

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека
Федеральное бюджетное учреждение науки
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ»
(ФБУН ГНЦ ПМБ)

На правах рукописи

Вагайская Анастасия Сергеевна

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ТЕНИ *Yersinia pestis*

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д-р. мед. наук Дентовская С.В.

Оболенск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Получение бактериальных теней.....	14
1.2 Взаимодействие бактериальных теней и клеток-мишеней.....	18
1.3 Бактериальные тени различных патогенов.....	21
1.4 Заключение по обзору литературы.....	30
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	33
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	33
2.1 Штаммы микроорганизмов.....	33
2.2 Плазмиды.....	35
2.3 Праймеры.....	36
2.4 Лабораторные животные.....	37
2.5 Среды и условия культивирования.....	38
2.6 Полимеразная цепная реакция.....	38
2.7 Анализ белковых препаратов в полиакриамидном геле.....	39
2.8 Выделение и очистка капсульного F1 (Caf1) и V (LcrV) антигенов <i>Y. pestis</i>	39
2.9 Конструирование штамма <i>Y. pestis</i> с низкой эндотоксичностью....	40
2.10 Конструирование литических плазмид.....	40
2.11 Препаративное получения бактериальных теней.....	42
2.12 Проверка специфической стерильности.....	43
2.13 Определение специфической безопасности.....	43
2.14 Просвечивающая электронная микроскопия.....	44
2.15 Иммунизация животных и последующее заражение вирулентным штаммом <i>Y. pestis</i>	45
2.16 Моделирование экспериментальной чумы в условиях УББ 2 лаборатории.....	46
2.17 Анализ иммунного ответа.....	47
2.17.1 Иммуноферментный анализ.....	47
2.17.2 Клеточный ответ: анализ стимулированных спленоцитов.....	47
2.18 Статистический анализ данных.....	48

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	49
ГЛАВА 3 ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФАГОВЫХ ЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТЕНЕЙ.....	49
3.1 Создание набора литических плазмид для продукции бактериальных теней.....	50
3.2 Получение бактериальных теней на основе штамма <i>E. coli</i> DH5a..	51
3.3 Сравнительный анализ препаратов бактериальных теней <i>E. coli</i> DH5a посредством просвечивающей электронной микроскопии.....	52
3.4 Заключение по главе 3.....	54
ГЛАВА 4 ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТЕНЕЙ <i>Y. pestis</i>	55
4.1 Конструирование штамма <i>Y. pestis</i> KM260(12) Δ lpxM.....	56
4.2 Получение бактериальных теней на основе штамма <i>Y. pestis</i> KM260(12) Δ lpxM.....	57
4.3 Просвечивающая электронная микроскопия бактериальных теней <i>Y. pestis</i> KM260 (12) Δ lpxM.....	58
4.4 Анализ иммунного ответа у лабораторных животных.....	61
4.4.1 Определение уровня IgG у лабораторных животных.....	61
4.4.2 IFN- γ анализ.....	62
4.4.3 Анализ воспалительной реакции.....	62
4.5 Оценка протективной активности различающихся по степени деструкции пептидогликана вариантов бактериальных теней <i>Y. pestis</i> KM260(12) Δ lpxM для лабораторных животных.....	63
4.6. Компонентный состав чумной субъединичной вакцины.....	65
4.7 Специфическая безопасность композиции ЕУК-БТ с капсульным F1 (Caf1) и V (LcrV) антигенами чумного микроба.....	66
4.8 Специфическая активность композиции ЕУК-БТ с капсульным F1 (Caf1) и V (LcrV) антигенами чумного микроба.....	67
4.8.1 Иммунологическая активность композиции ЕУК-БТ с капсульным F1 (Caf1) и V (LcrV) антигенами чумного микроба.....	68
4.9 Заключение по главе 4.....	70

ГЛАВА 5 МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧУМЫ В УСЛОВИЯХ УББ 2 ЛАБОРАТОРИИ.....	73
5.1 Влияние железа на остаточную вирулентность Δpgt штаммов <i>Y. pestis</i>	75
5.2 Характеристика заболевания.....	77
5.3 Распространение по органам.....	79
5.4. Модель бубонной чумы у беспородных мышей в условиях УББ 2 лаборатории после введения штамма <i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ и декстрана железа для изучения протективности кандидатных вакцинных препаратов.....	80
5.5 Заключение по главе 5.....	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	85
ВЫВОДЫ.....	90
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ	91
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	93
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	124

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность:

Чума – зоонозная бактериальная инфекция, вызываемая *Yersinia pestis* (I группа патогенности), унесла более 200 миллионов человеческих жизней. За чуть более 100 лет с момента открытия её этиологического агента предпринято несколько попыток разработать эффективную вакцину против чумы. Классические убитые и живые чумные вакцины первого поколения спасли десятки миллионов людей, но убитые неэффективны против легочной чумы, а живые могут вызвать у лиц с нарушениями иммунного статуса или метаболическими нарушениями генерализованный инфекционный процесс с летальным исходом.

Обоснование антигенного состава любой современной вакцины является первичным и решающим этапом ее разработки. При создании такого препарата для иммунопрофилактики чумы чрезвычайно сложна и до сих пор полностью не решена проблема выявления новых иммунодоминантных антигенов, а в некоторых случаях даже эпитопов, индуцирующих формирование защитного иммунитета. Для этого есть несколько причин, и, возможно, самая важная из них заключается в том, что не все гены, продукты которых необходимы для адаптации возбудителя чумы, *Y. pestis*, к различным нишам хозяина во время инфекции, способны экспрессироваться *in vitro* с образованием потенциальных протективных антигенов в количествах, достаточных для их выявления и анализа [22]. Кроме того, в процессе выделения и очистки антигенов, а также в процессе приготовления убитых вакцин может изменяться нативная структура белка [65], вызывая конформационную инактивацию протективной активности. Вероятно, что в индукции защитного иммунитета к чуме помимо уже известных иммунодоминантных участвует большое количество других антигенов, каждый из которых вносит относительно небольшой вклад в защитный иммунитет (и поэтому его трудно обнаружить), но при совместном введении они могут обеспечить достаточную защиту.

Что же касается двух иммунодоминантных антигенов *Y. pestis*, то молекулярные вакцины на основе капсульного антигена фракции 1 (F1, Caf1) и белка «вирулентности» V (LcrV) показали многообещающие результаты на нескольких моделях животных [172, 202, 210]. Однако они в основном индуцируют иммунный

ответ, который, как правило, у большинства животных моделей значительно уступает по напряженности и длительности постинфекционному иммунитету (у выживших животных) и даже поствакцинальному иммунитету, индуцированному живыми аттенуированными бактериями у различных видов млекопитающих [1, 46, 68, 69, 154]. Только у мышей препараты, содержащие антиген F1, могут индуцировать степень защиты не меньшую, чем живая чумная вакцина. Противоречивые данные разных лабораторий свидетельствуют о том, что судить об уровне защиты животных по титру антител к определенному антигену *Y. pestis* следует с большой осторожностью. Часть из них полностью отрицает такую корреляцию [73], а другая свидетельствует о умеренной или выраженной положительной корреляции [23, 45]. Эти недостатки чумных субъединичных вакцин объясняют, почему живую чумную вакцину, полученную из производных *pgm*-негативного штамма *Y. pestis* EV76, продолжают использовать в ряде стран [43], несмотря на опасения по поводу безопасности живых бактериальных вакцин [74] и широко известный летальный случай чумы человека, вызванной аналогичным *Pgm*-негативным штаммом у мужчины, страдавшего гемохроматозом [75].

Одним из главных преимуществ субъединичных вакцин является включение в их состав только одного или двух иммунодоминантных антигенов. Этот малокомпонентный состав упрощает и удешевляет производство и контроль препарата, но, в некоторых случаях, может быть и существенным недостатком. Например, иммунизация капсульным антигеном F1 никоим образом не может защитить от заражения бескапсульным штаммом, сохранившим вирулентность на уровне бактерий дикого типа [54, 76, 237]. Оба упомянутых антигена, Caf1 [133] и LcrV [15], имеют изоформы, характеризующиеся низкой перекрестной протективностью [44, 133, 189]. Необходимо также учитывать индивидуальный ответ иммунизированных или инфицированных животных и человека на введенные антигены [149, 154, 172], а также видовую специфичность иммунного ответа отдельных видов млекопитающих на отдельные антигены *Y. pestis* или их различные комбинации как в составе молекулярных [28, 119, 144-146, 182, 183, 199, 215-217], так и живых рекомбинантных [50] вакцин. Например, обеспечивая 100 %-ую защиту мышей субъединичные вакцины защищают лишь часть более близких к человеку по иммунному ответу морских свинок и обезьян [31]. Различия, выявленные в результатах

экспериментов по определению протективной эффективности вакцинных препаратов в отношении обезьян, вероятно, обусловлены использованием в экспериментах различных видов этих животных: макак-резусов (*Macaca mulatta*), павианов-гамадрилов (*Papio hamadryas*), вербен (*Cercopithecus pygerythrus*) или зеленых мартышек (*Chlorocebus aethiops*); различные линии мышей также отличаются чувствительностью к *Y. pestis* и свойствами иммуногенеза [48]. В свою очередь нерастворимый в воде «остаточный» антиген из клеточных стенок *Y. pestis* стимулирует Т-клеточный иммунный ответ, обеспечивающий надежную защиту от инфекции морских свинок и обезьян, но не эффективный в отношении мышей [16, 29, 31, 123].

Для повышения протективной эффективности вакцинных препаратов за счет формирования более сбалансированного клеточного и гуморального иммунного ответа в настоящее время применяют адьюванты [12, 132, 168, 211]. Адьюванты, содержащие алюминий, десятилетиями используют в составе вакцин, но они способствуют слабой индукции Th1 или клеточно-опосредованного иммунитета [86, 148] и требуют охлаждения во время транспортировки и хранения. В мире ежегодно примерно 50 % вакцин непригодно к использованию из-за нарушения холодной цепи [24, 192]. Усилия исследователей были направлены на разработку вакцинной композиции, которая решает проблемы сбалансированности Th2 гуморального и Th1 клеточного иммунного ответа и стабильности препарата во время его хранения в условиях отсутствия холодной цепи.

Было показано, что ряд природных компонентов бактериальных клеток обладают адьювантной активностью [9, 92, 97, 198, 222, 248]. Новые подходы создания неживых «самоадьювантных» бактериальных вакцин основаны на технологиях получения везикул внешних мембран (ВВМ) [38] и бактериальных теней (БТ) [39].

Степень разработанности темы исследования:

Группа австрийских ученых под руководством W. Lubitz предложила новую технологию конструирования полиантигенных вакцин на основе «бактериальных теней», которые представляют собой лишённые цитоплазмы клеточные стенки грамотрицательных бактерий с неповрежденными поверхностными структурами [20]. Данная технология была успешно использована на моделях *Vibrio cholerae*, *Salmonella*

enteritidis, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* и *Yersinia enterocolitica* и др. [34], но не была адаптирована к чумному микробу.

Конструирование бактериальных теней чумного микроба позволит оценить перспективность использования данной технологии для разработки прототипов инактивированной чумной вакцины, эффективно защищающих от гибели несколько видов лабораторных животных.

Цель работы:

Конструирование и оценка протективной активности бактериальных теней *Y. pestis*.

Задачи исследования:

1. Сконструировать набор плазмид, несущих различные комбинации гена белка E фага φX174 с кассетами литических генов систем «холин-эндолизин» фага λ или чумного диагностического фага Л-413С, и определить их эффективность на модели кишечной палочки.

2. Получить БТ на основе аттенуированного штамма *Y. pestis* с пониженной реактогенностью.

3. Оценить гуморальный и клеточный иммунный ответ у мышей и морских свинок на препараты БТ *Y. pestis* и изучить зависимость протективности от степени деструкции пептидогликана клеточной стенки.

4. Определить иммунологическую активность композиции БТ *Y. pestis* и иммунодоминантных антигенов чумного микроба – капсульного антигена F1 (Caf1) и V антигена (LcrV) для мышей и морских свинок.

5. Оптимизировать методические приемы моделирования бубонной чумы у лабораторных животных после введения аттенуированных Δpgm штаммов *Y. pestis* с использованием декстрана железа.

Научная новизна:

Сконструирован набор литических плазмид, несущих различные комбинации гена белка E бактериофага φX174 с кассетами литических генов систем «холин-эндолизин» бактериофага λ или чумного диагностического бактериофага Л-413С.

При сравнительной оценке эффективности фаговых литических ферментов сконструированных плазмид на модели кишечной палочки и чумного микроба получены бактериальные тени с различной степенью редукции пептидогликана

клеточной стенки. Установлена наименьшая литическая способность белка E бактериофага фХ174 и максимальная степень деструкции пептидогликана после воздействия холина и эндолизина чумного диагностического бактериофага Л-413С или комбинации белка E, холина и эндолизина бактериофага Л-413С.

Установлено, что гидролиз пептидогликана в составе бактериальных теней чумного микроба сопровождается достоверным повышением протективной активности препарата в отношении морских свинок, коррелирующее с значительным повышением уровней IFN- γ в спленocyтaх животных, иммунизированных препаратом УК-БТ и особенно ЕУК-БТ.

Показано, что моделирование бубонной чумы у беспородных мышей в условиях УББ 2 лаборатории путем подкожного введения штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ и декстрана железа можно использовать для изучения протективности кандидатных вакцинных препаратов на ранних стадиях разработки.

Теоретическая и практическая значимость исследования:

Получены новые данные о хозяйской специфичности противочумного иммунитета, индуцированного введением препаратов бактериальных теней из штамма чумного микроба, не содержащего основные иммунродоминантные антигены: капсульный антиген F1 (Caf1) и/или V антиген (LcrV), а также влияние степени редуцированности пептидогликана клеточной стенки чумного микроба в составе БТ на напряженность формируемого иммунного ответа у морских свинок.

Предложен новый морфотип БТ – «бактериальные мешочки», характеризующийся отсутствием пептидогликанового каркаса, и выдвинута гипотеза механизмов его формирования.

Обоснован компонентный состав прототипа чумной полигостальной вакцины, включающей препарат БТ из бесплазмидного аттенуированного штамма *Y. pestis* КМ 260(12) Δ *lpxM*/pEYR-E-Y-K и иммунодоминантные антигены чумного микроба – капсульный антиген F1 (Caf1) и V антиген (LcrV).

Разработаны основные приемы наработки препарата бактериальных теней из аттенуированных штаммов чумного микроба *Y. pestis* с использованием фаговых литических ферментов. Подготовлены методические рекомендации «Получение бактериальных теней из аттенуированных штаммов *Yersinia pestis*» (утверждены

директором ФБУН ГНЦ ПМБ 31.05.2023 г., протокол № 3) (учрежденческий уровень внедрения).

Оптимизированы методические приемы моделирования бубонной чумы с использованием декстрана железа у лабораторных животных, зараженных аттенуированными Δpgm штаммами *Y. pestis*.

Депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (п. Оболенск, Московская обл.) семь штаммов: *Y. pestis* subsp. *pestis* KM260(12) $\Delta lpxM/pEYR'$ -E-Y-K, несущий плазмиду pEYR'-E-Y-K с геном белка E бактериофага $\phi X174$ и кассетой литических генов систем «холин-эндолизин» чумного диагностического бактериофага Л-413С, а также *Escherichia coli* DH5 α /pEYR', *E. coli* DH5 α /pEYR'-E, *E. coli* DH5 α /pEYR'-Y-K, *E. coli* DH5 α /pEYR'-E-Y-K, *E. coli* DH5 α /pEYR'-Sam7-R-Rz и *E. coli* DH5 α /pEYR'-E-Sam7-R-Rz – штаммы, несущие литические плазмиды pEYR', pEYR'-E, pEYR'-Y-K, pEYR'-E-Y-K, pEYR'-Sam7-R-Rz и pEYR'-E-Sam7-R-Rz, соответственно (федеральный уровень внедрения).

Материалы диссертационной работы используются при подготовке кадров высшей квалификации (аспирантуре) и для слушателей курсов профессиональной переподготовки и повышения квалификации ФБУН Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора при чтении лекций и проведении практических занятий в рамках основной профессиональной образовательной программы подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по направлению 15.1. – Биологические науки, профиль 15.1.11. – микробиология и программы дополнительного профессионального образования «Микробиология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности».

Методология и методы исследования:

Методология исследования соответствовала поставленным задачам. Предметом исследования явились БТ *Y. pestis* с редуцированным в различной степени пептидогликаном и хозяйская специфичность иммунного ответа у лабораторных животных, индуцированная препаратами БТ. В работе использовали молекулярно-биологические, микробиологические, генетические, иммунобиологические и биоинформационные методы, а также методы статистической обработки данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный комплекс методических приемов и сконструированный на основе репликона рА15 набор литических плазмид, несущих под контролем промотора рR' фага λ *cI857Sam7* различные комбинации гена белка E фага ϕ X174 с кассетами литических генов систем «холин-эндолизин» фагов λ или чумного диагностического фага Л-413С обеспечивает конструирование изогенных наборов БТ энтеробактерий с различной степенью деструкции клеточной стенки, позволяющих отобрать наиболее перспективные литические конструкции для последующего производства вакцинных препаратов.

2. Бактериальные тени чумного микроба эффективно защищают от гибели морских свинок при заражении вирулентным штаммом *Y. pestis*, а в комбинации с иммунодоминантными антигенами чумного микроба – капсульным антигеном F1 (Caf1) и V антигеном (LcrV) достоверно потенцируют протективность последних как для мышей, так и морских свинок.

3. Моделирование с использованием декстрана железа бубонной чумы у беспородных мышей, зараженных подкожно аттенуированным Δ *rgm* штаммом *Y. pestis*, является безопасным для экспериментатора инструментом идентификации наиболее многообещающих кандидатных вакцинных препаратов, защитный потенциал которых впоследствии может быть оценен с использованием вирулентных штаммов чумного микроба.

Степень достоверности и апробация результатов:

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках гранта Российского научного фонда № 19-15-00072 «Протективная активность "бактериальных теней" *Yersinia pestis*» (научный руководитель – д.м.н., проф. А.П. Анисимов) (номер регистрации ЕГИСМ АААА-А19-119062690056-9), отраслевых научно-исследовательских программ Роспотребнадзора на 2016–2020 и 2021-2025 гг.: «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» (номер регистрации ЕГИСМ 116030310013), «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации» (номер регистрации

ЕГИСМ 121022500007-6), а также в рамках работы Центра геномных технологий мирового уровня по биобезопасности (грант 075-15-2019-1671 Министерства науки и высшего образования).

Достоверность результатов определяется использованием современных методов, документально регистрирующих изучаемые явления и объекты, достаточным по объему фактическим материалом и наличием соответствующих контролей, а также проведением статистической обработки данных.

Материалы диссертации представлены и обсуждены на шести Всероссийских и международных конференциях: XIII Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (24-26 мая 2021 г. Москва); IV Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (24-26 мая 2021 г. Москва); 24th International Scientific Conference «Current issues on zoonotic diseases» (2021 Ulaanbaatar, Mongolia); XIV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (22-24 июня 2022 д. Лужки, Московская обл.); Международном симпозиуме «*Yersinia* 14» (26–28 сентября 2022 г. Санкт-Петербург); VII Национальном конгрессе бактериологов (28-29 сентября 2022 г. г. Санкт-Петербург), VIII Национальном конгрессе бактериологов (27-28 сентября 2023 г. г. Москва)

Личное участие автора в получении результатов:

Личное участие автора заключалось в анализе литературных данных, планировании экспериментов, в выполнении молекулярно-биологических, микробиологических, биотехнологических и иммунобиологических экспериментов, анализе полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и стендовых докладов на конференциях. Отдельные разделы работы выполнены совместно с канд. биол. наук М.Е. Платоновым, д-ром мед. наук С.В. Дентовской, канд. биол. наук С.А. Ивановым, канд. биол. наук П.Х. Копыловым, канд. биол. наук Комбаровою Т.И., д-ром биол. наук Герасимовым В.Н.

Публикации:

По материалам диссертационной работы опубликовано 13 научных работ, в том числе 5 статей в реферируемых журналах и 8 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференци

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Одним из наиболее перспективных базовых носителей в составе модульных вакцин являются «бактериальные тени». Классические БТ представляют собой клеточные оболочки грамотрицательных бактерий, лишенные цитоплазматического содержимого, но сохранившие морфологию всех структур клеточной поверхности. Оригинальная технология получения «бактериальных теней» опирается на способность белка Е бактериофага фХ174 формировать трансмембранные туннельные структуры, пронизывающие внутреннюю и внешнюю мембраны бактерий. БТ – инновационная система доставки вакцин, лекарств или биологически активных веществ. Структура частиц и свойства поверхности БТ нацеливают их непосредственно на первичные антигенпрезентирующие клетки. Кроме того, БТ обладают адьювантными свойствами и индуцируют усиленный гуморальный и клеточный иммунный ответ на антигены – мишени. Множественные антигены нативной оболочки БТ и рекомбинантные белковые или ДНК-антигены могут быть объединены в одном типе БТ. Антигены могут быть представлены на цитоплазматической или внешней мембране БТ. Лекарства или протективные антигены также могут быть загружены во внутренний просвет или периплазматическое пространство БТ. После отмывки БТ могут храниться при комнатной температуре в виде лиофилизата. Рабочий цикл от посева производственной культуры до концентрата БТ, готового к лиофилизации, не превышает суток, что соответствует критериям быстрого производства вакцин. Широкий спектр возможного применения в сочетании со сравнительно низкой себестоимостью производства делает платформу БТ привлекательной технологией для конструирования вакцин и адресной доставки биологически активных веществ [142].

1.1 Получение бактериальных теней

Генно-инженерные методы. Бактериофаги – один из самых распространенных в нашем мире биологических объектов, были впервые идентифицированы в начале XX-го века [92]. Полиэдрические бактериофаги либо частично повреждают, либо полностью разрушают бактериальный пептидогликан для освобождения фагового потомства [245]. Двухцепочечные ДНК-фаги используют сложную систему лизиса –

холин-эндолизиную систему. Простые одноцепочечные ДНК или РНК-фаги лизируют клетки хозяина за счет ингибирования биосинтеза клеточной стенки всего одним лизирующим белком [245], что удобно для биотехнологических манипуляций. Вначале была исследована литическая активность гена *L* фага MS2 – первого секвенированного одноцепочечного РНК-фага. Позднее был подробно изучен ген лизиса *E* первого секвенированного одноцепочечного ДНК-фага φX174. Оба бактериофага с литическим жизненным циклом способны инфицировать широкий спектр представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Белок *E* фага φX174 – гидрофобный белок, который локально нарушает синтез пептидогликана бактерий за счет ингибирования активности фермента фосфо-N-ацетилмурамоил-пентапептидной транслоказы (*MraY*) [162]. Лизис опосредованный белком *E* осуществляется путем слияния внутренней и внешней мембран, ведущего в активно растущих клетках к образованию трансмембранного туннеля от 40 до 400 нм в диаметре, расположенного на экваторе или на полюсах клеток [226] Под действием осмотического давления через образовавшуюся пору бактериальная клетка освобождается от содержимого, сохраняя при этом исходную форму.

Для обеспечения, регулируемого лизирующего эффекта гены лизиса клонируют в плазмидном векторе, содержащем для обеспечения стабильности наследования маркер – ген устойчивости к антибиотику [226] или ген аспартатполуальдегиддегидрогеназы (*asd*) [171]. Эффективность лизиса зависит от экспрессирующей кассеты, которая включает промоторную область, управляющую транскрипцией гена лизиса, и его репрессор [203]. Индукцию лизиса клеток обычно начинают в средней или поздней фазе экспоненциального роста бактериальной культуры и контролируют путем измерения ее оптической плотности. Наиболее распространенной регуляторной системой является кассета экспрессии с термоиндуцибельным промотором *pL/pR* фага λ [116] и термочувствительным репрессором *cI857*, предотвращающим экспрессию при температурах ниже 37 °C [77]. Полученные бактериальные тени подвергают лиофилизации, после чего они могут храниться при комнатной температуре на протяжении нескольких лет (рисунок 1) [177].

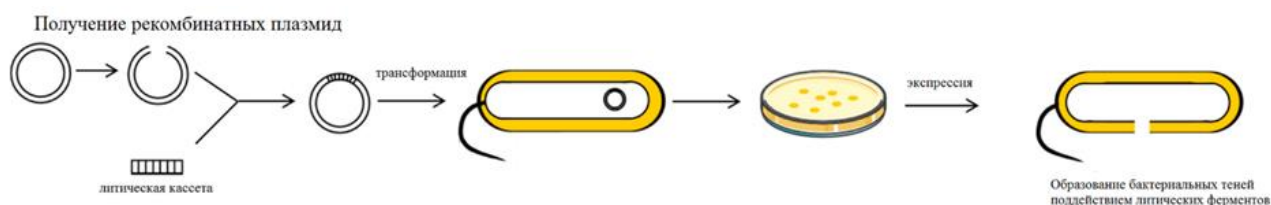


Рисунок 1 – Процесс/этапы получения бактериальных теней

Для получения БТ используют и другие литические гены. БТ *E. coli*, *Acinetobacter calcoacetate* и *Pseudomonas stephensi* были получены путем передачи в них плазмиды pDKL02, кодирующей литические гены *S* (холин), *R* (эндолизин) и *Rz* (спанин) бактериофага λ [131]. Zhu *et al.* [254] при получении БТ *E. coli* повысил литическую эффективность до 99,99995 % на логарифмической стадии роста путем конструирования литической плазмиды (*mE-L-SNA*), кодирующей синтез белка *E* слитого со стафилококковой нуклеазой *A* (*SNUC*). Q. Tian *et al.* [206] получили БТ *Streptococcus pullorum* путем слияния гена антимикробного пептида *SMAP29* с литическим геном *E* бактериофага ϕ X174. Через 24 ч после индукции лизиса жизнеспособные бактерии в препарате БТ не были обнаружены. Для получения БТ *Y. pestis* была использована литическая способность холин-эндолизиновой системы чумного диагностического бактериофага Л-413С [49].

Стремление разработать безопасные БТ на основе грамположительных микроорганизмов инициировало исследования по поиску новых фагов с новыми лизирующими генами. Вирулентный фаг *Lcb* против *Lactobacillus casei* ATCC 393 был выделен из ферментированных овощей [252]. Показано, что продукт гена холина (*Hocb*) данного фага способен успешно проникать в клетки *L. casei* [98].

Снижение эффективности лизиса при крупномасштабном производстве бактериальных теней, является ключевым препятствием для полной гарантии отсутствия в препарате жизнеспособных клеток [87, 247]. Введение мутации в литический ген белка *E* (*mE*) для корректировки рабочих условий [116, 247], использование новых литических генов холин-эндолизиновой системы [230], добавление дополнительных генов нуклеаз к литическим кассетам [77, 140, 250] или включение в их состав генов противомикробных пептидов [136, 206], применение антибиотиков на этапах отмывки препаратов [136, 155], лиофилизация БТ для

уничтожения всех жизнеспособных клеток [186] применяются для улучшения результатов лизиса и обеспечения высоких выходов безопасного конечного продукта.

Химические методы. В качестве подхода к созданию БТ применяют несколько щадящих методов химической обработки для образования пор в стенке микробной клетки. Использование химических методов позволяет устранить опасения, связанные с использованием векторных плазмид, которые могут нести гены возможных факторов патогенности или гены устойчивости к антибиотикам [13].

«Губчатый» метод является наиболее часто используемым химическим процессом приготовления БТ, в котором с помощью химических реагентов создаются поры в клеточной оболочке бактерий и клеточное содержимое удаляют путем центрифугирования. А.А. Amara *et al.* [10] разработали протокол получения бактериальных теней *E. coli* с использованием субингибирующих концентраций NaOH, ДСН, H₂O₂ и CaCO₃. S.A. Sheweita *et al.* [195] приготовили «губчатые» БТ путем инкубации *Acinetobacter baumannii* Ali190 в смеси NaOH, Na₂CO₃ и в растворе H₂O₂. S. Rabea *et al.* [184] создали новый химический метод приготовления БТ, выращивая штамм *Salmonella enterica* serovar Typhimurium в течение 24 ч в питательной среде с добавлением 7 % Tween 80, затем pH среды снижали на 1 ч до 3,6 добавлением молочной кислоты. Tween 80 вызывал растворение гидрофобных компонентов внешней мембраны бактерии, что облегчало образование пор, вызванное внезапным снижением pH. В другом биохимическом методе БТ были созданы путем инкубации бактерий в искусственном синтетическом амфифильном пептиде (MAP) [173]. Кроме того, для получения БТ *Actinobacillus pleuropneumoniae* использовали антимикробный пептид *Limulus* наряду с высоким гидростатическим давлением [151]. Свиной миелоидный противомикробный пептид (РМРА36) применили для получения БТ *Brucella abortus* [138], лизоцим использовали для получения БТ *Bacillus stearothermophilus* [11], а слитый белок РМРА36-лизоцим – для БТ *Salmonella* Typhimurium [167]. Протокол обработки NaOH-МІС в сочетании с пенициллином/стрептолизином используют для получения БТ *Streptococcus agalactiae* [219] или в сочетании с HCl – для получения БТ *Bacillus* spp. [41].

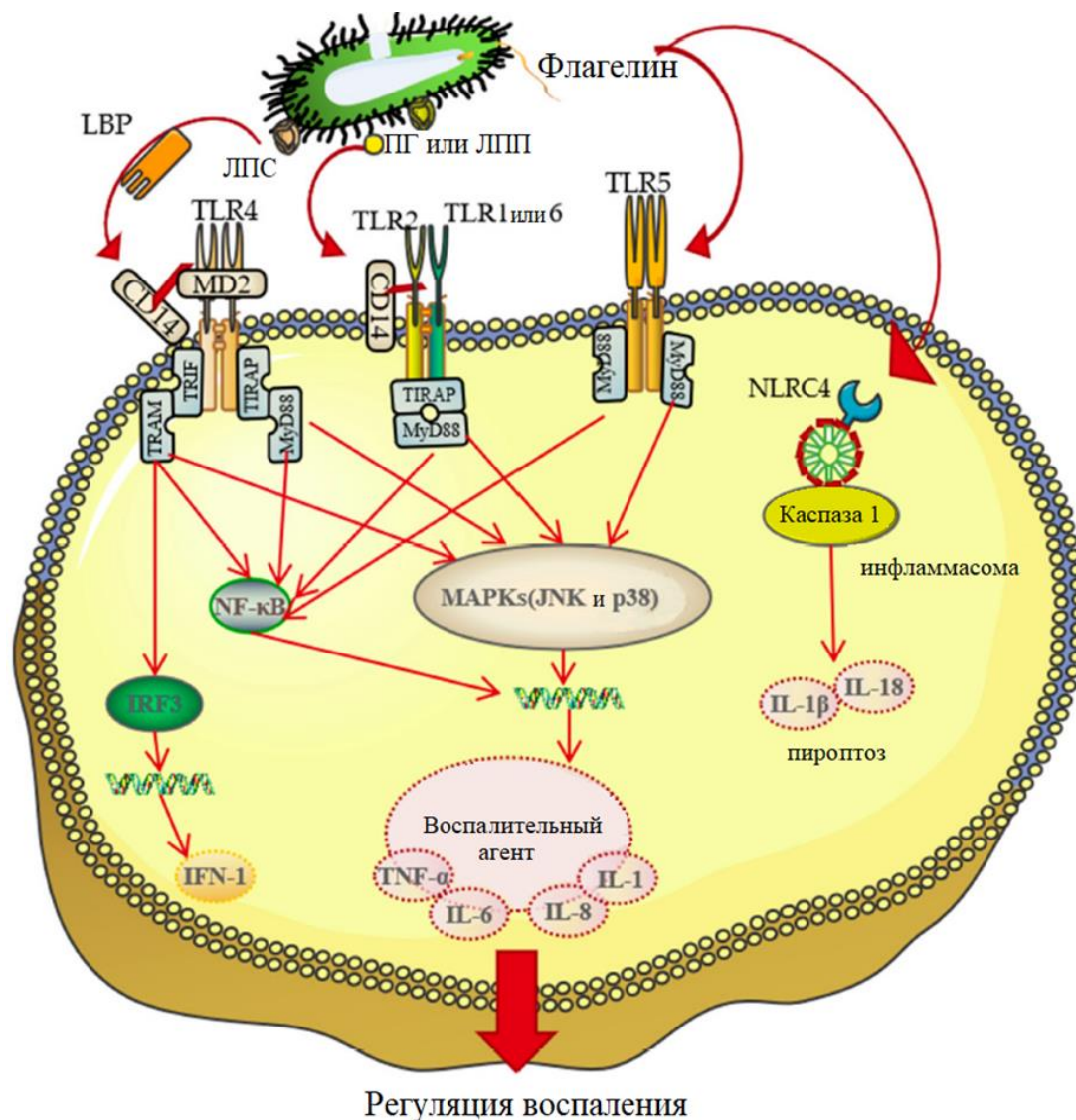
Химический процесс получения БТ может проводиться на любой стадии роста бактерий и требует только разбавления культуры до ОП₆₀₀ = 0,1. Кроме того, химический метод получения бактериальных теней не ограничивается только

грамположительными бактериями, поскольку он также эффективен для грамположительных бактерий и дрожжей [213]. Химический метод прост, быстр и не изменяет трехмерную морфологию клеток, за исключением образования отверстий. Однако химические вещества могут денатурировать поверхностные антигены. Лишние отверстия могут нарушить свойство контролируемого высвобождения внутриклеточного содержимого. Таким образом, методы генной инженерии по-прежнему являются наиболее широко используемыми методами получения бактериальных теней.

1.2 Взаимодействие бактериальных теней и клеток-мишеней

Интенсивность иммунного ответа зависит от физических и химических свойств антигенов и иммунной системы хозяина [52]. При использовании в качестве вакцинного препарата или адъюванта БТ могут усиливать врожденный иммунный ответ хозяина. БТ грамотрицательных бактерий сохраняют на клеточной поверхности патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP – Pathogen-associated molecular pattern) [89], а именно жгутики, липополисахарид (ЛПС) и пептидогликан (ПГ), взаимодействующие с иммунной системой макроорганизма (рисунок 2). ЛПС индуцирует иммунный ответ, опосредованный Toll-подобным рецептором 4 (TLR4 – Toll-like receptor 4) [25, 253], который локализуется главным образом на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК). БТ стимулируют АПК при связывании ЛПС с TLR4. Существует два внутриклеточных сигнальных пути TLR4: MyD88-зависимый (Myeloid differentiation primary response gene 88 – ген 88 первичного ответа миелоидной дифференцировки) и MyD88-независимый. MyD88-зависимый внутриклеточный сигнальный путь включает активацию экспрессии генов NF-κB-опосредованных воспалительных факторов (TNF-α, IL-1,6,8 и др.) и активацию сигнальных путей MAPK (mitogen-activated protein kinase – митоген-активируемая протеинкиназа), а именно пути JNK и P38 [70, 239]. MyD88-независимый путь (TRIF-зависимые сигнальные пути) индуцирует экспрессию фактора транскрипции IRF3, что приводит к экспрессии интерферона типа I (IFN-1 – Interferon type I) и активации NF-κB (nuclear factor κappa-light-chain-enhancer of activated B cells – транскрипционный фактор NF-κB), что способствует экспрессии воспалительных факторов. Активация рецептора TLR4 способствует созреванию дендритных клеток (ДК) и дифференцировке Т-клеток

в Th1-клетки [160]. Таким образом, ЛПС в составе БТ усиливает реакции врожденного и приобретенного иммунитета.



