

<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-5-49-57>

Анализ особенностей геномной организации штаммов чумного микроба, пригодных для создания новой аттенуированной вакцины

А. В. Григорьевых, Н. О. Бочалгин, С. А. Витязева, Р. И. Пещерова,
Г. Б. Мухтургин, В. И. Дубровина*, Л. В. Миронова, С. В. Балахонов

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзора, г. Иркутск

Резюме

Актуальность. На сегодняшний день специфическая профилактика чумы остается наиболее эффективной мерой по предупреждению ухудшения эпидемиологической ситуации по этой особо опасной инфекции на территории Российской Федерации. Разработка новых вакцинных препаратов, созданных на основе авирулентных штаммов *Yersinia pestis* со специфическими генетическими дефектами, может играть решающую роль в вопросах иммунопрофилактики чумы. **Цель.** Определение и сравнительный анализ геномной организации авирулентных штаммов *Y. pestis* I-1, *Y. pestis* I-3536 и вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. **Материалы и методы.** Особенности генетической структуры трёх штаммов *Y. pestis* были изучены по данным плазмидного скрининга и полногеномного секвенирования. **Результаты и обсуждение.** Установлено, что штаммы *Y. pestis* I-1 и *Y. pestis* I-3536, подобно *Y. pestis* EV, лишены хромосомной *pgm*-области. Анализ последовательности *Y. pestis* I-1 показал, что данный штамм лишён плазмиды *pMT1*, при этом отдельные её гены были найдены в структуре хромосомы и уникальной плазмиды размером 340 кб. Выявлено, что штамм *Y. pestis* I-3536 утратил плазмиду *pCD1*, однако гомологичные данной плазмиде фрагменты были обнаружены в структуре его генома. **Вывод.** Полученные данные позволяют рекомендовать *Y. pestis* I-1 и *Y. pestis* I-3536 в качестве основы для разработки современной живой аттенуированной вакцины против чумы.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, вакцинный штамм, живая аттенуированная вакцина, плазмидный анализ, полногеномное секвенирование, чума

Конфликт интересов не заявлен

Для цитирования: Григорьевых А. В., Бочалгин Н. О., Витязева С. А. и др. Анализ особенностей геномной организации штаммов чумного микроба, пригодных для создания новой аттенуированной вакцины. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2022;21(5): 49–57. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-5-49-57>

Analysis of the Features of the Genomic Organization of Plague Microbe Strains Suitable for the Creation of a New Attenuated Vaccine

AV Grigorievkh, NO Bochalgin, SA Vityazeva, RI Pescherova, GB Mukhturgin, VI Dubrovina**,
LV Mironova, SV Balakhonov

Irkutsk Anti plague Research Institute of Rospotrebnadzor, Russia

Abstract

Relevance. To date, the specific prevention of plague remains the most effective measure to prevent the deterioration of the epidemiological situation for this especially dangerous infection in the territory of the Russian Federation. The development of new vaccine preparations created on the basis of avirulent strains of *Yersinia pestis* with specific genetic defects, can play a crucial importance in the issues of plague immunoprophylaxis. **Aim.** Determination and comparative analysis of the genomic organization of avirulent strains *Y. pestis* I-1, *Y. pestis* I-3536 and vaccine strain *Y. pestis* EV line NIIEG. **Materials and methods.** The features of the genetic structure of three *Y. pestis* strains were studied using plasmid screening and whole genome sequencing. **Results and discussion.** It was found that the *Y. pestis* I-1 and *Y. pestis* I-3536 strains, like *Y. pestis* EV, lack the chromosomal *pgm* region. Analysis the genome sequence of *Y. pestis* I-1 showed that this strain is devoid of the plasmid *pMT1*, while its individual genes were found in the chromosome structure and the unique 340 kb plasmid. It was revealed that the *Y. pestis* strain I-3536 lost the plasmid *pCD1*, however, fragments homologous to this plasmid were found in the structure of its genome. **Conclusion.** The data

* Для переписки: Дубровина Валентина Ивановна, д. б. н., заведующая лабораторией патофизиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 664047, г. Иркутск, ул. Трилисера, 78. +7 (3952) 22-01-35; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru. dubrovina-valya@mail.ru. ©Григорьевых А. В. и др.

** For correspondence: Dubrovina Valentina I., Dr. Sci. (Biol.), Head of the Pathophysiological Laboratory of Irkutsk Anti plague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor, 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russia. +7 (3952) 22-01-35; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru. dubrovina-valya@mail.ru. ©Grigorievkh AV, et al.

obtained allow us to recommend *Y. pestis* I-1 and *Y. pestis* I-3536 as the basis for the development of a modern live attenuated plague vaccine.

Keywords: *Yersinia pestis*, vaccine strain, live attenuated vaccine, analysis of plasmids, whole genome sequencing, plague
No conflict of interest to declare.

For citation: Grigorievikh AV, Bochalgin NO, Vityazeva SA et al. Analysis of the Features of the Genomic Organization of Plague Microbe Strains Suitable for the Creation of a New Attenuated Vaccine. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(5): 49–57 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-5-49-57>

Введение

Вакцинопрофилактика является ключевым мероприятием, снижающим риск возникновения спорадических случаев и вспышек чумы на энзоотических территориях, а также предотвращения завозных случаев заболевания, которые могут возникнуть при возвращении людей из неблагополучных по данной инфекции стран [1,2]. Для осуществления специфической профилактики чумы на территории Российской Федерации доступны два препарата: живая сухая чумная вакцина, разработанная на основе штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, и вакцина чумная молекулярная микроинкапсулированная, которая состоит из рекомбинантных F1-антигена и V-антигена (LcrV) [3].

