cas-белков.

Таблица 2

Структуры спейсеров в CRISPR-кассете штамма *S. aureus* ST228 и детектируемые ими бактериофаги

№	Спейсеры CRISPR-кассеты	Комплементарные фаги. (родовой статус)	№ фара в GenBank
1	TCACTTATATGGATGGCTTAAAAGAACTTAAATCAATCTGTG	<i>Staphylococcus</i> phage IME-SA4 (unclassified Biseptimavirus)	NC_029025
2	CGCCGGCCTACAGAGAAATTAATCAGAAG	<i>Streptococcus</i> phage M102	NC_012884
3	TAAGCAATTTTGGGACAAGGCTAAGAAGATACGTCCCG	<i>Bacillus</i> phage TsarBomba	NC_028890
4	TTTTTTAGTAGACTTGATTCAGTCAATCAGATA	<i>Staphylococcus</i> phage Team1	NC_025417
5	AAAGCACAAGCGTTCTTTTGAAAAAACTTT	<i>Streptococcus</i> phage A25	NC_028697
6	GAATGATTCATTCGTCCGGTGTAGATGAAAC	<i>Arthrobacter</i> phage Wilde	KU160673
7	AAAATGTAGTTTGGAGGGATGAGAGCGTGAT	<i>Streptococcus</i> phage SMP	NC_008721
8	GAACAGTTTGATTTACCTTATCGCTATATT	<i>Mycobacterium</i> phage Nicholasp3	MF140422
9	GTTATGATGTTTGGCGATATGGGTCGTCGT	<i>Gordonia</i> phage GMA3	NC_028668
10	TAGTGGTGTGTCTGGTGGGATTAACAA	<i>Streptomyces</i> phage Samisti12	MF347639
11	ATGTGAGCCAAGGCAGAACAAGGGATCATGGCC	<i>Gordonia</i> phage GMA7	NC_028673

Таблица 3

Структура разнообразия фаговых рас, детектируемых через спейсеры CRISPR-кассеты штамма *S. aureus* ST228

№	Комплементарные виды фагов	Родовая принадлежность фагов	Размер генома фага (н. о.)	Бактерия-хозяин	Источник изоляции бактерий	Страна
1	<i>Staphylococcus</i> phage IME-SA4	unclassified <i>Biseptimavirus</i>	41 843	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Сточная вода	Китай
2	<i>Streptococcus</i> phage M102	unclassified <i>Moineauvirus</i>	31 147	<i>Streptococcus mutans</i>	Зубной кариес	Франция
3	<i>Bacillus</i> phage TsarBomba	<i>Tsarbombavirus</i>	162 486	<i>Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki</i>	Почва	Россия
4	<i>Staphylococcus</i> phage Team1	<i>Kayvirus</i>	140 903	<i>Staphylococcus xylosus</i> SMQ121	Закваска	Канада
5	<i>Streptococcus</i> phage A25	unclassified <i>Siphoviridae</i>	33 900	<i>Streptococcus pyogenes</i> K56	Коллекция	Франция
6	<i>Arthrobacter</i> phage Wilde	unclassified <i>Tankvirus</i>	68 203	<i>Arthrobacter</i> sp. ATCC 21022	Почва	США
7	<i>Streptococcus</i> phage SMP	unclassified <u><i>Siphoviridae</i></u>	36 019	<i>Streptococcus suis</i> capsular serotype 2	Мазки из носовых ходов свиней	Китай
8	<i>Mycobacterium</i> phage Nicholasp3	unclassified <i>Bronvirus</i>	75 822	<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc2 155	Почва	США
9	<i>Gordonia</i> phage GMA3	<i>Gordonia</i> Virus GMA3	77 779	<i>Gordonia malaquae</i> BEN700	Сточные воды	Австралия
10	<i>Streptomyces</i> phage Samisti12	<i>Streptomyces</i> virus Samisti12	133 710	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 10137	Почва	США
11	<i>Gordonia</i> phage GMA7	<i>Gordonia</i> virus GMA7	73 419	<i>Gordonia malaquae</i> CON60	Сточные воды	Австралия