Цитоплазматическая часть TLR содержит домен гомолога рецептора Toll/IL-1, который индуцирует рекрутирование различных адаптеров, таких как MyD88, TRIF, TIRAP/MAL и TRAM, регулирующих специфические биологические ответы [27, 180]. Мембранный рецептор CD14 опосредует связывание ЛПС БТ с гомологичным димером TLR2, активируя MyD88-независимый путь продукции IFN-1 [207]. CD14 также опосредует связывание поверхностных ЛПП и ЛПГ с гетеродимерами TLR2/TLR6 или TLR2/TLR1, активируя MyD88-зависимый путь. MyD88-независимый и MyD88-зависимый пути в конечном итоге стимулируют продукцию IFN-1 и NF-κB, которые активируют секрецию воспалительных факторов, таких как IL-1β, IL-8 и TNF-α [51]. Эти цитокины индуцируют и регулируют воспаление, рекрутируют иммунные клетки и индуцируют апоптоз. В дополнение к активации пути рецептора TLR5 и последующего пути MAPK, жгутики могут также активировать воспалительный путь NLRC4 в клетках, что вызывает гибель клеток от пироптоза.

Рисунок 2 – Внутриклеточная регуляция воспаления

Бактериальные жгутики являются фактором адгезии и обеспечивают колонизацию клеток хозяина. Учитывая антигенные свойства, флагеллин служит идеальным адъювантом и кандидатом для включения в состав любых вакцинных препаратов, как в случае со жгутиковыми белками *Clostridium difficile* [188] и ковалентно стабилизированными полимерными нитями флагеллина *Salmonella enterica* sp Typhimurium [84]. Структура жгутика в составе БТ остается интактной [166]. Флагеллин может индуцировать экспрессию TLR5 и NLRC4 (Nod-like receptor card domain containing 4 – Nod-подобный рецепторный домен активации и рекрутирования каспаз 4) сигнальных путей инфламмосомы [185, 225]. TLR5 в основном локализуется на поверхности эпителиальных клеток кишечника. Связывание флагеллина с TLR5 активирует MyD88-зависимый сигнальный путь и вызывает воспалительные реакции, опосредованные NF-κB [246]. NLR4 образует NLRC4 инфламмосомы и индуцирует рекрутирование, а также активацию каспазы-1 при обнаружении флагеллина в цитоплазме. Активированная каспаза-1 гидролизует, стимулирует и индуцирует созревание и высвобождение про-IL-18 и про-IL-1 для участия в иммунных реакциях [25, 164].

Толл-подобный рецептор 2 (TLR2) на поверхности макрофагов и дендритных клеток в основном распознает пептидогликан и липополипептид (ЛПП) бактериальных телей [30]. Секретируемые эпидермальными клетками лизоцимы расщепляют ПГ, а затем опосредуют его связывание с соответствующими рецепторами. Связывание ПГ с TLR1/2 стимулирует экспрессию NF-κB через MyD88-зависимый путь, который участвует в адаптивных иммунных реакциях [99, 224]. Кроме того, связывание фрагмента ПГ с рецептором NLR1/2 индуцирует продукцию TNF-α, IL-1 и IL-6 [36]. Связывание ЛПП с TLR2/6 активирует пути, аналогичные активируемым ПГ, и последующую продукцию TNF-α, а также воспалительных факторов, таких как IL-6 и макрофагальный воспалительный белок 2 [37].

Мало того, что БТ связывают антиген-презентирующие клетки и рецепторы на поверхности эпителиальных клеток, вызывая иммунные ответы, они также могут интернализироваться этими клетками, например, эпителиальными клетками конъюнктивы человека (HCDEC – human conjunctiva-derived epithelial cells), Caco-2 и т. д. [81]. P. Kudela *et al.* [135, 177] показали, что БТ не оказывали цитотоксического

действия на HCDEC независимо от вида бактерий, из которых они были получены, и клетки клеточной линии были способны к интернализации БТ.

БТ являются естественным адьювантом, который при загрузке ДНК или белками может индуцировать сильную перекрестную презентацию антигенов [208]. В эксперименте *in vitro* с дендритными клетками J. Michalek *et al.* [165] обнаружили, что введение БТ, нагруженных лизатом аутологичной опухоли, активирует пути процессинга и презентации антигена главным комплексам гистосовместимости МНС-I и МНС-II, способствуя пролиферации CD4⁺ и CD8⁺ на поверхности Т-клеток. После прилипания к поверхности целевых областей БТ или их высвободившееся содержимое могут подвергаться эндоцитозу клетками-мишенями. Путем стимуляции созревания ДК способствуют презентации антигенов БТ в составе МНС как I-го, так и II-го класса.

Как упоминалось ранее, структуры бактериальной поверхности на БТ, а именно жгутики, ЛПС, ПГ и другие иммуностимуляторные молекулы, остаются в нативной конформации. Как таковые, они хорошо распознаются АПК в различных тканях. Исследования показали, что вакцины на основе БТ более эффективны, чем инактивированные бактериальные вакцины. X. Ran *et al.* [186] показали, что по сравнению с инактивированной вакциной из *Pasteurella multocida* у мышей, иммунизированных препаратом БТ *P. multocida*, обнаружили больше лимфоцитов, более высокие уровни IL-4 и INF- γ и лучшую защиту от вирулентного штамма патогена. Кроме того, установлено, что БТ защищают молекулы, которыми они заполнены, от деградации; пригодны для адресной доставки нуклеиновых кислот, белков и химических препаратов; и их содержимое медленно доставляется к клеткам за счет адгезии [67, 169].

1.3 Бактериальные тени различных патогенов

Escherichia coli. (STEC – Shiga-toxin producing *E. coli*) штаммы, вызывающие ГУС (гемолитико-уремический синдром). Классическая технология конструирования бактериальных теней с помощью гена литического белка E фага ϕ X174 была разработана и детально исследована в конце 1980-х гг. в Венском университете группой W. Lubitz на лабораторных штаммах *E. coli*. Вспышка в 2011 г. в Германии токсикоинфекций, вызванных STEC O104:H4, и установление того, что заболеваемость

ГУС в мире составляет от 0,2 до 4,28 на 100 тыс. детского населения в год, а летальность в острый период колеблется от 2,5 до 12 % [5], возобновила интерес к конструированию эшерихиозных БТ вакцин, но преимущественно против Шига-токсин продуцирующих штаммов *E. coli*, отнесенных в России во II группу патогенности.

В нескольких сериях экспериментов было показано, что введение мышам БТ энтерогеморрагической *E. coli* O157:H7 двукратно алиментарно [32], однократно ректально [159], однократно внутрибрюшинно [187], или телятам, как основному резервуару возбудителя, путем двукратной подкожной инъекции [212], индуцировало клеточный и гуморальный иммунный ответ и обеспечивало защиту иммунизированных животных от алиментарного заражения гетерологичными серотипами кишечной палочки.

БТ штамма *E. coli*, экспрессирующего два иммунологически различных варианта Шига-анатоксина, успешно индуцировали антитоксиновую и антиадгезионную иммунную защиту у мышей против энтерогеморрагической *E. coli* O157:H7 [33]. Другие исследователи в качестве антидота к токсинам использовали БТ *E. coli*, одновременно экспрессирующей Gb3-рецепторы к Шига-токсинам Stx1 и Stx2 [176]. БТ *E. coli* O157:H7, экспрессирующей VP1 антиген вируса ящура, защищали мышей и их детенышей от инфекции, вызванной *E. coli* O157:H7, и вирусного заболевания [83].

БТ *E. coli* O78:K80, несущие внешний домен матриксного белка 2 и гены нуклеопротеина вируса птичьего гриппа, а также иммунодоминантные эпитопы генов гибридного белка и гемагглютинин-нейраминидазы вируса болезни Ньюкасла, индуцируют активацию систем врожденного и приобретенного иммунитета против вирусов и патогенной кишечной палочки [141]. Оральное введение БТ *E. coli*, содержащего плазмидную ДНК, кодирующую эпитопы OmpU и VMH *Vibrio mimicus*, вызывало защитный иммунный ответ [35]. При создании противораковых вакцин установлено, что бактериальные тени *E. coli*, применяемые отдельно [90] или заполненные лизатом опухоли [53], индуцировали более сильную активацию и созревание дендритных клеток, чем ЛПС.

Vibrio cholerae. Другим наиболее исследованным с середины 1990-ых гг. в Университете Вены бактериальным видом для производства БТ являются *Vibrio* spp. Установлено, что бактериальные тени холерного вибриона, продуцируемые при

экспрессии клонированного гена лизиса *E* бактериофага φX174, обладают адьювантными свойствами и являются иммуногенными. Мыши, иммунизированные внутрибрюшинно БТ *V. cholerae* (O1) показали более высокий уровень вибриоспецифических сывороточных IgG и вибриоцидных антител, чем после введения инактивированных нагреванием холерных вирионов [60]. Хотя гетерологичный иммунитет возникал у кроликов только при подкожном введении БТ *V. cholerae* (O139), продуцирующим токсин-корегулируемые пили [58], оральный путь иммунизации обеспечивал одинаковый иммунитет независимо от того, были у бактерии пили или нет [59].

В 1994 г. Фрэнсис Эко, исследователь из Венского университета, инициировал использование БТ *V. cholerae* в качестве платформы для экспрессии гетерологичных генов [64]. Несколько лет спустя в Медицинской школе Морхаус в Атланте (Джорджия, США) начались успешные исследования по использованию БТ холерного вибриона для экспрессии антигенов *Chlamydia* spp. [63].

***Salmonella enterica*.** Наиболее изученным микроорганизмом для получения бактериальных теней является *Salmonella enterica* spp. *enterica*, включающий несколько сероваров, патогенных для теплокровных животных. *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) и *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) – зоонозные патогены пищевого происхождения, которые поражают людей и животных и вызывают системные заболевания, диарею и гастроэнтерит. Однако *S. enterica* serovar Gallinarum (*S. Gallinarum*) вызывает у цыплят брюшной тиф, который является смертельным системным заболеванием. Возбудителем брюшного тифа человека является *S. enterica* сероваров Typhi или Paratyphi.

В 2011 г. сотрудники Харбинского института ветеринарных исследований (Китай) показали, что БТ *S. Enteritidis*, полученные путем лизиса, индуцированного продуктом мутантного гена *E*, вызывали защитный гуморальный и клеточный ответ у кур [178] и их цыплят [197]. В 2012 г. исследовательская группа Джона Хва Ли из Национального университета Чонбук в Южной Корее инициировала серию исследований, в частности, с доктором Четаном Джавале, по производству БТ *S. Enteritidis*. БТ *S. Enteritidis*, содержащие маркерный ген устойчивости к ампициллину [108] или не содержащие гены устойчивости к антибиотикам [112], защищали вакцинированных кур [110] и их яйца [107]. Подобные результаты были

получены авторами при получении бактериальных теней *S. Gallinarum*, содержащих плазмиды, несущие маркерный антибиотик [107] или не несущие его [115]. Хотя однократная доза вакцинного препарата и оказывала защитное действие, режим двукратной иммунизации обеспечивал более высокую защитную эффективность [106]. Бактериальные тени на основе *S. enterica* serovar *Gallinarum* biovar *Pullorum* [85] и *S. Typhi* [229] эффективно усиливали иммунный ответ у мышей на брюшной тиф.

В Национальном университете Чонбук изучали возможность использования нескольких коадьювантов для повышения иммуногенности препаратов бактериальных теней сальмонелл. Термолabileный энтеротоксин В *E. coli* (heat-labile enterotoxin В – LTB) образует стабильные связи с рецепторами эукариотических клеток, поэтому действует как носитель, повышающий поглощение клетками различных совместно вводимых или совместно слитых антигенов [249]. Иммунизация бактериальными тенями *S. Typhimurium* [104, 113], или *S. Enteritidis* [111], или *S. Gallinarum* [114], экспрессирующими LTB, взятых либо отдельно [109, 111], либо в сочетании с Montanide™ [114], показала повышенную иммуногенность и эффективную защиту зараженных цыплят и яиц [111]. В то же время внутримышечное введение кроликам препарата *S. Typhi* БТ, содержащего LTB, показала усиленный иммунный ответ при оральном заражении вирулентным штаммом [124]. Использование *S. Gallinarum* БТ, экспрессирующих флагеллин, агонист Toll-подобного рецептора 5, повысило защитную эффективность вакцины [91]. В Харбинском ветеринарном научно-исследовательском институте (Китай) использовали *S. Enteritidis* БТ в качестве адьюванта, что приводило к снижению минимальной иммунизирующей дозы антигена вируса чумы свиней [240] или повышало иммуногенность инактивированной вакцины против вируса болезни Ньюкасла [196]. Группа исследователей Национального университета Чонбук подтвердила, что бактериальные тени *S. Enteritidis* [120] и *S. Typhi* [232] индуцируют созревание дендритных клеток костного мозга.

В 2015 г. исследовательская группа Национального университета Чонбук инициировала исследование по применению БТ *Salmonella enterica* в качестве платформы для систем экспрессии и доставки нескольких вакцинных антигенов. Доказано, что внутримышечная [102, 125] или оральная [127] иммунизация мышей штаммом *S. Typhimurium*, экспрессирующим энтеротоксигенный фимбриальный антиген *E. coli* с различными адьювантами, обеспечивает усиление защитного эффекта.

Потомство свиноматок, иммунизированных орально [100] препаратом БТ в дозе расчетной дозой 2×10^{10} - 10^{11} м.к., обладает приобретенным иммунитетом [100]. Отечная болезнь свиней, вызванная F18⁺ шига-токсин 2e (Stx2e) продуцирующими штаммами *E. coli* (STEC) ведет к высокой смертности поросят после отъема. Бактериальные тени *S. Typhimurium*, экспрессирующие флагеллиновый белок F18⁺ STEC (fliC) [235], или гомопентамерную В-субъединицу шигатоксина 2e (Stx2eB) [231], или объединяющие три селективных антигена STEC, Stx2e, FedF и FedA [236]. индуцируют иммуностимулирующий [233] и защитный эффект против летального заражения STEC-штаммами кишечной палочки. Оральная иммунизация БТ *S. Typhimurium*, экспрессирующими III домен белка оболочки вируса денге, показала гетерологичный защитный иммунный ответ [126].

Несмотря на легкость производства и манипулирования ДНК-вакцины обычно обладают слабой иммуногенностью, особенно для человека. Использование БТ *S. Typhi* в качестве вектора, несущего ДНК gp140 ВИЧ-1 [230] или БТ *S. Enteritidis*, нагруженных геном порина В *Neisseria gonorrhoeae* [118], индуцирует более высокий иммунный ответ, чем «голая» ДНК, введенная без БТ-носителя. Использование БТ *S. Typhimurium* в качестве носителя для гена внешнего воспалительного белка *Helicobacter pylori* [40], противокариозной ДНК-вакцины [152] или плазмиды рсDNA-НА, кодирующей гиалуронидазу вируса гриппа H1N1 [121], индуцирует усиление системного иммунитета и иммунитета слизистых оболочек против патогенов.

Pasteurella spp. *Pasteurella multocida* и *Mannheimia haemolytica* (ранее *Pasteurella haemolytica*) являются патогенами, вызывающими инфекции респираторного тракта у животных, и могут наносить значительный экономический урон [14]. Доступны инактивированные формалином вакцинные препараты против инфекций, вызываемых этими патогенами, которые вызывают низкий иммунный ответ, что требует совершенствования процедуры инактивации [8]. *P. haemolytica* БТ, приготовленные с адьювантом Bay R1005, обеспечивают значительный уровень гомологичной защиты крупного рогатого скота [158]. Кролики и мыши, иммунизированные комбинированным препаратом БТ *P. multocida* и *P. haemolytica* [157] или бактериальными теньями *P. multocida* серотипа В:2, показали дозозависимую защиту от инфекции, особенно при введении в состав препарата адьюванта ISA 206 [186]. Применение ДНК-вакцин обычно связано с необходимостью использования высоких

доз плазмид и плохой иммуногенностью вакцины. Иммунизация мышей *P. haemolytica* БТ, несущими ДНК β -галактозидазы, стимулировала гуморальный и Th2-доминантный клеточный ответ в большей степени, чем вводимый препарат изолированной ДНК [57]. Точно так же дендритные клетки, сенсibilизированные приготовленными БТ [57] или лизатом бактерий [136], вызывали специфический иммунный ответ на антиген.

Actinobacillus pleuropneumoniae. *A. pleuropneumoniae* вызывает инфекции респираторного тракта, которые наносят значительный экономический ущерб свиноводству. Хотя полученные методом облучения бактериин [122], бактериальные тени или инактивированные формалином бактерии *A. pleuropneumoniae* [103] обеспечивали защиту от заболевания, только БТ подавляли колонизацию легких патогеном. Это было связано с сохранением антигенных эпитопов белка с молекулярной массой 100 кДа, который предотвращает колонизацию легких и обеспечивает перекрестную защиту, особенно при экспрессии в составе БТ, которые представляют его АПК [64].

Edwardsiella spp. *Edwardsiella tarda* — универсальный внутриклеточный патоген животных, поражающий их водные виды и птиц [139]. Мыши, иммунизированные орально вакцинным препаратом БТ *E. tarda*, демонстрировали более высокий клеточный и гуморальный иммунный ответ, выживаемость и неспецифический иммунитет, чем мыши, вакцинированные убитой формол-вакциной [223, 241]. *E. ictaluri* является всемирным патогеном, вызывающим кишечную инфекцию с септициемией у некоторых экономически важных рыб. Иммунизация сомов *E. ictaluri* БТ ведет к повышению неспецифического иммунитета, уровня сывороточных антител и выживаемости после заражения вирулентным штаммом [220].

Aeromonas spp. Бактерии *Aeromonas spp.* являются широко распространенными патогенами, вызывающими ряд заболеваний водных животных. Установлено, что иммунизация карповых рыб *A. hydrophila* БТ [42, 209] или иммунизация искусственно выведенной породы карпа (кои) *A. veronii* БТ [117] вызывала формирование более выраженного мукозального и системного иммунитета, чем убитая формалином вакцина.

Helicobacter pylori. Инфицирование *H. pylori* является основной причиной развития гастрита, пептической язвы, лимфоидной лимфомы желудка и аденокарциномы желудка. Возможность алиментарной передачи инфекции диктует

необходимость профилактической вакцинации в качестве основной меры защиты. Однако до настоящего времени вакцина отсутствует на рынке [7]. В эксперименте установлено, что оральное введение *H. pylori* БТ [174] или *H. pylori* БТ, содержащих рекомбинантный белок *rOmp18* [204], ведет к снижению бактериальной нагрузки у зараженных мышей и защите от гибели, особенно при добавлении адьюванта.

***Brucella* spp.** Бруцеллез, вызываемый патогенными представителями *Brucella* spp., является важным зоонозным инфекционным заболеванием, которое представляет значительную угрозу для здоровья и безопасности населения. Существующие бруцеллезные вакцины имеют ряд недостатков, включая высокую остаточную вирулентность для животных и людей. Альтернативным подходом в разработке вакцин против бруцеллеза является разработка БТ с использованием литических продуктов бактериофагов или антимикробных пептидов млекопитающих.

Как и формол-инактивированный препарат бруцелл, БТ *Brucella suis* S2, полученные путем литического действия белка E бактериофага ϕ X174, ген которого был расположен на введенной в штамм плазмиде, обладают способностью индуцировать патоген-специфический антительный ответ, повышать CD3⁺ и CD4⁺ Т-клеточный иммунный ответ, стимулировать секрецию IFN- γ и IL-4 и обеспечивают уровни защиты мышей от заражения *Brucella melitensis* 16М, как и живая вакцина на основе аттенуированного штамма *B. suis* [153].

J. Qian *et al.* [181] путем гомологичной рекомбинации интегрировали литический ген E в хромосому штамма *Brucella canis* RM6/66, создав генетически стабильный штамм, не несущий гена лекарственной устойчивости. Полученные БТ показали гарантированную безопасность и иммуногенность, сравнимую с живой вакциной. Ген, кодирующий бактериальный белок B0419, был делетирован в вакцинном штамме *B. canis* RM6/66, что может явиться молекулярной меткой при дифференциации инфекционного и вакцинного процессов с помощью ИФА. Созданный препарат БТ обеспечивал защиту вакцинированных мышей от *B. canis* RM6/66 и *B. melitensis* 16М.

Подобный подход, основанный на делеции гена хромосомной локализации и введения на его место литической кассеты, был использован с целью создания БТ *Brucella abortus* 2308 Δ gntR [221]. Авторы показали безопасность БТ *B. abortus* 2308 Δ gntR для мышей линии BALB/c. Введение БТ *B. abortus* 2308 Δ gntR индуцировало продукцию специфических IgG и секрецию IFN- γ и IL-4. Кроме того, БТ *B. abortus*

2308 Δ *gntR* индуцировали сильный ответ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток селезенки. Иммунизация стимулировала напряженный защитный иммунитет у мышей BALB/c против заражения штаммом *B. abortus* S2308.

Однако бактериальные клетки могут быть не полностью инактивированы путем биологического лизиса, что создает риск, связанный с вакцинацией живыми бактериями. С. Не *et al.* создали БТ штамма *B. abortus* A19 (БТА19) с помощью стратегии двойной инактивации с биологическим лизисом, опосредованным белком Е бактериофага фХ174, и последующей обработкой перекисью водорода [94], что обеспечивало 100 %-ную инактивацию бруцелл, так что жизнеспособные бактериальные клетки не были обнаружены даже при сверхвысокой концентрации 10¹⁰ КОЕ/мл. БТ А19 обладали типичной морфологией БТ, хорошей генетической стабильностью, не вызывали побочных реакций у морских свинок. Уровни антител, IFN- γ , IL-4 и CD4⁺ Т-клеток у морских свинок, привитых вакциной А19БТ, были аналогичны уровням у животных, привитых живым аттенуированным вакцинным штаммом А19. Иммунизация БТ А19 обеспечивала такой же уровень защиты, как и А19, от *B. melitensis* M28 как у морских свинок, так и у крупного рогатого скота. В заключение, комбинация биологического лизиса и инактивации, опосредованной H₂O₂, является безопасной и эффективной стратегией, которая может служить эталоном для приготовления вакцин БТ.

Антимикробные пептиды (АМП) являются компонентом врожденной иммунной системы. Механизм действия АМП заключается в нарушении барьерной функции мембраны путем образования пор или индукции проницаемости мембраны без нарушения целостности мембраны [21]. Кроме того, известно, что некоторые АМП действуют как адъюванты [130]. Свиной миелоидный антимикробный пептид-36 (РМРА36) обладает самым высоким положительным зарядом среди АМП, обнаруженных у свиней [193]. N-концевой α -спиральный домен РМАР36 состоит из 24 аминокислот (GI24), и может также проникать через бактериальную мембрану, как и полный 36 аминокислотный белок РМРА36 [156].

A.J. Kwon *et al.* [138] впервые использовали фрагмент РМРА36, названный GI24, для лизиса клеток и получения БТ *B. abortus*. Мыши, внутрибрюшинно иммунизированные БТ *B. abortus*, продуцировали значительное количество сывороточных IgG и цитокинов (TNF- α и IFN- γ), связанных с иммунным ответом типа

Th1. Кроме того, иммунизированные внутрибрюшинно мыши оказались защищены от системной инфекции при заражении вирулентным штаммом бруцелл *B. abortus* 544. Позднее авторы показали продуктивность клеток *B. abortus*, лизированных с помощью GI 24, для иммунизированных подкожно биглей [128] и черных корейских коз [129].

Для получения БТ В. Sumathi *et al.* [201] лизировали клетки вакцинного штамма *B. melitensis* Rev 1 и «дикого» штамма *B. melitensis* ($3,0 \times 10^9$ КОЕ/мл) с использованием свиного кателицидина GI24 из расчета 80 мкг/мл. Формирование БТ подтверждали отсутствием роста бруцелл на селективном агаре, отсутствием амплификации фрагмента размером 731 п.н. в AMOS-ПЦР и морфологическими изменениями клеток, включая образование туннелей при сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии. Две БТ вакцины и стандартную вакцину Rev 1 вводили внутрибрюшинно мышам, оценивая гуморальный иммунный ответ путем количественного определения уровней IgG в сыворотке и клеточно-опосредованный иммунный ответ с помощью анализа пролиферации лимфоцитов и определения профиля Th2 (IL-4, IL-10) и Th1 (TNF- α , IFN- γ) цитокинов. По данным авторов вакцинный штамм *B. melitensis* Rev 1 имел незначительное преимущество перед двумя вариантами БТ по индукции иммунного ответа, но БТ оказались более безопасны и обеспечили сопоставимый уровень защиты вакцинированных мышей после заражения вирулентным штаммом *B. melitensis* 16М.

Yersinia enterocolitica. Профилактика иерсиниоза, вызываемого *Y. enterocolitica*, по-прежнему остается сложной задачей, что указывает на необходимость разработки эффективной и безопасной вакцины, обеспечивающей защиту от инфекций, вызванных данным кишечным патогеном. К. Cai *et al.* [34] была разработана новая вакцина на основе БТ штамма *Y. enterocolitica*, несущего мутацию в гене *msbB*. После внутрижелудочного введения БТ *Y. enterocolitica* авторы обнаружили у мышей значительные уровни антител IgG1/IgG2a и цитокинов IL-4/IFN- γ , что указывает на стимуляцию опосредованного Th1/Th2 смешанного иммунного ответа. Важно отметить, что мутация гена *msbB* эффективно снижала секрецию провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6 и TNF- α , что свидетельствует об уменьшении воспалительной реакции, вызванной ЛПС, без снижения протективных свойств.

Burkholderia pseudomallei* u *Burkholderia mallei. Род *Burkholderia* включает три вида, *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *Burkholderia cepacia*, вызывающих смертельные

заболевания людей. *B. pseudomallei* и *B. mallei* – возбудители мелиоидоза и сапа, соответственно, а заражение *B. cepacia* приводит к летальному исходу у пациентов с муковисцидозом. Из-за высокого уровня инфекционности и устойчивости ко многим широко используемым антибиотикам, а также высокой летальности *B. mallei* и *B. pseudomallei* относят ко II группе патогенности. Лечение заболеваний, вызванных этими бактериями, часто безуспешно с частыми рецидивами инфекции. В настоящее время не существует эффективных вакцин для предотвращения инфекций, вызываемых *Burkholderia* spp. [64]. Несмотря на сообщения о способности нескольких вакцин против буркхольдерии обеспечивать определенную иммунопротективность, ни одна из вакцин не достигла стадии клинических испытаний, что указывает на серьезные трудности, существующие при разработке безопасных вакцин против инфекций, вызванных данными возбудителями [64]. Обнаружение ряда литических бактериофагов *Burkholderia* [137] дает надежду на возможность создания БТ патогенов данного рода в качестве инструментов для разработки убитых цельноклеточных вакцин.

***Bacillus anthracis*.** До настоящего времени нет сообщений о получении БТ грамположительной бактерии *B. anthracis*. Экспрессия белка E в грамположительных бактериях приводит к гибели клеток без лизиса, поскольку образование БТ зависит от слияния внутренней и внешней мембран, что происходит только у грамотрицательных бактерий [227]. Однако бактериальные тени *B. anthracis* можно попытаться получить химическим методом, успешно опробованном на других грамположительных патогенах [11, 41, 219, 238].

1.4 Заключение по обзору литературы

Без сомнения, вакцины на основе БТ демонстрируют явное превосходство над классическими убитыми вакцинами. Этот метод продемонстрировал свою пригодность для приготовления альтернативно-убитых рекомбинантных, ДНК- и бактериально-тневых вакцин, а также адьювантов, антидотов, терапевтических и клеточных прототипов вакцин. БТ обладают замечательной адьювантностью при нескольких способах доставки. Они улучшают эффективность ДНК вакцин, лизатов опухолевых клеток. БТ специфически доставляют собственные или включенные в их состав

антигены к антигенпрезентирующим клеткам, что индуцирует формирование напряженного и сбалансированного клеточного (Th1) и гуморального (Th2) иммунитета даже при низких концентрациях антигена или однократной иммунизации, особенно при введении через слизистую оболочку. Аэрозольная иммунизация БТ показала свою эффективность в качестве метода массовой иммунизации. В отличие от традиционных способов наработки рекомбинантных белков, формирование БТ сопровождается правильным фолдингом, обеспечивающим нативную конформацию трехмерной структуры экспрессируемых белков [39]

Использование химического способа при производстве бактериальных теней все еще имеет некоторые ограничения. Это связано с тем, что даже мягкий химический лизис способен изменять конфигурацию поверхностных антигенов бактерий. Более того, образование капсул или экзополисахаридов некоторыми видами бактерий или даже присутствие бактериальных клеток с разными фазами роста в одной и той же культуре может сделать результат процесса химического гидролиза переменным и трудно воспроизводимым. Это означает, что в одной и той же микробной культуре химический процесс может чрезмерно воздействовать на одни клетки и полностью разрушать их, в то время как другие клетки остаются жизнеспособными.

С биотехнологической точки зрения идеальная БТ вакцина должна:

1. содержать нативные целевые иммунодоминантные антигены;
2. отвечать требованиям биологической безопасности;
3. быть технологичной в плане рациональной продолжительности рабочего цикла, используемых химических веществ и необходимых этапов очистки;
4. обеспечивать в процессе наработки высокую плотность биомассы;
5. обладать стабильностью конечного продукта.

С точки зрения биобезопасности технология получения БТ должна:

1. гарантировать полное уничтожение жизнеспособных клеток штамма-производителя,
2. эффективно работать в культурах с высокой плотностью,
3. быть независимой от использования антибиотиков для любых целей во время производства,
4. удалять остаточные количества нуклеиновых кислот

5. использовать для наработки БТ безопасные производственные культуры бактерий, не обладающие перекрестными реакциями с антигенами хозяина и/или микробиомом человека.

Для обеспечения уверенного выхода БТ на рынок медицинских препаратов необходимо:

1. расширить спектр фагов – источников лизирующих генов – комбинации которых обеспечат полную утрату жизнеспособности продуцентов БТ и удаление бактериальных нуклеиновых кислот;

2. найти и охарактеризовать новые, продукты, которые могут лизировать грамположительные бактерии и грибы;

3. подобрать несколько универсальных для отдельных филогенетических групп носителей на основе безопасных грамотрицательных бактерий, которые имеют высокую скорость наработки, эффективно лизируются, доставляют целевой антиген к антигенпрезентирующим клеткам и выступают в качестве адъювантов.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ¹

2.1 Штаммы микроорганизмов

Релевантные характеристики штаммов микроорганизмов, использованных в работе и источники их получения представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика штаммов, использованных в работе

п/н	Номер штамма (особое название)	Характеристика	Источник получения и (или) ссылка на литературу
1	2	3	4
<i>E. coli</i>			
1	DH5 α	F ⁻ <i>gyrA96(Nal^R) recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17 (r_{km}⁺_k) glnV44 deoRΔ(<i>lacZYA-argF</i>) U169[Δ80dΔ(<i>lacZ</i>)M15]</i>	ГКПМ-Оболенск
	S17-1 λ pir	<i>thi pro hsdR⁻ hsdM⁺ recA RP4</i> 2-Tc:: <i>Mu-Km</i> ::Tn7(<i>Tr^R Sm^R Pm^S</i>)	ГКПМ-Оболенск
2	DH5 α /pEYR'	DH5 α , несущий плазмиду pEYR'	НИ
3	DH5 α /pEYR'-E	DH5 α , несущий плазмиду pEYR'-E	НИ
4	DH5 α /pEYR'-E-Y-K	DH5 α , несущий плазмиду pEYR'-E-Y-K	НИ
5	DH5 α /pEYR'-Y-K	DH5 α , несущий плазмиду pEYR'-Y-K	НИ
6	DH5 α /pEYR'-E-S-R-Rz	DH5 α , несущий плазмиду pEYR'-E-S-R-Rz	НИ
7	DH5 α /pEYR'-S-R-Rz	DH5 α , несущий плазмиду pEYR'-S-R-Rz	НИ

¹ Все представленные исследования проводили в соответствии с: Санитарно-эпидемиологическими правилами СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», "Инструкцией по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного и холерного микробов. – Саратов, 1982", МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности».