В нашей стране живая чумная вакцина (ЖЧВ) с 1942 г. активно применяется для иммунизации лиц, проживающих на территориях природных очагов чумы [1]. В основе утраты штаммом *Y. pestis* EV своей вирулентности лежит спонтанная делеция хромосомной *pgm*-области размером 102 тыс. п.н. [4], в состав которой входит оперон *hmsHFRS*, а также геномный остров *HPI*, продукты генов которого играют важную роль в вирулентности чумного микроба [5]. Многолетняя практика использования ЖЧВ наглядно показывает её иммунологическую эффективность [6]. Однако вакцинный штамм не лишён недостатков. Так, несмотря на его более выраженные, по сравнению с убитой вакциной, защитные свойства, у иммунизированных *Y. pestis* EV грызунов и приматов часто возникали местные и системные побочные реакции [7]. Кроме того, этот штамм проявляет избирательную вирулентность в отношении отдельных видов нечеловеческих приматов [7], а его испытания на людях показали высокую реактогенность [8]. В силу этих особенностей ЖЧВ не отвечает требованиям профиля безопасности, рекомендованного ВОЗ [9]. Стоит отметить, что *pgm*-отрицательные изоляты способны восстанавливать свою вирулентность в присутствии внешнего источника железа. Установлено, что добавление небольшого количества хлорида железа при внутривенном или интраназальном введении мышам *Y. pestis* EV приводит к развитию у них системной и легочной чумы [10]. Таким образом, ЖЧВ может представлять опасность для людей с нарушением обмена железа, например гемохроматозом. Так, в США зафиксировано два летальных случая лабораторного заражения исследователей

с этим дефектом штаммами *Y. pestis* с делецией *pgm*-области [11]. Позднее способность *pgm*-изолятов вызывать заболевание на фоне гемохроматоза была доказана на мышах с нокаутом по гену гемоувелина [12].

Отечественная субъединичная вакцина была зарегистрирована МЗ РФ в 2018 г. [3]. Она состоит из капсульного и V-антигенов, в качестве продуцентов которых выступают рекомбинантные штаммы *Y. pseudotuberculosis* EV11M/ pFSK3/9 и *E. coli* BL21(DE3)/pETV-I-3455. Данная вакцина рекомендована для иммунопрофилактики военнослужащих, действующих в условиях ЧС [2]. Используемые в её составе компоненты обладают наиболее выраженной иммуногенностью среди антигенов чумного микроба, в частности, анализ образцов сывороток крови лиц, ранее перенёвших чуму, показал возможность сохранения антител к F1 и LcrV спустя более чем 10 лет с момента заражения [13]. Кроме того, применение комбинации антигенов может обеспечить защиту вакцинированных от заражения штаммами *Y. pestis*, несущими делецию *caf1*-оперона или обладающими структурно отличающимся вариантом LcrV [14]. Безопасность и иммуногенность F1-V-вакцин подтверждена в ряде клинических испытаний [15], её защитные свойства не раз были оценены в опытах на различных животных моделях. Показано, что двухкомпонентные вакцины способны предохранять грызунов от подкожного и аэрозольного заражения *Y. pestis* [16, 17], их защитное действие сравнимо с эффектом от иммунизации животных штаммом *Y. pestis* EV [17] и намного превосходит эффективность убитой вакцины. При этом эксперименты, проводимые на нечеловеческих приматах, дали спорные результаты: вакцины на основе F1 и V обеспечивали выживание яванских макаков при аэрозольном заражении и макаков-резусов при подкожном введении *Y. pestis* [18], но не смогли обеспечить адекватную защиту зелёных мартышек [19], что вносит неопределённость в вопрос о возможности защищать людей подобными препаратами. Слабым звеном F1-V-вакцин является и их способность преимущественно стимулировать иммунный ответ по Th2-пути, что было показано в опытах на макаках-резусах [18] и в ходе клинических испытаний. Также установлено, что иммунизация мышей *Y. pestis* KIM5 стимулирует образование CD4 и CD8 T-клеток, распознающих антигены, отличные

от F1 и LcrV [20], что диктует необходимость в пересмотре состава разрабатываемых субъединичных вакцин.

В связи с этим сохраняется необходимость как в совершенствовании имеющихся средств иммунопрофилактики чумы, так и в разработке принципиально новых препаратов, в том числе ослабленных вакцин нового поколения, созданных на основе авирулентных штаммов *Y. pestis* с чётко контролируемыми генетическими дефектами [21], что позволит повысить эффективность и безопасность разрабатываемых специфически профилактических средств. Указанная задача требует проведения детального анализа характеристик генетической структуры кандидатных вакцинных штаммов чумного микроба.

Цель работы – определение и сравнительный анализ геномной организации авирулентных штаммов *Y. pestis* И-1, *Y. pestis* И-3536 и вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ.

Материалы и методы

В ходе выполнения работы были изучены три штамма *Y. pestis* subsp. *pestis*: *Y. pestis* И-1, выделенный от человека в 1923 г. (г. Чита), *Y. pestis* И-3536, селекционированный на основе штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, полученные из отдела «Коллекция патогенных бактерий» ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, и вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Культивирование штаммов чумного микроба проводили на агаре Хоттингера (рН 7,2) при 28 °С в течение 48 часов.

С целью оценки возможности реверсии исходной вирулентности штаммов *Y. pestis* И-1 и И-3536 проведён ряд пассажей на биопробных животных, которых заражали микробной взвесью, приготовленной в концентрации 1×10^7 м.к./мл. В качестве экспериментальной модели служили 15 морских свинок массой 200–250 г и 10 беспородных белых мышей, имевших стандартные условия содержания и вес (18–20 г), которых получили из питомника ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (РД 42-26-3...3738, НПО «Вектор», Новосибирск). Животных выводили из эксперимента под наркозом в соответствии с Правилам надлежащей лабораторной практики и Директивой № 2010/63/ЕС «О защите животных, использующихся для научных целей» [22]. Исследование одобрено локальным этическим комитетом института (протокол № 5 от 01.11.2021 г.).

Плазмидный скрининг штаммов чумного микроба проводился по методу, предложенному Т. Kieser [23], в модификации С. В. Балахонова [24]. Размеры плазмид определяли путём постановки электрофореза в 0,7% агарозного геле. Были изучены плазмидные профили как исходных культур, так и прошедших пассаж через лабораторных животных. В качестве молекулярного маркера

был использован четырехплазмидный референсный штамм *Y. pestis* И-2638 (pMT1, pCD1, pPCP1 и rTP33). Анализ электрофоретического разделения велся с использованием трансиллюминатора Bio-Rad Gel Doc XR+ (США), системы видеофиксации «DNA Analyzer» и программы «Quantity One ver. 4.6.0».

Выделение тотальной ДНК бактериальных штаммов было выполнено по методу фенол-хлороформной экстракции, а также при помощи набора реагентов «DNAeasy Blood & Tissue Kit» (Германия).