Таким образом, на основании полученных результатов выяснено, что разработанный программный алгоритм позволяет выявлять локусы CRISPR/Cas-систем в геномах бактерий, а также оценивать степень их устойчивости к чужеродным генетическим элементам (бактериофагам, плазмидам). Удалось выявить также структуры спейсеров в CRISPR-кассете исследуемого штамма и межспейсерные повторы. Используемые биоинформационные программы позволили выявить структуры и позиции *cas*- и *csn*-генов и установить тип CRISPR/*cas*-системы бактерии, который определён как III-A, а также идентифицировать фаги через спейсеры CRISPR-кассет исследуемого штамма *S. aureus* ST228. Дальнейший анализ фагов, идентичных спейсерным последовательностям CRISPR/Cas-системы, позволит оценить степень устойчивости данного штамма к выявленным специфичным фаговым расам. Полученная информация о количестве спейсеров и степени их идентичности протоспейсерам бактериофагов свидетельствует о существовании межвидовых генетических взаимодействий. Выявлено, что на анализируемый штамм *S. aureus* ST228 наибольшее генетическое влияние оказывали бактериофаги из родов бактерий *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Gordonia*, *Arthrobacter*, *Streptomyces* (см. табл. 2). Ранее, также посредством использования поисковых методов биоинформатики, аналогичные результаты были получены в геномах других штаммов *S. aureus* [Использование биоинформационных ..., 2015; Биоинформационные алгоритмы..., 2016; Prospects to enhance ..., 2018].

### **Заключение**

Использованные в работе биоинформационные методы демонстрируют перспективные возможности для осуществления исследований структуры, функционирования и эволюции CRISPR/Cas-систем стафилококков и других бактерий. Уникальное строение CRISPR/Cas-системы *S. aureus*, продемонстрированное в данной работе, свидетельствует о разнообразии генов и кассет, входящих в состав генома возбудителя. Генетические отличия защитной системы внутри одного вида являются весьма значимыми с точки зрения создания методов лечения стафилококковых инфекций. Вполне возможно, что уникальное строение выявленной CRISPR/Cas-системы объясняется приспособленностью *S. aureus* к внутривидовым и межвидовым отношениям. За последнее время были расшифрованы тысячи геномов многих видов бактерий, бактериофагов, плазмид, в том числе и штаммов *S. aureus*, а потому разработанный нами алгоритм программных методов поиска локусов CRISPR/Cas-систем может быть использован и на других расшифрованных геномах многих бактерий. Это даёт возможность в дальнейшем проводить аналогичные поисковые исследования на большой выборке геномов бактерий, которая будет важна для сравнительного анализа разнообразия структур CRISPR/Cas-систем в рамках как конкретного, так и различных видов. Определение структуры спейсеров в CRISPR-кассете позволяет определять степень устойчивости бактерий к специфичным бактериофагам, что в перспективе может быть использовано для разработки технологии таргетной

фаговой терапии инфекций, вызываемых патогенными бактериями, включая «супербактерии».

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и правительства Иркутской области в рамках проекта № 17-415-380005.*

### Список литературы

Биоинформационные алгоритмы поиска и анализа CRISPR/Cas-систем и фаговых профилей в геноме штамма *Staphylococcus aureus* M1216 / А. Ю. Борисенко, Ю. П. Джиоев, А. И. Парамонов, Ю. С. Букин, Л. А. Степаненко, О. В. Колбасеева, В. И. Злобин, Е. А. Воскресенская, Л. А. Степаненко, Н. Е. Зелинская, О. В. Колбасеева, Н. В. Шмидт, И. В. Малов // Журнал инфектологии. 2016. Т. 8, № S2. С. 27–28.

Землянюк О. М., Рогоза Т. М., Журавлева Г. А. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам // Экологическая генетика. 2018. Т. 16, № 3. С. 4–17. <https://doi.org/10.17816/ecogen1634-17>

Использование биоинформационных программных методов для поиска CRISPR/Cas-систем в геномах штаммов *Staphylococcus aureus* / А. Ю. Борисенко, Ю. П. Джиоев, А. И. Парамонов, Ю. С. Букин, Л. А. Степаненко, О. В. Колбасеева, В. И. Злобин // Сибирский медицинский журнал. 2015. Т. 133, № 2. С. 71–74.

Проблема резистентности к антибиотикам возбудителей болезней, общих для человека и животных / А. Н. Панин, А. А. Комаров, А. В. Куликовский, Д. А. Макаров. // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2017. № 5. С. 18–24.