1	2	3	4
8	BL21(DE3)/pETV I3455	Продуцент LcrV (N18, R72, E103, G113, S273 и S324–G325–K326)	ГКПМ-Оболенск
<i>Y. pestis</i>			
9	231	Штамм дикого типа; универсально вирулентный (LD ₅₀ для мышей ≤ 10 CFU, для морских свинок ≤ 10 CFU); Pgm ⁺ , pMT1, pPCP1, pCD	ГКПМ-Оболенск
10	EV НИИЭГ	<i>Δprgm</i> , вакцинный; линия EV, поддерживаемая в России для производства живой чумной вакцины	ГИСК им. Л.А Тарасевича
11	KM260(12)	Авирулентный штамм, полученный из 231; Pgm ⁺ , pMT1 ⁻ , pPCP1 ⁻ , pCD ⁻	ГКПМ-Оболенск
12	KM260(12) <i>ΔlpxM</i>	<i>ΔlpxM</i> производный от KM260(12)	НИ
13	KM260(12) <i>ΔlpxM/pEYR'</i>	KM260(12) <i>ΔlpxM</i> , несущий плазмиду pEYR'	НИ
14	KM260(12) <i>ΔlpxM/pEYR'</i> -E	KM260(12) <i>ΔlpxM</i> , несущий плазмиду pEYR'-E	НИ
15	KM260(12) <i>ΔlpxM/pEYR'</i> -E-Y-K	KM260(12) <i>ΔlpxM</i> , несущий плазмиду pEYR'-E-Y-K	НИ
16	KM260(12) <i>ΔlpxM/pEYR'</i> -Y-K	KM260(12) <i>ΔlpxM</i> , несущий плазмиду pEYR'-Y-K	НИ
17	KM260(12) <i>ΔlpxM/pEYR'</i> -E-S-R-Rz	KM260(12) <i>ΔlpxM</i> , несущий плазмиду pEYR'-E-S-R-Rz	НИ
18	KM260(12) <i>ΔlpxM/pEYR'</i> -S-R-Rz	KM260(12) <i>ΔlpxM</i> , несущий плазмиду pEYR'-S-R-Rz	НИ
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>			
19	11M/pFSK 3/9	O:3 серотип, продуцент капсульного антигена (F1) <i>Y. pestis</i>	ГКПМ-Оболенск
Бактериофаги			
20	λCE6	Источник промотора pR, холина (S) и эндолизинов (R-Rz) генов (<i>cl857Sam7</i>)	Thermo Scientific
21	φX174	Источник гена белка E	Thermo Scientific
22	Л-413С	Источник генов холина (Y) и эндолизина (K)	ГКПБ «Микроб»

2.2 Плазмиды

Таблица 2 – Список использованных в работе плазмид

Плаزمида	Описание	Цель использования	Источник получения и (или) ссылка на литературу
1	2	3	4
pACYC184	Источник p15A <i>ori</i> и <i>cat</i> -гена	Вектор для клонирования	Invitrogen
pBAD/myc-HisA	Источник терминатора транскрипции <i>rrnB</i>	Вектор для клонирования	Novagene
pET32b (+)	Источник полилинкера	Экспрессирующий вектор	ГКПМ-Оболенск
pEYR'	Экспрессирующий вектор (pA15 <i>ori</i> , Cm ^r , cI857/pR')	Экспрессирующий вектор	ГКПМ-Оболенск
pEYR'-E	pEYR' с геном белка E фага φX174	Лизирующая плаزمида	ГКПМ-Оболенск
pEYR'-Y-K	pEYR' с генами холина Y и эндолизина K фага Л-413С	Лизирующая плазмида	ГКПМ-Оболенск
pEYR'-Sam7-R-Rz	pEYR' с генами холина S (амбер-мутант Sam7), эндолизина R, и спанинов Rz и Rz1 фага λ	Лизирующая плазмида	ГКПМ-Оболенск
pEYR'-E-Y-K	pEYR' с генами белка E фага φX174, холина Y и эндолизина K фага Л-413С	Лизирующая плазмида	ГКПМ-Оболенск
pEYR'-E-Sam7-R-Rz	pEYR' с генами белка E фага φX174, холина S (амбер-мутант Sam7), эндолизина R, и спанинов Rz и Rz1 фага λ	Лизирующая плазмида	ГКПМ-Оболенск
pCVD442	<i>ori</i> R6K <i>mob</i> RP4 <i>bla</i> <i>sacB</i>	суицидный вектор, Amp ^R	ГКПМ-Оболенск

1	2	3	4
pCP20	<i>bla cat cI857 λP_Rflp</i> pSC101 <i>ori</i> TS	Вектор, экспрессирующий Flp-рекомбиназу	ГКИМ- Оболенск

2.3 Праймеры

Таблица 3 – Нуклеотидные последовательности использованных праймеров

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')
1	2
pEY-1 (ClaI)	CCC <u>ATCGAT</u> CATATCGTCAATTATTAC*
pEY-2 (SphI)	ATATTGCATGCTGTCAAACATGAGAATTAC
pEY-5 (NdeI)	GGCC <u>CATATG</u> CACCATCATCATC
pEY-6 ⁶	<i>TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT**</i>
pEY-7 ⁶	<i>CACCACCACCACCACC</i> ACTGATGAGTTTAAACGGTCTCCAG
pEY-8 (ClaI)	CCC <u>ATCGAT</u> TTGCTTCGCAACGTTCAAATC
pR-For (SphI)	CACAAAG <u>CATGCG</u> GAGTGAAAATCCCCTAATTCG
pR-Rev (NdeI)	GATAC <u>CATATG</u> AACCTCCTTAGTACATGCAACCATT
pR(T>C) (NdeI)	GTGC <u>CATATG</u> AACCTCCTTAGTACATGCAACCATTATCACCGCCAGAG GTA AAATAGTCAACACGCGCGGTGTTAG
E1 (NdeI)	AGGCATATGGTACGCTGGACTTTGTG
E2 (XhoI)	AATCTCGAGTCACTCCTTCCGCACGTAA
Y-NdeI (XhoI)	GGTGG <u>CATATG</u> ACAGCAGAAGAAAAAAGC
Y-SalI (SalI)	GCCGTCGACAACAGGAGGAATTAACCATGACAGCAGAAGAAAAA GC
K-XhoI (XhoI)	ATTCTCGAGTTAAGCCGGTACGCCGCCAG
S-R-Rz-For (SalI)	AAAGTCGACAACAGGAGGAATTAACCATGAAGATGCCAGAAAAAC ATG
S-R-Rz- Rev (XhoI)	ATTCTCGAGCTATCTGCACTGCTCATTAAT

* сайты связывания эндонуклеаз рестрикции подчеркнуты

** курсивом выделены комплементарные последовательности

2.4 Лабораторные животные

Семинедельные самцы и самки беспородных мышей и четырехнедельные морские свинки обоих полов (Центр разведения лабораторных животных РАМН, Столбовая, Московская область, Россия) были размещены в поликарбонатных клетках и содержались в освещенном помещении (свет включается с 7:00 до 19:00) в Государственном научно-исследовательском центре прикладной микробиологии и биотехнологии. Температуру и влажность в помещении для животных поддерживали на уровне 22 ± 2 °С и 50 ± 10 %, соответственно. Грызунам давали водопроводную воду и комбикорм для мышей ПК-120 или комбикорм для кроликов и морских свинок ПК-122 (Лабораторкорм, Россия) *ad libitum* на протяжении всего исследования. Количество животных, используемых для экспериментов, было минимальным, диктуемым необходимостью. Животные были разделены на группы случайным образом. В этом исследовании мы использовали гуманную эвтаназию инфицированных животных. В соответствии с ветеринарным протоколом, мышей и морских свинок подвергали эвтаназии, если они становились чрезмерно вялыми, обезвоженными, умирающими, неспособными вставать, нечувствительными к прикосновениям или потерявшими более 10 % массы тела.

Гуманную эвтаназию с использованием сжатого газа CO₂ с последующей цервикальной дислокацией делали хорошо обученные сотрудники. За состоянием здоровья животных наблюдали не реже двух раз в день. За всю серию экспериментов не было ни одной неожиданной смерти.

Все протоколы экспериментов на животных были одобрены Комитетом по биоэтике Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (Разрешение №: ВП-2019/4, ВП-2021/4) и все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

2.5 Среды и условия культивирования

Штаммы *E. coli* выращивали при температуре 37 °С в бульоне LB (Luria Bertani broth medium – триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 10 г/л) или LB, с

добавлением 1,2 % бакто-агара (Difco). *Y. pestis* выращивали при температуре 28 °С в среде ВНИ (Brain Heart Infusion производства NiaMedia, Индия) или Хоттингера (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск). При необходимости добавляли ампициллин (100 мкг/мл, Amp), хлорамфеникол (20 мкг/мл, Cm) или 10 % сахарозы.

Для получения бактериальных теней *Y. pestis* (УР-БТ) штаммы, несущие литические плазмиды, культивировали в течение ночи при температуре 28 °С. Штамм с векторной плазмидой рEYR' без генов лизиса использовали в экспериментах в качестве отрицательного контроля. Индукция лизиса была достигнута путем сдвига температуры с 28 °С на 42 °С, когда культуры выращивали до $ОП_{600} = 0,6$ и за процедурой следили по оптической плотности. Лизированные клетки собирали центрифугированием при $11000 \times g$ в течение 15 мин с последующей обработкой мертиолятом натрия и лиофильной сушкой. Полученные тени были названы Е-БТ, УК-БТ, ЕУК-БТ, SRRz-БТ и ESRRz-БТ, а скорость лизиса определяли путем подсчета КОЕ, как описано ранее [32].

2.6 Полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в реакционной смеси, содержащей 1,5 мМ хлорида магния ($MgCl_2$), смесь дНТФ – по 2,5 мкМ каждого (Fermentas, Литва), по 10 пМ прямого и обратного соответствующих праймеров, 1 единицу Taq-полимеразы (Fermentas, Литва), 10 нг геномной ДНК соответствующего штамма. Реакцию проводили на амплификаторе GeneAmp PCRSystem 2700 (Applied Biosystems, США) в соответствующем режиме: предварительная денатурация ДНК при температуре 94 °С в течение 5 мин; 30 циклов, включающих в себя денатурацию ДНК при температуре 94 °С в течение 30 с; отжиг праймеров в течение 30 с; элонгацию комплементарной цепи ДНК при температуре 72 °С в течение достаточного для данного ампликона времени. После последнего цикла пробирки прогревали в течение 5 мин при температуре 72 °С.

2.7 Анализ белковых препаратов в полиакриламидном геле

Электрофоретическое разделение белков в системе ПААГ с 0,1 % додецилсульфатом натрия осуществляли по методу U.K. Laemmli. Для визуализации белковых примесей использовали Кумасси R250. В качестве маркеров молекулярных весов использовали стандарты фирмы Fermentas (Латвия) – 116,0; 66,2; 45,0; 35,0; 25,0; 18,4; 14,4 кДа.

2.8 Выделение и очистка капсульного F1 (Caf1) и V (LcrV) антигенов

Y. pestis

Фильтрат пропускали через колонку XK50/40, наполненную 600 мл Toyopearl HW-40F, предварительно уравновешенный 20 mM трис-HCl буфером, pH 8.0, содержащим 1 mM ЭДТА, (TE, буфер А). Фракции, элюирующиеся после свободного объема колонки, содержали изоформы LcrV. Эти фракции наносили на колонку XK50/20, наполненную 200 мл Toyopearl DEAE-650M. Не связавшиеся белки удаляли, промывая колонку буфером А, и элюировали фракции, содержащие LcrV, ступенчатым градиентом хлористого натрия в том же буфере. Фракции с наибольшим содержанием целевого белка смешивали с эквивалентными объемами 1 М сернокислого аммония и инкубировали в течение 18 ч при 10°C, после чего центрифугировали при 20°C. Фильтрат наносили на колонку XK26/20, наполненную 80 мл фенил-сефарозы, предварительно уравновешенной буфером А, содержащим 0.5 М сернокислый аммоний. Элюировали белки при комнатной температуре. Сначала балластные белки удаляли тем же буфером, а затем фракции LcrV элюировали нисходящим ступенчатым градиентом сернокислого аммония.

Секретируемый капсульный антиген выделяли из надосадочной фракции бульонной культуры штамма *Y. pseudotuberculosis* 11M/pFSK 3/9 с последующей хроматографической очисткой.

2.9 Конструирование штамма *Y. pestis* с низкой эндотоксичностью

Конструирование $\Delta lpxM$ производного авирулентного штамма *Y. pestis* KM260(12) осуществляли методом сайт-направленного мутагенеза с использованием суицидного вектора pCVD442. Сконструированные плазмиды pCVD442 $\Delta lpxM::cat$ трансформировали в штамм *E. coli* S17 (λpir). Для получения штамма *Y. pestis* KM260(12) $\Delta lpxM$ использовали конъюгативный перенос по стандартной методике.

Первым шагом аллельного обмена была селекция штамма-реципиента *Y. pestis* KM260(12) содержащего интегрированную в хромосому, модифицированную плазмиду. Для этого осуществляли посев на плотную питательную среду, содержащую хлорамфеникол (20 мкг/мл). Донорный штамм *E. coli* S17-1 $\lambda pir/pCVD442\Delta lpxM::cat$ элиминировали добавлением в среду культивирования полимиксина В (50 мкг/мл). Для второго этапа рекомбинации (удаление интегрированной плазмиды) проводили селекцию в присутствии 10 % сахарозы. Отбирали полученные колонии с определенным фенотипом. Наличие вставки определяли методом ПЦР с использованием фланкирующих праймеров.

Удаление кассеты устойчивости к антибиотику в инактивированном гене проводили с помощью вектора pCP20, содержащего Flp-рекомбинационную систему *Saccharomyces cerevisiae* и маркеры устойчивости к ампициллину и хлорамфениколу. Плазмиду pCP20 вводили в штаммы *Y. pestis* методом критрансформации и отбирали трансформанты при температуре 28 °С по фенотипу Ap^R. С целью элиминации плазмиды pCP20 полученные клоны выращивали при температуре 40 °С в жидкой питательной среде, содержащей 2,5 мМ хлорида кальция (CaCl₂), в течение двух суток без селективного давления. Отбирали клоны, потерявшие устойчивость к ампициллину (100 мкг/мл) и хлорамфениколу (20 мкг/мл). Подтверждение утраты ген-блока *cat* проводили с помощью ПЦР.

2.10 Конструирование литических плазмид

Для конструирования векторной плазмиды фрагмент, содержащий p15A *ori* и ген *cat*, амплифицировали с использованием праймеров pEY-1 и pEY-2. Промотор pR' бактериофага λ амплифицировали с использованием праймеров pR-For и pR (T > C).

Сайт множественного клонирования из плазмиды pET32b(+) и терминатор транскрипции *rrnB* из плазмиды pBAD/мус-HisA были амплифицированы с использованием праймеров pEY-5 - pEY-6 и pEY-7 - pEY-8, соответственно, и соединены с помощью сплайсинг-ПЦР с удлинением перекрытия с праймерами pEY-5 и pEY-8. После этого все фрагменты были гидролизованы соответствующими рестрикционными ферментами и лигированы. Полученная конструкция pEYR' (рисунок 3) была трансформирована в *E. coli* DH5 α и подвергнута секвенированию.

Для плазмид pEYR'-E и pEYR'-Y-K гены лизиса клонировали в сайты клонирования NdeI-XhoI. Для плазмид pEYR'-S-R-Rz, pEYR'-E-Y-K и pEYR'-E-S-R-Rz, S-R-Rz и Y-K гены со своими собственными сайтами связывания рибосом были клонированы в сайты клонирования Sall-XhoI. Ген *E* клонировали в сайты клонирования NdeI-SalI.

Полученные конструкции трансформировали в *E. coli* DH5 α и *Y. pestis* KM260(12) Δ *lpxM*.

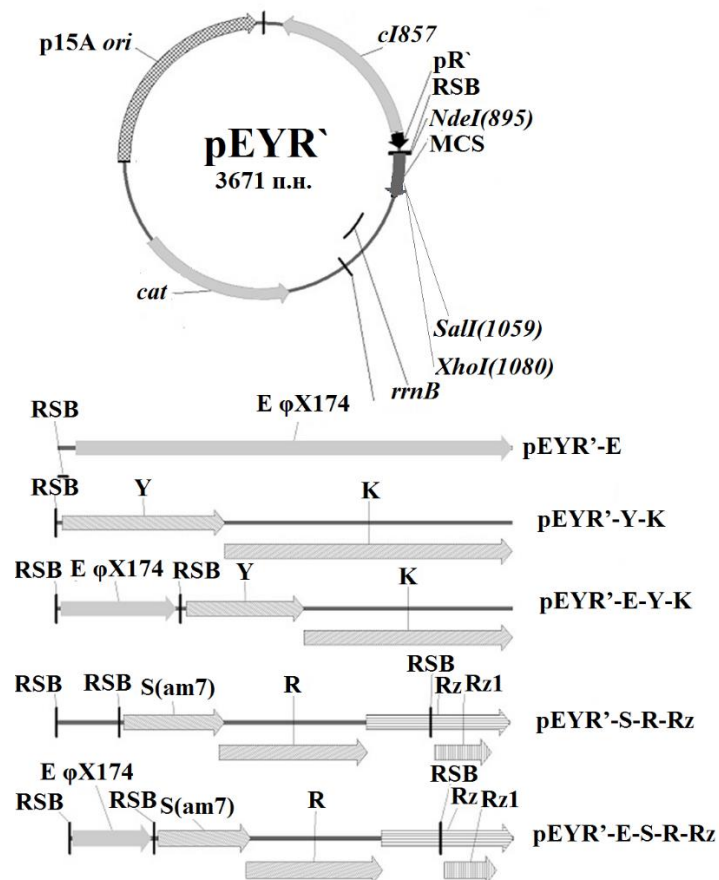


Рисунок 3 – Схематическое изображение векторной плазмиды и лизирующих кассет, использованных в этом исследовании.

2.11 Препаративное получение бактериальных теней

Для получения БТ используют штаммы *Y. pestis* KM 260(12) Δ lpxM с различными литическими плазмидами. Культуру высевают из вскрытой ампулы на чашки Петри с агаризованной средой ВНИ, содержащей 1% крови крупного рогатого скота с хлорамфениколом (20 мкг/мл), и инкубируют при температуре 28 °С в течение 48 ч (первый пассаж). Чистоту культуры проверяют по способности к лизису бактериофагом чумным Покровской диагностическим сухим (ТУ 9386-021-01898109-2008). Затем культуру пересевают в колбу с 300 мл бульона Хоттингера, содержащими 1 % крови крупного рогатого скота с хлорамфениколом (20 мкг/мл) и инкубируют при температуре 28°С в течение 16 ч (второй пассаж).

Культивирование и индукция. Партию бактериальных теней получают методом глубинного культивирования в ферментере с рабочим объемом 10 л в жидкой обогащенной питательной среды на основе солянокислого гидролизата казеина с содержанием N_{амин} до 150 мг% следующего состава: дрожжевой экстракт – 15 г/л, глюкозу – 5 г/л (стартовая концентрация) + 5 г/л (подпитка), гидрофосфат калия – 6 г/л, дигидрофосфат калия – 3 г/л, сульфат магния – 0,5 г/л, микроэлементы (сульфат марганца – 0,6 мкМ, сульфат меди 1,25 мкМ, сульфат железа 2⁺ – 0,6 мкМ, сульфат цинка – 0,6 мкМ, цитрат натрия – 0,1 мкМ), хлорамфеникол – 20 мг/л, pH 7,0. Аппарат должен быть оснащен турбинной мешалкой, система аэрации должна обеспечивать подачу воздуха до 2 л/мин. При частоте вращения мешалки до 1000 об/мин система обеспечивает нелимитированный по массообмену рост культуры.

Полученную ночную культуру второго пассажа засевают в ферментер до достижения ОП₆₀₀ = 0,2. Температура культивирования в фазе роста поддерживается в пределах (28 ± 1) °С. Уровень аэрации и перемешивания для обеспечения массообмена поддерживается не ниже 20 % от насыщения по O₂.

При достижении бактериальной культурой оптической плотности (ОП₆₀₀) ≥ 2,0 ед запускается стадия лизиса клеток. Для этого температура резко поднимается до значения = 42,0 °С; обороты мешалки и аэрирования фиксируются на последних значениях для отслеживания процесса гибели клеток вследствие выработки белка E и эндוליзинов. Вышеизложенные условия культивирования поддерживаются в течении 12 – 24 ч, после чего культуральная жидкость передается на сепарацию.

Перед подъемом температуры проводится определение бактериальной концентрации (БК) культуральной жидкости методом разведений с высевом на чашки с плотной питательной средой.

Сепарация и отмывка. Биомассу отделяют путем центрифугирования при $11000 \times g$ в течение 15 мин в стерилизованных 3 %-ной перекисью водорода и отмытых стерильной водой стаканах. После чего полученную сырую биомассу ресуспендируют в половинном объеме стерильной дистиллированной воды с температурой 4-8 °С и снова центрифугируют. Процедуру повторяют дважды и захлаживают при температуре 4 ± 2 °С.

Подготовка биомассы и проведение лиофилизации. Для консервации препарата сырую биомассу ресуспендируют в дистиллированной воде с добавлением мертиолята натрия (0,2 мг/г), разливают в стерильные флаконы и передают на лиофилизацию. По результатам посева проводят подсчет содержания бактериальных теней во флаконе, выраженное в количестве КОЕ бактериальной культуры перед началом термоиндукции.

Флаконы замораживают до температуры - 80 °С и помещают в лиофильную сушилку VirTis. Сушку производят при температуре конденсора - 71 °С и остаточном давлении 80 мбар в течении 44 ч.

2.12 Проверка специфической стерильности

Контроль стерильности проводят методом прямого посева по ГФ XII, часть 1, стр.125. Препарат считают стерильным при отсутствии роста микроорганизмов во всех образцах.

2.13 Определение специфической безопасности

Определение специфической безопасности осуществляется по ГФ XII, ч. 1., с. 124. Препарат должен быть безопасным и не оказывать токсического действия на организм лабораторных животных при внутрибрюшинном введении 10^8 КОЕ бактериальных теней (ГФ XII, ч. 1.)

Определение специфической безопасности на модели белых мышей. Испытание проводят на 5 белых мышах массой ($18,5 \pm 1,5$) г. Препарат растворяют в воде для инъекций и вводят по 0,5 мл внутривенно через индивидуальную иглу каждому животному. Наблюдают за животными в течение 7 сут. Препарат выдерживает испытание, если в течение предусмотренного срока ни у одного из животных не проявятся признаки интоксикации и не будет отмечено уменьшение массы тела. При появлении признаков интоксикации или снижении массы тела животных испытание повторяют. Препарат считают выдержавшим испытание, если при повторном введении в период наблюдения не проявятся признаки интоксикации и не будет отмечено уменьшение массы тела белых мышей и морских свинок.

Определение специфической безопасности на модели морских свинок. Испытание проводят на двух морских свинках массой (275 ± 25) г. Препарат растворяют в воде для инъекций и вводят внутривенно по 0,5 мл через индивидуальную иглу каждому животному. Наблюдают за животными в течение 7 суток. Препарат выдерживает испытание, если в течение предусмотренного срока ни у одного из животных не проявятся признаки интоксикации и не будет отмечено уменьшение массы тела. При появлении признаков интоксикации или снижении массы тела животных испытание повторяют. Препарат считают выдержавшим испытание, если при повторном введении в период наблюдения не проявятся признаки интоксикации и не будет отмечено уменьшение массы тела белых мышей и морских свинок.

2.14 Просвечивающая электронная микроскопия

Пробоподготовку для просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN, Чехия) проводили центрифугированием бактериальной суспензии при $3000 \times g$ в течение 10 мин, перед фиксацией 2,5 % глутаровым альдегидом (рН 7,2) в течение 2-3 ч при 4 °С. Образцы промывали трижды по 10 мин 4 %-ным раствором глутаральдегида в 0,2 М Na-какодилатном буфере, рН 7,2. Фиксацию проводили в течение ночи при 4 °С. Дополнительную фиксацию бактерий проводили в 4 %-ном водном растворе четырехоксида осмия в буфере Рейтера-Келенбергера в течение ночи при 4 °С. После фиксации и промывки в буфере

образцы бактерий обезвоживали в течение 10 мин в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (30 %, 50 %, 70 %, 95 %) и в течение 20 мин в абсолютном спирте с его трехкратной заменой. Далее образцы пропитывали смесями абсолютного этанола и аралдита (соотношение 3: 1; 1: 1; 1: 3) при 37 °С в течение суток, переводили в чистый аралдит, выдерживали в вакууме (10^{-2} торр.) в течение 1,5 ч при температуре 37 °С. Образцы заливали аралдитом и полимеризовали при температуре 40 °С в течение ночи, затем при температуре 60 °С в течение одного дня, при температуре 90 °С в течение двух дней. Срезы фиксированных бактерий получали стеклянным ножом на ультрамикротоме Ultracut (Reichert Jung, Австрия). Срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали при ускоряющем напряжении 120 кВ и увеличении от 10000 до 100000 раз. Электронно-микроскопические изображения были получены с помощью камер высокого разрешения GatanOriusSC200W 120 кВ и GatanOriusSC 1000V 200 кВ.

2.15 Иммунизация животных и последующее заражение вирулентным штаммом *Y. pestis*

Беспородных мышей и морских свинок, случайным образом разделенных на группы, на 0 сут и 14 сут иммунизировали подкожно (п/к): препаратами Е-БТ, ЕУК-БТ, УК-БТ, SRRz-БТ или ESRRz-БТ (10^8 м.к.); экспериментальным препаратом вакцины чумной трёхкомпонентной (ВЧТК), состоящей из препарата бактериальных теней ЕУК-БТ (10^8 м.к.) и рекомбинантных антигенов чумного микроба – капсульного антигена F1 и V антигена (по 10 мкг), растворенными в 0,2 мл PBS (рН 7,2). В качестве отрицательного контроля (плацебо) использовали группу животных, получивших только раствор PBS. Через 14 сут после последней иммунизации мышей и морских свинок в каждой группе заражали подкожно серийными 10-кратными разведениями двухдневной агаровой культуры штамма *Y. pestis* 231 дикого типа, выращенного при температуре 28 °С (шесть животных на дозу).

Специфическую безопасность определяли по отсутствию токсического действия на организм лабораторных животных при внутрибрюшинном введении ГФ XII, ч. 1., с. 124.

Иммунологическую активность рекомбинантного белка F1 (10 мкг), сорбированного на гидроокиси алюминия (1 : 1), оценивали после двукратного подкожного введения (через 30 сут) животным. Для определения ЛД₅₀ на 30 сут после бустерного введения иммунизированных мышей и морских свинок и животных контрольных групп заражали вирулентным штаммом *Y. pestis* 231.

Фактическое количество присутствующих бактерий определяли путем посева на агаризованную среду. Гуманные конечные точки строго соблюдались. Животных, которые умерли от инфекции, или подвергнутые эвтаназии исследовали бактериологически, чтобы убедиться, что инфекция была причиной их смерти. За остальными животными наблюдали 30 дней.

Способность БТ, F1 или ВЧТК защищать животных от смерти после введения высокой дозы вирулентного штамма, обозначенную как индекс иммунитета (ИИ), рассчитывали, как соотношение:

$$ИИ = ЛД_{50имм} / ЛД_{50инт}$$

где ЛД₅₀ – средняя летальная доза; ЛД_{50имм} – это ЛД₅₀ для животных, иммунизированных исследуемым антигеном; ЛД_{50инт} – это ЛД₅₀ для интактных (не иммунизированных) животных.

2.16 Моделирование экспериментальной чумы в условиях УББ 2 лаборатории

Определение вирулентности проводили на 6–8-недельных самцах беспородных мышей (18-20) г. Мышам подкожно вводили суспензию двухсуточной агаровой культуры *Y. pestis* EV НИИЭГ в изотоническом растворе NaCl в разведениях с 10 по 10⁵ КОЕ в объеме 0,2 мл на животное. Погибших животных вскрывали, внутренние органы (селезенка, регионарные лимфоузлы) подвергали бактериологическому исследованию. В ходе эксперимента по моделированию чумной инфекции все животные были разделены на 4 группы. Первая группа состояла из мышей, которым однократно внутрибрюшинно вводили 40 мг декстрана железа (раствор для внутримышечного введения «Феррум Лек» 50 мг/мл, Словения) за 1 ч до инокуляции штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Во второй группе были мыши, которым вводили препарат

железа в той же дозе ежедневно. Мышам третьей группы вводили только штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, а животным четвертой группы – только декстран железа.

Оценку здоровья проводили ежедневно. Активность, внешний вид, признаки обезвоживания и потерю веса животных оценивали по шкале от 1 до 4 баллов.

2.17 Анализ иммунного ответа

2.17.1 Иммуноферментный анализ

Уровни IgG к БТ и рекомбинантным белкам *Y. pestis* в сыворотках измеряли в непрямом варианте ИФА. 96-луночные планшеты покрывали БТ (0,1 мг/мл) в течение ночи при температуре 4 °С. Образцы сыворотки мышей серийно разводили от 1: 200 до 1: 409600, а образцы сыворотки морских свинок – от 1: 500 до 1: 64000. В качестве детектирующих антител использовали anti-mouse и anti-guinea pig IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, 1:5000). Реакции визуализировали с помощью ТМВ (3,3', 5,5'-тетраметилбензидин) и останавливали с помощью 2 М H₂SO₄. Измеряли оптическую плотность при 450 нм. Титр конечного разведения рассчитывали, как разведение сыворотки, значение оптической плотности которого было на 0,2 единицы выше фона. Фоновые значения были получены из образцов сыворотки, собранных у животных, которым вводили только фосфатно-солевой буфер.

2.17.2 Клеточный ответ: анализ стимулированных спленоцитов

Спленоциты морских свинок и мышей (10⁶), собранные через 14 сут после второй иммунизации Е-БТ, ЕУК-БТ, УК-БТ, SRRz-БТ, ESRRz-БТ или ФСБ, смешивали с соответствующими иммуногенами. Клетки инкубировали в течение 48 ч при температуре 37 °С и помещали в 96-луночный планшет, покрытый антителами против IFN-γ (набор для ИФА для INF-γ морской свинки; CSB-E0676GU; GUSABIO; Technology LLC; Хьюстон, США и набор для ИФА для мышинового IFN-γ; BMS606-2; ThermoFisher Scientific; Waltham, MA USA) или IL-1β (набор для ИФА с интерлейкином 1β (IL-1β) морской свинки; CSB-E06782p GUSABIO Technology LLC., Houston, США и набор для ИФА IL-1 β мыши, BMS6002; ThermoFisher Scientific;

Уолтем, Массачусетс, США). ConA (5 мкг/мл) (Sigma-Aldrich) в конечной концентрации 5 мкг/мл использовался как положительный контроль. Стандарты и образцы добавляли в лунки, суспензии инкубировали и промывали промывочным буфером из набора. Для обнаружения использовали 100 мкл конъюгированных с оловом антител против IFN- γ или IL-1 β . После отмывки в лунки добавляли 0,09 мл субстрата ТМВ. Суспензии инкубировали 30 мин при температуре 37 °С для визуализации активности использовали пероксидазу хрена. Для остановки реакции в каждую лунку добавляли 0,05 мл стоп-раствора. Оптическую плотность измеряли на микропланшетном ридере при длине волны 450 нм для расчета концентрации IFN- γ или IL-1 β .

2.18 Статистический анализ данных

Определение специфических антител и цитокинов проводили 3 раза для воспроизводимости и результаты суммировали как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Статистическую значимость определяли с помощью t-критерия непарных выборок и дисперсионного анализа. Результаты вакцинированных групп сравнивали с результатами невакцинированной контрольной группы PBS; статистически значимыми были сравнения с $p < 0,05$. Графики были подготовлены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 8.0.0 для Windows (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

ЛД₅₀ и 95 % доверительные интервалы вирулентного штамма для иммунизированных и неиммунизированных животных были рассчитаны с использованием метода Кербера [71]. Были записаны временные рамки смертности и рассчитано среднее время жизни до смерти для каждой группы лечения. Сравнение кривых выживаемости проводили с использованием теста логарифмического ранга (Мантела-Кокса). Значение p ниже 0,05 считали значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3 ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФАГОВЫХ ЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТЕНЕЙ

Высвобождение фагового потомства из бактерий-хозяев является конечной стадией жизненного цикла бактериофагов [244]. Нитевидные фаги, подобные M13, f1, fd, высвобождаются без лизиса, не вызывая гибели микробных клеток [191]. Другие же разрушают клеточную стенку, что приводит к лизису и гибели бактерий. Так, продукт гена *E* бактериофага φX174 ингибирует синтез муреина и олигомеризуется с образованием тоннеля, соединяющего внутреннюю и наружную мембраны бактериальной клетки, через который цитоплазма покидает клеточную оболочку [19]. Способность белка *E* инактивировать грамотрицательные бактерии привела к созданию генетически инактивированных вакцин, известных как бактериальные тени [61, 90, 142].

БТ – это лишенные цитоплазмы клеточные стенки бактерий с неповрежденными поверхностными структурами, содержащими потенциальные протективные антигены и/или обладающие выраженными адьювантными свойствами, а также способностью индуцировать местный, и системный иммунитет [57]. Технологический цикл от инокуляции маточной культуры до очищенного концентрата БТ занимает не более суток, а широкий спектр возможных применений сочетается с относительно низкими затратами на производство и пригодностью одних литических конструкций для разработки вакцин против нескольких видов патогенов [142].

Безопасность вакцин на основе БТ не полностью гарантирована из-за возможного сбоя в опосредованной геном *E* инактивации бактериальных клеток. Полученные путем лизиса с использованием белка *E* БТ *E. coli* содержали 1,2 % [88], БТ *S. enterica* serovar Enteritidis приблизительно 10 % [194], а БТ *B. bronchiseptica* – 2 % живых клеток [170].

Для усиления литической способности гена *E* в дополнение к нему в бактериальные клетки вносят другие связанные с бактериолизом гены такие как гены холина и эндолизина фага λ [234]. С другой стороны различия в степени деградации бактериальных клеток при использовании различных литических плазмид дают

возможность подобрать варианты бактериальных теней нескольких видов патогенов с оптимальным сочетанием степени деградации клеточной стенки и протективной активностью.

Целью настоящего раздела исследования являлось создание набора плазмид, обеспечивающих на модели *E. coli* за счёт комбинаций каскет генов лизиса бактериофагов λ [205] или Л-413С [82] с геном *E* бактериофага ϕ X174 [227] различную степень деструкции клеточной стенки энтеробактерий.

3.1 Создание набора литических плазмид для продукции бактериальных теней

Созданный набор плазмид предназначен для экспрессии каскет генов литических белков бактериофагов ϕ X174, λ (*cI857Sam7*) и Л-413С. Векторы, которые используют для этих целей, должны обладать следующими характеристиками: небольшое количество копий на клетку, строго контролируемый индуцируемый промотор, содержать универсальный сайт для множественного клонирования, и быть построены модульным способом, чтобы обеспечить будущие адаптации.

Сконструированная плазида рEYR' представляет собой вектор на базе репликона р15А с копийностью 5-20 копий на клетку, способный реплицироваться в различных видах семейства *Enterobacteriaceae*. Плазида содержит ген устойчивости к хлорамфениколу *cat* из транспозона Tn9, терминатор транскрипции рибосомальных генов *rrnB E. coli* и мутантный вариант промотора рR (рR') бактериофага λ с мутациями в гене белка-репрессора *cI* (*cI857*) и во втором операторе [116], что позволяет экспрессировать гены при повышении температуры культивирования до 42 °С. В данном векторе рEYR' клонировали все варианты каскет генов литических белков (рисунок 3).

Литическая каскета плазмиды рEYR'-Y-K состоит из генов холина (Y) и эндолизина (K) бактериофага Л-413С, клонированных по сайтам рестрикции NdeI-XhoI. В каскете плазмиды рEYR'-E-Y-K к генам холина (Y) и эндолизина (K) бактериофага Л-413С с собственным сайтом связывания рибосом, клонированных по сайтам рестрикции Sall-XhoI, добавили ген белка E бактериофага ϕ X174, клонированный по сайтам рестрикции NdeI-Sall. Каскета плазмиды рEYR'-Sam7-R-Rz включала гены холина (Sam7), эндолизина (R) и спанинов (Rz и Rz1) бактериофага

λ (*cI857Sam7*) с собственным сайтом связывания рибосом, клонированных по сайтам рестрикции SalI-XhoI. Кассета плазмиды pEYR'-E-Sam7-R-Rz состояла из генов холина (*Sam7*) и эндолизина (R) и спанинов (Rz и Rz1) бактериофага λ (*cI857Sam7*) с собственным сайтом связывания рибосом, клонированных по сайтам рестрикции SalI-XhoI, и гена белка E бактериофага ϕ X174 клонированного по сайтам рестрикции NdeI-SalI.

3.2 Получение бактериальных теней на основе штамма *E. coli* DH5 α

У полученных в результате трансформации литическими плазмидами производных штамма *E. coli* DH5 α изучали способность образовывать БТ при различных температурах культивирования. Эксперименты показали, что рост при температуре 28 °С не вызывает лизиса бактериальных культур (таблица 4). При повышении температуры с 28 °С до 42 °С наблюдали лизис культур штаммов DH5 α /pEYR'-E, DH5 α /pEYR'-Y-K, DH5 α /pEYR'-E-Y-K, DH5 α /pEYR'-E-Sam7-R-Rz (рисунок 4, таблица 4).