Подготовка библиотек ДНК для проведения нанопорового секвенирования была произведена по протоколу Native barcoding genomic DNA с применением комплекта реактивов для подготовки образцов «Legation Sequencing Kit» SQK-LSK109 (Великобритания) и наборов баркодов для мультиплексирования двухцепочечной ДНК «Native Barcoding Expansion» EXP-NBD104 и EXP-NBD114 (Великобритания). Секвенирование выполнено на приборе Oxford Nanopore MinION (Великобритания).

Геномные библиотеки для секвенирования на приборе Illumina MiSeq™ System (исходных данных нанопорового секвенирования, а также демультиплексирование сырых прочтений были проведены с применением программы MinKNOW и инструмента Guppy ver. 3.6.0. Парные риды, полученные на приборе Illumina MiSeq, были качественно оценены с помощью программного обеспечения FastQC ver. 0.11.9 и предварительно обработаны с использованием инструмента Trimmomatic ver. 0.40 [25]. Оценка покрытия и количества ридов для каждого отсекуированного генома проводилась посредством пакета Proch::N50 ver. 1.3.0.

Гибридная сборка данных секвенирования, полученных на обеих платформах, произведена при помощи ассемблера SPAdes ver. 3.13.0 [26]. Полученные последовательности были аннотированы при использовании программы Prokka ver. 1.12 [27]. С помощью инструмента Roary ver. 3.13.0 [28] данные аннотации были изучены с целью поиска коровых, группоспецифических и уникальных генов. Альтернативный подход к сборке геномов заключался в картировании ридов на последовательности хромосомы и плазмид референсного штамма *Y. pestis* CO92. Анализ крупных генетических перестроек был проведён с применением метода множественного выравнивания в программе Mauve ver. 2.4.0 [29]. В целях поиска биосинтетических генных кластеров использовался программный инструмент antiSMASH ver. 5.0 [30].

Результаты и обсуждение

Анализ плазмидного профиля Анализ штамма *Y. pestis* И-1 показал наличие в его составе плазмид массой 45 и 6 МДа, что соответствует pCD1 и rPCP1. В структуре штамма *Y. pestis* И-3536 обнаружены две плазмиды с молекулярной массой

61 и 6 МДа (рMT1 и рPCP1). Взятый в работу штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ содержал типичные для него плазмиды рMT1, рCD1 и рPCP1 с молекулярным весом 61, 45 и 6 МДа. Показано, что плазмидный состав штаммов *Y. pestis* И-1 и И-3536 не претерпел изменений при проведении пассажа через биопробных животных.

Полногеномное секвенирование. По результатам гибридной сборки *de novo* геномов трёх штаммов *Y. pestis* число контигов в полученных последовательностях варьировалось от 3 до 4.

При использовании метода, основанного на картировании ридов на геном референсного штамма *Y. pestis* C092 (табл. 1), было показано, что протяжённость кольцевой хромосомы *Y. pestis* И-3536 составляет 4,5 Мб, для данного штамма характерно наличие двух плазмид – рMT1 размером 95,7 кб и рPCP1 размером 7,8 кб, что подтверждается данными плазмидного анализа. Геном штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ представлен кольцевой хромосомой размером порядка 4,5 Мб и тремя плазмидами рMT1, рCD1 и рPCP1, имеющими длину 94,5; 70 и 7,8 кб соответственно.

В отличие от двух других штаммов, для *Y. pestis* И-1 характерен меньший размер хромосомы (порядка 4,3 Мб), а его плазмидный профиль представлен тремя плазмидами: рCD1 и рPCP1 длиной 68,5 и 7,8 кб и дополнительной плазмидой размером 340 кб, которая ранее не была определена по данным скрининга, что может быть связано с большей разрешающей способностью

полногеномного анализа. Обнаруженная плазида не выявлялась в геноме других ранее изученных штаммов *Y. pestis*, и, вероятно, является следствием генетических перестроек, возникших в ходе лабораторных пассажей культуры *Y. pestis* И-1.

В геномах штаммов исследуемой выборки было предсказано наличие 4140-4227 белок-кодирующих последовательностей, 70-73 локуса, кодирующих тРНК, от 19 до 22 последовательностей рРНК и по одному гену тмРНК (см. табл. 1). Путём выравнивания аннотированных последовательностей *Y. pestis* установлено, что в состав их пангенома входит 4391 locus, при этом 3957 генов являются коровыми. Среди выявленных группоспецифических генов 98 локусов были общими для *Y. pestis* EV и *Y. pestis* И-1, а 123 гена были характерны для чумных микробов EV и И-3536. Количество уникальных локусов варьировалось в зависимости от штамма микроба и было максимальным для *Y. pestis* И-1 (123 гена).

Поиск генов, кодирующих факторы патогенности микроба (табл. 2), показал, что в структуру хромосомы изученных штаммов входят кластеры *waal*, *waalI* и *wab*, связанные с синтезом липополисахарида, ряд локусов, детерминирующих биосинтез липида А, в т.ч. гены поздних ацилтрансфераз *LpxL*, *LpxP* и *MsbB*, гены липопротеина *Lpp* и белка *Ail*, а также локусы *rsa* оперона, кодирующие факторы синтеза и сборки рН6-антигена.

Установлено, что в состав плазмиды рMT1, выявленной у *Y. pestis* EV и *Y. pestis* И-3536,

Таблица 1. Особенности геномной организации исследованных штаммов
Table 1. Features of the genomic organization of the studied strains

Показатель Index <i>Y. pestis</i> EV		Наименование штамма Name strain		
		<i>Y. pestis</i> И-1	<i>Y. pestis</i> И-3536	
Структура генома, размер п.н. Genome structure, bp size	Хромосома Chromosome	4 553 041	4 296 984	4 553 148
	рMT1	94 506	–	95 741
	рCD1	70 336	68 592	–
	рPCP1	7897	7897	7897
Число контигов Number of contigs		4	4	3
GC-состав, % GC composition, %		47,6	47,6	47,6
Общее число ORF Total number		4317	4286	4230
Белок-кодирующие последовательности Protein coding sequences		4227	4190	4140
тРНК		70	73	70
рРНК		19	22	19
тмРНК		1	1	1

Таблица 2. Структура элементов генома изучаемых штаммов *Y. pestis*
Table 2. Structure of genome elements of the studied *Y. pestis* strains