Bhaya D., Davison M., Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation // Annu. Rev. Genet. 2011. N 45. P. 273–297. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430>

Burki T. K. Superbugs: An Arms Race Against Bacteria // Lancet Respir. Med. 2018. Vol. 6, N 9. P. 668. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30271-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30271-6)

CRISPI: a CRISPR interactive database / C. Rousseau, M. Gonnet, M. Le Romancer, J. Nicolas // Bioinformatics. 2009. Vol. 25, N 24. P. 3317–3318. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp586>

CRISPR Target: Bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets / A. Biswas, J. N. Gagnon, S. J. J. Brouns, P. Fineran, C. Brown // RNA Biology. 2013. Vol. 10, N 5. P. 817–827. <https://doi.org/10.4161/rna.24046>

CRISPR-Cas influences the acquisition of antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* / N. A. Mackow, J. Shen, M. Adnan, A. S. Khan, B. C. Fries, E. Diago-Navarro // PLoS One. 2019. Vol. 14, N 11: e0225131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225131>

Deurenberg R. H., Stobberingh E. E. The evolution of *Staphylococcus aureus* // Infect. Genet. Evol. 2008. Vol. 8, N 6. P. 747–763. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.007>

Domingo-Calap P., Delgado-Martínez J. Bacteriophages: protagonists of a post-antibiotic era // Antibiotics. 2018. Vol. 7, N 3. P. 66. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030066>

Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review / M. S. Mulani, E. E. Kamble, S. N. Kumkar, M. S. Tawre, K. R. Pardesi // Front. Microbiol. 2019. N 10. P. 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>

Founou R. C., Founou L. L., Essack S. Y. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: a systematic review and meta-analysis // PLoS ONE. 2017. Vol. 12, N 12. e0189621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189621>

Gasiunas G., Sinkunas T., Siksnys V. Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity // Cell. Mol. Life Sci. 2014. Vol. 71, N 3. P. 449–465. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1438-6>

Goldmann O., Medina E. *Staphylococcus aureus* strategies to evade the host acquired immune response // Int. J. Med. Microbiol. 2018. Vol. 308, N 6. P. 625–630. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.013>

Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats // *Nucleic Acids Research*. 2007. Vol. 35. P. W52–W57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm360>

High vancomycin minimum inhibitory concentrations with heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in methicillin-resistant *S. aureus* bacteraemia patients / J. L. Wang, C. H. Lai, H. H. Lin, W. F. Chen, Y. C. Shih, C. H. Hung // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2013. Vol. 42, N 5. P. 390–394. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.07.010>

de Jong N. W. M., van Kessel K. P. M., van Strijp J. A. G. Immune Evasion by *Staphylococcus aureus* // *Microbiol Spectr*. 2019. Vol. 7, N 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0061-2019>

MacSyFinder: A Program to Mine Genomes for Molecular Systems with an Application to CRISPR-Cas Systems / S. S. Abby, B. Neron, H. Menager, M. Touchon, E. P. C. Rocha // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, N 10, P. e110726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110726>

Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins / J. Bondy-Denomy, B. Garcia, S. Strum, M. Du, M. F. Rollins, Yu. Hidalgo-Reyes, B. Wiedenheft, K. L. Maxwell, A. R. Davidson // *Nature*. 2015. Vol. 526, N 7571. P. 136–139. <https://doi.org/10.1038/nature15254>

Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia / C. Eiff, K. Becker, K. Machka, H. Stammer, G. Peters // *N. Engl. J. Med*. 2001. N 344. P. 11–16. <https://doi.org/10.1056/NEJM200101043440102>

Nasal carriage as a source of agr-defective *Staphylococcus aureus* bacteremia / D. S. Smyth, J. M. Kafer, G. A. Wasserman, L. Velickovic, B. Mathema, R. S. Holzman // *J. Infect. Dis*. 2012. Vol. 206, N 8. P. 1168–1177. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis483>

Navidinina M. The clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections // *J. Paramed. Sci*. 2016. Vol. 7, N 3. P. 43–56.

Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens / H. H. Chang, T. Cohen, Y. H. Grad, W. P. Hanage, T. F. O'Brien, M. Lipsitch // *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2015. Vol. 79, N 1. P. 101–16. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00039-14>

Prospects to Enhance Phage Therapy by Looking At CRISP Fingerprints in Bacterial Populations / V. I. Zlobin, Y. P. Dzhiyev, N. P. Peretolchina, A. Y. Borisenko, L. A. Stepanenko, Y. Wang, Z. Qu, R. Pierneef, O. N. Reva // *Curr. Trends Biomedical Eng. & Biosci*. 2018. Vol. 10, N 5. P. 1–3. <https://juniperpublishers.com/ctbeb/pdf/CTBEB.MS.ID.555800.pdf>

Revisiting Bacterial Interference in the Age of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Insights into *Staphylococcus aureus* Carriage, Pathogenicity and Potential Control / P. J. Planet, D. Parker, N. L. Ruff, H. R. Shinefield // *Pediatr. Infect. Dis. J*. 2019. Vol. 38, N 9. P. 958–966. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002411>

Rice L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE // *J. Inf. Dis*. 2008. Vol. 197, N 8. P. 1079–1081. <https://doi.org/10.1086/533452>

Short term evolution of a highly transmissible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone (ST228) in a tertiary care hospital / V. Vogel, L. Falquet, S. P. Calderon-Copete, P. Basset, D. C. Blanc // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, N 6:e38969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038969>

Sontheimer E. J., Barrangou R. The Bacterial Origins of the CRISPR Genome-Editing Revolution // *Hum. Gene Ther*. 2015. Vol. 26, N 7. P. 413–24. <https://doi.org/10.1089/hum.2015.091>

The magistral phage / J. P. Pirnay, G. Verbeken, P. J. Ceysens, I. Huys, D. De Vos, C. Ameloot, A. Fauconnier // *Viruses*. 2018. Vol. 10, N 2. pii:E64. <https://doi.org/10.3390/v10020064>

Veeraraghavan B., Walia K. Antimicrobial susceptibility profile & resistance mechanisms of Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) priority pathogens from India // *Indian J. Med. Res*. 2019. Vol. 149, N 2. P. 87–96. [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_214\\_18](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_214_18)

## Structures of the CRISPR/Cas System in the Genome of the *Staphylococcus aureus* ST228 Strain and Phage Races Detected by Bioinformatics

A. Yu. Borisenko<sup>1</sup>, Yu. P. Dzhioev<sup>1</sup>, L. A. Stepanenko<sup>1</sup>,  
Yu. M. Zemlyanskaya<sup>1</sup>, N. P. Peretolchina<sup>1</sup>, N. A. Arefieva<sup>2</sup>,  
Yu. S. Bukin<sup>2,3</sup>, E. B. Rakova<sup>1</sup>, L. A. Kokorina<sup>1</sup>, Ya. A. Portnaya<sup>1</sup>,  
O. F. Vyatchina<sup>2</sup>, A. S. Martynova<sup>2</sup>, L. A. Frantseva<sup>2</sup>, V. V. Vasiliev<sup>4</sup>,  
G. A. Teterina<sup>2</sup>, V. P. Salovarova<sup>2</sup>, E. V. Simonova<sup>1</sup>, V. I. Zlobin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russian Federation*

<sup>2</sup>*Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation*

<sup>3</sup>*Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russian Federation*

<sup>4</sup>*Irkutsk Anti-plague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор, Irkutsk, Russian Federation*

**Abstract.** In the modern world, infections caused by multidrug-resistant (MDR) bacteria have become carriers of global threats to human health. Today these pathogenic bacteria have come to be referred to as “superbugs” and their number and aggressiveness is growing. This group of “superbugs” also includes *Staphylococcus aureus*. It is capable of infecting almost any tissue in the human body. Therefore, it became necessary to find alternative antibiotic methods of treating bacterial infections. The use of bacteriophages is again among them. We propose a new approach in the search for strain-specific (target) phages through the structures of the CRISPR/Cas-systems of bacteria. As is known, CRISPR/Cas systems are the most ancient system of “adaptive immunity” in bacteria. This system makes bacteria resistant to phages and plasmids. This approach is based on the use of methods of structural genomics and software bioinformatics modeling. Using them, an algorithm was developed to search for the structures of CRISPR/Cas systems in bacterial genomes presented in the NCBI databases and screening through their CRISPR cassettes of phages with which a particular strain could meet. The design of the developed algorithm was tested on the genome of methicillin-resistant *S. aureus* strain (ST228-MRSA-I) from the GenBank database. The results of the search for loci and structures of the CRISPR/Cas system in the genome of this strain showed that the identified system belongs to type III-A. It was found that the *cas* genes and the CRISPR cassette are located at a distance from each other and between them are located several genes that perform other functions in the genome of the *S. aureus* strain. It was shown that the structures of spacers in the detected CRISPR cassette are identical to protospacers of phages, the hosts of which are bacteria of the following genera – *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Gordonia*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*. Thus, it can be stated that the developed algorithm of software methods for searching for loci of CRISPR/Cas systems and screening for phages makes it possible to type both the system itself and through its spacers to detect and identify phage races with which a particular bacterial strain could meet. The degree of resistance of a particular bacterial strain to specific phages is also determined, which in the long term should ensure the effectiveness of targeted phage therapy for infections caused by pathogenic bacteria, including “superbugs”.