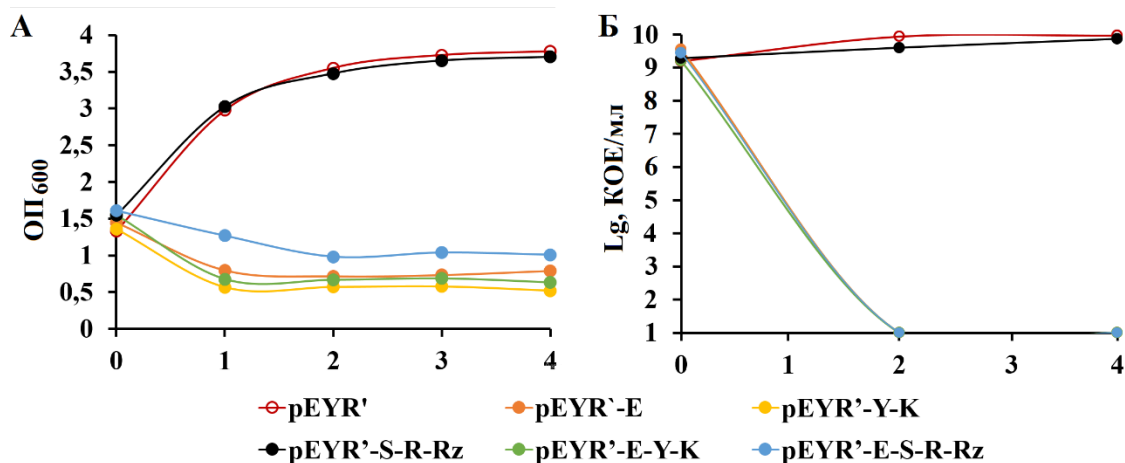


Рисунок 4 – Кинетика лизиса (А) и жизнеспособность (Б) штаммов *E. coli* DH5 α , содержащих различные литические плазмиды при температуре 42 °С

Исключение составил лишь штамм DH5 α /pEYR'-Sam7-R-Rz, несущий кассету генов *Sam7-R-Rz* бактериофага λ (*cI857Sam7*). Амбер-мутация в гене холина (*Sam7*) приводит к отсутствию синтеза белка S и накоплению эндолизина R и спанинов Rz и

Rz1 в цитоплазме бактериальной клетки. Лизис клеток DH5 α /pEYR'-S-R-Rz практически не наблюдался при росте культуры, как и у контрольного штамма DH5 α /pEYR'.

Таблица 4 – Жизнеспособность штаммов *E. coli* DH5 α , содержащих различные литические плазмиды при температурах культивирования 28 °C и 42 °C

Плазмида	0 ч	Время после индукции, ч			
		2 ч		4 ч	
	КОЕ/мл				
	28°C	28°C	42°C	28°C	42°C
pEYR'	1,6 $\times 10^8$	7,8 $\times 10^8$	8,7 $\times 10^8$	9 $\times 10^8$	9,3 $\times 10^8$
pEYR'-E	3,6 $\times 10^8$	2,8 $\times 10^8$	0	1,0 $\times 10^9$	0
pEYR'-Y-K	2,8 $\times 10^8$	4,6 $\times 10^8$	0	7,3 $\times 10^8$	0
pEYR'-E-Y-K	1,6 $\times 10^8$	2,1 $\times 10^8$	0	7 $\times 10^8$	0
pEYR'-Sam7-R-Rz	1,9 $\times 10^8$	2,7 $\times 10^8$	3,9 $\times 10^8$	4,3 $\times 10^8$	7,3 $\times 10^8$
pEYR'-E-Sam7-R-Rz	2,7 $\times 10^8$	3,2 $\times 10^8$	0	4,3 $\times 10^8$	0

3.3 Сравнительный анализ препаратов бактериальных теней *E. coli* DH5 α посредством просвечивающей электронной микроскопии

Анализ ультратонких срезов препаратов БТ методом электронной ПЭМ показал положительную корреляцию с данными определения оптической плотности и результатами высевов индуцированных культур сконструированных штаммов, а также позволил оценить тонкое строение бактериальных клеток, несущих различные комбинации литических фаговых генов (рисунок 5).

Как видно из рисунка 5А, клетки контрольного штамма DH5 α /pEYR', несущего векторную плазмиду, сохранили интактную структуру после индукции. То же можно сказать и про штамм DH5 α /pEYR'-Sam7-R-Rz (рисунок 5Д). Клетки же остальных штаммов подверглись различной степени лизиса, сопровождающегося потерей цитоплазматического содержимого, в результате частичного разрушения цитоплазматической мембраны и клеточной стенки под действием различных комбинаций литических фаговых белков.

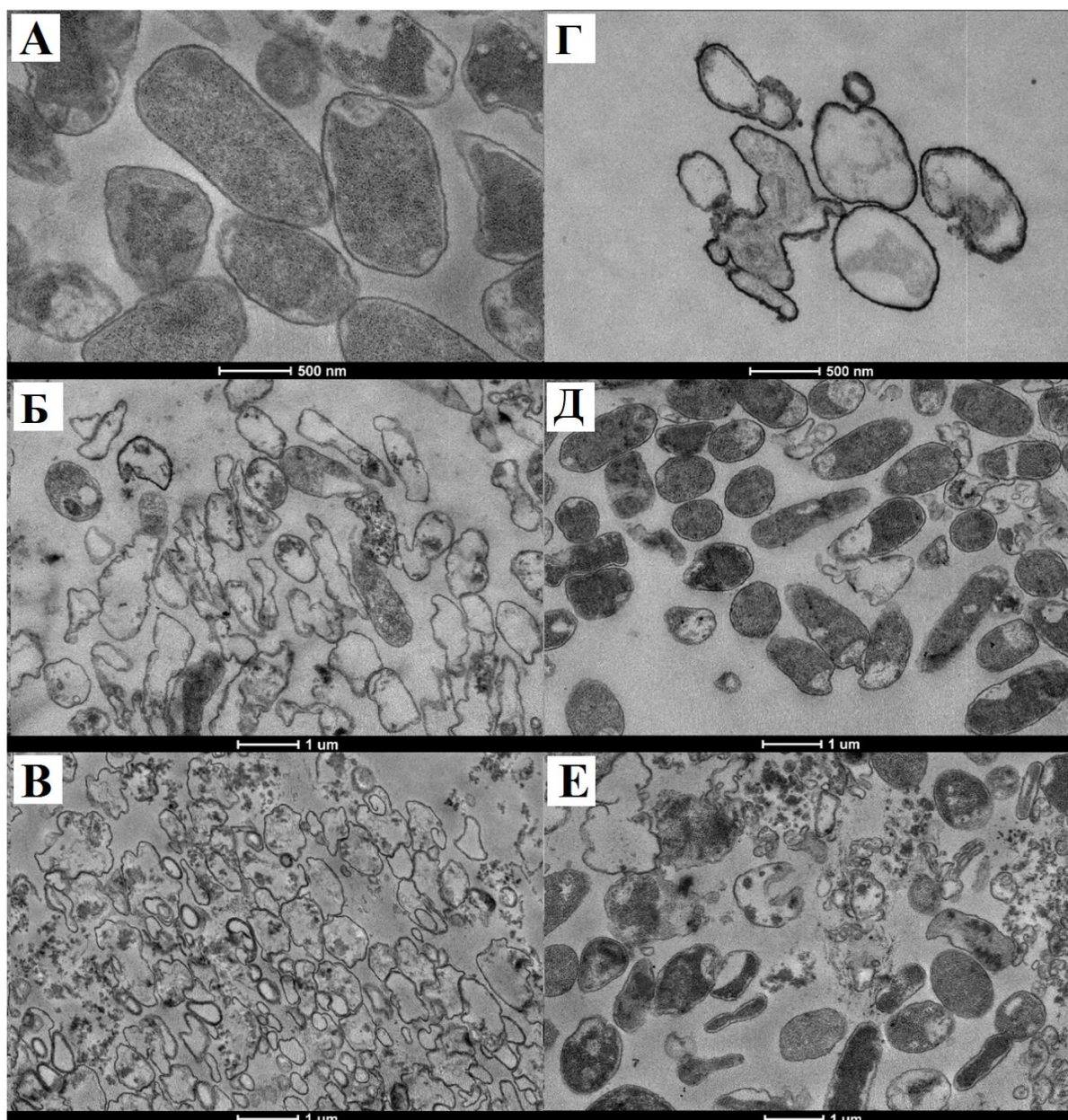


Рисунок 5 – ПЭМ микрофотографии ультратонких срезов клеток штаммов *E. coli*: DH5α/pEYR' (А), DH5α/pEYR'-Е (Б), DH5α/pEYR'-Y-К (В), DH5α/pEYR'-Е-Y-К (Г), DH5α/pEYR'-S-R-Rz (Д), DH5α/pEYR'-Е-S-R-Rz (Е)

Ранее было показано, что при образовании БТ инактивация *E. coli* может быть не абсолютной – незначительное количество жизнеспособных клеток присутствовало в препарате бактериальных теней [88, 90]. По нашим данным, после индукции фаговых генов число жизнеспособных клеток в суспензиях DH5α/pEYR'-Е, DH5α/pEYR'-Y-К, DH5α/pEYR'-Е-Y-К, DH5α/pEYR'-Е-S-R-Rz быстро снижалось (таблица 4). Ни одной живой клетки не обнаружили на втором часу культивирования после подъема

температуры до 42 °С. Таким образом, эффективная продукция эндолизинов в сконструированных штаммах обеспечивает быструю инактивацию *E. coli* с образованием бактериальных теней.

В представленной работе мы впервые продемонстрировали, что использование холина и эндолизина фага Л-413С в отдельности или в сочетании белком Е бактериофага φХ174 способствует эффективному образованию БТ *E. coli*. Кроме того, мы наблюдали, что совместная экспрессия генов лизиса Е и S-R-Rz позволяет быстро и высокоэффективно инактивировать клетки *E. coli* во время процедуры формирования бактериальных теней.

3.4 Заключение по главе 3

Таким образом, совместная экспрессия литического гена *E* фага φХ174 и генов холина-эндолизина фага Л-413С индуцирует быструю и эффективную продукцию БТ на кишечной палочке. Мы считаем, что стратегия использования БТ обладает потенциалом при создании высокоэффективных инактивированных вакцин-кандидатов, которые могли бы заменить имеющиеся в настоящее время бактериальные термоинактивированные и формолвакцины. Полученные результаты послужили основой для следующего этапа наших исследований, посвященного конструированию и оценке протективности различающихся по степени деструкции пептидогликана вариантов БТ на основе мутанта *Y. pestis* KM260(12)Δ*lpxM*, с инактивированным геном ацилтрансферазы *LpxM*, выбору наиболее протективного варианта, а также изучению иммунологической активности препарата БТ *Y. pestis* в комбинации с иммунодоминантными антигенами чумного микроба – капсульным антигеном F1 (Caf1) и V антигеном (LcrV).

ГЛАВА 4 ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТЕНЕЙ *Y. pestis*

Чума, печально известная зоонозная бактериальная инфекция, вызываемая *Y. pestis*, унесла более 200 миллионов человеческих жизней. За чуть более 100 лет с момента открытия ее этиологического агента было предпринято множество попыток разработать вакцину против чумы. Убитые и живые чумные вакцины первого поколения спасли десятки миллионов людей, но имели ряд недостатков. Чумные вакцины на основе живых аттенуированных штаммов могут вызвать у лиц с нарушениями иммунного статуса или метаболическими нарушениями генерализованный инфекционный процесс с летальным исходом; убитые вакцины неэффективны против легочной чумы [134, 163]. В настоящее время в целом ряде лабораторий продолжается разработка чумных вакцин-кандидатов, однако общепризнанная чумная вакцина до сих пор не лицензирована, так как ни одна из них не показала полного соответствия современным требованиям ВОЗ к «профилю целевого продукта против чумы» [242]. Субъединичные вакцины, содержащие только один или два иммунодоминантных антигена, капсульный антиген F1 (Caf1) и/или V антиген (LcrV), не защищают от заражения штаммами, лишенными F1 и/или продуцирующими атипичные изоформы V антигена. Кроме того, будучи высокоэффективными для защиты от гибели мышей, инфицированных типичными штаммами *Y. pestis*, они в меньшей степени протективны для морских свинок и обезьян при аналогичных способах заражения. В свою очередь водонерастворимый «остаточный» антиген (Б-антиген) из клеточных стенок иерсиний, индуцирующий клеточное звено иммунитета, надежно защищает морских свинок и обезьян, но малоэффективен для мышей [2, 3].

Было показано, что ряд природных компонентов бактериальных клеток обладают адьювантной активностью [9, 92, 97, 198, 222, 248]. Недавно были разработаны новые подходы к разработке неживых «самоадьювантных» бактериальных вакцин на основе технологии везикул внешних мембран (ВВМ) [38] и технологии бактериальных теней [39].

Целью настоящего раздела являлась конструирование и оценка протективности различающихся по степени деструкции пептидогликана вариантов БТ *Y. pestis*

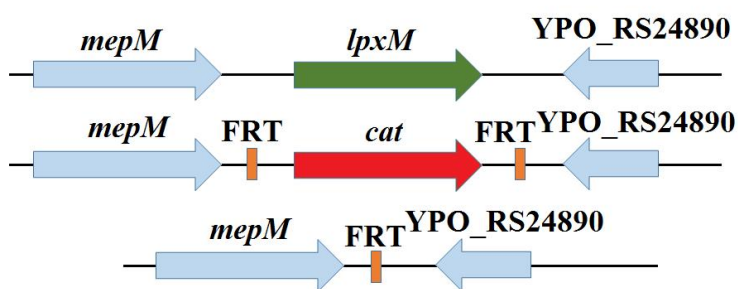
KM260(12) Δ *lpxM* для лабораторных животных (мышей и морских свинок), выбор наиболее протективного варианта, а также изучение иммунологической активности препарата БТ *Y. pestis* в комбинации с иммунодоминантными антигенами чумного микроба – капсульным антигеном F1 (Caf1) и V антигеном (LcrV).

4.1 Конструирование штамма *Y. pestis* KM260(12) Δ *lpxM*

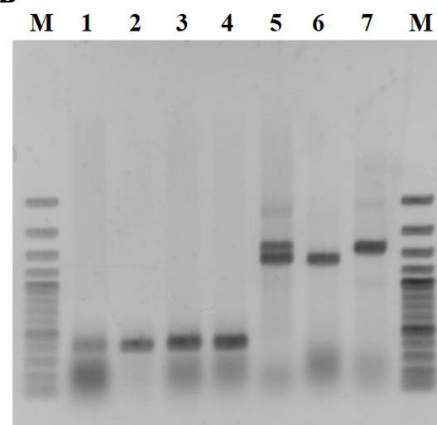
Учитывая, что бактериальный липополисахарид ответственен за ряд эндотоксических эффектов в макроорганизме [79] и при иммунизации бактериальными теньями *E. coli* O157:H7 у мышей обнаружили высокое содержание провоспалительных цитокинов [32], что указывает на потенциальную воспалительную реакцию, в качестве штамма-основы для получения бактериальных теней использовали сконструированный в настоящем исследовании мутант *Y. pestis* KM260(12) Δ *lpxM*, с инактивированным геном ацилтрансферазы *LpxM*, что приводит к синтезу менее токсичного пентаацилированного липополисахарида.

Методика конструирования Δ *lpxM* мутанта штамма *Y. pestis* KM260(12) заключалась в инактивации гена *lpxM* с помощью замены его на кассету устойчивости к антибиотику и последующем удалении кассеты из хромосомы (рисунок 6).

А



Б



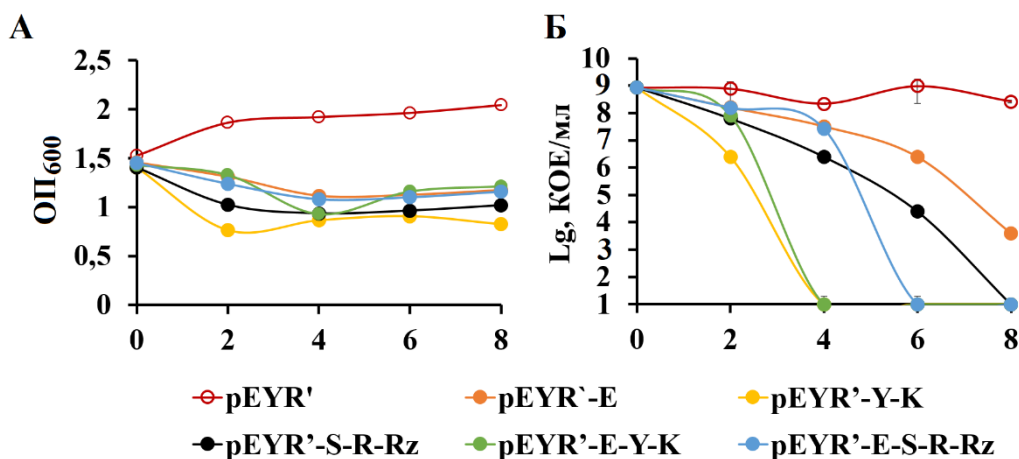
Б: 1-4 – *Y. pestis* KM260(12) Δ *lpxM* (мутантная аллель, размер ампликона 355 п.н.); 5 – *Y. pestis* KM260(12)/pCVD442442 Δ *lpxM::cat* (мерозигота); 6 – *Y. pestis* KM260(12) Δ *lpxM::cat* (размер ампликона 1335 п.н.); 7 – исходный штамм *Y. pestis* KM260(12) («дикая» аллель, размер ампликона 1555 п.н.); М – маркер молекулярных масс 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas)

Рисунок 6 – Схема конструирования (А) и электрофорез (Б) Δ *lpxM* мутанта штамма *Y. pestis* KM260(12)

В результате был получен лишенный маркера антибиотикоустойчивости штамм *Y. pestis* KM260(12) Δ *lpxM* (Ap^SCm^S) с делетированным геном *lpxM*, синтезирующий модифицированный ЛПС, состоящий из молекул со сниженной токсичностью.

4.2 Получение бактериальных теней на основе штамма *Y. pestis* KM260(12) Δ *lpxM*

Литические плазмиды трансформировали в штамм *Y. pestis* KM260(12) Δ *lpxM* для получения БТ. Значения ОП₆₀₀ для суспензий штаммов KM260(12) Δ *lpxM*/pEYR'-E (E-БТ), KM260(12) Δ *lpxM*/pEYR'-E-Y-K (EYK-БТ), KM260(12) Δ *lpxM*/pEYR'-Y-K (YK-БТ), KM260(12) Δ *lpxM*/pEYR'-S-R-Rz (SRRz-БТ) и KM260(12) Δ *lpxM*/pEYR'-E-S-R-Rz (ESRRz-БТ) определяли при разном времени инкубации, а кривые роста E-БТ, EYK-БТ, YK-БТ, SRRz-БТ и ESRRz-БТ были подготовлены на основе измеренных значений ОП₆₀₀ в каждый момент времени (рисунок 7А). ОП₆₀₀ E-БТ, EYK-БТ, YK-БТ, SRRz-БТ и ESRRz-БТ постоянно снижалась после повышения температуры культивирования. Жизнеспособность клеток также снизилась после индукции лизиса (рисунок 7Б). Производные родительского штамма, несущие различные литические плазмиды, утратили свою жизнеспособность после индукции фаговых генов с разной скоростью в течение 4-8 ч (рисунок 7Б), за исключением E-БТ, который потерял жизнеспособность только через 24 ч. Количество жизнеспособных клеток YK-БТ снижалось быстрее, чем количество жизнеспособных клеток SRRz-БТ, ESRRz-БТ и EYK-БТ, о чем свидетельствует меньшее количество КОЕ, наблюдаемое в препаратах «теней» (рисунок 7Б). Напротив, *Y. pestis* KM260(12) Δ *lpxM*/pEYR', несущий пустой вектор для клонирования, не испытывал затруднений в росте при температуре 42 °С в течение до 8 ч и демонстрировал лишь небольшое снижение через 24 ч (данные не показаны). Эффективность лизиса индуцированных мутантных БТ составляла 99,99% \pm 0,01%, когда БТ *Y. pestis* собирали через 24 ч после индукции (данные не показаны).



БТ *Y. pestis*, выросшие до экспоненциальной фазы, инактивировались индукцией генов лизиса. Подсчеты КОЕ были преобразованы в значения с логарифмической базой 10. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. из трех образцов.

Рисунок 7 – Кинетика лизиса *Y. pestis* KM260 (12) Δ lpxM, несущего различные плазмиды лизиса. Лизис контролировали путем измерения ОП₆₀₀ (А) и определения количества КОЕ (Б)

4.3 Просвечивающая электронная микроскопия бактериальных теней *Y. pestis* KM260 (12) Δ lpxM

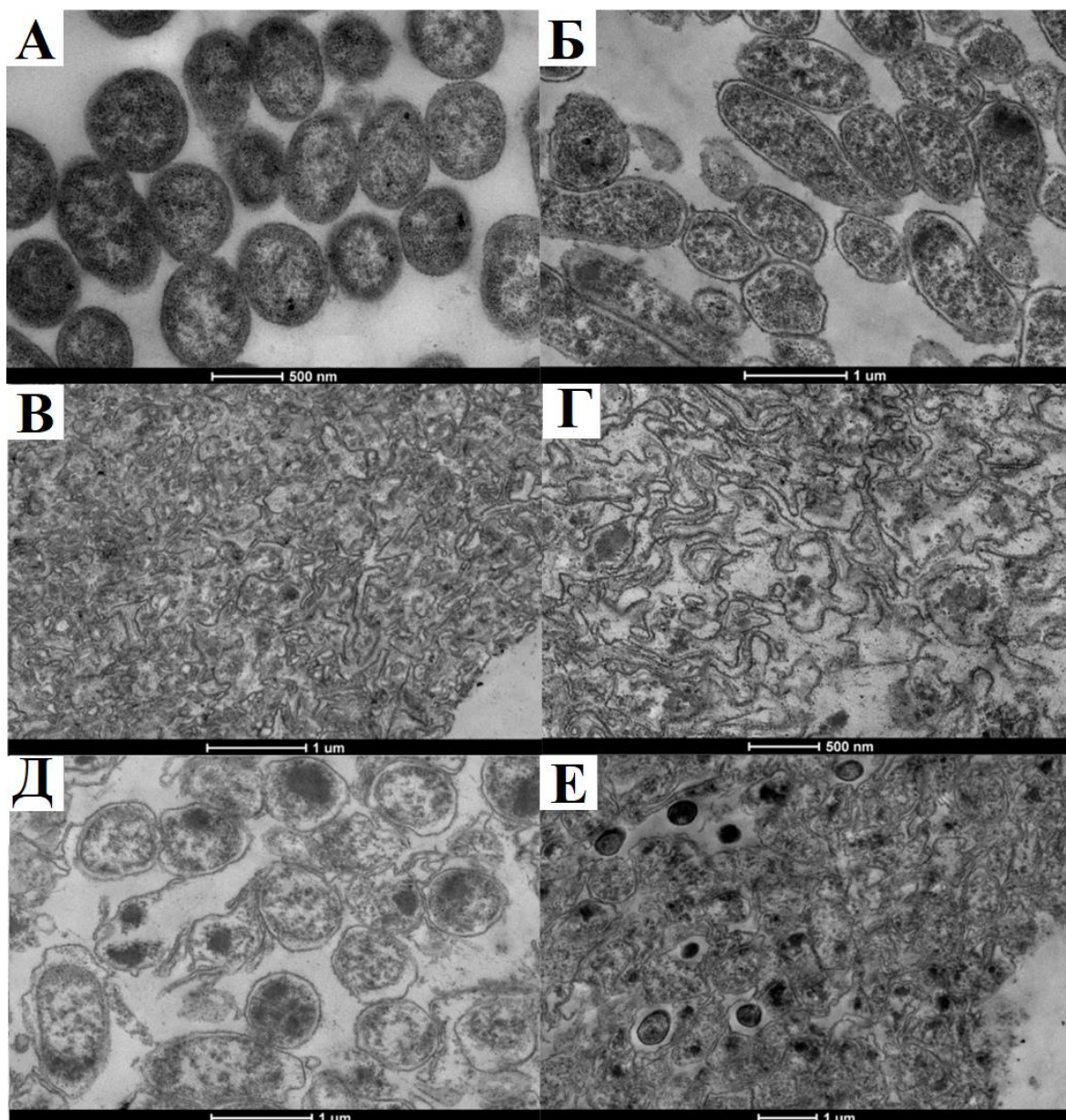
Образование БТ *Y. pestis* и высвобождение клеточного содержимого было подтверждено с помощью ПЭМ (рисунок 8Б-Е) путем сравнения с *Y. pestis* KM260(12) Δ lpxM/pEYR', несущим пустой вектор клонирования (рисунок 8А). Девяносто восемь процентов бактерий в популяции штамма-предшественника имели тонкую структуру, типичную для грамотрицательных бактерий. Компоненты клеточной стенки отчетливо видны только на части поверхности клеток примерно у половины бактерий, которые не продуцируют фаговые белки (рисунок 8А). Наружная оболочка тонкая. Тонкая периплазма заполнена относительно электронно-плотным пептидогликаном. Цитоплазматические мембраны относительно гладкие. Цитоплазма заполнена различными глобулярными и фибриллярными компонентами, которые образуют интенсивную диффузную неравномерную электронную плотность. Нуклеоиды локализуются в электронно-прозрачных зонах цитоплазмы. Остальные менее 2% бактерий имели необратимые структурные повреждения клеточных стенок, цитоплазмы и нуклеоидов.

Электронно-микроскопический анализ не выявил образования пор лизиса у БТ *Y. pestis* (рисунок 8Б-Е), но были и другие признаки нарушения целостности стенки бактериальной клетки. Оценка ПЭМ показала, что бактериальные тени *Y. pestis* были пустыми из-за потери цитоплазматического материала и имели сплюснутые оболочки по сравнению с клетками, которые были свободны от генов фаговых лизинов (рисунок 8А).

Экспрессия белка Е (рисунок 8Б) сопровождалась увеличением прозрачности периплазмы, что обеспечивало визуализацию внешних мембран и внешней границы цитоплазматических мембран. Бактериальные клетки практически сохраняли форму, но клеточная стенка теряла округлость и местами становилась морщинистой. Толщина периплазмы не увеличивалась, но освобождалась от электронно-плотного вещества. Цитоплазма становилась менее электронно-плотной, что сопровождалось появлением четких границ в электронно-плотных гранулах и телах внутриклеточного содержимого. Только 3% Е-БТ не имели необратимых структурных повреждений.

Микрофотографии бактерий, продуцирующих холин и эндолизин фага Л-413С, практически не отличаются, независимо от наличия (рисунок 8Е) или отсутствия (рисунок 8В) комбинированного синтеза белка Е. Бактериальные клетки полностью теряют свою трехмерную форму, напоминая не «бактериальные тени», а скорее смятые тканевые мешочки, что и побудило нас назвать этот вариант «бактериальными мешочками».

Присутствие в штамме генов холина и эндолизинов фага λ (рисунок 8Г, Е) сопровождается тенденцией бактериальных теней принимать более округлую форму, чем в классических Е-индуцированных БТ с еще более морщинистыми клеточными стенками. В отдельных полях обзора видны БТ, не замкнутые в кольцо. На фоне общей очистки от содержимого БТ примерно в трети клеток видны скопления электронно-плотного материала с размытыми (рисунок 8Г) или четкими границами (рисунок 8Е). Штамм, несущий гены холина и эндолизина фага λ в сочетании с геном белка Е (рисунок 8Е), в дополнение к БТ с четко ограниченными цитоплазматическими мембранами с очень электронно-плотным содержимым, образуют «бактериальные мешочки», похожие на те, что индуцируется действием холина и эндолизина фага Л-413С (рисунок 8В, Д).



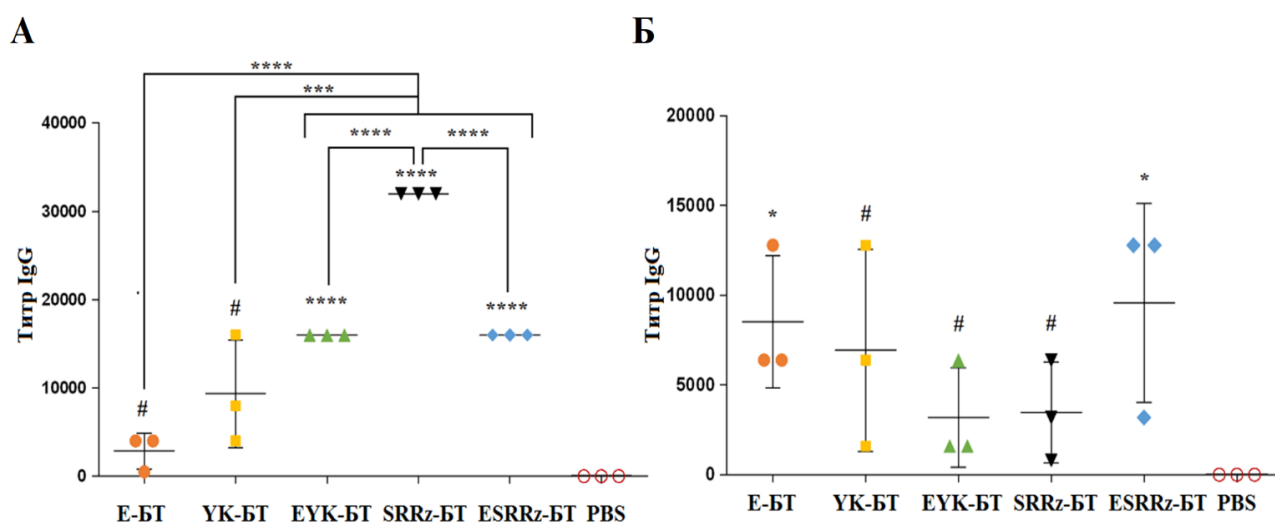
Полоса соответствует 0,1 мкм (Б, В, Г, Е) или 500 нм (А, Д).

Рисунок 8 – Электронные микрофотографии штаммов *Y. pestis* KM260(12) Δ *lpxM* /pEYR' (А), KM260(12) Δ *lpxM* /pEYR'-E (Б), KM260(12) Δ *lpxM* /pEYR'-Y-K (В), KM260(12) Δ *lpxM* /pEYR'-E-Y-K (Г), KM260(12) Δ *lpxM* /pEYR'-S-R-Rz (Д), KM260(12) Δ *lpxM* /pEYR'-E-S-R-Rz (Е)

4.4 Анализ иммунного ответа у лабораторных животных

4.4.1 Определение уровня IgG у лабораторных животных

Титры специфических IgG-антител к бактериальным теньям в сыворотке морских свинок и мышей контролировали во время иммунизации шести групп. Как показано на рисунке 9 в контрольных образцах PBS не было обнаружено специфических IgG антител. Подкожное введение препаратов Е-БТ, ЕУК-БТ, УК-БТ, SRRz-БТ и ESRRz-БТ привело у мышей к сходным уровням анти-БТ IgG антител без существенных различий ($p > 0,05$). Самый высокий титр IgG у морских свинок, индуцированный SRRz-БТ, ЕУК-БТ и ESRRz-БТ, составлял 32000, 16000 и 16000 соответственно ($p < 0,001$). Титры антител в группах морских свинок, вакцинированных препаратами Е-БТ и УК-БТ, были ниже, чем в группах SRRz-БТ, ЕУК-БТ и ESRRz-БТ ($p < 0,001$) (рисунок 9А).



Животные были иммунизированы подкожно препаратами Е-БТ, ЕУК-БТ, УК-БТ, SRRz-БТ, ESRRz-БТ и PBS спустя 4 недели после первого введения. В качестве антигена 100 мкл БТ *Y. pestis* сорбировали в лунку микропланшета, в качестве детектирующих антител использовали козы антимышинные IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена, или козы антитела к IgG морских свинок, конъюгированные с пероксидазой хрена.

- $p > 0,05$; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,005$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$.

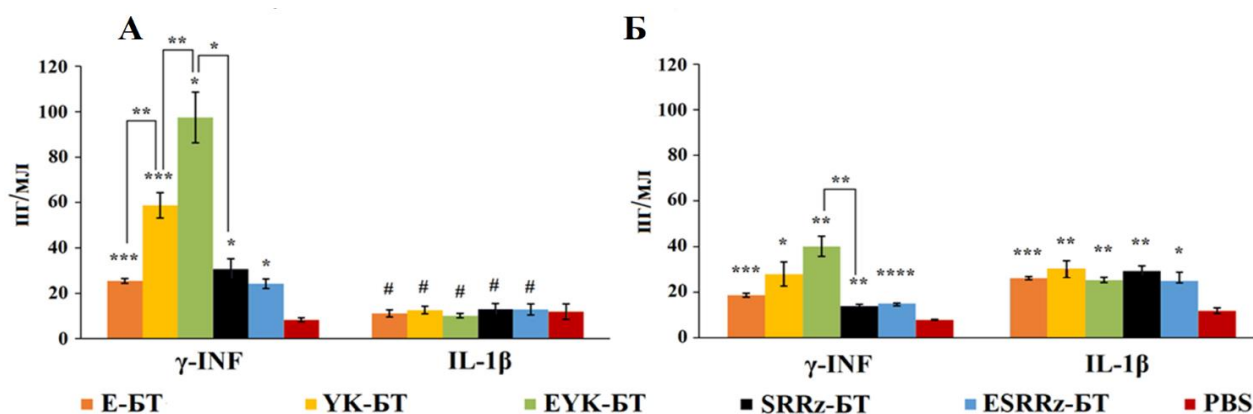
Рисунок 9 – Антительный ответ в сыворотках морских свинок (А) и мышей (Б) на препараты БТ

4.4.2 IFN- γ анализ

Для дальнейшего понимания иммунных механизмов, индуцированных БТ, была оценена экспрессия цитокина IFN- γ у морских свинок и мышей. Как показано на рисунке 10, группы, получавшие PBS, показали неспособность индуцировать продукцию IFN- γ . Напротив, значительное повышение уровней IFN- γ было обнаружено в группе, иммунизированной препаратом YK-БТ и особенно в группе морских свинок, получавших EYK-БТ, после последней иммунизации ($p < 0,05$). Способность БТ индуцировать продукцию IFN- γ у морских свинок была заметно выше (рисунок 10А).

4.4.3 Анализ воспалительной реакции

Повышение уровней IL-1 β наблюдали у мышей, получавших любой вариант БТ ($p < 0,05$). Во всех других собранных образцах уровни IL-1 β были по крайней мере в два раза ниже ($p < 0,05$), чем уровни, индуцированные БТ у мышей (рисунок 10Б). В группах животных, получавших PBS, не было обнаружено увеличения цитокина ($p < 0,01$).



Лимфоциты селезенки выделяли на 14 день после последней иммунизации, и соответствующие БТ использовали в качестве иммуногенов. Культуральные супернатанты собирали через 48 ч, и концентрацию цитокинов измеряли с помощью ИФА.
- $p > 0,05$; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,005$; *** - $p < 0,001$; **** - $p < 0,0001$.

Рисунок 10 – Уровни цитокинов лимфоцитов селезенки иммунизированных морских свинок (А) и мышей (Б).