Наименование штамма Name strain	Количество выявленных генов факторов вирулентности Number of identified virulence factor genes				
	Хромосома Chromosome	pMT1	pCD1	pPCP1	NN, 340 kb
<i>Y. pestis</i> EV	95	5	42	1	–
<i>Y. pestis</i> И-1	104	–	42	1	2
<i>Y. pestis</i> И-3536	95	5	–	1	–

входят гены *caf1*-оперона, детерминирующие синтез и сборку F1-антигена, и ген мышинового токсина *Ymt*. Организация плазмиды *pPCP1* была одинаковой для всех штаммов и включала ген активатора плазминогена *Pla*. В свою очередь плазмида *pCD1*, присутствующая в геноме *Y. pestis* И-1 и *Y. pestis* EV, включала 42 локуса, в числе которых были обнаружены псевдоген белка адгезина *YadA*, гены компонентов аппарата секреции третьего типа (*Ysc*), эффекторные белки *Yops* и регуляторные факторы *T3SS*. Определено, что в геноме штамма *Y. pestis* И-1 присутствуют гены оперона *caf1*, имеющие хромосомную, а не плазмидную локализацию. Также в структуре хромосом данного изолята выявлено девять копий псевдогена инвазина *InvA*, который в геноме двух других штаммов присутствовал в количестве двух копий.

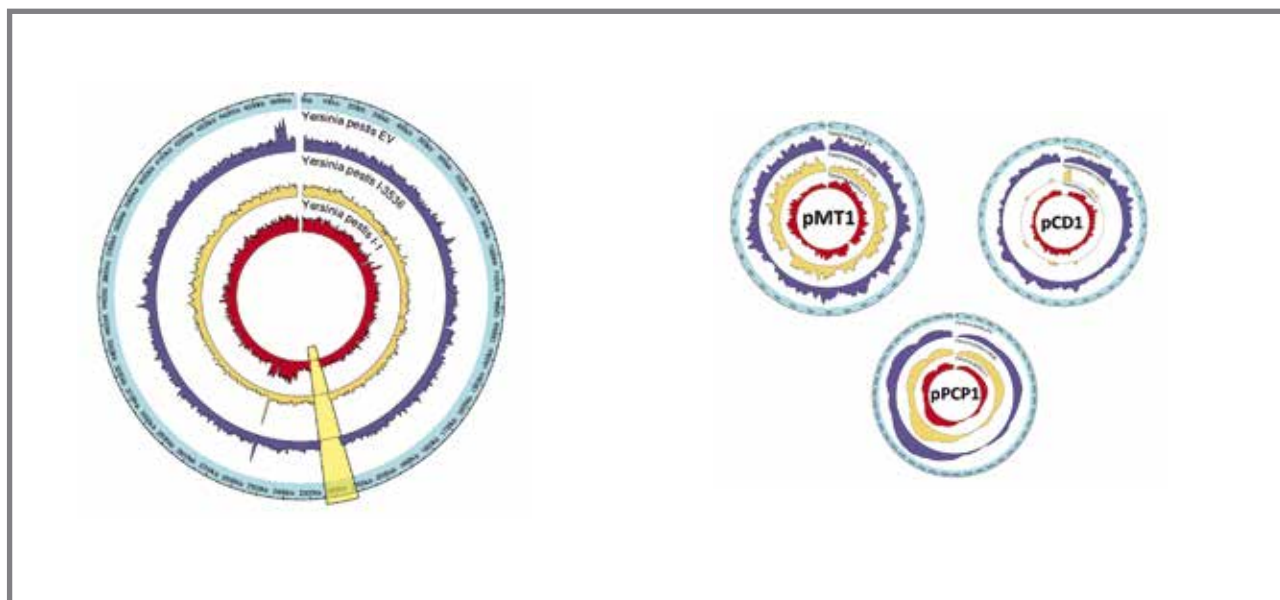
Показано, что в структуре генома всех штаммов отмечается наличие делеции хромосомного локуса *pgm* размером 102 тыс. п.н (рис. 1). Потеря данной области, а также ряда плазмидных генов

обуславливают авирулентность *Y. pestis* И-1 и *Y. pestis* И-3536, что позволяет рассматривать данные штаммы в качестве перспективных кандидатов для последующей разработки на их основе живой ослабленной вакцины. Особый интерес представляет *Y. pestis* И-1, утрата *pgm*-локуса у которого произошла независимо от штаммов линии EV.

Было установлено, что несмотря на результаты скринингового исследования и сборки генома *Y. pestis* И-1, свидетельствующих об отсутствии в его составе плазмиды *pMT1*, сравнение последовательности этого штамма с геномом *Y. pestis* CO92 выявило наличие участков гомологичных данной плазмиде в составе хромосомы, а также плазмиды длиной 340 кб. Аналогичным образом показано, что в структуре генома *Y. pestis* И-3536 присутствуют последовательности гомологичные утраченной этим штаммом плазмиды *pCD1*.

В дальнейшем было выполнено множественное выравнивание хромосомных последовательностей штаммов *Y. pestis* И-1 и И-3536 относительно

Рисунок 1. Карта глубины покрытия ридов изучаемых штаммов относительно генома референсного штамма *Y. pestis* CO92. 1а – покрытие хромосомных последовательностей, выделенный сегмент соответствует делеции *pgm*-локуса. 1б – покрытие последовательностей плазмид
Figure 1. Map of the depth of read coverage of the studied strains relative to the genome of the reference strain *Y. pestis* CO92. The segment highlighted in Figure 1a corresponds to the deletion of the *pgm* locus. 1a – coverage of chromosome sequences, the selected segment corresponds to the deletion of the *pgm* locus. 1b - coverage of plasmid sequences



генома *Y. pestis* EV с целью отражения таких крупных эволюционных изменений, как инверсии, транслокации, события горизонтального переноса генов (рис. 2).

По данным выравнивания установлено, что нуклеотидная последовательность *Y. pestis* И-3536 содержит обширную область размером 146 кб, инвертированную относительно генома *Y. pestis* EV. Также в отличие от контрольной последовательности в геноме штамма *Y. pestis* И-1 было выявлено присутствие значительного числа неомологичных участков.