**Keywords:** genome of strain of *Staphylococcus aureus* ST228, program methods of bioinformatics, CRISPR/Cas-system, spacers, repeats, protospacers, bacteriophages.

**For citation:** Borisenko A.Yu., Dzhioev Yu.P., Stepanenko L.A., Zemlyanskaya Yu.M., Peretolchina N.P., Arefieva N.A., Bukin Yu.S., Rakova E.B., Kokorina L.A., Portnaya Ya.A., Vyatchina O.F., Martynova A.S., Frantseva L.A., Vasiliev V.V., Teterina G.A., Salovarova V.P., Simonova E.V., Zlobin V.I. Structures of the CRISPR/Cas System in the Genome of the *Staphylococcus aureus* ST228 Strain and Phage Races Detected by Bioinformatics. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2020, vol. 31, pp. 3-18. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2020.31.3> (in Russian)

## References

- Borisenko A.Yu., Dzhioev Yu.P., Paramonov A.I., Bukin Yu.S., Stepanenko L.A., Kolbaseeva O.V., Zlobin V.I., Voskresenskaya E.A., Stepanenko L.A., Zelinskaya N.E., Kolbaseeva O.V., Schmidt N.V., Malov I.V. Bioinformatsonnye algoritmy poiska i analiza CRISPR/Cas-sistem i fagovykh profilei v genome shtamma *Staphylococcus aureus* M1216 [Bioinformational algorithms for searching and analyzing CRISPR/Cas systems and phage profiles in the genome of the *Staphylococcus aureus* strain M1216]. *J. Infect.*, 2016, vol. 8, no. S2, pp. 27-28. (in Russian)
- Zemlyanko O.M., Rogoza T.M., Zhuravleva G.A. Mekhanizmy mnozhestvennoi ustoichivosti bakterii k antibiotikam [Mechanisms of multiple resistance of bacteria to antibiotics]. *Ecol. Gen.*, 2018, vol. 16, no. 3, pp. 4-17. (in Russian). <https://doi.org/10.17816/ecogen1634-17>
- Borisenko A.Yu., Dzhioev Yu.P., Paramonov A.I., Bukin Yu.S., Stepanenko L.A., Kolbaseeva O.V., Zlobin V.I. Ispol'zovanie bioinformatsonnykh programmnykh metodov dlya poiska CRISPR/Cas-sistem v genomakh shtammov *Staphylococcus aureus* [The use of bioinformation software methods for searching for CRISPR/Cas-systems in the genomes of *Staphylococcus aureus* strains]. *Siberian Med. J.*, 2015, vol. 133, no. 2, pp. 71-74. (in Russian)
- Panin A.N., Komarov A.A., Kulikovskiy A.V., Makarov D.A. Problema rezistentnosti k antibiotikam vzbuditelei boleznei, obshchikh dlya cheloveka i zhivotnykh [The problem of antibiotic resistance of pathogens common to humans and animals]. *Veterinariya, Zootekhniya i Biotekhnologiya* [Veterinary medicine, zootechnics and biotechnology], 2017, no. 5, pp. 18-24. (in Russian)
- Bhaya D., Davison M., Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu. Rev. Genet.*, 2011, no. 45, pp. 273-297. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430>
- Burki T. K. Superbugs: An Arms Race Against Bacteria // *Lancet Respir. Med.*, 2018, vol. 6, no. 9, pp. 668. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30271-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30271-6)
- Biswas A., Gagnon J. N., Brouns S. J. J., Fineran P., Brown C. CRISPR Target: Bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets. *RNA Biology*, 2013, vol. 10, no. 5, pp. 817-827. <https://doi.org/10.4161/rna.24046>
- Rousseau C., Gonnet M., Le Romancer M., Nicolas J. CRISPI: a CRISPR interactive database. *Bioinformatics*, 2009, vol. 25, no. 24, pp. 3317-3318. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp586>
- Mackow N.A., Shen J., Adnan M., Khan A.S., Fries B.C., Diago-Navarro E. CRISPR-Cas influences the acquisition of antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 11:e0225131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225131>
- Deurenberg R. H., Stobberingh E. E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.* 2008, vol. 8, no. 6, pp. 747-763. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.007>
- Domingo-Calap P., Delgado-Martinez J. Bacteriophages: protagonists of a post-antibiotic era. *Antibiotics*, 2018, vol. 7, no. 3, p. 66. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030066>
- Mulani M.S., Kamble E.E., Kumkar S.N., Tawre M.S., Pardesi K.R. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front. Microbiol.*, 2019, no. 10, p. 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
- Founou R.C., Founou L.L., Essack S.Y. Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, no. 12. e0189621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189621>
- Gasiunas G., Sinkunas T., Siksnys V. Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2014, vol. 71, no. 3, pp. 449-465. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1438-6>
- Goldmann O., Medina E. *Staphylococcus aureus* strategies to evade the host acquired immune response. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2018, vol. 308, no. 6, pp. 625-630. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.013>

Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucl. Acids Res.*, 2007, vol. 35, pp. W52-W57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm360>

Wang J.L., Lai C.H., Lin H.H., Chen W.F., Shih Y.C., Hung C.H. High vancomycin minimum inhibitory concentrations with heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in methicillin-resistant *S. aureus* bacteraemia patients. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2013, vol. 42, no. 5, pp. 390-394. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.07.010>

Abby S.S., Neron B., Menager H., Touchon M., Rocha E.P.C. MacSyFinder: A Program to Mine Genomes for Molecular Systems with an Application to CRISPR-Cas Systems. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 10, p. e110726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110726>

Bondy-Denomy J., Garcia B., Strum S., Du M., Rollins M.F., Hidalgo-Reyes Y., Wiedenheft B., Maxwell K.L., Davidson A.R. Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins. *Nature*, 2015, vol. 526, no. 7571, pp. 136-139. <https://doi.org/10.1038/nature15254>

Smyth D.S., Kafer J.M., Wasserman G.A., Velickovic L., Mathema B., Holzman R. S. Nasal carriage as a source of agr-defective *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J. Infect. Dis.*, 2012, vol. 206, no. 8, pp. 1168-77. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis483>

Eiff C., Becker K., Machka K., Stammer H., Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N. Engl. J. Med.*, 2012, no. 344, pp. 11-16. <https://doi.org/10.1056/NEJM200101043440102>

de Jong N.W.M., van Kessel K.P.M., van Strijp J.A.G. Immune Evasion by *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr.*, 2019, vol. 7, no. 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0061-2019>

Navidinia M. The clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections. *J. Paramed. Sci.*, 2016, no. 7, pp. 4978.

Chang H.H., Cohen T., Grad Y.H., Hanage W.P., O'Brien T.F., Lipsitch M. Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2015, vol. 79, no. 1, pp. 101-16. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00039-14>

Planet P.J., Parker D., Ruff N.L., Shinefield H.R. Revisiting Bacterial Interference in the Age of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Insights into *Staphylococcus aureus* Carriage, Pathogenicity and Potential Control. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2019, vol. 38, no. 9, pp. 958-966. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002411>

Zlobin V.I., Dzhoiev Y.P., Peretolchina N.P., Borisenko A.Y., Stepanenko L.A., Wang Y., Qu Z., Pierneef R., Reva O.N. Prospects to Enhance Phage Therapy by Looking At CRISP Fingerprints in Bacterial Populations. *Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences*, 2018, vol. 10, no. 5, pp. 1-3. <https://juniperpublishers.com/ctbeb/pdf/CTBEB.MS.ID.555800.pdf>

Rice L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J. Inf. Dis.*, 2008, vol. 197, no. 8, pp. 1079-1081. <https://doi.org/10.1086/533452>

Vogel V., Falquet L., Calderon-Copete S.P., Basset P., Blanc D.C. Short term evolution of a highly transmissible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone (ST228) in a tertiary care hospital. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 6:e38969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038969>