4.5 Оценка протективной активности различающихся по степени деструкции пептидогликана вариантов бактериальных тений *Y. pestis* KM260(12) Δ prxM для для лабораторных животных

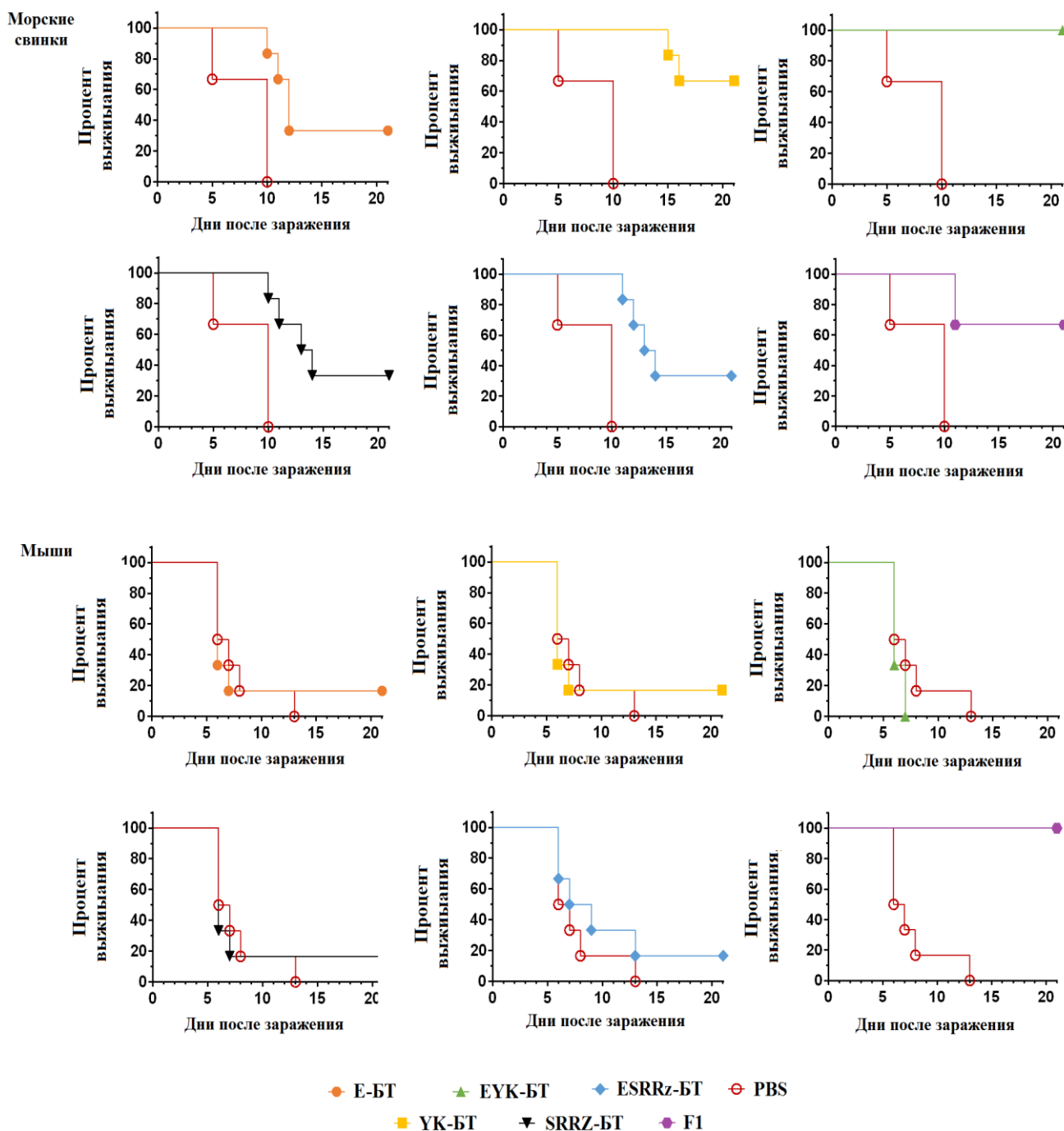
Для сравнительной оценки защитной активности у двух видов лабораторных животных определяли показатели иммунитета, индуцированного вариантами БТ, а именно отношение значений ЛД₅₀ у иммунизированных животных к аналогичным показателям у интактных животных (таблица 5). Иммунная система мышей практически не обладала защитным ответом на инокуляцию БТ, в то время как морские свинки, напротив, формировали значительный защитный иммунитет, особенно против препаратов УК-БТ и ЕУК-БТ. Капсульный антиген F1, с другой стороны, обеспечивал надежную защиту мышей, но не влиял на выживаемость морских свинок (рисунок 11). У иммунизированных грызунов не наблюдалось аномального поведения, и не было обнаружено явной разницы в весе между животными из разных групп.

Таблица 5 – Индекс иммунитета (ИИ), индуцированного вариантами БТ.

Животные, иммунизированные БТ / антигеном	Морские свинки		Мыши	
	ЛД ₅₀ , КОЕ	ИИ**	ЛД ₅₀ , КОЕ	ИИ
Е	147 37÷584	4,9×10 ¹	32 8×126	4,6×10 ⁰
У-К	6813 2154÷27123	2,3×10³	22 5×86	3×10 ⁰
Е-У-К	146789 36869÷926119	4,9×10⁴	22 5×86	3×10 ⁰
S-R-Rz	68 17÷271	2,3×10 ¹	15 4×58	2×10 ⁰
Е-S-R-Rz	147 37÷584	4,9×10 ¹	46 12÷233	6,6×10 ⁰
F1**	316 79÷1259	1,0×10 ²	100000 25119÷630957	1,4×10⁴
PBS	3 1÷13	1×10 ⁰	7 2÷27	1×10 ⁰

* Значения даны как средние ± 95% доверительный интервал.

** Способность БТ защищать животное от смерти после введения высокой дозы вирулентного штамма дикого типа, обозначенного как индекс иммунитета (ИИ), рассчитывалась как соотношение: $ИИ = ЛД_{50imm} / ЛД_{50int}$



Морских свинок и мышей вакцинировали подкожно различными препаратами БТ или F1 в 0 день и повторная вакцинация на 14 день. Через 14 дней после последней иммунизации 6 мышей и 6 морских свинок из каждой группы были заражены подкожно 10^2 КОЕ дикого типа *Y. pestis* 231 (33,3 ЛД₅₀ для мышей и 14,3 ЛД₅₀ для морских свинок).

Рисунок 11 – Защита различных вариантов БТ *Y. pestis* KM260(12)*ΔlpxM* от летального заражения штаммом *Y. pestis* 231 дикого типа для морских свинок (А) и мышей (Б)

4.6. Компонентный состав чумной субъединичной вакцины

Основной задачей настоящего раздела работы было изучение иммунологической активности композиции отобранного на предыдущем этапе препарата ЕУК-БТ штамма *Y. pestis* КМ 260(12) Δ *lpxM*/pEYR-E-Y-K и иммунодоминантных антигенов чумного микроба – капсульного антигена F1 (Caf1) и V антигена (LcrV) для определения компонентного состава прототипа вакцины чумной полигостальной субъединичной вакцины.

Предлагаемая нами вакцина чумная трехкомпонентная (ВЧТК) содержит действующие вещества:

Компонент 1 – бактериальные тени штамма *Y. pestis* КМ 260(12) Δ *lpxM*/pEYR-E-Y-K.

Компоненты 2 и 3 – рекомбинантные антигены чумного микроба – капсульный антиген F1 (Caf1) с молекулярной массой 17,7 кДа и V антиген (LcrV) с молекулярной массой 37 кДа в. Растворитель – 10 мМ фосфатный буфер, pH 7,2–7,4.

Одна иммунизирующая доза содержит компонент 1 в концентрации 10^8 м.к., компоненты 2 и 3 по 10 мкг на животное.

В качестве консерванта препарат содержит мертиолят натрия в количестве 0,2 мг/г.

Препарат полностью растворяется в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,2–7,4 в течение 3 мин и в растворенном виде представляет собой гомогенную взвесь серовато-белого цвета без посторонних примесей и хлопьев. Растворенный препарат свободно проходит в шприц через иглу № 0840.

Потеря массы при высушивании – не более 5 %. Препарат стерилен.

По результатам трансмиссионной электронной микроскопии в компоненте 1 зафиксирована потеря цитоплазматического содержимого в результате разрушения цитоплазматической мембраны и клеточной стенки.

По результатам электрофореза компоненты 2 и 3 содержат F1 антиген чумного микроба с мол. массой 17,7 кДа и V антиген чумного микроба с мол. массой 37 кДа, соответственно (рисунок 12).

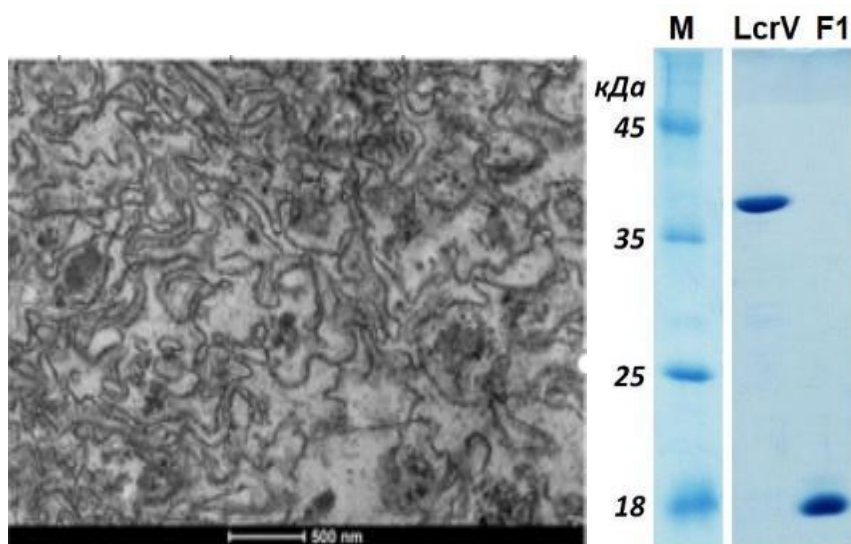


Рисунок 12 – Результаты тестирования подлинности препарата ВЧТК: трансмиссионная электронная микроскопия препарата бактериальных теней и ДСН-ПААГ-электрофорез

4.7 Специфическая безопасность композиции ЕУК-БТ с капсульным F1 (Caf1) и V (LcrV) антигенами чумного микроба

Двукратное подкожное введение ВЧТК не приводило к появлению у животных видимых негативных реакций: не влияло на поведение животных, не вызывало изменений шерстяного покрова, слизистых глаз и носа; снижения темпа набора веса (рисунок 13) и не приводило к повышению температуры тела.

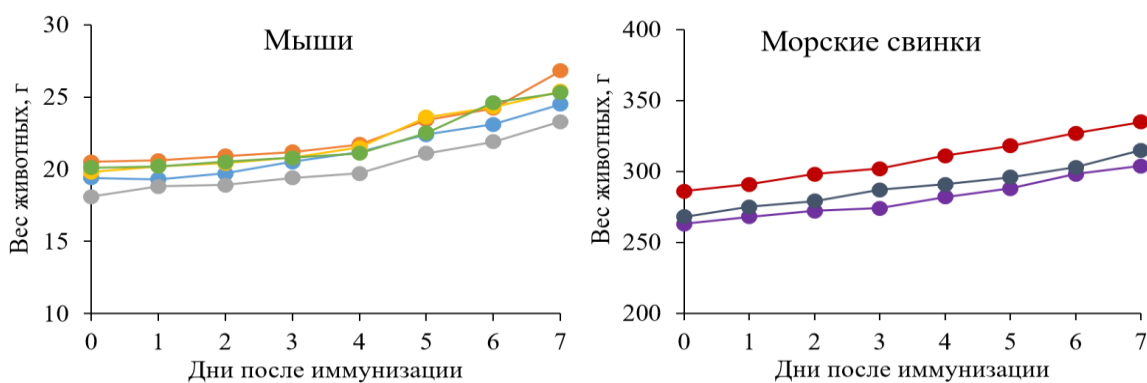


Рисунок 13 – Вес беспородных мышей и морских свинок до и после иммунизации прототипом чумной трехкомпонентной вакцины

4.8 Специфическая активность композиции ЕУК-БТ с капсульным F1 (Caf1) и V (LcrV) антигенами чумного микроба

Для оценки протективности и иммуногенных свойств кандидатных вакцинных препаратов используют тест-штаммы *Y. pestis*. Согласно «Инструкции по приготовлению и поддержанию вирулентных тест-штаммов *Yersinia pestis* сухих» [1999] вирулентность тест-штамма, выраженная в ЛД₅₀ (доза, убивающая 50 % животных), не должна превышать 50 м.к. по стандарту мутности (ОСО 42-28-59-85П) 10 единиц. Поэтому на первом этапе оценили вирулентность используемого для заражения тест-штамма чумного микроба *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 при подкожном введении.

При введении вирулентного тест-штамма 100 % мышей пало в дозе 10 КОЕ и выше, тогда как, при заражающей дозе 1 КОЕ, выживаемость мышей составляла около 80 %. При заражении морских свинок вирулентным штаммом 100 % животных пало, начиная с дозы 10² КОЕ. При этом процент выживаемости морских свинок составлял 30 % и 80 % в дозах 10 КОЕ и 1 КОЕ, соответственно (рисунок 14).

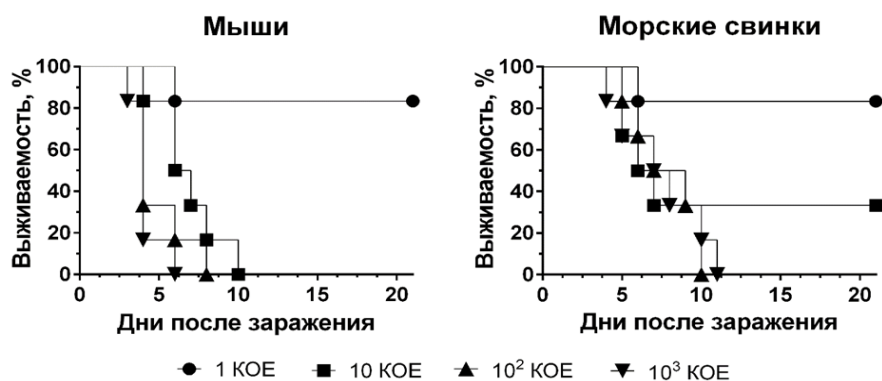


Рисунок 14 – Выживаемость беспородных мышей и морских свинок после п/к введения тест-заражающего штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* 231

При подкожном введении ЛД₅₀ тест-заражающего штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 составила 2 КОЕ (1÷9 КОЕ) для беспородных мышей и 3 КОЕ (1÷13 КОЕ) для морских свинок (таблица 6), что соответствует требованиям, предъявляемым регламентирующими документами.

Таблица 6 – Значения ЛД₅₀ тест-штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* 231 для лабораторных животных

Штамм	ЛД ₅₀ , КОЕ	
	мыши	морские свинки
<i>Y. pestis</i> 231	2 (1÷9)	3 (1÷13)

4.8.1 Иммунологическая активность композиции ЕУК-БТ с капсульным F1 (Caf1) и V (LcrV) антигенами чумного микроба

Для определения формирования гуморального иммунного ответа на введение ВЧТК беспородных белых мышей и морских свинок иммунизировали подкожно двукратно с интервалом в 14 сут препаратом ВЧТК, состоящим из препарата бактериальных тений штамма *Y. pestis* KM 260(12) Δ *lpxM*/pEYR-E-Y-K в концентрации $3,6 \times 10^8$ м.к./животное и рекомбинантных антигенов чумного микроба – капсульного антигена F1 (Caf1) в концентрации 10 мкг/животное и V антигена (LcrV) в концентрации 10 мкг/животное. Подкожное введение препарата ВЧТК стимулировало продукцию антител у лабораторных животных. Отмечали увеличение титров специфических IgG антител к препарату БТ, F1 и V антигенам после второй иммунизации мышей и морских свинок (таблица 7). Отличия между иммунной и неиммунной группой были достоверны ($p < 0,05$).

Таблица 7 – Средние реципрокные титры после иммунизации прототипом чумной трехкомпонентной вакцины

Животные	Препарат тений		F1		V	
	Иммунизация		Иммунизация		Иммунизация	
	1	2	1	2	1	2
Морские свинки	5333 ± 2613	18667 ± 6914	< 100	1333 ± 653	< 100	181333 ± 73172
Мыши	1688 ± 845	11600 ± 2799	5700 ± 2609	7400 ± 2471	< 100	< 100

Напряженность иммунитета, индуцированного введением препарата ВЧТК, определяли по способности предохранять от гибели беспородных белых мышей и морских свинок после заражения массивной дозой вирулентного штамма *Y. pestis* 231

и выражали в ЛД₅₀ и индексе иммунитета. Двукратная иммунизация ВЧТК предоставляла 100 %-ную защиту от гибели при подкожном заражении беспородных мышей и морских свинок вирулентным штаммом *Y. pestis* 231. Неиммунные мыши и морские свинки контрольных групп, зараженные *Y. pestis* 231, пали к 12 сут и 10 сут наблюдения, соответственно (рисунок 15).

ЛД₅₀ вирулентного штамма *Y. pestis* 231 для мышей и морских свинок, иммунизированных данным препаратом (таблица 8), достоверно отличалась от ЛД₅₀ для контрольных групп лабораторных животных ($p < 0,001$).

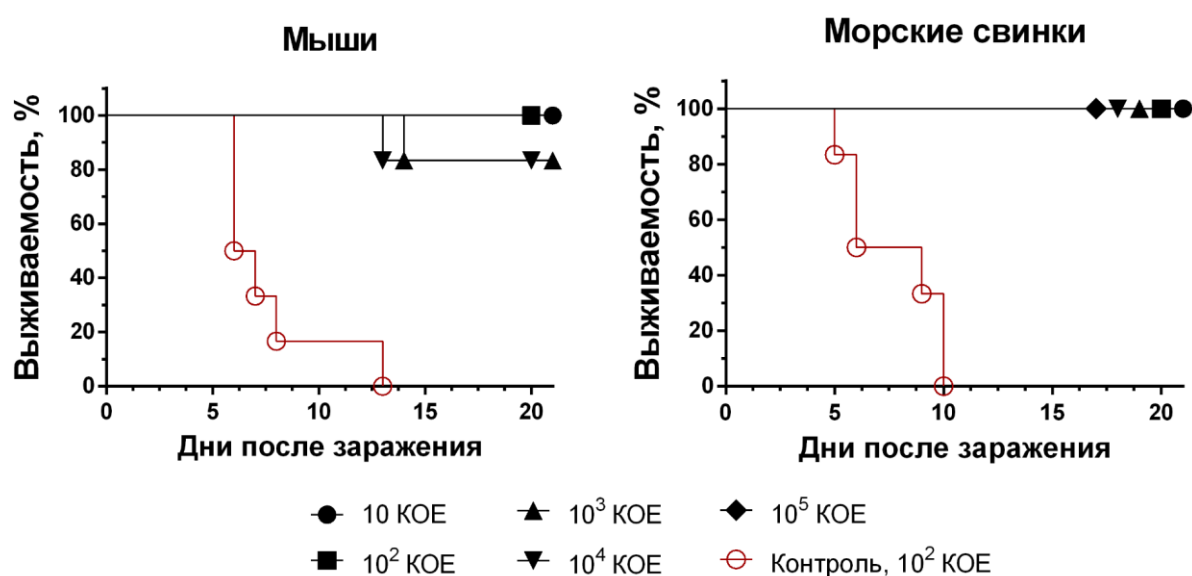


Рисунок 15 – Выживаемость беспородных мышей и морских свинок, двукратно иммунизированных ВЧТК, после подкожного введения вирулентного штамма *Y. pestis* 231

Таблица 8 – Иммунологическая активность ВЧТК

Препарат	ЛД ₅₀ <i>Y. pestis</i> 231, КОЕ		Индекс иммунитета (ЛД ₅₀ для иммунизированных / ЛД ₅₀ для интактных животных)	
	Мыши	Морские свинки	Мыши	Морские свинки
ВЧТК	$> 3,2 \times 10^4$	$> 3,2 \times 10^5$	$> 1,6 \times 10^4$	$> 1,1 \times 10^5$
Контроль	2 (1 ÷ 9)	3 (1 ÷ 13)	1×10^0	1×10^0

4.9 Заключение по главе 4

Основная цель нашего исследования состояла в том, чтобы определить наличие в препаратах БТ компонентов, которые защищают морских свинок (и, возможно, человека), а также зависимость силы иммунного ответа от степени деградации клеточной стенки БТ. На первом этапе работы планировали разработать препараты бактериальных теней *Y. pestis*, лизируемых в разной степени [18], и провести сравнительную оценку их защитной активности на мышах и морских свинках.

Принимая во внимание возможность присутствия жизнеспособных бактерий в препаратах БТ, полученных с использованием как протеин-Е-опосредованного лизиса, так и системы холин-эндолизин [234], в качестве основы для вакцин-кандидатов мы выбрали авирулентный штамм *Y. pestis* KM260(12), лишенный трех резидентных плазмид. Помимо аттенуации, потеря этих плазмид сопровождалась утратой способности продуцировать ряд кодируемых ими белков, включая небезопасные для организма, вакцинированного факторы, такие как активатор плазминогена (Pla) и «мышинный» токсин [222], а также ряд незащищающих балластных антигенов, например, Pst, YopE и др. [31]. Отсутствие двух основных защитных антигенов F1 и V, кодируемых этими плазмидами, в дальнейшем компенсировали путем введения в вакцину-кандидат очищенных рекомбинантных белков.

Выбранный подход к построению БТ оказался верным и, судя по данным ПЭМ, позволил сформировать практически полный спектр структурных вариантов БТ, определяемых степенью деградации пептидогликанового скелета. Сравнение ПЭМ-фотографий поверхности клеток *Y. pestis* после индукции лизиса показало, что БТ, несущие ген *E* [234] или гены *S*, *R* и *Rz* [218], демонстрируют заметные поверхностные складки (потерю округлости) из-за потери цитоплазматического содержимого, хотя и сохраняется основная морфология родительских бактериальных клеток. Относительно полные наружные мембраны с небольшими изменениями морфологии указывают только на локальный гидролиз пептидогликана. Очевидно, что белок E гидролизует слой муреина только в месте формирования трансмембранного туннеля [234], а мутация *Sam7* генов лизиса фага λ затрудняет переход эндолизина из цитоплазмы в периплазму [251] и, соответственно, гидролиз пептидогликана.

Одна из основных целей внедрения технологии бактериальных теней – создание структур с минимально измененной бактериальной поверхностью. Ожидалось, что лучше сохраненные препараты клеточной стенки будут вызывать лучшую защиту. Однако, как в наших исследованиях, так и в работах других авторов [234] значительное усиление защиты было отмечено в вариантах БТ с полностью разрушенным пептидогликановым скелетом. По сравнению с отрицательным контролем иммунизация Е-У-К-БТ защищала от гибели морских свинок при заражении 333 ЛД₅₀ вирулентного штамма *Y. pestis*.

Было показано, что пептидогликан обладает как иммунодепрессивными [55], так и иммуностимулирующими свойствами [56]. Гидролиз пептидогликана приводит к образованию множества молекул мурамил-дипептида (N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин), мельчайших адъювантных активных частей, способных заменять целые убитые микобактериальные клетки в полном адъюванте Фрейнда [17] и, соответственно, повышению иммунного ответа.

Таким образом, наш вакцинный-кандидат ЕУК-БТ с полностью гидролизированным пептидогликаном вызывает значительно большую защиту от *Y. pestis* у морских свинок по сравнению с классическими БТ и может использоваться в качестве относительно эффективного вектора для разработки безопасной вакцины против чумы для нескольких хозяев (человек, мыши и обезьяны).

Независимо от того, верна ли наша гипотеза о пептидогликан-зависимом механизме усиления защитной активности у морских свинок, нам удалось создать кандидатную вакцину против чумы, которая индуцирует интенсивный иммунитет у морских свинок (индекс иммунитета = 49000) в сравнении с развивающимся в ответ на иммунизацию живой чумной вакциной (индекс иммунитета = 9400000) [48]. Наши данные ясно показывают, что отбор защитных антигенов для вакцин для нескольких видов хозяев должен проводиться с самого начала, используя как можно больше видов животных, которых эта вакцина должна защищать.

В последующих экспериментах оценили, насколько защитная сила наших БТ может быть увеличена для морских свинок при их совместном введении с антигенами F1 и V, а также эффективность такой трехкомпонентной вакцины-кандидата для мышей.

Кроме того, в ходе выполнения настоящего раздела работы определен состав субъединичной противочумной вакцины и изучены основные характеристики компонентов вакцины чумной трехкомпонентной. Установлено, что по подлинности, наличию консерванта, растворимости, дисперсности, рН суспензии, потере массы при высушивании, герметизации, стерильности исследованный предложенный прототип вакцины чумной трехкомпонентной соответствуют требованиям, предъявляемым к средствам специфической профилактики чумы. Показана специфическая безопасность и высокая специфическая активность препарата ВЧТК. Установлено, что двукратное подкожное введение препарата ВЧТК мышам и морским свинкам вело к индукции синтеза специфических анти-F1 и анти-V антител, а также антител к компонентам клеточной стенки бактериальных теней чумного микроба, формированию напряженного иммунного ответа и защищало от гибели животных при подкожном заражении вирулентным штаммом чумного микроба (ИИ > 10⁵ для морских свинок и ИИ > 10⁴ для мышей).

На следующем этапе диссертационной работы оптимизировали методический прием моделирования бубонной чумы у лабораторных животных после подкожного введения аттенуированного Δpgm штамма *Y. pestis* с использованием декстрана железа для использования в ходе оценки протективности кандидатных вакцин на ранних стадиях разработки в условиях лаборатории УББ 2.

ГЛАВА 5 МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧУМЫ В УСЛОВИЯХ УББ 2 ЛАБОРАТОРИИ

Чума – острое инфекционное заболевание, характеризующееся явлениями тяжелой общей интоксикации, воспалительными процессами в лимфатических узлах, легких и других органах – признана в настоящее время «возвращающейся» инфекцией, а ее возбудитель, *Y. pestis*, может быть использован в качестве агента биотерроризма [78]. Поиски «идеальной» вакцины против чумы продолжаются. *Y. pestis* относят к I группе патогенности (биологической опасности), что подразумевает при проведении работ соблюдение санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, направленных на обеспечение личной и общественной безопасности и защиту окружающей среды. Одним из основных препятствий при изучении биологии *Y. pestis* и патогенеза чумы является то, что многие лаборатории не имеют доступа к необходимым для работы с такими патогенами помещениям 3-го уровня биобезопасности и поэтому должны работать с аттенуированными штаммами чумного микроба.

Важным этапом в процессе создания вакцинных препаратов является демонстрация защитной эффективности, обычно включающая заражение вакцинированных и контрольных интактных животных вирулентными штаммами, воспроизводящими заболевание. На ранних стадиях разработки, когда перспективные вакцины-кандидаты должны быть первоначально охарактеризованы и доработаны, риск и сложность, связанные с использованием вирулентных тест-заражающих штаммов при оценке протективности на модели животных, могут быть снижены за счет воспроизведения чумной инфекции в условиях УББ 2, а не УББ 3 лаборатории с использованием стандартных аттенуированных штаммов.

Аттенуированные (авирулентные) штаммы чумного микроба, относящиеся к III группе патогенности согласно СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», обычно не обладающие либо хромосомным локусом пигментации (*pgm*), основным компонентом которого является иерсиниабактин-зависимая система транспорта железа (*ybt*), необходимая для проявления вирулентности штаммов чумного микроба при интрадермальном введении, либо плазмидой кальцийзависимости (*pCad*, *pYV*, *pCD1*), более безопасны

при манипуляциях, что позволяет проводить экспериментальные исследования в лабораториях уровня УББ 2 [179].

Морбиторы – это вещества (дефибринированная кровь барана, сульфат железа, декстран железа и др.), повышающие содержание ионов железа в крови и способствующие эффективному развитию сепсиса и гибели лабораторных животных при введении аттенуированных Δpgm штаммов чумного микроба. Показано, что введение мышам сульфата железа может нивелировать потребность в продуктах локуса иерсиниабактина, полностью восстанавливая вирулентность Δpgm мутанта *Y. pestis* введённого парентерально [4, 105]. При этом использование подобного подхода для воспроизведения лёгочной чумы после интраназального введения штамма KIMD27 не было успешным [147]. М.А. Parent *et al.* [175] показали токсичность хлорида железа, ограничив дозу введения до 0,5 мг/мышь, что согласуется с ранее полученными данными о токсичности неорганического железа в концентрациях 30–60 мг/кг.

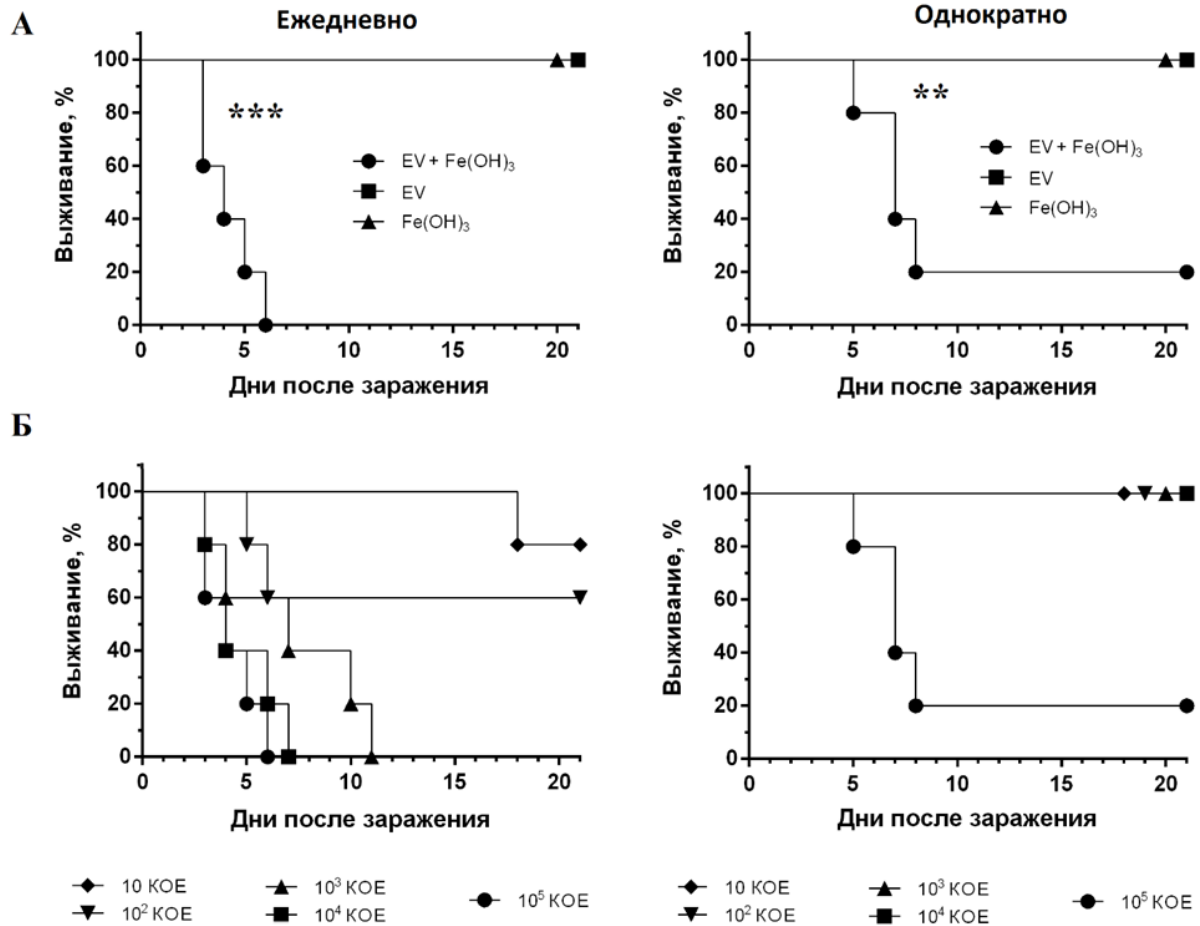
Токсичность неорганического железа и потребность в его парентеральном введении при лечении различных заболеваний привели к появлению более безопасных коллоидных растворов гидроксида железа, стабилизированных различными полисахаридами [47]. Подкожное введение мышам штамма *Y. pestis*, дефектного по области пигментсорбции *pgm*, с добавлением коллоидного раствора хондроитин сульфата железа приводило к смерти животных с гистологическими изменениями в печени и селезенке, напоминающими те, что возникают в результате инфицирования вирулентным штаммом [214]. В дальнейшем миллиграммовые дозы коллоидного декстрана железа начали использовать при воспроизведении моделей других бактериальных инфекций [96, 200, 243]. Е.М. Galván *et al.* [80] описали УББ 2 модель лёгочной чумы у мышей, основанную на внутрибрюшинном введении коллоидного декстрана железа, применение которого позволяет избежать возникновения проблем токсичности и использовать благоприятные преимущества фармакокинетики, такие как более низкий клиренс и более длительный период полувыведения, чем у других коллоидных или неорганических препаратов железа [47]. В доступной литературе отсутствуют данные об использовании железа (III) гидроксид декстрана для воспроизведения бубонной чумы у мышей, обусловленной введением Δpgm штаммов *Y. pestis*. Кроме того, не описано течение инфекции у животных при разных режимах введения данного препарата железа.

В настоящей работе мы оптимизировали методический прием моделирования бубонной чумы у лабораторных животных после подкожного введения аттенуированного Δpgm штамма *Y. pestis* с использованием декстрана железа с целью оценки протективности кандидатных вакцин на ранних стадиях разработки. Предлагаемая к использованию модель является безопасным инструментом идентификации наиболее многообещающих кандидатных препаратов, защитный потенциал которых в последствии может быть оценен с использованием вирулентных штаммов чумного микроба.

5.1 Влияние железа на остаточную вирулентность Δpgm штаммов *Y. pestis*

Ранее проведенные исследования показали, что аттенуированные Δpgm штаммы *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, не обладающие способностью получать железо из биологических жидкостей, восстанавливают вирулентность для мышей и морских свинок при парентеральном введении гема или неорганического железа перед заражением [104, 105]. Для создания воспроизводимой модели бубонной чумы исследовали изменение остаточной вирулентности Δpgm штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для мышей при совместном введении с декстраном железа. Развитие заболевания и выживаемость животных при подкожном введении штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в концентрациях от 10 по 10^5 КОЕ изучили при однократной и ежедневных инъекциях декстрана $Fe(OH)_3$ в дозе 40 мг, так как более высокие концентрации могут проявлять токсический эффект [161]. Мыши контрольных групп получили или только штамм чумного микроба, или только препарат железа.

После подкожного введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в дозах 10- 10^4 КОЕ наряду с однократной внутрибрюшинной инъекцией раствора Феррум Лек мыши оставались живы на протяжении всего эксперимента (рисунок 16), при дозе 10^5 КОЕ четыре из пяти животных пали к 8-ым суткам наблюдения. При ежедневном введении декстрана $Fe(OH)_3$ гибель животных наблюдали при всех использованных дозах штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ со 100%-ной смертностью в дозах 10^3 - 10^5 КОЕ. Животные контрольных групп, получившие только препарат железа или только штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, оставались здоровыми.



А – кривые выживания при дозе 10^5 КОЕ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ; Б – кривые выживания при введении разных доз штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ

** $p \leq 0,01$

*** $p \leq 0,001$

Рисунок 16 – Выживаемость беспородных мышей после подкожного введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ при добавлении железа

ЛД₅₀ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ при ежедневном введении беспородным мышам декстрана Fe(OH)₃ достоверно превышала аналогичный показатель при однократном введении препарата ($p = 0,0086$). Различия в выживаемости животных в группах как с однократным ($p = 0,003$), так и с ежедневным ($p = 0,0001$) введением железа по сравнению с контролем были достоверны (рисунок 16, таблица 9).