Также в этой работе проведен анализ гена оротатфосфорибозилтрансферазы *pyrE*, который ранее был охарактеризован в качестве горячей точки мутаций для штаммов линии *Y. pestis* EV [31]. Установлено, что штамм *Y. pestis* И-3536, подобно *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, характеризуется наличием делеции длиной 6 п.н., расположенной на 3'-конце *pyrE* (рис. 3). В отличие от них, *Y. pestis* И-1 подобно штаммам дикого типа содержит интактную последовательность данного локуса.

В процессе выполнения исследования был осуществлен поиск кластеров, отвечающих за синтез

бактериальных вторичных метаболитов. Было выявлено восемь подобных регионов (табл. 3).

Особый интерес вызвал кластер, предположительно связанный с синтезом сидерофора пуртебактина/авароферрина. В настоящий момент накоплены данные о немаловажной роли транспортных систем переходных металлов в выживании *Y. pestis* в макроорганизме и их влиянии на патогенез чумы [5]. В составе выявленного кластера (рис. 4) обнаружены две копии гена, кодирующего белок, относящийся к семейству азробактинсинтетаз *lucA/lucC*, гены сидерофоржелезоредуктазы *FhuF*, аспаратаминотрансферазы, L-орнитин-N(5)-оксигеназы и ацетилтрансферазы, локус *gndA*, кодирующий НАДФ-зависимую фосфоглюконатдегидрогеназу, две копии гена УТФ-глюкозо-1-фосфатуридилтрансферазы *GalU*, гены компонентов АВС-транспортной системы железа – АТФ-связывающего белка, двух пермеаз транспортера железа АВС, субстрат-связывающего белка, ТопВ-зависимого рецептора сидерофоров.

Отмечено, что для *Y. pestis* И-1 и *Y. pestis* И-3536 организация генного кластера идентична. Иная картина характерна для *Y. pestis* EV – в геноме

Рисунок 2. Сравнение геномной структуры исследуемых штаммов: 1 – *Y. pestis* EV; 2 – *Y. pestis* И-3536; 3 – *Y. pestis* И-1

Figure 2. Comparison of the genomic structure of the studied strains: 1 – *Y. pestis* EV; 2 – *Y. pestis* I-3536; 3 – *Y. pestis* I-1

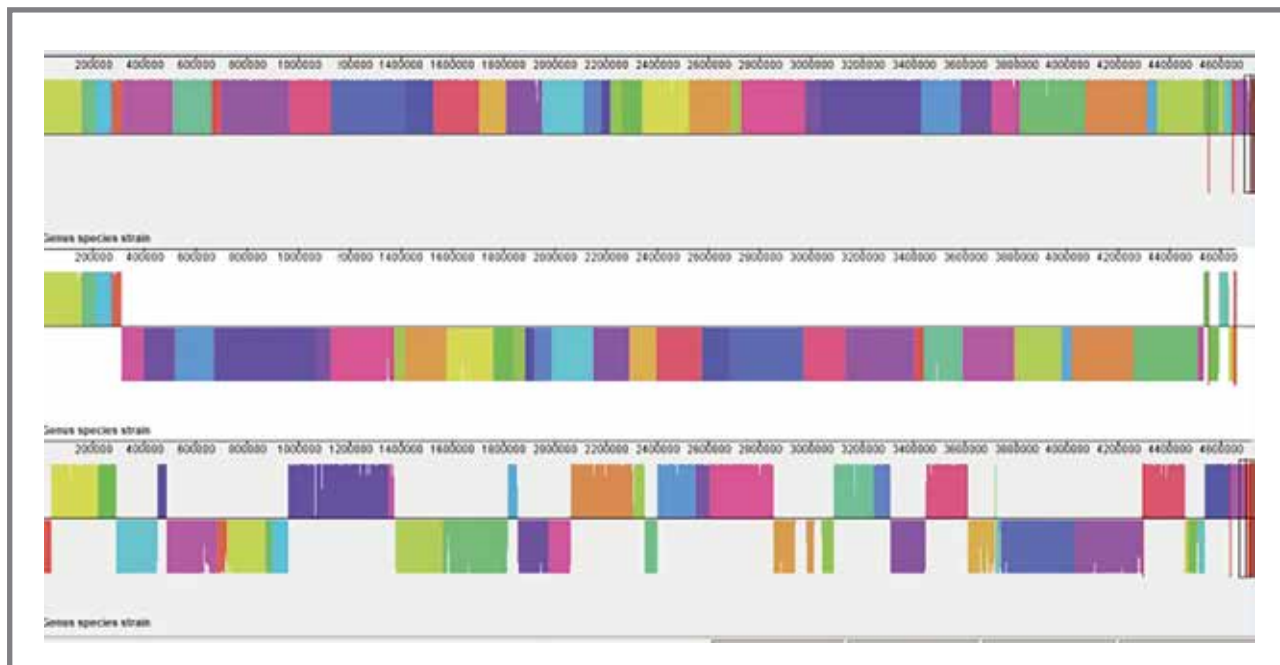


Рисунок 3. Структура целевого участка гена *pyrE* штаммов *Y. pestis*

Figure 3. Structure of the target region of the *pyrE* gene of the *Y. pestis* strains