Sontheimer E.J., Barrangou R. The Bacterial Origins of the CRISPR Genome-Editing Revolution. *Hum. Gene Ther.*, 2015, vol. 26, no. 7, pp. 413-24. <https://doi.org/10.1089/hum.2015.091>

Pirnay J.P., Verbeke G., Ceysens P.J., Huys I., De Vos D., Ameloot C., Fauconnier A. The magistral phage. *Viruses*, 2018, vol. 10, no. 2, pii: E64. <https://doi.org/10.3390/v10020064>

Veeraraghavan B., Walia K. Antimicrobial susceptibility profile & resistance mechanisms of Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) priority pathogens from India. *Indian J. Med. Res.*, 2019, vol. 149, no. 2, pp. 87-96. [https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR\\_214\\_18](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_214_18)

*Борисенко Андрей Юрьевич*  
ассистент  
Иркутский государственный  
медицинский университет  
Россия, 664003, г. Иркутск,  
ул. Красного Восстания, 1  
e-mail: 89500720225@mail.ru

*Borisenko Andrei Yurievich*  
Assistant  
Irkutsk State Medical University  
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk,  
664003, Russian Federation  
e-mail: 89500720225@mail.ru

*Джюев Юрий Павлович*  
кандидат биологических наук,  
ведущий научный сотрудник,  
заведующий лабораторией  
Иркутский государственный  
медицинский университет  
Россия, 664003, г. Иркутск,  
ул. Красного Восстания, 1  
e-mail: alanir07@mail.ru

*Dzhioev Yuri Pavlovich*  
Candidate of Sciences (Biology),  
Senior Research Scientist,  
Head of Laboratory  
Irkutsk State Medical University,  
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk,  
664003, Russian Federation  
e-mail: alanir07@mail.ru

*Степаненко Лилия Александровна*  
кандидат медицинских наук,  
старший научный сотрудник  
Иркутский государственный  
медицинский университет  
Россия, 664003, г. Иркутск,  
ул. Красного Восстания, 1  
e-mail: steplia@mail.ru

*Stepanenko Lilia Alexandrovna*  
Candidate of Sciences (Medicine),  
Senior Research Scientist  
Irkutsk State Medical University  
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk,  
664003, Russian Federation  
e-mail: steplia@mail.ru

*Землянская Юлия Михайловна*  
старший преподаватель,  
Иркутский государственный  
медицинский университет  
Россия, 664003, г. Иркутск,  
ул. Красного Восстания, 1  
e-mail: yuliyazemlya84@mail.ru

*Zemlyanskaya Julia Mikhailovna,*  
Senior Lecturer  
Irkutsk State Medical University,  
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk,  
664003, Russian Federation  
e-mail: yuliyazemlya84@mail.ru

*Перетолчина Надежда Павловна*  
младший научный сотрудник  
Иркутский государственный  
медицинский университет  
Россия, 664003, г. Иркутск,  
ул. Красного Восстания, 1  
e-mail: nadine1lenz@gmail.com

*Peretolchina Nadezhda Pavlovna*  
Junior Research Scientist  
Irkutsk State Medical University,  
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk,  
664003, Russian Federation  
e-mail: nadine1lenz@gmail.com

*Арефьева Надежда Александровна*  
студент  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. Карла  
Маркса, 1  
e-mail: arefieva.n4@gmail.com

*Arefieva Nadezhda Aleksandrovna*  
Student  
Irkutsk State University  
1, Karl Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
e-mail: arefieva.n4@gmail.com

*Букин Юрий Сергеевич*  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник

*Bukin Yuri Sergeevich*  
Candidate of Sciences (Biology),  
Senior Research Scientist

*Лимнологический институт СО РАН  
Россия, 664033, г. Иркутск, Улан-  
Баторская, 3  
e-mail: bukinys@lin.irk.ru*

*Limnological Institute SB RAS  
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033,  
Russian Federation  
e-mail: bukinys@lin.irk.ru*

*Ракова Елена Борисовна  
кандидат биологических наук, доцент  
Иркутский государственный  
медицинский университет  
Россия, 664003, г. Иркутск,  
ул. Красного Восстания, 1  
e-mail: lenova\_@mail.ru*

*Rakova Elena Borisovna  
Candidate of Sciences (Biology),  
Associate Professor  
Irkutsk State Medical University  
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk,  
664003, Russian Federation  
e-mail: lenova\_@mail.ru*