Таблица 9 – Влияние декстрана железа на остаточную вирулентность штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для беспородных мышей

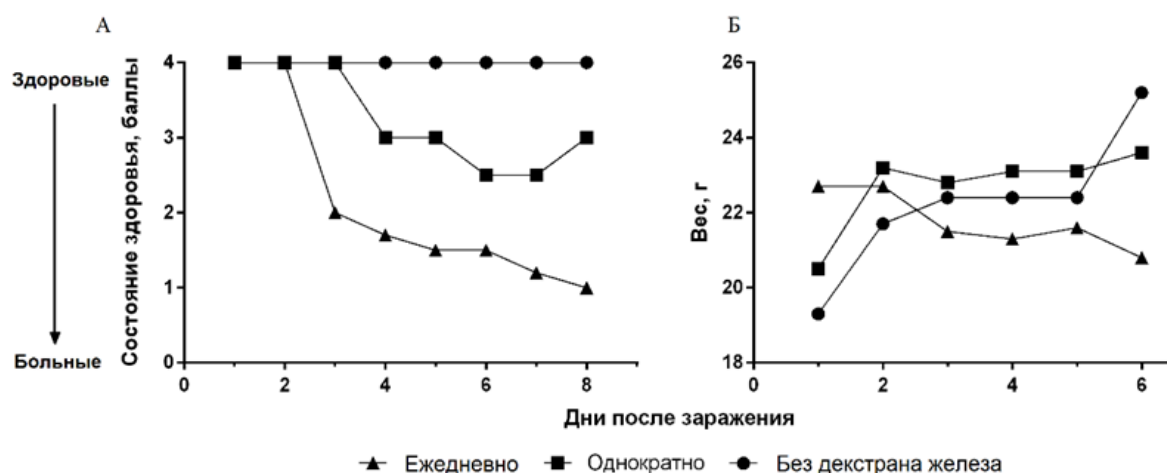
Штамм	Декстран железа, 40 мг	ЛД ₅₀ , КОЕ*	Доза, КОЕ	Средние сроки жизни, сутки
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	однократно	50119 (19953 ÷ 794328)	10 – 10 ⁴	> 21
			10 ⁵	5,4 ± 1,3
	ежедневно	79 (20 ÷ 316)	10	18
			10 ²	5,5 ± 0,7
			10 ³	7 ± 3,5
			10 ⁴	4,8 ± 1,6
		10 ⁵	4,2 ± 1,3	
<i>Y. pestis</i> 231	–	3 (1-12)	10 – 10 ⁴	5,4 ± 0,5

Примечания: * 95 % доверительный интервал представлен в круглых скобках

В последующем оценку физического здоровья, патологоанатомических изменений и обсемененности внутренних органов мышей проводили для дозы 10⁵ КОЕ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ.

5.2 Характеристика заболевания

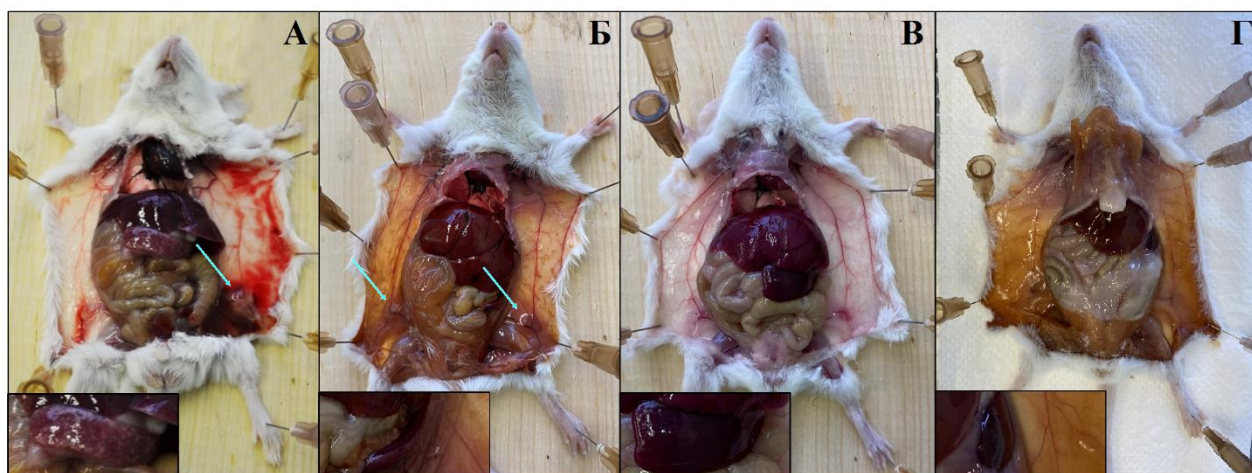
Для установления особенностей заболевания ежедневно в течение всего эксперимента контролировали состояние здоровья и массу тела беспородных мышей из всех экспериментальных групп. Признаки заболевания, а именно снижение активности, обезвоживание и взъерошенность шерсти, стали появляться на 3-и сутки у мышей при ежедневном введении декстрана железа, при однократном – только на 4-е. Животные контрольных групп не проявляли признаков заболевания. Снижение веса наблюдали в первых двух группах, при этом во второй группе снижение было более прогрессирующим. В двух оставшихся группах вес мышей не снижался (рисунок 17). У животных первых двух групп, получивших штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ с добавлением декстрана железа, заболевание прогрессировало, пока мыши не пали, в то время как контрольные мыши оставались здоровыми.



А – показатель здоровья; Б – вес

Рисунок 17 – Оценка физического здоровья мышей после введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в присутствии железа

Для оценки патологоанатомических изменений павших мышей из первой и второй групп подвергали вскрытию. Мышей из контрольных групп вскрывали ежедневно (рисунок 18). У павших мышей из первой группы наблюдали формирование бубона в месте введения, геморрагию в подкожной клетчатке в виде характерных для чумы разлитых кровоизлияний, занимающих весь бок животного, а также увеличение селезенки с характерными очагами некроза. Патологоанатомические изменения у мышей из второй группы включали образование бубонов в паховых лимфатических узлах (регионарном и контралатеральном), увеличение и кровенаполнение печени, незначительное увеличение в размерах, «дряблость» селезенки. Подкожная клетчатка животных была окрашена в оранжевый цвет как следствие ежедневного введения железа. У мышей из третьей группы отмечали увеличение селезенки, не отражающееся на общем состоянии здоровья. У мышей, получавших только препарат железа, наблюдали изменение цвета подкожной клетчатки, изменения тканей и внутренних органов отсутствовали.



Стрелками обозначены сформировавшиеся бубоны в лимфатических узлах

А – однократное введение; Б – ежедневное введение; В – контроль после введения только штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ; Г – контроль после введения только препарата железа

Рисунок 18 – Патологоанатомические изменения у беспородных мышей при введении декстрана $\text{Fe}(\text{OH})_3$ совместно с *Y. pestis* EV НИИЭГ

5.3 Распространение по органам

Диссеминацию чумного микроба изучили при ежедневном и однократном введении препарата железа (рисунок 19). В первые дни после введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ наряду с однократной инъекцией железа большая часть микроорганизмов находилась в регионарных лимфоузлах с последующим распространением в селезенку, в которой со временем количество бактерий уменьшалось. При ежедневном введении декстрана $\text{Fe}(\text{OH})_3$ наблюдали сохранение высокого уровня бактериальной колонизации регионарных лимфоузлов и селезенки мышей. Селезенки и лимфатические узлы, полученные от мышей из групп контроля, были стерильны (данные не показаны).

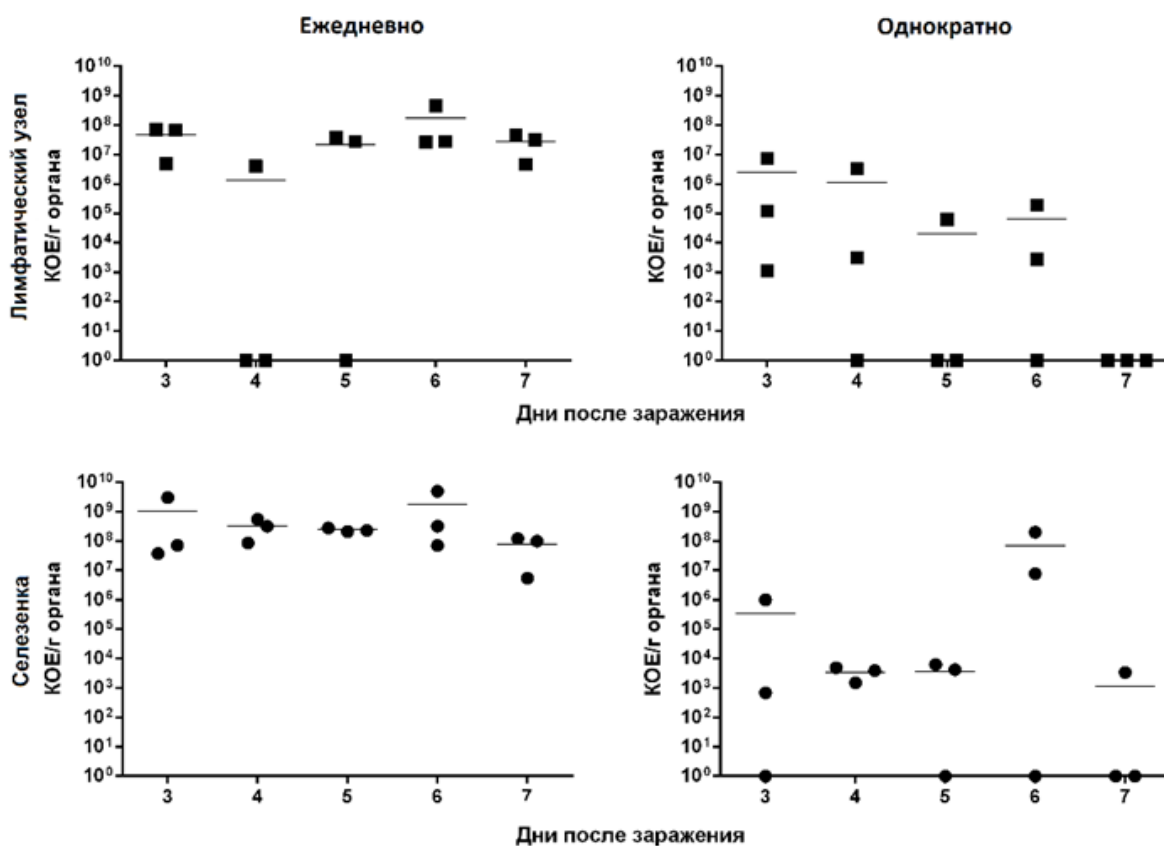


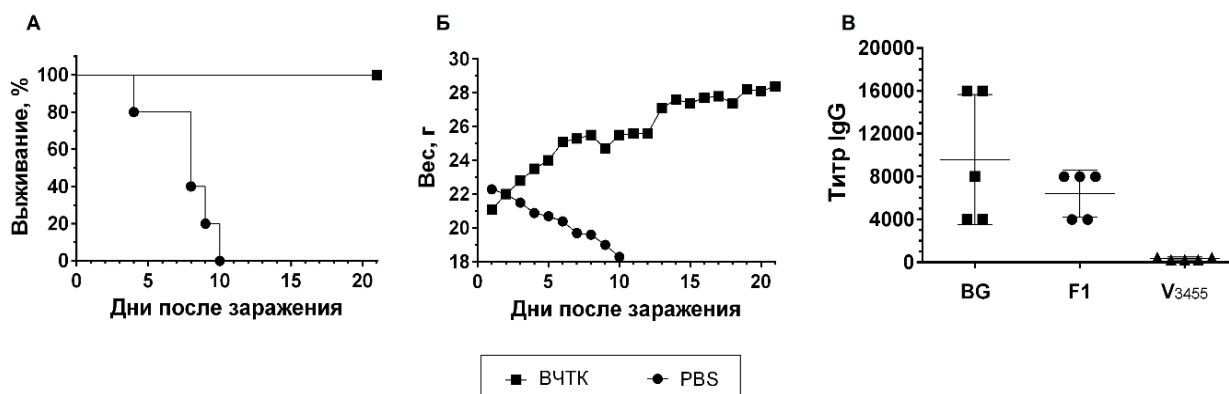
Рисунок 19 – Бактериальная колонизация внутренних органов беспородных мышей, после введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в присутствии железа

5.4. Модель бубонной чумы у беспородных мышей в условиях УББ 2 лаборатории после введения штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и декстрана железа для изучения протективности кандидатных вакцинных препаратов

Учитывая, что беспородных мышей, обработанных декстраном железа, можно использовать для имитации бубонной чумы при введении штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, мы определили, применимость данной модели для исследования протективности препарата бактериальных теней чумного микроба с рекомбинантными белками капсульным антигеном (F1) и V антигеном (LcrV) (вакцина чумная трехкомпонентная) (см. главу 4). Две группы по 5 беспородных мышей были иммунизированы двукратно подкожно вакциной чумной трехкомпонентной или PBS в качестве отрицательного контроля (вводили на 0-й и 14-й дни). Бактериальные тени, капсульный антиген F1

(CafI) и V антиген (LcrV) индуцировали у вакцинированных животных образование специфических IgG антител со средними титрами 9600, 6400 и 350, соответственно.

На 28-й день после повторной иммунизации мышам ввели подкожно 10^5 КОЕ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и ежедневно внутривенно вводили по 4,0 мг декстрана железа на протяжении 5 дней. Все мыши контрольной группы, иммунизированные только PBS, пали на 4–10 день после заражения (средние сроки гибели – 7,8 сут). Как и ожидалось, иммунизация ВЧТК обеспечила 100% защиту животных от гибели после заражения. Не наблюдали значительных изменений веса после заражения у животных иммунизированной ВЧТК группы, в то время как у животных контрольной группы признаки заболевания и потеря веса появилась на 2 день после заражения и вес снижался до гибели (рисунок 20).



Группы из 5 мышей были иммунизированы двукратно подкожно PBS или ВЧТК. На 28 день после бустерной иммунизации мышам подкожно вводили 10^5 КОЕ *Y. pestis* EV НИИЭГ и ежедневно декстран железа 5 дней. Выживание (А) и вес животных (Б) наблюдали на протяжении 21 дня. IgG антитела против F, LcrV и бактериальных теней *Y. pestis* (B) определяли методом ИФА в сыворотках животных на 28 день после бустерной иммунизации

Рисунок 20 – Заражение ВЧТК-иммунизированных беспородных мышей

Полученные результаты подтверждают, что ВЧТК защищает от гибели беспородных мышей, подкожно зараженных вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 (смотри главу 4) или вакцинным штаммом EV НИИЭГ при условии введения декстрана железа.

5.5 Заключение по главе 5

Как биологическую модель мышей широко используют для изучения патогенеза инфекции, вызываемой *Y. pestis*, а также для оценки иммуногенности и защитной эффективности кандидатных вакцин против чумы [6, 26, 143, 190]. Мыши являются естественными хозяевами чумного микроба, заболевание которых протекает подобно возникающему у инфицированного человека [143]. Эксперименты *in vivo* с использованием высоко вирулентных штаммов чумного микроба проводят в соответствии с санитарными правилами СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» уровня УББ 3. Таким образом, лабораторные работы с использованием подобных штаммов сложны, дорогостоящи и сопряжены с риском инфицирования лабораторного персонала.

Аттенуация вакцинного штамма *Y. pestis* EV произошла из-за спонтанной делеции 102-т.п.о. локуса *pgm*, отвечающего за поглощение железа бактерией [70]. Данный штамм относится к III группе патогенности, не подпадает под нормативные требования в отношении вирулентных аналогов и может безопасно использоваться в работе в соответствии с требованиями лаборатории УББ 2.

Согласно МУ 3.3.1.1113-02 «Основные требования отбора новых вакцинных штаммов чумного микроба» подкожное введение штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ не должно вызывать гибели беспородных мышей при введении доз до 10^7 КОЕ. При использовании бактериальной культуры в большей концентрации гибель животных может наступить в первые трое суток после введения вследствие токсического эффекта, обусловленного наличием мышинового токсина Ymt (*y*ersinia mouse toxin, фосфолипаза Д) [66, 95]. Кроме того, установлено, что патолого-гистологические изменения у мышей после введения штамма *Y. pestis* EV отличаются от наблюдаемого при использовании вирулентных аналогов [179].

Остаточную вирулентность Δ *pgm* штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ можно повысить при одновременном внутрибрюшинном введении животным препаратов железа (так называемая «условная» вирулентность) без роста риска для исследователей. О влиянии железа на рост и вирулентность Δ *pgm* штаммов *Y. pestis* впервые сообщили Jackson S. и Burrows T.W. в середине 1950-ых гг. при изучении механизмов патогенеза чумы

[105]. Введение мышам штамма *Y. pestis* KIM, дефектного по локусу *pgm*, с добавлением железа было описано в двух исследованиях [47, 104]. Н. Lee-Lewis *et al.* [147] сообщали о летальной инфекции у мышей BALB/c после введения штамма KIM D27 в присутствии большого количества неорганического железа (до 500 мкг), введенного внутривентриально. При этом исследователи наблюдали размножение бактерий и повреждение нескольких органов, но не обнаружили признаков пневмонии или поражений, характерных для легочной чумы. Проблема, возникающая при использовании больших доз неорганического железа *in vivo* – это токсичность. Самая высокая доза $FeCl_2$, которую смогли без токсических последствий вводить мышам интраназально – 40 мкг; большие количества вызывали побочные эффекты, включая сухость глаз, взъерошенность шерсти и сутулость, на устранение которых требовалось 1-3 дня. Эти неспецифические побочные эффекты не только вызывали чрезмерный стресс у животных, но также затрудняли оценку «истинного» заболевания [161]. Использование декстрана железа снижает токсичность из-за более медленного высвобождения из углеводных комплексов, несмотря на необходимость даже больших количеств и многократного введения. Например, в исследовании, описанном Е.М. Galván *et al.* [80], для моделирования легочной чумы мышам ежедневно вводили коллоидный раствор железа за 2-3 ч до и в течение 10 сут после заражения.

По нашим данным использование декстрана железа однократно или ежедневно при моделировании бубонной чумы позволило повысить остаточную вирулентность аттенуированного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для беспородных мышей. При ежедневном введении препарата железа ЛД₅₀ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для животных приблизилась к аналогичному показателю штамма «дикого» типа *Y. pestis* 231. Несмотря на достоверность отличий в величинах ЛД₅₀ вакцинного штамма при однократном и ежедневном введении декстрана $Fe(OH)_3$, средние сроки гибели животных при введении дозы 10^5 КОЕ практически не отличались.

Таким образом, в присутствии внутривентриально вводимого декстрана железа штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ можно использовать для воспроизведения бубонной чумы с выраженными патологоанатомическими изменениями и гибелью мышей в условиях УББ 2. Модель, описанная в настоящем исследовании, не предназначена для замены, а является дополнительным инструментом предварительного тестирования протективности и определения приоритетных потенциальных кандидатов для

дальнейшей оценки с использованием вирулентных штаммов чумного микроба. Использование предложенной модели бубонной чумы, позволит быстро и безопасно оценить кандидатные препараты и выделить наиболее перспективные для дальнейшего тестирования в условиях УББ 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вакцинация остается наиболее эффективным инструментом борьбы с инфекционными заболеваниями. Традиционно для формирования защитного иммунного ответа используют живые аттенуированные штаммы или убитые микроорганизмы. Живые микроорганизмы обычно аттенуируют либо путем последовательного пассирования в культуре клеток, организмах неспецифических хозяев, иммунных животных, на искусственных питательных средах при повышенной температуре и/или с добавлением этанола, в присутствии бактериофагов, либо избирательным выключением генов, продукты которых связаны с патогенностью. Хотя аттенуированные вакцинные штаммы вызывают формирование напряженного иммунного ответа, для борьбы с инфекционными заболеваниями чаще используют убитые вакцины из-за соображений безопасности. Однако во время процесса инактивации происходит денатурация большинства основных структурных и иммуногенных компонентов микроорганизмов, что обычно приводит к менее эффективной индукции клеточно-опосредованных иммунных реакций и более короткой продолжительности иммунитета по сравнению с живыми вакцинами. В два последние десятилетия были широко опробованы новые варианты вакцин, такие как ДНК- и субъединичные вакцины, но пока с ограниченным успехом. Однако эти вакцины следующего поколения по своей природе обладают слабой иммуногенностью по сравнению с традиционными вакцинами и, следовательно, требуют добавления соответствующего адъюванта. Вакцины на основе ДНК нуждаются в более совершенной системе доставки, чтобы полностью раскрыть свой потенциал. Постоянно исследуются новые подходы к разработке сильнодействующих вакцин, которые не только безопасны, но и требуют меньшего количества прививок и высокоэффективны в особых группах населения, включая пожилых людей и лиц с ослабленным иммунным статусом.

Бактериальные тени – потенциальная платформа, которая может давать не только высокоиммуногенный вакцинный препарат, но и предоставляет инструмент для создания эффективных систем доставки адъювантов и вакцин. Этот новый подход показывает многообещающие результаты по борьбе с инфекционными заболеваниями, опробованные как на естественных хозяевах, так и на лабораторных животных.

Представленные в настоящем исследовании данные имеют общебиологическое значение и направлены на получение новых сведений о конструировании и изучении протективной активности бактериальных теней *Y. pestis* для оценки перспективности их использования в качестве компонентов вакцинных препаратов для профилактики чумы.

На первом этапе мы сконструировали набор плазмид, содержащих различные комбинации кассет генов лизиса бактериофагов λ или чумного диагностического бактериофага Л-413С с геном *E* бактериофага ϕ X174. Сконструированная плазмида pEYR' представляет собой вектор на базе репликона p15A с копийностью 5-20 копий на клетку, способный реплицироваться в представителях различных видов семейства *Enterobacteriaceae*. Плазмида содержит ген устойчивости к хлорамфениколу *cat* из транспозона Tn9, терминатор транскрипции рибосомальных генов *E. coli rrmB* и мутантный вариант промотора бактериофага λ pR (pR') с мутациями в гене белка-репрессора *cI* (*cI857*) и во втором операторе, что позволяет экспрессировать гены при повышении температуры культивирования до 42 °С.

В ходе выполнения этой части исследования изучили эффективность использованных фаговых литических ферментов при получении бактериальных теней на модели лабораторного штамма кишечной палочки. Лизис бактериальной культуры контролировали по изменению оптической плотности и количеству жизнеспособных клеток после индукции, а также методом просвечивающей электронной микроскопии.

В представленной работе мы впервые продемонстрировали, что использование только холина и эндолизина фага Л-413С или в сочетании с белком *E* бактериофага ϕ X174 способствует эффективному образованию БТ *E. coli*. Кроме того, мы наблюдали, что совместная экспрессия генов лизиса *E* и S-R-Rz позволяет более эффективно инактивировать клетки *E. coli* во время процедуры формирования бактериальных теней по сравнению с использованием литической плазмиды pEYR'-S-R-Rz, несущей только гены холина, эндолизина и спанинов S-R-Rz, но незначительно уступает по эффективности плазмидам pEYR'-E, pEYR'-Y-K и pEYR'-E-Y-K.

Следующий этап нашей работы был посвящен конструированию и оценке протективности различающихся по степени деструкции пептидогликана вариантов БТ *Y. pestis* KM260(12) Δ lpxM для лабораторных животных (мышей и морских свинок).

Для получения БТ был сконструирован не несущий маркеров антибиотикоустойчивости штамм *Y. pestis* KM 260(12) Δ *lpxM* с инактивированным геном ацилтрансферазы *LpxM*, продуцирующий менее токсичный пентаацилированный липополисахарид.

БТ на основе *Y. pestis* были получены путем использования комбинации генов, кодирующих лизис-опосредующий белок E бактериофага ϕ X174 и/или холин-эндолизиновые системы фагов λ или чумного диагностического бактериофага Л-413С. Экспрессия гена белка E приводила к формированию БТ, которые сохраняли форму исходной бактерии. Одновременная экспрессия гена белка E с генами, кодирующими холин-эндолизиновую систему фага Л-413С, вызывала образование структур, напоминающих коллапсированные (схлопнувшиеся) мешочки. Такие структуры, утратившие свою жесткость, также образовались в результате экспрессии только генов холина и эндолизина фага Л-413С. Аналогичная холин-эндолизиновая система из фага λ , содержащего мутацию в гене холина *S* и интактные гены *R-Rz*, кодирующие эндолизины, приводила к образованию смесей БТ как сохранивших, так и полностью утративших исходную форму, определяемую пептидогликановым каркасом. Добавление белка E к этой системе смещало равновесие в смеси в сторону спавшихся мешочков. Утрату жесткости структуры БТ можно объяснить лизисом пептидогликанового скелета.

Иммунизация лабораторных животных вариантами БТ с последующим заражением штаммом *Y. pestis* дикого типа показала, что бактериальные оболочки защищали только морских свинок. БТ с максимально гидролизированным пептидогликаном для морских свинок достоверно обладали большей протективностью по сравнению с БТ с сохраненным пептидогликановым скелетом.

Для объяснения полученного феномена мы выдвинули гипотезу пептидогликан-зависимого механизма усиления защитной активности препарата ЕУК-БТ с полностью гидролизированным пептидогликаном для морских свинок в результате возможного образования множества молекул мурамил-дипептида, мельчайших адьювантных активных частей, способных по ранее полученным данным заменять целые убитые микобактериальные клетки в полном адьюванте Фрейнда.

Таким образом, препарат ЕУК-БТ с полностью гидролизированным пептидогликаном вызывает значительно большую защиту от гибели при

инфицировании *Y. pestis* у морских свинок по сравнению с классическими БТ и может использоваться в качестве эффективного компонента при разработке безопасной вакцины против чумы для нескольких хозяев (человек, мышь и обезьяны).

В ходе выполнения следующего этапа нашего исследования, оценили иммунологическую активность препарата БТ *Y. pestis* в комбинации с иммунодоминантными антигенами чумного микроба - капсульным антигеном F1 (Caf1) и V антигеном (LcrV) для морских свинок и мышей. По нашим данным двукратное подкожное введение препарата мышам и морским свинкам с интервалом в две недели вело к индукции синтеза специфических анти-F1 и анти-V антител, а также антител к компонентам клеточной стенки бактериальных тел чумного микроба, формированию напряженного иммунного ответа и защищало от гибели животных при подкожном заражении вирулентным штаммом чумного микроба (индекс иммунитета (ИИ) $> 10^5$ для морских свинок и ИИ $> 10^4$ для мышей).

Учитывая необходимость в безопасной идентификации наиболее многообещающих кандидатных противочумных вакцинных препаратов, защитный потенциал которых впоследствии может быть оценен с использованием вирулентных штаммов чумного микроба, на следующем этапе нашего исследования оптимизировали методический прием моделирования бубонной чумы у лабораторных животных после подкожного введения аттенуированного Δpgt штамма *Y. pestis* с использованием декстрана железа для оценки протективности кандидатных вакцин на ранних стадиях разработки.

По нашим данным использование декстрана железа однократно или ежедневно при моделировании бубонной чумы позволило повысить остаточную вирулентность аттенуированного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для беспородных мышей. При ежедневном введении препарата железа ЛД₅₀ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для животных приблизилась к аналогичному показателю штамма «дикого» типа *Y. pestis* 231. Несмотря на достоверность отличий в величинах ЛД₅₀ вакцинного штамма при однократном и ежедневном введении декстрана Fe(OH)₃, средние сроки гибели животных при введении дозы 10^5 КОЕ практически не отличались.

Таким образом, в присутствии внутрибрюшинно вводимого декстрана железа штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ можно использовать для воспроизведения бубонной чумы с выраженными патологоанатомическими изменениями и гибелью мышей в условиях

УББ 2. Модель, описанная в настоящем исследовании, не предназначена для замены, а является дополнительным инструментом предварительного тестирования протективности и определения приоритетных потенциальных кандидатов для дальнейшей оценки с использованием вирулентных штаммов чумного микроба.

Сконструированные литические плазмиды и методические приемы получения бактериальных теней *Y. pestis* в настоящее время применяются при разработке средств специфической профилактики чумы в рамках деятельности Центра геномных исследований мирового уровня «Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий» (Соглашение № 075-15-2019-1671 от 31.10.2019 г.), а также при создании платформ для быстрой разработки бактериальных вакцин в рамках Федерального проекта «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)».

В заключение следует отметить, что при обсуждении результатов исследований, представленных в различных разделах данной диссертационной работы, мы попытались кратко остановиться на возможностях использования и значимости в совершенствовании специфической профилактики чумы. Одним из основных итогов методической части работы является создание набора плазмид, позволяющих проводить направленное конструирование штаммов энтеробактерий, продуцирующих БТ с различной степенью деградации пептидогликана – потенциальные компоненты кандидатных вакцинных препаратов. Что же касается окончательного решения вопроса о том, какая технология конструирования вакцин является оптимальной для профилактики чумы: рекомбинантные белки в составе субъединичных препаратов, препараты на основе нуклеиновых кислот, живые аттенуированные вакцины, везикулы наружной мембраны или БТ, то для решения необходимо провести большой объем дополнительных сравнительных исследований, включающий не только подкожное, но и аэрозольное заражение расширенного списка иммунизированных лабораторных животных несколькими вирулентными штаммами, отличающимися по антигенному составу.

ВЫВОДЫ

1. Сконструирован набор плазмид с различными комбинациями гена белка Е фага φX174 и кассет литических генов систем «холин-эндолизин» фагов λ или чумного диагностического фага Л-413С для получения теней энтеробактерий с различной степенью деструкции клеточной стенки.

2. Экспериментально доказано, что использование холина и эндолизина чумного диагностического бактериофага фага Л-413С в отдельности или в сочетании с белком Е бактериофага φX174 приводит к максимальной деструкции пептидогликанового каркаса клеточной стенки кишечной палочки и чумного микроба.

3. Определено, что двукратная подкожная иммунизация препаратом Е-У-К-БТ индуцирует напряженный иммунный ответ и защищает от гибели морских свинок при заражении вирулентным штаммом *Y. pestis* дикого типа (ИИ = $4,9 \times 10^4$), но не протективна для беспородных мышей (ИИ = 3×10^0).

4. Установлено, что двукратное с интервалом в две недели подкожное введение беспородным мышам и морским свинкам композиции ЕУК-БТ с иммунодоминантными антигенами чумного микроба – капсульным антигеном F1 (Caf1) и V антигеном (LcrV), вело к индукции синтеза специфических анти-F1 и анти-V антител, а также антител к компонентам клеточной стенки бактериальных теней чумного микроба, формированию напряженного иммунного ответа и защищало животных от гибели при подкожном заражении вирулентным штаммом *Y. pestis* дикого типа (ИИ > 10^5 для морских свинок и ИИ > 10^4 для мышей).

5. Показано, что аттенуированные Δ*prgM* штаммы *Y. pestis* в присутствии коллоидного железа могут быть использованы в условиях лаборатории УББ 2 для моделирования бубонной чумы с выраженными патологоанатомическими изменениями и летальностью у мышей, а также оценки напряженности иммунного ответа.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

АМП	– антимикробные пептиды
АПК	– антигенпрезентирующие клетки
БК	– бактериальная концентрация
БТ	– бактериальные тени
ВВМ	– везикулы наружных мембран
ВЧТК	– вакцина чумная трехкомпонентная
ГКПМ	– Государственная коллекция патогенных микроорганизмов
ДК	– дендритные клетки
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ГУС	– гемолитико-уремический синдром
ИФА	– иммуноферментный анализ
КОЕ	– колониеобразующая единица
ЛД ₅₀	– доза, летальная для 50 % животных
ЛПП	– липополипротеин
ЛПС	– липополисахарид
НИР	– Научная исследовательская работа
НИИЭГ	– Научно-исследовательский институт экспериментальной гигиены
ОП	– оптическая плотность
ПГ	– пептидоглиан
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ПЭМ	– просвечивающая электронная микроскопия
РАМН	– Российская академия медицинских наук
РНК	– рибонуклеиновая кислота
УББ	– уровень биологической безопасности
ФБУН	– Федеральное бюджетное учреждение науки
TNF- α	– фактор некроза опухоли α
ФСБ	– фосфатно-солевой буфер
ЦГИМУ	– Центр геномных исследований мирового уровня
Ap ^{R(S)}	– устойчивость (или чувствительность) к ампициллину
ВНИ	– Brain Heart Infusion
<i>asd</i>	– ген аспартатполуальдегиддегидрогеназы
Caf1	– капсульный антиген чумного микроба
<i>cat</i>	– ген, кодирующий хлорамфениколацетилтрансферазу
Cm ^{R(S)}	– устойчивость (или чувствительность) к хлорамфениколу
fliC	– флагеллиновый белок F18 ⁺ STEC
HCDEC	– human conjunctiva-derived epithelial cells - эпителиальные клетки конъюнктивы человека
<i>Hocb</i>	– гена холина фага Lcb против <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393
IFN-1	– IFN-1 – Interferon type I – интерферона типа I
IL	– Interleukin - интерлейкин
<i>K</i>	– ген эндолизина бактериофага Л-413С
LB	– Luria Bertani broth medium
LcrV	– V антиген чумного микроба
<i>lpxM</i>	– ген лаурилтрансферазы

LTV	– heat-labile enterotoxin B – термолabileльный энтеротоксин B <i>E. coli</i>
MAP	– искусственный синтетический амфифильный пептид
МАРК	– <u>mitogen-activated protein kinase</u> – митоген-активируемая протеинкиназа
<i>mE</i>	– литический ген белка E с мутационными изменениями
МНС	– <u>major histocompatibility complex</u> – главный комплекс гистосовместимости
MraY	– фосфо-N-ацетилмурамоил-пентапептидная транслоказа
MyD88	– <u>Myeloid differentiation primary response gene 88</u> - ген 88 первичного ответа миелоидной дифференцировки
NF-κB	– <u>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</u> – транскрипционный фактор NF-κB
NLRC4	– <u>Nod-like receptor card domain containing 4</u> - <i>Nod</i> -подобный рецепторный домен активации и рекрутирования каспаз 4
PAMP	– <u>Pathogen-associated molecular pattern</u> – Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
<i>pgm</i>	– локус пигментсорбции
PMPA36	– <u>Porcine myeloid antimicrobial peptide-36</u> – свиной миелоидный противомикробный пептид
<i>R</i>	– ген эндолизина бактериофага λ
<i>Rz</i>	– ген спанина бактериофага λ
<i>S</i>	– ген холина бактериофага λ
SNUC	– стафилококковая нуклеаза А
STEC	– <u>Shiga-toxin producing E. coli</u> – шигатоксин <i>E. coli</i>
TLR	– <u>Toll-like receptor</u>
<i>Y</i>	– ген холина бактериофага Л-413С
<i>ybt</i>	– иерсиниабактин-зависимая система транспорта железа
Ymt	– <u>yersinia mouse toxin</u> – мышинный токсин

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Анисимов, А.П. Молекулярно-генетические механизмы образования и функциональная значимость капсулы *Yersinia pestis*: Дисс. ... докт. мед. наук. – Саратов, Оболенск, 1999. – 326 с. DOI: 10.13140/2.1.4919.8088.
2. Бывалов, А.А. Идентификация и выделение антигена, защищающего морских свинок от экспериментальной чумы / А.А. Бывалов, В.И. Евстигнеев, И.В. Дармов, Е.В. Пименов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2005. – №. 1. – С. 54-58.
3. Бывалов, А.А. Иммуногенность Б-антигена при экспериментальной чуме и псевдотуберкулезе лабораторных животных / А.А. Бывалов, В.В. Крупин, К.Е. Гаврилов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – №. 3. – С. 49-53.
4. Сазанова, Е.В. Моделирование чумной инфекции при заражении авирулентными штаммами *Yersinia pestis* / Е.В. Сазанова, А.Н. Малахаева, Т.А. Малюкова, А.В. Бойко, Е.Г. Булгакова, Ю.А. Попов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – №. 2. – С. 45-49. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-45-49.
5. Эмирова, Х.М. Гемолитико-уремический синдром, ассоциированный с шига-токсин-продуцирующей *Esherichia coli* / Х.М. Эмирова, Е.М. Толстова, М.Ю. Каган, О.М. Орлова, Т.Ю. Абасеева, Т.Е. Панкратенко, И.Ю. Шпикалова // Нефрология. – 2016. – Т. 20. – №. 2. – С. 18-32.
6. Agar, S.L. Characterization of the rat pneumonic plague model: infection kinetics following aerosolization of *Yersinia pestis* CO92 / S.L. Agar, J. Sha, S.M. Foltz, T.E. Erova, K.G. Walberg, T.E. Parham, W.B. Baze, G. Suarez, J.W. Peterson, A.K. Chopra // Microbes and Infection. – 2009. – Vol. 11. – No. 2. – P. 205-214. DOI: 10.1099/mic.0.2008/017335-0.
7. Agarwal, K. *Helicobacter pylori* vaccine: from past to future / K. Agarwal, S. Agarwal // Mayo Clinic Proceedings. – Elsevier, 2008. – Vol. 83. – No. 2. – P. 169-175. DOI: 10.4065/83.2.169.
8. Ahmad, T.A. Development of immunization trials against *Pasteurella multocida* / T.A. Ahmad, S.S. Rammah, S.A. Sheweita, M. Haroun, L.H. El-Sayed // Vaccine. – 2014. – Vol. 32. – No. 8. – P. 909-917. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.11.068.