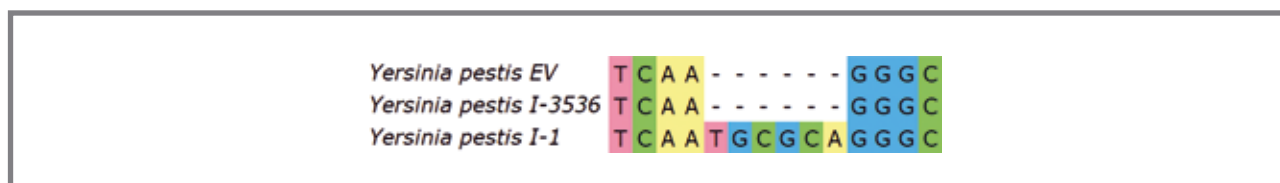
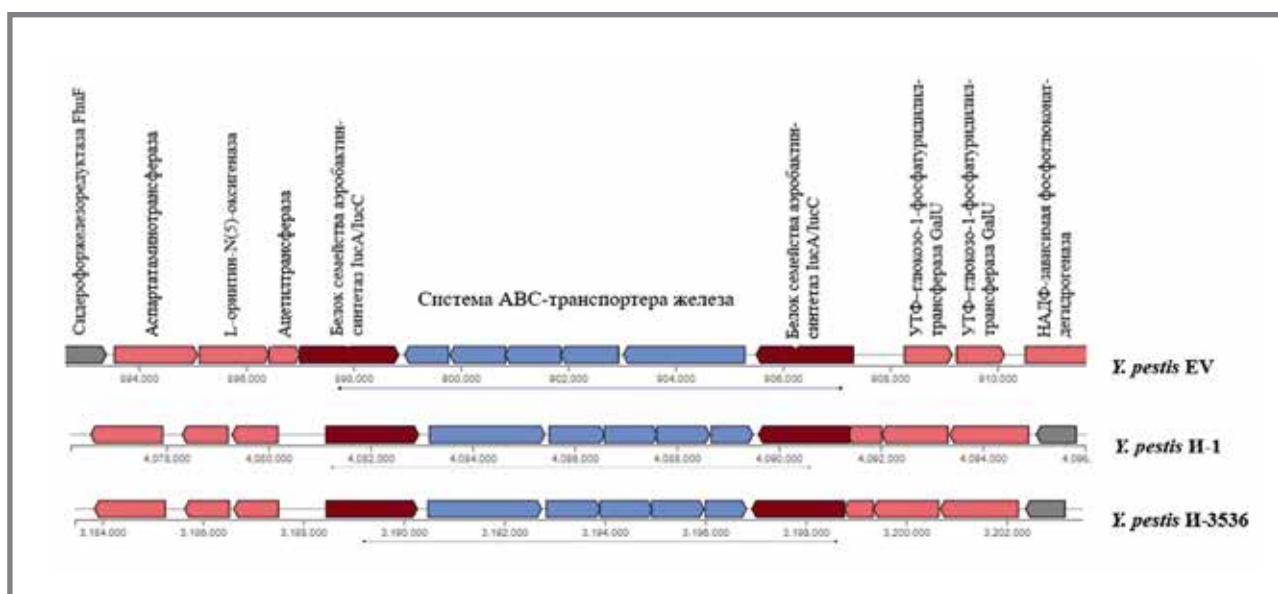


Таблица 3. Данные скрининга биосинтетических кластеров
Table 3. Screening data for biosynthetic clusters

Наименование Name	Известный кластер с наибольшим сходством Known Cluster with Most Similarity	Процент сходства, % Similarity percentage, %
Кластер синтеза тиопептидных антибиотиков Cluster for the synthesis of thiopeptide antibiotics	–	–
Гены, подобные поликетид-синтазам Genes similar to polyketide synthase	TaxIIAids A	15
Кластер синтеза сидерофора Cluster of siderophore synthesis	Путребактин/ авароферрин Putrebactin/Avaroferrin	100
Гены, кодирующие синтез серлактона Genes encoding serlactone synthesis	–	–
Гены, подобные нерибосомным пептидсинтазам Genes similar to nonribosomal peptide synthetases	Колицин V Colicin V	1
Кластеры, кодирующий синтез сидерофора Clusters encoding siderophore synthesis	Аэробактин Aerobactin	66
Гены нерибосомных пептидсинтаз Genes of nonribosomal peptide synthetases	Колицин V Colicin V	1
Кластер, кодирующий β-лактонсодержащий ингибитор протеазы Cluster encoding a β-lactone-containing protease inhibitor	Колицин V Colicin V	1

Рисунок 4. Структура обнаруженного кластера генов синтеза сидерофора
Figure 4. Structure of the detected siderophore synthesis gene cluster



этого штамма наблюдается инверсия и транслокация этой структуры. Остается открытым вопрос о возможной роли данного кластера в вирулентности и реактогенности чумного микроба, что требует проведения его дальнейшего изучения.

Таким образом, в рамках работы осуществлено изучение геномной организации двух авирулентных штаммов *Y. pestis* II-1 и *Y. pestis* II-3536, а также уточнена генетическая структура вакцинного штамма *Y. pestis* EV. Согласно полученным данным, для всех трёх штаммов характерна

делеция хромосомной области *pgm*, что по аналогии с *Y. pestis* EV даёт возможность использования *Y. pestis* II-1 и *Y. pestis* II-3536 в качестве основы для создания вакцинной культуры. Особый интерес вызвал штамм *Y. pestis* II-3536, для которого характерна потеря плазмиды *pCD1* (при наличии в структуре генома гомологичных плазмиде участков), что в теории может свидетельствовать о более низкой реактогенности этого штамма по сравнению с *Y. pestis* EV и сохранение его иммуногенности из-за наличия плазмиды *pMT1*.

В свою очередь, *Y. pestis* И-1 утратил плазмиду рMT1, последовательности гомологичные которой обнаружены в составе хромосомы и плазмиды протяженностью 340 кб.