*Кокорина Любовь Александровна  
ассистент  
Иркутский государственный  
медицинский университет  
Россия, 664003, г. Иркутск,  
ул. Красного Восстания, 1  
e-mail: lubovkokorina1990@yandex.ru*

*Kokorina Lyubov Aleksandrovna  
Assistant  
Irkutsk State Medical University  
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk,  
664003, Russian Federation  
e-mail: lubovkokorina1990@yandex.ru*

*Портная Яна Алексеевна  
студент  
Иркутский государственный  
медицинский университет  
Россия, 664003, г. Иркутск,  
ул. Красного Восстания, 1  
e-mail: portnaya.yana.1997@yandex.ru*

*Portnaya Yana Alekseevna  
Student  
Irkutsk State Medical University  
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk,  
664003, Russian Federation  
e-mail: portnaya.yana.1997@yandex.ru*

*Вятчина Ольга Федоровна  
кандидат биологических наук, доцент  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. Карла  
Маркса, 1  
e-mail: olgairk3@rambler.ru*

*Vyatchina Olga Fedorovna  
Candidate of Sciences (Biology),  
Associate Professor  
Irkutsk State University  
Russia, 664003, Irkutsk, st. Karl Marx, 1  
e-mail: olgairk3@rambler.ru*

*Мартынова Алена Сергеевна  
магистрант  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
e-mail: martynovalen@mail.ru*

*Martynova Alena Sergeevna,  
Undergraduate  
Irkutsk State University  
1, Karl Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
e-mail: martynovalen@mail.ru*

*Францева Лада Андреевна  
студент  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
e-mail: ladafrantseva@yandex.ru*

*Frantseva Lada Andreevna  
Student  
Irkutsk State University  
1, Karl Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
e-mail: ladafrantseva@yandex.ru*

*Васильев Валерий Владимирович*  
научный сотрудник  
Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт Сибири  
и Дальнего Востока  
Россия, 664047, г. Иркутск,  
ул. Трилисера, 78  
e-mail: marmakeda\_007@mail.ru

*Vasiliev Valery Vladimirovich*  
Research Scientist  
Irkutsk Anti-plague Research Institute of  
Siberia and Far East of Rospotrebnadzor  
78, Trilisser st., Irkutsk. 664047, Russian  
Federation  
e-mail: marmakeda\_007@mail.ru

*Тетерина Галина Александровна*  
аспирант  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
e-mail: galina.teterina.91@mail.ru

*Teterina Galina Aleksandrovna*  
Graduate Student  
Irkutsk State University  
1, Karl Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
e-mail: galina.teterina.91@mail.ru

*Саловарова Валентина Петровна*  
доктор биологических наук, профессор,  
заведующая кафедрой  
Иркутский государственный университет  
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
e-mail: vsalovarova@rambler.ru

*Salovarova Valentina Petrovna*  
Doctor of Sciences (Biology),  
Professor, Head of Department  
Irkutsk State University  
1, Karl Marx st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
e-mail: vsalovarova@rambler.ru

*Симонова Елена Васильевна*  
доктор биологических наук, профессор,  
Иркутский государственный  
медицинский университет  
Россия, 664003, г. Иркутск,  
ул. Красного Восстания, 1  
e-mail: ev.simonova@yandex.ru

*Simonova Elena Vasilievna*  
Doctor of Sciences (Biology), Professor,  
Irkutsk State Medical University  
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk,  
664003, Russian Federation  
e-mail: ev.simonova@yandex.ru

*Злобин Владимир Игоревич*  
доктор медицинских наук, профессор,  
академик РАН, заведующий кафедрой,  
директор НИИ биомедицинских  
технологий  
Иркутский государственный  
медицинский университет  
Россия, 664003, г. Иркутск,  
ул. Красного Восстания, 1  
e-mail: vizlobin@mail.ru

*Zlobin Vladimir Igorevich*  
Doctor of Sciences (Medicine), Professor,  
Academician of RAS, Head of Department,  
Director of the Research Institute  
of Biomedical Technologies  
Irkutsk State Medical University  
1, Krasnogo Vosstania st., Irkutsk, 664003,  
Russian Federation  
e-mail: vizlobin@mail.ru

**Дата поступления:** 07.12.2019  
**Received:** December, 07, 2019