9. Airhart, C.L. Lipid A mimetics are potent adjuvants for an intranasal pneumonic plague vaccine / C.L. Airhart, H.N. Rohde, C.J. Hovde, G.A. Bohach, C.F. Deobald, S.S. Lee, S.A. Minnich // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26. – No. 44. – P. 5554-5561. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.08.007.
10. Amara, A.A. Sponge-like: a new protocol for preparing bacterial ghosts / A.A. Amara, M.M. Salem-Bekhit, F.K. Alanazi // *The Scientific World Journal*. – 2013. – Vol. 2013. DOI: 10.1155/2013/545741.
11. Amara, A.A. The critical activity for the cell all degrading enzymes: Could the use of the lysozyme for microbial ghosts preparation establish emergence oral vaccination protocol / A.A. Amara // *International Science and Investigation Journal*. – 2016. – Vol. 5. – No. 2. – P. 351-369.
12. Amemiya, K. CpG oligodeoxynucleotides augment the murine immune response to the *Yersinia pestis* F1-V vaccine in bubonic and pneumonic models of plague / K. Amemiya, J.L. Meyers, T.E. Rogers, R.L. Fast, A.D. Bassett, P.L. Worsham, B.S. Powell, S.L. Norris, A.M. Krieg, J.J. Adamovicz // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27. – No. 16. – P. 2220-2229. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.02.016.
13. Amro, A.A. Evaluation the surface antigen of the *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ghosts prepared by “SLRP” / A.A. Amro, A.J. Neama, A. Hussein, E.A. Hashish, S.A. Sheweita // *The Scientific World Journal*. – 2014. – Vol. 2014. DOI: 10.1155/2014/840863.
14. Angen, O. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov / O. Angen, R. Mutters, D.A. Caugant, J.E. Olsen, M. Bisgaard // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1999. – Vol. 49. – No. 1. – P. 67-86. DOI: 10.1099/00207713-49-1-67.
15. Anisimov, A.P. Amino acid and structural variability of *Yersinia pestis* LcrV protein / A.P. Anisimov, S.V. Dentovskaya, E.A. Panfertsev, T.E. Svetoch, P. Kopylov, B.W. Segelke, A. Zemla, M.V. Telepnev, V.L. Motin // *Infect. Genet. Evol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 137–145. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.10.003.

16. Anisimov, A.P. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis* / A.P. Anisimov, L.E. Lindler, G.B. Pier // *Clin Microbiol Rev.* – 2004 – Vol. 17. – No. 2. – P. 434-64. DOI: 10.1128/CMR.17.2.434-464.2004.
17. Bahr G. M., Chedid L. Immunological activities of muramyl peptides / G.M. Bahr, L. Chedid // *Federation proceedings.* – 1986. – Vol. 45. – No. 11. – P. 2541-2544.
18. Benne, N. Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines / N. Benne, J. van Duijn, J. Kuiper, W. Jiskoot, B. Slütter // *Journal of Controlled Release.* – 2016. – Vol. 234. – P. 124-134. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.05.033.
19. Bläsi, U. Evidence for membrane-bound oligomerization of bacteriophage ϕ X174 lysis protein-E / U. Bläsi, R.P. Linke, W. Lubitz // *Journal of Biological Chemistry.* – 1989. – Vol. 264. – No. 8. – P. 4552-4558.
20. Bläsi, U. Lysis of *Escherichia coli* by Cloned ϕ X174 Gene *E* Depends on its Expression / U. Bläsi, B. Henrich, W. Lubitz // *Microbiology.* – 1985. – Vol. 131. – No. 5. – P. 1107-1114. DOI: 10.1099/00221287-131-5-1107.
21. Boman, H.G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts / H.G. Boman // *Journal of internal medicine.* – 2003. – Vol. 254. – No. 3. – P. 197-215. DOI: 10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x.
22. Bontemps-Gallo, S. Nutrient depletion may trigger the *Yersinia pestis* OmpR-EnvZ regulatory system to promote flea-borne plague transmission / S. Bontemps-Gallo, M. Fernandez, A. Dewitte, E. Raphaël, F.C. Gherardini, P. Elizabeth, L.Koch, F. Biot, A. Reboul, F. Sebbane // *Mol. Microbiol.* – 2019. – Vol. 112. – P. 1471–1482. DOI: 10.1111/mmi.14372.
23. Bowen, W. Robust Th1 cellular and humoral responses generated by the *Yersinia pestis* rF1-V subunit vaccine formulated to contain an agonist of the CD137 pathway do not translate into increased protection against pneumonic plague / W. Bowen, L. Batra, A.R. Pulsifer, E.S. Yolcu, M.B. Lawrenz, H. Shirwan // *Vaccine.* – 2019. – Vol. 37. – P. 5708–5716. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.103.
24. Brandau, D.T. Thermal stability of vaccines / D.T. Brandau, L.S. Jones, C.M. Wiethoff, J. Rexroad, C.R. Middaugh, // *Journal of pharmaceutical sciences.* – 2003. – Vol. 92. – No. 2. – P. 218-231.

25. Brown, J. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk / J. Brown, H. Wang, G.N. Hajishengallis, M. Martin // *Journal of dental research*. – 2011. – Vol. 90. – No. 4. – P. 417-427. DOI: 10.1177/0022034510381264.
26. Bubeck, S.S. Delayed inflammatory response to primary pneumonic plague occurs in both outbred and inbred mice / S.S. Bubeck, A.M. Cantwell, P.H. Dube // *Genes & Immunity*. – 2007. – Vol. 75. – No. 2. – P. 697-705. DOI: 10.1128/IAI.00403-06.
27. Burns, K. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling / K. Burns, F. Martinon, C. Esslinger, H. Pahl, P. Schneider, J.L. Bodmer, F. Di Marco, L. French, J. Tschopp // *J Biol Chem*. – 1998. – Vol. 273. – P. 12203-12209. DOI: 10.1074/jbc.273.20.12203.
28. Burrows, T.W. Virulence of *Pasteurella pestis* / T.W Burrows // *Nature*. – 1957. – Vol. 179. – P. 1246–1247. DOI: 10.1038/1791246a0.
29. Burrows, T.W. Virulence of *Pasteurella pestis* and immunity to plague / T.W. Burrows // Springer Berlin Heidelberg, 1963. – Vol. 39. – P. 59-113. DOI: 10.1007/978-3-662-36742-1_2.
30. Buwitt-Beckmann, U. Lipopeptide structure determines TLR₂ dependent cell activation level / U. Buwitt-Beckmann, H. Heine, K.-H. Wiesmuller, G. Jung, R. Brock, A.J. Ulmer // *The FEBS journal*. – 2005. – Vol. 272. – No. 24. – P. 6354-6364. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.05029.x.
31. Byvalov, A.A. *Yersinia* outer membrane vesicles as potential vaccine candidates in protecting against plague / A.A. Byvalov, I.V. Konyshev, V.N. Uversky, S.V. Dentovskaya, A.P. Anisimov // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10. – No. 12. – P. 1694. DOI: 10.3390/biom10121694.
32. Cai, K. Intra-gastric immunization of mice with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts reduces mortality and shedding and induces a Th2-type dominated mixed immune response / K. Cai, X. Gao, T. Li, X. Hou, Q. Wang, H. Liu, L. Xiao, W. Tu, Y. Liu, J. Shi, H. Wang // *Canadian Journal of Microbiology*. – 2010. – Vol. 56. – No. 5. – P. 389-398. DOI: 10.1139/w10-025.
33. Cai, K. Novel fusion antigen displayed-bacterial ghosts vaccine candidate against infection of *Escherichia coli* O157:H7 / K. Cai, W. Tu, Y. Liu, T. Li, H. Wang // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – No. 1. – P. 17479. DOI: 10.1038/srep17479.

34. Cai, K. *Yersinia enterocolitica* ghost with *msbB* mutation provides protection and reduces proinflammatory cytokines in mice / K. Cai, Y. Zhang, B. Yang, S. Chen // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31. – No. 2. – P. 334-340. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.11.004.
35. Cao, J. An oral double-targeted DNA vaccine induces systemic and intestinal mucosal immune responses and confers high protection against *Vibrio mimicus* in grass carps / J. Cao, X.C. Zhu, X.Y. Liu, K. Yuan, J.J. Zhang, H.H. Gao, J.N. Li // *Aquaculture*. – 2019. – Vol. 504. – P. 248-259. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.02.006.
36. Carneiro, L.A.M. Innate immune recognition of microbes through Nod1 and Nod2: implications for disease / L.A.M. Carneiro, L.H. Travassos, D.J. Philpott // *Microbes and infection*. – 2004. – Vol. 6. – No. 6. – P. 609-616. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.01.012.
37. Chandler, C.E. Bacterial lipids: powerful modifiers of the innate immune response / C.E. Chandler, R.K. Ernst // *F1000Research*. – 2017. – Vol. 6. DOI: 10.12688/f1000research.11388.1.
38. Chen, D.J. Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines / D.J. Chen, N. Osterrieder, S.M. Metzger, E. Buckles, A.M. Doody, M.P. DeLisa, D. Putnam // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – No. 7. – P. 3099-3104. DOI: 10.1073/pnas.0805532107.
39. Chen, H. Bacterial ghosts-based vaccine and drug delivery systems / H. Chen, H. Ji, X. Kong, P. Lei, Q. Yang, W. Wu, L. Jin, D. Sun // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13. – No. 11. – P. 1892. DOI: 10.3390/pharmaceutics13111892.
40. Chen, J. *Helicobacter pylori* outer inflammatory protein DNA vaccine-loaded bacterial ghost enhances immune protective efficacy in C57BL/6 mice / J. Chen, N. Li, F. She // *Vaccine*. – 2014. – Vol. 32. – No. 46. – P. 6054-6060. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.09.014.
41. Choi, C.W. Method of preparing bacterial ghosts from gram-positive bacteria by hydrochloric acid treatment: пат. 11066638 США. – 2021.
42. Chu W., Zhuang X., Lu C. Generation of *Aeromonas hydrophila* ghosts and their evaluation as oral vaccine candidates in *Carassius auratus gibelio* / W. Chu, X. Zhuang, C. Lu // *Wei Sheng wu xue bao= Acta Microbiologica Sinica*. – 2008. – Vol. 48. – No. 2. – P. 202-206.
43. Cui, Y. Genetic variations of live attenuated plague vaccine strains (*Yersinia pestis* EV76 lineage) during laboratory passages in different countries / Y. Cui, X. Yang, X. Xiao, A.P. Anisimov, D. Li, Y. Yan, D. Zhou, M. Rajerison, E. Carniel, M. Achtman, R.

Yang, Y. Song // Infect. Genet. Evol. – 2014. – Vol. 26. – P. 172–179. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.05.023.

44. Daniel, C. Polymorphism in the *Yersinia* LcrV antigen enables immune escape from the protection conferred by an LcrV-secreting *Lactococcus lactis* in a pseudotuberculosis mouse model / C. Daniel, A. Dewitte, S. Poiret, M. Marceau, M. Simonet, L. Marceau, G. Descombes, D. Boutillier, N. Bennaceur, S. Bontemps-Gallo, N. Lemaître, F. Sebbane // Front. Immunol. – 2019. – Vol. 10. – P. 1830:1–1830:10. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01830.

45. Demeure, C.E. Humoral and cellular immune correlates of protection against bubonic plague by a live *Yersinia pseudotuberculosis* vaccine / C.E. Demeure, A. Derbise, C. Guillas, C. Gerke, S. Cauchemez, E. Carniel, J. Pizarro-Cerdá // Vaccine. –2019. – Vol. 37. – P.123–129. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.11.022.

46. Demeure, C.E. *Yersinia pestis* and plague: An updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics / C.E. Demeure, O. Dussurget, G. Mas Fiol, A.S. Le Guern, C.Savin, J. Pizarro-Cerdá // Genes Immun. – 2019. – Vol. 20. – P. 357–370. DOI: 10.1038/s41435-019-0065-0.

47. Denoël, P. Comparison of acellular pertussis vaccines-induced immunity against infection due to *Bordetella pertussis* variant isolates in a mouse model / P. Denoel, F. Godfroid, N. Guiso, H. Hallander, J. Poolman // Vaccine. – 2005. – Vol. 23. – No. 46-47. – P. 5333-5341. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.06.021.

48. Dentovskaya, S.V. Molecular bases of vaccine-prevention of plague / S.V. Dentovskaya, P.K. Kopylov, S.A. Ivanov, S.A. Ageev, A.P. Anisimov // Molecular Genetics, Microbiology and Virology. – 2013. – Vol. 28. – No. 3. – P. 87-98. DOI: 10.3103/S089141681303004X.

49. Dentovskaya, S.V. Peptidoglycan-free bacterial ghosts confer enhanced protection against *Yersinia pestis* infection / S.V. Dentovskaya, A.S. Vagaiskaya, M.E. Platonov, A.S. Trunyakova, S.A. Kotov, E.A. Krasil'nikova, G.M. Titareva, E.M. Mazurina, T.V. Gapel'chenkova, R.Z. Shaikhutdinova, S.A. Ivanov, T.I. Kombarova, V.N. Gerasimov, V.N. Uversky, A.P. Anisimov // Vaccines. – 2021. – Vol. 10. – No. 1. – P. 51. DOI: 10.3390/vaccines10010051.

50. Dentovskaya, S.V. Selective protective potency of *Yersinia pestis* $\Delta nlpD$ mutants / S.V. Dentovskaya, S.A. Ivanov, P. Kopylov, R.Z. Shaikhutdinova, M.E. Platonov,

T.I. Kombarova, T.V. Gapel'chenkova, S.V. Balakhonov, A.P. Anisimov // *Acta Naturae*. – 2015. – Vol. 7. – No. 1 (24). – P. 102–108. DOI: 10.32607/20758251-2015-7-1-102-108.

51. Ding, C. Targeting IL-6 in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases / C. Ding, F. Cicuttini, J. Li, G. Jones // *Expert opinion on investigational drugs*. – 2009. – Vol. 18. – No. 10. – P. 1457-1466. DOI: 10.1517/13543780903203789.

52. Dobrovolskaia, M.A. Dendrimers effects on the immune system: insights into toxicity and therapeutic utility // *Current pharmaceutical design*. – 2017. – Vol. 23. – No. 21. – P. 3134-3141. DOI: 10.2174/1381612823666170309151958.

53. Dobrovolskienė, N. Tumor lysate-loaded Bacterial Ghosts as a tool for optimized production of therapeutic dendritic cell-based cancer vaccines / N. Dobrovolskienė, V. Pašukonienė, A. Darinskas, J.A. Kraško, K. Žilionytė, A. Mlynska, Ž. Gudlevičienė, E. Mišeikytė-Kaubrienė, V. Schijns, W. Lubitz, P. Kudela, M. Strioga // *Vaccine*. – 2018. – Vol. 36. – No. 29. – P. 4171-4180. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.06.016.

54. Drozdov, I.G. Virulent non-capsulate *Yersinia pestis* variants constructed by insertion mutagenesis / I.G. Drozdov, A.P. Anisimov, S.V. Samoilova, I.N. Yezhov, S.A. Yeremin, A.V. Karlyshev, V.M. Krasilnikova, V.I. Kravchenko // *J. Med. Microbiol.* – 1995. – Vol. 42. – P.264–268. DOI: 10.1099/00222615-42-4-264.

55. Dziarski, R. Immunosuppressive effect of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan on antibody response in mice / R. Dziarski // *International Archives of Allergy and Immunology*. – 1978. – Vol. 57. – No. 4. – P. 304-311. DOI: 10.1159/000232119.

56. Dziarski, R. Relationships between adjuvant, immunosuppressive, and mitogenic activities of staphylococcal peptidoglycan / R. Dziarski // *Infection and Immunity*. – 1979. – Vol. 26. – No. 2. – P. 508-514. DOI: 10.1128/iai.26.2.508-514.1979.

57. Ebensen, T. Bacterial ghosts are an efficient delivery system for DNA vaccines / T. Ebensen, S. Paukner, C. Link, P. Kudela, C. de Domenico, W. Lubitz, C.A. Guzmán // *The Journal of Immunology*. – 2004. – Vol. 172. – No. 11. – P. 6858-6865. DOI: 10.4049/jimmunol.172.11.6858.

58. Eko, F.O. Characterization and immunogenicity of *Vibrio cholerae* ghosts expressing toxin-coregulated pili / F.O. Eko, U.B. Mayr, S.R. Attridge, W. Lubitz // *Journal of biotechnology*. – 2000. – Vol. 83. – No. 1-2. – P. 115-123. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00315-1.

59. Eko, F.O. Evaluation of the protective efficacy of *Vibrio cholerae* ghost (VCG) candidate vaccines in rabbits / F.O. Eko, T. Schukovskaya, E.Y. Lotzmanova, V.V. Firstova, N.V. Emalyanova, S.N. Klueva, A.L. Kravtsov, L.F. Livanova, V.V. Kutyrev, J.U. Igietseme, W. Lubitz // *Vaccine*. – 2003a. – Vol. 21. – No. 25-26. – P. 3663-3674. DOI: 10.1016/s0264-410x(03)00388-8.
60. Eko, F.O. Immunogenicity of *Vibrio cholerae* ghosts following intraperitoneal immunization of mice / F.O. Eko, A. Hensel, S. Bunka, W. Lubitz // *Vaccine*. – 1994a. – Vol. 12. – No. 14. – P. 1330-1334. DOI: 10.1016/s0264-410x(94)80061-4.
61. Eko, F.O. New strategies for combination vaccines based on the extended recombinant bacterial ghost system / F.O. Eko, A. Witte, V. Huter, B. Kuen, S. Fürst-Ladani, A. Haslberger, A. Katinger, A. Hensel, M.P. Szostak, S. Resch., H. Mader, P. Raza, E. Brand, J. Marchart, W. Jechlinger, W. Haidinger, W. Lubitz // *Vaccine*. – 1999. – Vol. 17. – No. 13-14. – P. 1643-1649. DOI: 10.1016/s0264-410x(98)00423-x.
62. Eko, F.O. Production of *Vibrio cholerae* ghosts (VCG) by expression of a cloned phage lysis gene: potential for vaccine development / F.O. Eko, M.P. Szostak, G. Wanner, W. Lubitz // *Vaccine*. – 1994b. – Vol. 12. – No. 13. – P. 1231-1237. DOI: 10.1016/0264-410x(94)90249-6.
63. Eko, F.O. Recombinant *Vibrio cholerae* ghosts as a delivery vehicle for vaccinating against *Chlamydia trachomatis* / F.O. Eko, W. Lubitz, L. McMillan, K. Ramey, T.T. Moore, G.A. Ananaba, D. Lyn, C.M. Black, J.U. Igietseme // *Vaccine*. – 2003b. – Vol. 21. – No. 15. – P. 1694-1703. DOI: 10.1016/s0264-410x(02)00677-1.
64. Elkins, K.L. Vaccines against bioterror agents / K.L. Elkins, D.L. Burns, M.P. Schmitt, J.P. Weir // *Novel vaccination strategies*. – 2004. – P. 529-545. DOI: 10.1002/3527601449.ch24
65. Eren, E. Structural basis for activation of an integral membrane protease by lipopolysaccharide / E. Eren, B. van den Berg // *J. Biol Chem*. – 2012. – Vol. 287. – P. 23971–23976. DOI: 10.1074/jbc.M112.376418.
66. Fan, Y. Recombinant murine toxin from *Yersinia pestis* shows high toxicity and β -adrenergic blocking activity in mice / Y. Fan, Y. Zhou, N. Feng, Q. Wang, G. Tian, X. Wu, Z. Liu, Y. Bi, R. Yang, X. Wang // *Microbes and Infection*. – 2016. – Vol. 18. – No. 5. – P. 329-335. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.01.001.

67. Felnerova, D. T cell-specific immune response induced by bacterial ghosts / D. Felnerova, P. Kudela, J. Bizik, A. Haslberger, A. Hensel, A. Saalmuller, W. Lubitz // *Med Sci Monit.* – 2004. – Vol. 10. – No. 10. – P. 362-370.
68. Feng, J. Construction of a live-attenuated vaccine strain of *Yersinia pestis* EV76-B-SHU Δ *pla* and evaluation of its protection efficacy in a mouse model by aerosolized intratracheal inoculation / J. Feng, Y. Deng, M. Fu, X. Hu, W. Luo, Z. Lu, L. Dai, H. Yang, X. Zhao, Z. Du, B. Wen, L. Jiang, D. Zhou, J. Jiao, X. Xiong // *Front. Cell Infect. Microbiol.* – 2020. – Vol. 10. – P. 473:1–473:13. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00473.
69. Feodorova, V.A. Humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* Pla antigen in humans immunized with live plague vaccine / V.A. Feodorova, A.M. Lyapina, M.A. Khizhnyakova, S.S. Zaitsev, L.V. Sayapina, T.E. Arseneva, A.L. Trukhachev, S.A. Lebedeva, M.V. Telepnev, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, S.S. Ulyanov, V.L. Motin // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2018. – Vol. 12. – e0006511:1–e0006511:14. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006511.
70. Fetherston, J.D. The yersiniabactin transport system is critical for the pathogenesis of bubonic and pneumonic plague / J.D. Fetherston, O. Kirillina, A.G. Bobrov, J.T. Paulley, R.D. Perry // *Infection and immunity.* – 2010. – Vol. 78. – No. 5. – P. 2045-2052. DOI: 10.1128/IAI.01236-09.
71. Finney, D.J. Statistical method in biological assay. – Charles Griffin & Company., 1978. – No. Ed. 3. – 508pp.
72. Fitzgerald, K.A. Toll-like receptors and the control of immunity / K.A. Fitzgerald, J.C. Kagan // *Cell.* – 2020. – Vol. 180. – No. 6. – P. 1044-1066. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.041.
73. Fournier, J. Experimental study of subcutaneous and aerosol vaccination against the plague in cynocephalous monkeys. Absence of correlation between hemagglutination and precipitant antibodies and protection / J. Fournier, G. Paul, J. Chomel, A. Dodin, R. Fontanges // *Ann. Microbiol. (Paris).* – 1973. – Vol. 124. P. 315–328.
74. Frey, J Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines / J. Frey // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25. – P. 5598–5605. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.11.058.

75. Frieden, T.R. Fatal laboratory-acquired infection with an attenuated *Yersinia pestis* strain / T.R. Frieden, H.W. Jaffe, J.W. Stephens, S.B. Thacker, S. Zaza // *Morbidity and Mortality Weekly Report*. – 2011. – Vol. 60. – P. 201–205.
76. Friedlander, A.M. Relationship between virulence and immunity as revealed in recent studies of the F1 capsule of *Yersinia pestis* / A.M. Friedlander, S.L. Welkos, P.L. Worsham, G.P. Andrews, D.G. Heath, G.W., Jr. Anderson, M.L. Pitt, J. Estep, K. Davis // *Clin. Infect. Dis.* – 1995. – Vol. 21. – P. S178–S181. DOI: 10.1093/clinids/21.supplement_2.s178.
77. Fu, L. A novel dual vector coexpressing ϕ X174 lysis E gene and staphylococcal nuclease A gene on the basis of λ promoter pR and pL, respectively / L. Fu, C. Lu // *Molecular biotechnology*. – 2013. – Vol. 54. – P. 436–444. DOI: 10.1007/s12033-012-9581-0.
78. Gage, K.L. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research / K.L. Gage, M.Y. Kosoy // *Annu. Rev. Entomol.* – 2005. – Vol. 50. – P. 505–528. DOI: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130337.
79. Galanos, C. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities / C. Galanos, O. Lüderitz, E.Th. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M. Freudenberg, U. Schade, M. Imoto, H. Yoshimura, S. Kusumoto, T. Shiba // *European journal of biochemistry*. – 1985. – Vol. 148. – No. 1. – P. 1–5. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb08798.x.
80. Galván, E.M. Biosafety level 2 model of pneumonic plague and protection studies with F1 and Psa / E.M. Galván, M.K. Nair, H. Chen, P.F. Del, D.M. Schifferli // *Infection and immunity*. – 2010. – Vol. 78. – No. 8. – P. 3443–3453.
81. Ganeshpurkar, A. Harnessing the potential of bacterial ghost for the effective delivery of drugs and biotherapeutics / A. Ganeshpurkar, V. Pandey, A. Agnihotri, D. Bansal, N. Dubey // *International journal of pharmaceutical investigation*. – 2014. – Vol. 4. – No. 1. – P. 1. DOI: 10.4103/2230-973X.127733.
82. Garcia, E. Molecular characterization of L-413C, a P2-related plague diagnostic bacteriophage / E. Garcia, P. Chain, J.M. Elliott, A.G. Bobrov, V.L. Motin, O. Kirillina, V. Lao, R. Calendar, A.A. Filippov // *Virology*. – 2008. – Vol. 372. – No. 1. – P. 85–96. DOI: 10.1016/j.virol.2007.10.032.
83. Gong, S. Protective immunity elicited by VP1 chimeric antigens of bacterial ghosts against hand-foot-and-mouth disease virus / S. Gong, N. Nan, Y. Sun, Z. He, J. Li, F.

Chen, T. Li, N. Ning, J. Wang, Z. Li, D. Luo, H. Wang // *Vaccines*. – 2020. – Vol. 8. – No. 1. – P. 61. DOI: 10.3390/vaccines8010061.

84. Gries, C.M. Crosslinked flagella as a stabilized vaccine adjuvant scaffold / C.M. Gries, R.R. Mohan, D. Morikis, D.D. Lo // *BMC biotechnology*. – 2019. – Vol. 19. – No. 1. – P. 1-11. DOI: 10.1186/s12896-019-0545-3.

85. Guo, R. Evaluation of protective efficacy of a novel inactivated *Salmonella Pullorum* ghost vaccine against virulent challenge in chickens / R. Guo, S. Geng, H. Jiao, Z. Pan, X. Chen, X. Jiao // *Veterinary immunology and immunopathology*. – 2016. – Vol. 173. – P. 27-33. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.03.015.

86. Gupta, R.K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants / R.K. Gupta // *Advanced drug delivery reviews*. – 1998. – Vol. 32. – No. 3. – P. 155-172.

87. Haidinger, W. Green fluorescent protein (GFP)-dependent separation of bacterial ghosts from intact cells by *FACS* / W. Haidinger, M.P. Szostak, W. Beisker, W. Lubitz // *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. – 2001. – Vol. 44. – No. 2. – P. 106-112. DOI: 10.1002/1097-0320(20010601)44:2.

88. Haidinger, W. Online monitoring of *Escherichia coli* ghost production / W. Haidinger, M.P. Szostak, W. Jechlinger, W. Lubitz // *Applied and environmental microbiology*. – 2003. – Vol. 69. – No. 1. – P. 468-474. DOI: 10.1128/aem.69.1.468-474.2003.

89. Hajam, I.A. Bacterial ghosts as adjuvants: mechanisms and potential / I.A. Hajam, P.A. Dar, G. Won, J.H. Lee // *Veterinary Research*. – 2017. – Vol. 48. – No. 1. – P. 1-13. DOI: 10.1186/s13567-017-0442-5.

90. Hajam, I.A. Bacterial ghosts of *Escherichia coli* drive efficient maturation of bovine monocyte-derived dendritic cells / I.A. Hajam, P.A. Dar, E. Appavoo, S. Kishore, V. Bhanuprakash, K. Ganesh // *PloS one*. – 2015. – Vol. 10. – No. 12. – P. e0144397. DOI: 10.1371/journal.pone.0144397.

91. Hajam, I.A. Incorporation of membrane-anchored flagellin into *Salmonella Gallinarum* bacterial ghosts induces early immune responses and protection against fowl typhoid in young layer chickens / I.A. Hajam, J.H. Kim, J.H. Lee // *Veterinary immunology and immunopathology*. – 2018. – Vol. 199. – P. 61-69. DOI: 10.1016/j.vetimm.2018.03.011.

92. Hamzabegovic, F. Flagellin adjuvanted F1/V subunit plague vaccine induces T cell and functional antibody responses with unique gene signatures / F. Hamzabegovic, J.B.

Goll, W.F. Hooper, S. Frey, C.E. Gelber, G. Abate // NPJ vaccines. – 2020. – Vol. 5. – No. 1. – P. 1-10. DOI: 10.1038/s41541-020-0156-y.

93. Haq, I.U. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review / I.U. Haq, W.N. Chaudhry, M.N. Akhtar, S. Andleeb, I. Qadri // Virology journal. – 2012. – Vol. 9. – No. 1. – P. 1-8. DOI: 10.1186/1743-422X-9-9.

94. He, C. Vaccination with a *Brucella* ghost developed through a double inactivation strategy provides protection in Guinea pigs and cattle / C. He, J. Yang, H. Zhao, M. Liu, D. Wu, B. Liu, S. He, Z. Chen // Microbial Pathogenesis. – 2022. – Vol. 162. – P. 105363. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.105363.

95. Hinnebusch, J. Murine toxin of *Yersinia pestis* shows phospholipase D activity but is not required for virulence in mice / J. Hinnebusch, P. Cherepanov, Y. Du, A. Rudolph, J.D. Dixon, T. Schwan, A. Forsberg // International journal of medical microbiology. – 2000. – Vol. 290. – No. 4-5. – P. 483-487. DOI: 10.1016/S1438-4221(00)80070-3.

96. Holbein, B.E. *Neisseria meningitidis* infection in mice: influence of iron, variations in virulence among strains, and pathology / B.E. Holbein, K.W. Jericho, G.C. Likes // Infection and Immunity. – 1979. – Vol. 24. – No. 2. – P. 545-551. DOI: 10.1128/iai.24.2.545-551.1979.

97. Honko, A.N. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis* / A.N. Honko, N. Sriranganathan, C.J. Lees, S.B. Mizel // Infection and immunity. – 2006. – Vol. 74. – No. 2. – P. 1113-1120. DOI: 10.1128/IAI.74.2.1113-1120.2006.

98. Hou, R. Construction of *Lactobacillus casei* ghosts by Holin-mediated inactivation and the potential as a safe and effective vehicle for the delivery of DNA vaccines / R. Hou, M. Li, T. Tang, R. Wang, Y. Li, Y. Xu, L. Tang, L. Wang, M. Liu, Y. Jiang, W. Cui, X. Qiao // BMC microbiology. – 2018. – Vol. 18. – P. 1-9. DOI: 10.1186/s12866-018-1216-6.

99. Hug, H. Toll-like receptors: regulators of the immune response in the human gut / H. Hug, M.H. Mohajeri, G. La Fata // Nutrients. – 2018. – Vol. 10. – No. 2. – P. 203. DOI: 10.3390/nu10020203.

100. Hur, J. A new enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine candidate constructed using a *Salmonella* ghost delivery system: comparative evaluation with a commercial vaccine for neonatal piglet colibacillosis / J. Hur, J.H. Lee // Veterinary immunology and

immunopathology. – 20156. – Vol. 164. – No. 3-4. – P. 101-109.
DOI: 10.1016/j.vetimm.2015.01.010.

101. Hur, J. Protective efficacy by various doses of *Salmonella* ghost vaccine candidate carrying enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbrial antigen against neonatal piglet colibacillosis / J. Hur, J.H. Lee // Canadian Journal of Veterinary Research. – 2016. – Vol. 80. – No. 3. – P. 245-249.

102. Hur, J. *Salmonella* ghosts expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* k88ab, k88ac, k99, and fasa fimbrial antigens induce robust immune responses in a mouse model / J. Hur, C.S. Kim, S.K. Eo, S.Y. Park, J.H. Lee // Veterinary Quarterly. – 2015a. – Vol. 35. – No. 3. – P. 125-132. DOI: 10.1080/01652176.2015.1029598.

103. Huter, V. Improved protection against lung colonization by *Actinobacillus pleuropneumoniae* ghosts: characterization of a genetically inactivated vaccine / V. Huter, A. Hensel, E. Brand, W. Lubitz // Journal of biotechnology. – 2000. – Vol. 83. – No. 1-2. – P. 161-172. DOI: 10.1016/s0168-1656(00)00310-2.

104. Ivanov, M.I. Vaccination of mice with a Yop translocon complex elicits antibodies that are protective against infection with F1⁻ *Yersinia pestis* / M.I. Ivanov, B.L. Noel, R. Rampersaud, P. Mena, J.L. Benach, J.B. Bliska // Infection and immunity. – 2008. – Vol. 76. – No. 11. – P. 5181-5190. DOI: 10.1128/IAI.00189-08.

105. Jackson, S. The virulence-enhancing effect of iron on non-pigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis* / S. Jackson, T.W. Burrows // British journal of experimental pathology. – 1956. – Vol. 37. – No. 6. – P. 577.

106. Jawale, C.V. A novel approach for the generation of *Salmonella Gallinarum* ghosts and evaluation of their vaccine potential using a prime-booster immunization strategy / C.V. Jawale, J.H. Lee // Vaccine. – 2014г. – Vol. 32. – No. 50. – P. 6776-6782. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.10.012

107. Jawale, C.V. An immunogenic *Salmonella* ghost confers protection against internal organ colonization and egg contamination / C.V. Jawale, J.H. Lee // Veterinary immunology and immunopathology. – 20146. – Vol. 162. – No. 1-2. – P. 41-50. DOI: 10.1016/j.vetimm.2014.08.015.