Литература

1. Бугоркова С. А., Девдариани З. Л., Шуковская Т. Н., Кутырев В. В. Исторические и современные представления о проблеме специфической профилактики чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2013;(3):63–9.
2. Микшис Н. И., Кутырев В. В. Современное состояние проблемы разработки вакцин для специфической профилактики чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2019;(1):50–63.
3. Вакцина чумная молекулярная микроинкапсулированная (ВЧММ). Бактериология. 2018;3(1):74–5.
4. Кутырев В. В., Ерошенко Г. А., Куклева Л. М. и др. Сравнительная генетическая характеристика вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV и его предполагаемых «вирулентных производных». Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009;(3):50–6.
5. Perry R.D., Bobrov A.G., Fetherston J.D. The role of transition metal transporters for iron, zinc, manganese, and copper in the pathogenesis of *Yersinia pestis*. *Metallomics*. 2015;7(6): 965–78.
6. Бывалов А. А., Кутырев В. В. Современное состояние проблемы совершенствования средств вакцинопрофилактики чумы. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011;(2):97–104.
7. Meyer K. F., Smith G., Foster L., Brookman M., Sung M. Live, Attenuated *Yersinia pestis* Vaccine: Virulent in Nonhuman Primates, Harmless to Guinea Pigs. *The Journal of Infectious Diseases*. 1974;29(1):85–120.
8. Meyer K.F. Effectiveness of live or killed plague vaccines in man. *Bull. World Health Organ*. 1970;42(5):653–6.
9. WHO Target Product Profile for Plague Vaccines. [Internet]. 2018 [Cited 07 Aug 2018]. Доступно на: http://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/Plague_vaccines_workshop-23-april-2018/en/.
10. Mellado-Sanchez G., Ramirez K., Drachenberg C.B., et al. Characterization of systemic and pneumonic murine models of plague infection using a conditionally virulent strain. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2013;36(2):113–28.
11. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fatal laboratory-acquired infection with an attenuated *Yersinia pestis* Strain—Chicago, Illinois, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2011;60(7):201–5.
12. Quenee L.E., Hermanas T.M., Ciletti N., et al. Hereditary hemochromatosis restores the virulence of plague vaccine strains. *J Infect Dis*. 2012;206(7):1050–8.
13. Li B., Du C., Zhou L., Bi Y., Wang X., et al. Humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* infection in long-term recovered plague patients. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19(2):228–34.
14. Davis K.J., Fritz D.L., Pitt M.L., et al. Pathology of experimental pneumonic plague produced by fraction 1-positive and fraction 1-negative *Yersinia pestis* in African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Arch Pathol Lab Med*. 1996;120(2):156–63.
15. Hu J., Jiao L., Hu Y., et al. One year immunogenicity and safety of subunit plague vaccine in Chinese healthy adults: An extended open-label study. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;14(11): 2701–2705.
16. Jones S.M., Day F., Stagg A.J., Williamson E.D. Protection conferred by a fully recombinant sub-unit vaccine against *Yersinia pestis* in male and female mice of four inbred strains. *Vaccine*. 2000;19(2–3):358–66.
17. Qi Z., Zhou L., Zhang Q., et al. Comparison of mouse, guinea pig and rabbit models for evaluation of plague subunit vaccine F1+rV270. *Vaccine*. 2010;28(6):1655–60.
18. Qiu Y., Liu Y., Qi Z., et al. Comparison of immunological responses of plague vaccines F1+rV270 and EV76 in Chinese-origin rhesus macaque, *Macaca mulatta*. *Scand J Immunol*. 2010; 72(5): 425–33.
19. Pitt M.L.M. Non-human primates as a model for pneumonic plague. Gaithersburg, MD: Animal Models and Correlates of Protection for Plague Vaccines Workshop; 2004.
20. Philipovskiy A.V., Smiley S.T. Vaccination with live *Yersinia pestis* primes CD4 and CD8 T cells that synergistically protect against lethal pulmonary *Y. pestis* infection. *Infect Immun*. 2007;75(2):878–85.
21. Cote C.K., Biryukov S.S., Klimko C.P., et al. Protection Elicited by Attenuated Live *Yersinia pestis* Vaccine Strains against Lethal Infection with Virulent *Y. pestis*. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(161):1–25.
22. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union. 2010;276(53):33–79.
23. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*. 1984;12(1):19–36.
24. Витязева С. А., Балахонов С. В., Пещерова Р. И., Шестопалов М. Ю. Методические рекомендации по определению плазмидного состава патогенных штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Иркутск; 2018;12.
25. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–20.
26. Antipov D., Korobeynikov A., McLean J.S., Pevzner P.A. HybridSPAdes: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads. *Bioinformatics*. 2016;32(7):1009–15.
27. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068–9.
28. Page A.J., Cummins C.A., Hunt M., et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*. 2015; 31(22):3691–3.
29. Darling A.C., Mau B., Blattner F.R., Perna N.T. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res*. 2004;14(7):1394–403.
30. Medema M.H., Cimermanic P., et al. AntiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:W339–46.
31. Cui Y., Yang X., Xiao X., et al. Genetic variations of live attenuated plague vaccine strains (*Yersinia pestis* EV76 lineage) during laboratory passages in different countries. *Infect Genet Evol*. 2014;26:172–9.

References

1. Bugorkova S.A., Devdariani Z.L., Shchukovskaya T.N., Kutyrev V.V. Historical and Modern Views on the Problem of Specific Plague Prophylaxis. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2013;(3):63–9 (In Russ.).
2. Mikshis N.I., Kutyrev V.V. Current State of the Problem of Vaccine Development for Specific Prophylaxis of Plague. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019;(1):50–63 (In Russ.).
3. Molecular micro-encapsulated plague vaccine (MMPV). *Bakteriologiya*. 2018;3(1):74–5 (In Russ.).
4. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., et al. Comparative genetic characteristics of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV and its proposed «virulent derivatives». *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2009;(3):50–6 (In Russ.).
5. Perry R.D., Bobrov A.G., Fetherston J.D. The role of transition metal transporters for iron, zinc, manganese, and copper in the pathogenesis of *Yersinia pestis*. *Metallomics*. 2015;7(6): 965–78.
6. Byvalov A.A., Kutyrev V.V. Current state of the problem of improving the tools for plague vaccine prophylaxis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2011;(2):97–104 (In Russ.).
7. Meyer K. F., Smith G., Foster L., Brookman M., Sung M. Live, Attenuated *Yersinia pestis* Vaccine: Virulent in Nonhuman Primates, Harmless to Guinea Pigs. *The Journal of Infectious Diseases*. 1974;29(1):85–120.
8. Meyer K.F. Effectiveness of live or killed plague vaccines in man. *Bull. World Health Organ*. 1970;42(5):653–6.
9. WHO Target Product Profile for Plague Vaccines. [Internet]. 2018 [Cited 07 Aug 2018]. Доступно на: http://www.who.int/blueprint/what/norms-standards/Plague_vaccines_workshop-23-april-2018/en/.
10. Mellado-Sanchez G., Ramirez K., Drachenberg C.B., et al. Characterization of systemic and pneumonic murine models of plague infection using a conditionally virulent strain. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2013;36(2):113–28.
11. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fatal laboratory-acquired infection with an attenuated *Yersinia pestis* Strain—Chicago, Illinois, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2011;60(7):201–5.
12. Quenee L.E., Hermanas T.M., Ciletti N., et al. Hereditary hemochromatosis restores the virulence of plague vaccine strains. *J Infect Dis*. 2012;206(7):1050–8.
13. Li B., Du C., Zhou L., Bi Y., Wang X., et al. Humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* infection in long-term recovered plague patients. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19(2):228–34.
14. Davis K.J., Fritz D.L., Pitt M.L., et al. Pathology of experimental pneumonic plague produced by fraction 1-positive and fraction 1-negative *Yersinia pestis* in African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Arch Pathol Lab Med*. 1996;120(2):156–63.
15. Hu J., Jiao L., Hu Y., et al. One year immunogenicity and safety of subunit plague vaccine in Chinese healthy adults: An extended open-label study. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;14(11): 2701–2705.

16. Jones S.M., Day F., Stagg A.J., Williamson E.D. Protection conferred by a fully recombinant sub-unit vaccine against *Yersinia pestis* in male and female mice of four inbred strains. *Vaccine*. 2000;19(2-3):358-66.
17. Qi Z., Zhou L., Zhang Q., et al. Comparison of mouse, guinea pig and rabbit models for evaluation of plague subunit vaccine F1+rV270. *Vaccine*. 2010;28(6):1655-60.
18. Qiu Y., Liu Y., Qi Z., et al. Comparison of immunological responses of plague vaccines F1+rV270 and EV76 in Chinese-origin rhesus macaque, *Macaca mulatta*. *Scand J Immunol*. 2010; 72(5): 425-33.
19. Pitt M.L.M. Non-human primates as a model for pneumonic plague. Gaithersburg, MD: Animal Models and Correlates of Protection for Plague Vaccines Workshop; 2004.
20. Philipovskiy A.V., Smiley S.T. Vaccination with live *Yersinia pestis* primes CD4 and CD8 T cells that synergistically protect against lethal pulmonary *Y. pestis* infection. *Infect Immun*. 2007;75(2):878-85.
21. Cote C.K., Biryukov S.S., Klimko C.P., et al. Protection Elicited by Attenuated Live *Yersinia pestis* Vaccine Strains against Lethal Infection with Virulent *Y. pestis*. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(161):1-25.
22. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union. 2010;276(53):33-79.
23. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*. 1984;12(1):19-36.
24. Vityazeva S.A., Balakhonov S.V., Peschero R.I., Shestopalov M.Yu. Guidelines for determining the plasmid composition of pathogenic strains of bacteria of the Enterobacteriaceae family. *Irkutsk*; 2018;12 (In Russ.).
25. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-20.
26. Antipov D., Korobeynikov A., McLean J.S., Pevzner P.A. HybridSPAdes: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads. *Bioinformatics*. 2016;32(7):1009-15.
27. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068-9.
28. Page A.J., Cummins C.A., Hunt M., et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*. 2015; 31(22):3691-3.
29. Darling A.C., Mau B., Blattner F.R., Perna N.T. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res*. 2004;14(7):1394-403.
30. Medema M.H., Blin K., Cimermancic P., et al. AntiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:W339-46.
31. Cui Y., Yang X., Xiao X., Anisimov A.P., Li D., Yan Y., et al. Genetic variations of live attenuated plague vaccine strains (*Yersinia pestis* EV76 lineage) during laboratory passages in different countries. *Infect Genet Evol*. 2014; 26: 172-9.

Об авторах

- **Алексей Викторович Григорьевых** – м. н. с. отдела микробиологии чумы ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. +7 (914) 934-20-50, grigorievykh-av@yandex.ru. ORCID: 0000-0001-6563-9938.
- **Никита Олегович Бочалгин** – врач-бактериолог лаборатории холеры ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. +7 (395) 222-02-35, sublica@mail.ru. ORCID: 0000-0002-3053-6514.
- **Светлана Александровна Витязева** – к. м. н., заведующая отдела микробиологии чумы ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. +7 (3952) 22-01-35, adm@chumin.irkutsk.ru. ORCID: 0000-0003-0959-4987.
- **Геннадий Борисович Мухтургин** – врач-бактериолог лаборатории экспериментальных животных ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. +7 (3952) 22-01-35, adm@chumin.irkutsk.ru. ORCID: 0000-0002-0340-8584.
- **Валентина Ивановна Дубровина** – д. б. н., заведующая лабораторией патофизиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. +7 (395) 222-02-35, dubrovina-valya@mail.ru. ORCID: 0000-0001-8561-6207, ScopusID 6603504416.
- **Лилия Валерьевна Миронова** – д. м. н., заместитель директора по лабораторно-диагностической работе ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. +7 (3952) 22-01-35, mironova-lv@yandex.ru. ORCID: 0000-0001-8481-6442.
- **Сергей Владимирович Балахонov** – д. м. н., профессор, директор, ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. +7 (3952) 22-01-35, balakhonov.irk@mail.ru. ORCID: 0000-0003-4201-5828, ScopusID 6602291694.

Поступила: 14.07.2022. Принята к печати: 06.09.2022.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Alexey V. Grigorievykh** – junior researcher of department of plague microbiology of the Irkutsk Research Antiplague Institute of Siberia and Far East. +7 (914) 934-20-50, grigorievykh-av@yandex.ru. ORCID: 0000-0001-6563-9938.
- **Nikita O. Bochalgin** – bacteriologist of the cholera laboratory of the Irkutsk Research Antiplague Institute of Siberia and Far East. +7 (395) 222-02-35, sublica@mail.ru. ORCID: 0000-0002-3053-6514.
- **Svetlana A. Vityazeva** – Cand. Sci. (Med.), chief of department of plague microbiology, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East. +7 (3952) 22-01-35, adm@chumin.irkutsk.ru. ORCID: 0000-0003-0959-4987.
- **Gennadiy B. Mukhturgin** – bacteriologist, laboratory of experimental animals, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East. +7 (3952) 22-01-35, adm@chumin.irkutsk.ru. ORCID: 0000-0002-0340-8584.
- **Valentina I. Dubrovina** – Dr. Sci. (Biol.), Head of the Pathophysiological Laboratory, Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. +7 (395) 222-02-35, dubrovina-valya@mail.ru. ORCID: 0000-0001-8561-6207, ScopusID 6603504416.
- **Liliya V. Mironova** – Dr. Sci. (Med.), chief of the cholera laboratory of the Irkutsk Research Antiplague Institute of Siberia and Far East. +7 (3952) 22-01-35, mironova-lv@yandex.ru. ORCID: 0000-0001-8481-6442.
- **Sergey V. Balakhonov** – Dr. Sci. (Med.), Professor, Director of Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. +7 (3952) 22-01-35, balakhonov.irk@mail.ru. ORCID: 0000-0003-4201-5828, ScopusID 6602291694.

Received: 14.07.2022. Accepted: 06.09.2022.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.