108. Jawale, C.V. Characterization of a novel inactivated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis vaccine candidate generated using a modified cI857/ λ PR/gene E expression system / C.V. Jawale, A.A. Chaudhari, B.W. Jeon, R.M. Nandre, J.H. Lee //

Infection and immunity. – 2012. – Vol. 80. – No. 4. – P. 1502-1509. DOI: 10.1128/IAI.06264-11.

109. Jawale, C.V. Characterization of a *Salmonella* Typhimurium ghost carrying an adjuvant protein as a vaccine candidate for the protection of chickens against virulent challenge / C.V. Jawale // Avian Pathology. – 2014д. – Vol. 43. – No. 6. – P. 506-513. DOI: 10.1080/03079457.2014.966303.

110. Jawale, C.V. Characterization of adaptive immune responses induced by a new genetically inactivated *Salmonella* Enteritidis vaccine / C.V. Jawale, J.H. Lee // Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. – 2014a. – Vol. 37. – No. 3. – P. 159-167. DOI: 10.1016/j.cimid.2014.05.001.

111. Jawale, C.V. Comparative evaluation of *Salmonella* Enteritidis ghost vaccines with a commercial vaccine for protection against internal egg contamination with *Salmonella* / C.V. Jawale, J.H. Lee // Vaccine. – 2014e. – Vol. 32. – No. 45. – P. 5925-5930. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.08.072.

112. Jawale, C.V. Development of a biosafety enhanced and immunogenic *Salmonella* Enteritidis ghost using an antibiotic resistance gene free plasmid carrying a bacteriophage lysis system / C.V. Jawale, J.H. Lee // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – No. 10. – P. e78193. DOI: 10.1371/journal.pone.0078193.

113. Jawale, C.V. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of adjuvanted *Salmonella* Typhimurium ghost vaccine against salmonellosis in chickens / C.V. Jawale, J.H. Lee // Veterinary Quarterly. – 2016. – Vol. 36. – No. 3. – P. 130-136. DOI: 10.1080/01652176.2016.1138248.

114. Jawale, C.V. Evaluation of *Salmonella* Gallinarum ghost formulated with Montanide™ ISA 70 VG adjuvant as a vaccine against fowl typhoid / C. Jawale, N. Somsanith, S. Eo, S. Park, J. Lee // Acta Veterinaria Hungarica. – 2015. – Vol. 63. – No. 4. – P. 401-412. DOI: 10.1556/004.2015.038.

115. Jawale, C.V. Generation of a safety enhanced *Salmonella* Gallinarum ghost using antibiotic resistance free plasmid and its potential as an effective inactivated vaccine candidate against fowl typhoid / C.V. Jawale, A.A. Chaudhari, J.H. Lee // Vaccine. – 2014b. – Vol. 32. – No. 9. – P. 1093-1099. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.12.053.

116. Jechlinger, W. Altered temperature induction sensitivity of the lambda p R/cI857 system for controlled gene E expression in *Escherichia coli* / W. Jechlinger, M.P.

Szostak, A. Witte, W. Lubitz // FEMS microbiology letters. – 1999. – Vol. 173. – No. 2. – P. 347-352. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13524.x.

117. Jiang, N. Generation and immunity effect evaluation of biotechnology-derived *Aeromonas veronii* ghost by PhiX174 gene *E*-mediated inactivation in koi (*Cyprinus carpio*) / N. Jiang, L. Luo, W. Xing, T. Li, D. Yuan, G. Xu, W. Li, Z. Ma, L. Jin, M. Ji // Fish & shellfish immunology. – 2019. – Vol. 86. – P. 327-334.

118. Jiao, H. Design and immune characterization of a novel *Neisseria gonorrhoeae* DNA vaccine using bacterial ghosts as vector and adjuvant / H. Jiao, H. Yang, D. Zhao, J. Chen, Q. Zhang, J. Liang, Y. Yin, G. Kong, G. Li // Vaccine. – 2018. – Vol. 36. – No. 30. – P. 4532-4539. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.06.006.

119. Jones, S.M. Protective efficacy of a fully recombinant plague vaccine in the guinea pig / S.M. Jones, K.F. Griffin, I. Hodgson, E.D. Williamson // Vaccine. – 2003. – Vol. 21. – P. 3912–3918. DOI: 10.1016/s0264-410x(03)00379-7.

120. Kamble, N.M. Activation of chicken bone marrow-derived dendritic cells induced by a *Salmonella* Enteritidis ghost vaccine candidate / N.M. Kamble, C.V. Jawale, J.H. Lee // Poultry Science. – 2016. – Vol. 95. – No. 10. – P. 2274-2280. DOI: 10.3382/ps/pew158.

121. Kamble, N.M. Self-destructing *Salmonella* via temperature induced gene *E* of phage PhiX174 improves influenza HA DNA vaccine immune protection against H1N1 infection in mice model / N.M. Kamble, A. Senevirathne, H.B. Koh, J.I. Lee, J.H. Lee // Journal of immunological methods. – 2019. – Vol. 472. – P. 7-15. DOI: 10.1016/j.jim.2019.06.008.

122. Katinger, A. Pigs aerogenously immunized with genetically inactivated (ghosts) or irradiated *Actinobacillus pleuropneumoniae* are protected against a homologous aerosol challenge despite differing in pulmonary cellular and antibody responses / A. Katinger, W. Lubitz, M.P. Szostak, M. Stadler, R. Klein, A. Indra, V. Huter, A. Hensel // Journal of biotechnology. – 1999. – Vol. 73. – No. 2-3. – P. 251-260. DOI: 10.1016/s0168-1656(99)00143-1.

123. Keppie, J. The Chemical Basis of the Virulence of *Pasteurella pestis*: III. An Immunogenic Product Obtained from *Past. pestis* which Protects both Guinea-pigs and Mice / J. Keppie, E.C. Cocking, K. Witt, H. Smith // British Journal of Experimental Pathology. – 1960. – Vol. 41. – No. 6. – P. 577.

124. Kim, B. Construction of an inactivated typhoid vaccine candidate expressing *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit and evaluation of its immunogenicity in a murine model / B. Kim, G. Won, J.H. Lee // Journal of Medical Microbiology. – 2017. – Vol. 66. – No. 8. – P. 1235-1243. DOI: 10.1099/jmm.0.000543.

125. Kim, C.S. Generation of *Salmonella* ghost cells expressing fimbrial antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* and evaluation of their antigenicity in a murine model / C.S. Kim, J. Hur, S.K. Eo, S.Y. Park, J.H. Lee // Canadian Journal of Veterinary Research. – 2016. – Vol. 80. – No. 1. – P. 40-48.

126. Kim, E. Construction of a novel tetravalent dengue vaccine with a *Salmonella* Typhimurium bacterial ghost and evaluation of its immunogenicity and protective efficacy using a murine model / E. Kim, G. Won, J.H. Lee // Vaccine. – 2020. – Vol. 38. – No. 4. – P. 916-924. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.10.075.

127. Kim, S.W. Immune responses of BALB/c mice orally immunized with *Salmonella* Typhimurium ghost cells carrying antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* / S.W. Kim, S.W. Gal, J.H. Lee, Y.S. Hah, T.W. Kim, C.W. Kim, I.S. Kim, S.W. Kim // Veterinarski arhiv. – 2017. – Vol. 87. – No. 1. – P. 87-101.

128. Kim, W.K. *Brucella abortus* lysed cells using GI24 induce robust immune response and provide effective protection in Beagles / W.K. Kim, J.Y. Moon, J.S. Cho, M.R. Akanda, B.Y. Park, S. Kug Eo, S.Y. Park, J.H. Lee, J. Hur // Pathogens and disease. – 2018. – Vol. 76. – No. 1. – P. ftx124. DOI: 10.1093/femspd/ftx124.

129. Kim, W.K. Protective efficacy of an inactivated *Brucella abortus* vaccine candidate lysed by GI24 against brucellosis in Korean black goats / W.K. Kim, J.Y. Moon, J.S. Cho, E. Ochirkhuyag, M.R. Akanda, B.Y. Park, J. Hur // Canadian Journal of Veterinary Research. – 2019. – Vol. 83. – No. 1. – P. 68-74.

130. King, T.P. Inflammatory role of two venom components of yellow jackets (*Vespula vulgaris*): a mast cell degranulating peptide mastoparan and phospholipase A1 / T.P. King, S.Y. Jim, K.M. Wittkowski // International archives of allergy and immunology. – 2003. – Vol. 131. – No. 1. – P. 25-32. DOI: 10.1159/000070431.

131. Kloos, D.U. Inducible cell lysis system for the study of natural transformation and environmental fate of DNA released by cell death / D.U. Kloos, M. Strätz, A. Güttler, R.J. Steffan, K.N. Timmis // Journal of bacteriology. – 1994. – Vol. 176. – No. 23. – P. 7352-7361. DOI: 10.1128/jb.176.23.7352-7361.1994.

132. Kocourkova, A. Vaccine ingredients: components that influence vaccine efficacy / A. Kocourkova, J. Honegr, K. Kuca, J. Danova // *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. – 2017. – Vol. 17. – No. 5. – P. 451-466. DOI: 10.2174/1389557516666160801103303.

133. Kopylov, P. *Yersinia pestis* Caf1 protein: Effect of sequence polymorphism on intrinsic disorder propensity, serological cross-reactivity and cross-protectivity of isoforms / P. Kopylov, M.E. Platonov, V.G. Ablamunits, T.I. Kombarova, S.A. Ivanov, L.A. Kadnikova, A.N. Somov, S.V. Dentovskaya, V.N. Uversky, A.P. Anisimov // *PLoS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – e0162308:1–e0162308:16. DOI: 10.1371/journal.pone.0162308.

134. Kroger, A.T. General immunization practices / A.T. Kroger, W.L. Atkinson, L.K. Pickering // *Vaccines*, 7th ed.; Plotkin, AS, Orenstein, WA, Offit, PA, Edwards, KM, Eds. – 2013. – P. 96-120.

135. Kudela, P. Bacterial ghosts as antigen and drug delivery system for ocular surface diseases: effective internalization of bacterial ghosts by human conjunctival epithelial cells / P. Kudela, V.J. Koller, U.B. Mayr, J. Nepp, W. Lubitz, T. Barisani-Asenbauer // *Journal of biotechnology*. – 2011. – Vol. 153. – No. 3-4. – P. 167-175. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.03.022.

136. Kudela, P. Bacterial ghosts as novel efficient targeting vehicles for DNA delivery to the human monocyte-derived dendritic cells / P. Kudela, S. Paukner, U.B. Mayr, D. Cholujoval, Z. Schwarczova, J. Sedlak, J. Bizik, W. Lubitz // *Journal of Immunotherapy*. – 2005. – Vol. 28. – No. 2. – P. 136-143. DOI: 10.1097/01.cji.0000154246.89630.6f.

137. Kvitko, B.H. ϕ X216, a P2-like bacteriophage with broad *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* strain infectivity / B.H. Kvitko, C.R. Cox, D. DeShazer, S.L. Johnson, K.J. Voorhees, H.P. Schweizer // *BMC Microbiol*. – 2012. – Vol. 12. – P. 289. DOI: 10.1186/1471-2180-12-289.

138. Kwon, A.J. Protection efficacy of the *Brucella abortus* ghost vaccine candidate lysed by the N-terminal 24-amino acid fragment (GI24) of the 36-amino acid peptide PMAP-36 (porcine myeloid antimicrobial peptide 36) in murine models / A.J. Kwon, J.Y. Moon, W.K. Kim, S. Kim, J. Hur // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2016. – Vol. 78. – No. 10. – P. 1541-1548. DOI: 10.1292/jvms.16-0036.

139. Kwon, S.R. Generation of *Edwardsiella tarda* ghosts by bacteriophage PhiX174 lysis gene *E* / S.R. Kwon, Y.K. Nam, S.K. Kim, D.S. Kim, K.H. Kim // *Aquaculture*. – 2005. – Vol. 250. – No. 1-2. – P. 16-21. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.02.052
140. Kwon, S.R. Generation of *Vibrio anguillarum* ghost by coexpression of PhiX 174 lysis *E* gene and staphylococcal nuclease A gene / S.R. Kwon, Y.J. Kang, D.J. Lee, E.H. Lee, Y.K. Nam, S.K. Kim, K.H. Kim // *Molecular biotechnology*. – 2009. – Vol. 42. – P. 154-159. DOI: 10.1007/s12033-009-9147-y.
141. Lagzian, M. *In vitro* responses of chicken macrophage-like monocytes following exposure to pathogenic and non-pathogenic *E. coli* ghosts loaded with a rational design of conserved genetic materials of influenza and Newcastle disease viruses / M. Lagzian, M.R. Bassami, H. Dehghani // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2016. – Vol. 176. – P. 5-17. DOI: 10.1016/j.vetimm.2016.05.005.
142. Langemann, T. The bacterial ghost platform system: production and applications / T. Langemann, V.J. Koller, A. Muhammad, P. Kudela, U.B. Mayr, W. Lubitz // *Bioengineered bugs*. – 2010. – Vol. 1. – No. 5. – P. 326-336. DOI: 10.4161/bbug.1.5.12540.
143. Lathem, W.W. Progression of primary pneumonic plague: a mouse model of infection, pathology, and bacterial transcriptional activity / W.W. Lathem, S.D. Crosby, V.L. Miller, W.E. Goldman // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – Vol. 102. – No. 49. – P. 17786-17791. DOI: 10.1073/pnas.0506840102.
144. Lawton, W.D. Biosynthesis and purification of V and W antigen in *Pasteurella pestis* / W.D. Lawton, R.L. Erdman, M.J. Surgalla // *J. Immunol.* – 1963A. – Vol. 91. – P. 179–184. DOI: 10.21236/ad0299868.
145. Lawton, W.D. Immunization against plague by a specific fraction of *Pasteurella pseudotuberculosis* / W.D. Lawton, M.J. Surgalla // *J. Infect. Dis.* – 1963B. – Vol. 113. – P. 39–42. DOI: 10.1093/infdis/113.1.39.
146. Lawton, W.D. Studies on the antigens of *Pasteurella pestis* and *Pasteurella pseudotuberculosis* / W.D. Lawton, G.M. Fukui, M.J. Surgalla // *J. Immunol.* – 1950. – Vol. 84. – P. 475–479.
147. Lee-Lewis, H. Absence of inflammation and pneumonia during infection with nonpigmented *Yersinia pestis* reveals a new role for the *pgm* locus in pathogenesis / H. Lee-Lewis, D.M. Anderson // *Infection and immunity*. – 2010. – Vol. 78. – No. 1. – P. 220-230. DOI: 10.1128/IAI.00559-09.

148. Leroux-Roels, G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response / G. Leroux-Roels // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – P. C25-C36.
149. Li, B. Antibody profiling in plague patients by protein microarray / B. Li, D. Zhou, Z. Wang, Z. Song, H. Wang, M. Li, X. Dong, M. Wu, Z. Guo, R. Yang // *Microbes Infect.* – 2008. – Vol. 10. – P. 45–51. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.10.003.
150. Li, B. Protein microarray for profiling antibody responses to *Yersinia pestis* live vaccine / B. Li, L. Jiang, Q. Song, J. Yang, Z. Chen, Z. Guo, D. Zhou, Z. Du, Y. Song, J. Wang, H. Wang, Sh. Yu, J. Wang, R. Yang // *Infect. Immun.* – 2005. – Vol. 73. – P. 3734–3739. DOI: 10.1128/IAI.73.6.3734-3739.2005.
151. Li, L.X. Preparation and experimental immunity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ghost vaccine / L.X. Li, L. Lei, S. Zhang, W. Han, W. Wang // *Chinese Journal of Veterinary Science*. – 2012. – Vol. 32. – No. 10. – P. 1461-1467.
152. Liu, G. Efficacy of immune responses induced by anti-caries DNA vaccine-loaded bacterial ghost in mice / G. Liu, M. Fan, J. Guo // *Zhonghua kou Qiang yi xue za zhi= Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi= Chinese Journal of Stomatology*. – 2014. – Vol. 49. – No. 1. – P. 37-41.
153. Liu, J. Immune responses and protection induced by *Brucella suis* S2 bacterial ghosts in mice / J. Liu, Y. Li, Y. Sun, X. Ji, L. Zhu, X. Guo, W. Zhou, B. Zhou, S. Liu, R. Zhang, S. Feng // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2015. – Vol. 166. – No. 3-4. – P. 138-144. DOI: 10.1016/j.vetimm.2015.04.008.
154. Liu, L. A safety and immunogenicity study of a novel subunit plague vaccine in cynomolgus macaques / L. Liu, D. Wei, Z. Qu, L. Sun, Y. Miao, Y. Yang, J. Lu, W. Du, B. Wang, B. Li // *J. Appl. Toxicol.* – 2018. – Vol. 38. – P. 408–417. DOI: 10.1002/jat.3550.
155. Lv, M.N. Immunogenicity of bacterial ghosts from *Escherichia coli* O78 isolated from ducklings / M. Lv, Z. Qin, J. Yu, J. Yuan, M. Sun, C. Wu, J. Cai // *Zhongguo Yufang Shouyi Xuebao/Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*. – 2010. – Vol. 32. – No. 9. – P. 712-715.
156. Lv, Y. Antimicrobial properties and membrane-active mechanism of a potential α -helical antimicrobial derived from cathelicidin PMAP-36 / Y. Lv, J. Wang, H. Gao, Z. Wang, N. Dong, Q. Ma, A. Shan // *PloS one*. – 2014. – Vol. 9. – No. 1. – P. e86364. DOI: 10.1371/journal.pone.0086364.

157. Marchart, J. *Pasteurella multocida*-and *Pasteurella haemolytica*-ghosts: new vaccine candidates / J. Marchart, G. Dropmann, S. Lechleitner, T. Schlapp, G. Wanner, M.P. Szostak, W. Lubitz // *Vaccine*. – 2003. – Vol. 21. – No. 25-26. – P. 3988-3997. DOI: 10.1016/s0264-410x(03)00383-9.
158. Marchart, J. Protective immunity against pasteurellosis in cattle, induced by *Pasteurella haemolytica* ghosts / J. Marchart, M. Rehagen, G. Dropmann, M.P. Szostak, S. Alldinger, S. Lechleitner, T. Schlapp, S. Resch, W. Lubitz // *Vaccine*. – 2003. – Vol. 21. – No. 13-14. – P. 1415-1422. DOI: 10.1016/s0264-410x(02)00635-7.
159. Mayr, U.B. Rectal single dose immunization of mice with *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts induces efficient humoral and cellular immune responses and protects against the lethal heterologous challenge / U.B. Mayr, P. Kudela, A. Atrasheuskaya, E. Bukin, G. Ignatyev, W. Lubitz // *Microbial biotechnology*. – 2012. – Vol. 5. – No. 2. – P. 283-294. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00316.x.
160. McAleer, J.P. Educating CD4 T cells with vaccine adjuvants: lessons from lipopolysaccharide / J.P. McAleer, A.T. Vella // *Trends in immunology*. – 2010. – Vol. 31. – No. 11. – P. 429-435. DOI: 10.1016/j.it.2010.08.005.
161. Mellado-Sanchez, G. Characterization of systemic and pneumonic murine models of plague infection using a conditionally virulent strain / G. Mellado-Sanchez, K. Ramirez, C.B. Drachenberg, J. Diaz-McNair, A.L. Rodriguez, J.E. Galen, J.P. Nataro, M.F. Pasetti // *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. – 2013. – Vol. 36. – No. 2. – P. 113-128. DOI: 10.1016/j.cimid.2012.10.005.
162. Mendel, S. Interaction of the transmembrane domain of lysis protein E from bacteriophage ϕ X174 with bacterial translocase MraY and peptidyl-prolyl isomerase SlyD / S. Mendel, J.M. Holbourn, J.A. Schouten, T.D.H. Bugg // *Microbiology*. – 2006. – Vol. 152. – No. 10. – P. 2959-2967. DOI: 10.1099/mic.0.28776-0.
163. Meyer, K.F. Effectiveness of live or killed plague vaccines in man / K.F. Meyer // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1970. – Vol. 42. – No. 5. – P. 653.
164. Miao, E.A. TLR₅ and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system / E.A. Miao, E. Andersen-Nissen, S.E. Warren, A. Aderem // *Seminars in immunopathology*. – 2007. – Vol. 29. – P. 275-288. DOI: 10.1007/s00281-007-0078-z.
165. Michalek, J. Oncolysate-loaded *Escherichia coli* bacterial ghosts enhance the stimulatory capacity of human dendritic cells / J. Michalek, R. Hezova, P. Turanek-

Knötigova, J. Gabkova, M. Strioga, W. Lubitz, P. Kudela // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2017. – Vol. 66. – P. 149-159. DOI: 10.1007/s00262-016-1932-4.

166. Montanaro, J. *Escherichia coli* Nissle 1917 bacterial ghosts retain crucial surface properties and express chlamydial antigen: an imaging study of a delivery system for the ocular surface / J. Montanaro, A. Inic-Kanada, A. Ladurner, E. Stein, S. Belij, N. Bintner, S. Schlacher, N. Schuerer, U.B. Mayr, W. Lubitz, N. Leisch, T. Barisani-Asenbauer // *Drug Design, Development and Therapy*. – 2015. – T. 9. – C. 3741. DOI: 10.2147/DDDT.S84370.

167. Moon, J.Y. Protective efficacy of a *Salmonella Typhimurium* ghost vaccine candidate constructed with a recombinant lysozyme-PMAP36 fusion protein in a murine model / J.Y. Moon, S.Y. Kim, W.K. Kim, Z. Rao, J.H. Park, J.Y. Mun, B. Kim, H.S. Choi, J. Hur // *Canadian Journal of Veterinary Research*. – 2017. – Vol. 81. – No. 4. – P. 297-303.

168. Moyer, T.J. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines / T.J. Moyer, A.C. Zmolek, D.J. Irvine // *The Journal of clinical investigation*. – 2016. – Vol. 126. – No. 3. – P. 799-808. DOI: 10.1172/JCI81083.

169. Muhammad, A. Bacterial ghosts as carriers of protein subunit and DNA-encoded antigens for vaccine applications / A. Muhammad, J. Champeimont, U.B. Mayr, W. Lubitz, P. Kudela // *Expert review of vaccines*. – 2012. – Vol. 11. – No. 1. – P. 97-116. DOI: 10.1586/erv.11.149.

170. Muhammad, A. Subcutaneous immunization of dogs with *Bordetella bronchiseptica* bacterial ghost vaccine / A. Muhammad, J. Kassmannhuber, M. Rauscher, A.A. Falcon, D.W. Wheeler, A.A. Zhang, P. Lubitz, W. Lubitz // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1377. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01377.

171. Nakayama, K. Construction of an Asd⁺ expression-cloning vector: stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain / K. Nakayama, S.M. Kelly, R. Curtiss // *Bio/technology*. – 1988. – Vol. 6. – No. 6. – P. 693-697.

172. Nazarova, E.L. Genetic Markers of Immune Response to *Yersinia pestis* F1 and V Antigens–Loaded Microspheres Vaccine Against Plague / E.L. Nazarova, I.A. Dyatlov, N.M. Pozdeev, V.T. Demyanova, I.V. Paramonov, A.V. Rylov, M.V. Khramov, A.I. Borzilov, A.N. Somov, V.G. Ablamunits, A.P. Anisimov. // *Russ. Biomed. Res*. – 2017. – Vol. 2. – No.2. – P.19–28.

173. Palm-Apergi, C. A new rapid cell-penetrating peptide based strategy to produce bacterial ghosts for plasmid delivery / C. Palm-Apergi, M. Hällbrink // Journal of controlled release. – 2008. – Vol. 132. – No. 1. – P. 49-54. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.08.011.

174. Panthel, K. Generation of *Helicobacter pylori* ghosts by PhiX protein E-mediated inactivation and their evaluation as vaccine candidates / K. Panthel, W. Jechlinger, A. Matis, M. Rohde, M. Szostak, W. Lubitz, R. Haas // Infection and immunity. – 2003. – Vol. 71. – No. 1. – P. 109-116. DOI: 10.1128/IAI.71.1.109-116.2003.

175. Parent, M.A. Gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide synthase 2, key elements of cellular immunity, perform critical protective functions during humoral defense against lethal pulmonary *Yersinia pestis* infection / M.A. Parent, L.B. Wilhelm, L.W. Kummer, F.M. Szaba, I.K. Mullarky, S.T. Smiley // Infection and Immunity. – 2006. – Vol. 74. – No. 6. – P. 3381-3386. DOI: 10.1128/IAI.00185-06.

176. Paton, A.W. Protection against shiga-toxigenic *Escherichia coli* by non-genetically modified organism receptor mimic bacterial ghosts / A.W. Paton, A.Y. Chen, H. Wang, L.J. McAllister, F. Höggerl, U.B. Mayr, L.K. Shewell, M.P. Jennings, R. Morona, W. Lubitz, J.C. Paton // Infection and Immunity. – 2015. – Vol. 83. – No. 9. – P. 3526-3533. DOI: 10.1128/IAI.00669-15.

177. Paukner, S. Bacterial ghosts as a novel advanced targeting system for drug and DNA delivery / S. Paukner, T. Stiedl, P. Kudela, J. Bizik, F. Al Laham, W. Lubitz // Expert opinion on drug delivery. – 2006. – Vol. 3. – No. 1. – P. 11-22. DOI: 10.1517/17425247.3.1.11.

178. Peng, W. *Salmonella enteritidis* ghost vaccine induces effective protection against lethal challenge in specific-pathogen-free chicks / W. Peng, W. Si, L. Yin, H. Liu, S. Yu, S. Liu, C. Wang, Y. Chang, Z. Zhang, S. Hu, Y. Du // Immunobiology. – 2011. – Vol. 216. – No. 5. – P. 558-565. DOI: 10.1016/j.imbio.2010.10.001.

179. Perry, R.D. Iron and heme uptake systems / R.D. Perry, J.D. Fetherston // *Yersinia: Molecular and Cellular Biology*. – 2004. – P. 257-283.

180. Piras, V. Beyond MyD88 and TRIF pathways in Toll-like receptor signaling / V. Piras, K. Selvarajoo // Frontiers in immunology. – 2014. – Vol. 5. – P. 70. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00070.

181. Qian, J. A safe and molecular-tagged *Brucella canis* ghosts confers protection against virulent challenge in mice / J. Qian, Z. Bu, X. Lang, G. Yan, Y. Yang, X. Wang, X.

Wang // Veterinary microbiology. – 2017. – Vol. 204. – P. 121-128. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.04.027.

182. Quenee, L.E. Plague in guinea pigs and its prevention by subunit vaccines / L.E. Quenee, N. Ciletti, B. Berube, T. Krausz, D. Elli, T. Hermanas, O. Schneewind // The American journal of pathology. – 2011B. – Vol. 178. – No. 4. – P. 1689-1700. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.12.028.

183. Quenee, L.E. Prevention of pneumonic plague in mice, rats, guinea pigs and non-human primates with clinical grade rV10, rV10-2 or F1-V vaccines / L.E. Quenee, N.A. Ciletti, D. Elli, T.M. Hermanas, O. Schneewind // Vaccine. – 2011A. – Vol. 29. – No. 38. – P. 6572-6583. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.06.119.

184. Rabea, S. A novel protocol for bacterial ghosts' preparation using tween 80 / S. Rabea, M.M. Salem-Bekhit, F.K. Alanazi, A.S. Yassin, N.A. Moneib, A.E.M. Hashem // Saudi Pharmaceutical Journal. – 2018. – Vol. 26. – No. 2. – P. 232-237. DOI: 10.1016/j.jsps.2017.12.006.

185. Ramos, H.C. Conservation of flagellin detection systems in plants and mammals / H.C. Ramos, M. Rumbo, J.C. Sirard // Trends in Microbiology. – 2004. – Vol. 11. – No. 12. – P. 509-517. DOI: 10.1016/j.tim.2004.09.002.

186. Ran, X. Generation of porcine *Pasteurella multocida* ghost vaccine and examination of its immunogenicity against virulent challenge in mice / X. Ran, X.Z. Meng, H.L. Geng, C. Chang, X. Chen, X. Wen, H. Ni // Microbial pathogenesis. – 2019. – Vol. 132. – P. 208-214. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.04.016.

187. Ran, X. Preparation of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) ghosts and immunogenic analysis in a mouse model / X. Ran, X. Chen, S. Wang, C. Chang, X. Wen, J. Zhai, H. Ni // Microbial pathogenesis. – 2019. – Vol. 126. – P. 224-230. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.11.015.

188. Razim, A. Identification of linear epitopes on the flagellar proteins of *Clostridioides difficile* / A. Razim, K. Pacyga, P. Naporowski, D. Martynowski, A. Szuba, A. Gamian, S. Górska // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11. – No. 1. – P. 1-13. DOI: 10.1038/s41598-021-89488-7.

189. Roggenkamp, A. Passive immunity to infection with *Yersinia* spp. mediated by anti-recombinant V antigen is dependent on polymorphism of V antigen / A. Roggenkamp,

A.M. Geiger, L. Leitritz, A. Kessler, J. Heesemann // *Infect. Immun.* – 1997. – Vol. 65. – P. 446–451. DOI: 10.1128/IAI.65.2.446-451.1997.

190. Rosenzweig, J.A. Progress on plague vaccine development / J.A. Rosenzweig, O. Jejelowo, J. Sha, T.E. Erova, S.M. Brackman, M.L. Kirtley, C.J. van Lier, A.K. Chopra // *Applied microbiology and biotechnology.* – 2011. – Vol. 91. – P. 265-286. DOI: 10.1007/s00253-011-3380-6.

191. Russel, M. Filamentous phage assembly / M. Russel // *Molecular microbiology.* – 1991. – Vol. 5. – No. 7. – P. 1607-1613. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb01907.x.

192. Schlehuber, L.D. Towards ambient temperature-stable vaccines: the identification of thermally stabilizing liquid formulations for measles virus using an innovative high-throughput infectivity assay / L.D. Schlehuber, I.J. McFadyen, Y. Shu, J. Carignan, W.P. Duprex, W.R. Forsyth, J.C. Alvarez // *Vaccine.* – 2011. – Vol. 29. – No. 31. – P. 5031-5039.

193. Scocchi, M. Structural aspects and biological properties of the cathelicidin PMAP-36 / M. Scocchi, I. Zelezetsky, M. Benincasa, R. Gennaro, A. Mazzoli, A. Tossi // *The FEBS journal.* – 2005. – Vol. 272. – No. 17. – P. 4398-4406. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04852.x.

194. Senevirathne, A. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ghosts displaying a surface FliC adjuvant elicit a robust immune response and effective protection against virulent challenge / A. Senevirathne, C. Hewawaduge, J.H. Lee // *Veterinary microbiology.* – 2020. – Vol. 243. – P. 108633. DOI: 10.1016/j.vetmic.2020.108633.

195. Sheweita, S.A. A new strain of *Acinetobacter baumannii* and characterization of its ghost as a candidate vaccine / S.A. Sheweita, A.M. Batah, A.A. Ghazy, A. Hussein, A.A. Amara // *Journal of infection and public health.* – 2019. – Vol. 12. – No. 6. – P. 831-842. DOI: 10.1016/j.jiph.2019.05.009.

196. Si, W. A bacterial ghost improves the immunological efficacy of a Newcastle disease virus inactivated vaccine / W. Si, S. Yu, H. Liu, C. Wang, L. Chen, G. Wang, J. Wu, S. Liu // *Veterinary microbiology.* – 2017. – Vol. 203. – P. 189-195. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.02.018.

197. Si, W. Passive protection against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection from maternally derived antibodies of hens vaccinated with a ghost vaccine / W.

Si, S. Yu, L. Chen, X. Wang, W. Zhang, S. Liu, G. Li // Research in Veterinary Science. – 2014. – Vol. 97. – No. 2. – P. 191-193. DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.08.001.

198. Singh, A.K. Oral vaccination with live attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* strains delivering a FliC180-LcrV fusion antigen confers protection against pulmonary *Y. pestis* infection / A.K. Singh, X. Wang, W. Sun // Vaccine. – 2020. – Vol. 38. – P. 3720–3728. DOI: 10.1016/j.vaccine.2020.03.055.

199. Spivack, M.L. The immune response of the guinea pig to the antigens of *Pasteurella pestis* / M.L. Spivack, L. Foster, A. Larson, T.H. Chen, E.E. Baker, K.F. Meyer // J. Immunol. – 1958. Vol. –80. – P. 132–141.

200. Starks, A.M. Pathogenesis of infection by clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice / A.M. Starks, T.R. Schoeb, M.L. Tamplin, S. Parveen, T.J. Doyle, P.E. Bomeisl, G.M. Escudero, P.A. Gulig // Infection and immunity. – 2000. – Vol. 68. – No. 10. – P. 5785-5793. DOI: 10.1128/iai.68.10.5785-5793.2000.

201. Sumathi, B. Construction of *Brucella melitensis* ghost as a putative vaccine candidate against re-emerging disease–Brucellosis / B. Sumathi, B. Veeregowda, S. Byregowda, D. Rathnamma, S. Rajeswari, S. Isloor, M. Sobharani, M. Venkatesha, H. Narayanaswamy // International Journal of Infectious Diseases. – 2020. – Vol. 101. – P. 475-476. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.09.1245.

202. Sun, W. Plague vaccine: Recent progress and prospects / W. Sun, A.K. Singh // NPJ vaccines. – 2019. – Vol. 4. – No. 11. – P. 1–11. DOI: 10.1038/s41541-019-0105-9.

203. Szostak, M.P. Bacterial ghosts: non-living candidate vaccines / M.P. Szostak, A. Hensel, F.O. Eko, R. Klein, T. Auer, H. Mader, A. Haslberger, S. Bunka, G. Wanner, W. Lubitz // Journal of biotechnology. – 1996. – Vol. 44. – No. 1-3. – P. 161-170. DOI: 10.1016/0168-1656(95)00123-9.

204. Talebkhan, Y. *Helicobacter pylori* bacterial ghost containing recombinant Omp18 as a putative vaccine / Y. Talebkhan, M. Bababeik, M. Esmaili, A. Oghalaei, S. Saberi, Z. Karimi, N. Afkhami, M. Mohammadi // Journal of microbiological methods. – 2010. – Vol. 82. – No. 3. – P. 334-337. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.07.001

205. Taylor, A. Bacteriophage λ lysis gene product modified and inserted into *Escherichia coli* outer membrane: Rz1 lipoprotein / A. Taylor, S. Kedzierska, A. Wawrzynów // Microbial Drug Resistance. – 1996. – Vol. 2. – No. 1. – P. 147-153. DOI: 10.1089/mdr.1996.2.147.

206. Tian, Q. Construction of *Salmonella Pullorum* ghost by co-expression of lysis gene E and the antimicrobial peptide SMAP29 and evaluation of its immune efficacy in specific-pathogen-free chicks / Q. Tian, W. Zhou, W. Si, F. Yi, X. Hua, M. Yue, L. Chen, S. Liu, S. Yu // Journal of integrative agriculture. – 2018. – Vol. 17. – No. 1. – P. 197-209. DOI: 10.1016/S2095-3119(17)61696-4.
207. Tough, D.F. T cell stimulation *in vivo* by lipopolysaccharide (LPS) / D.F. Tough, S. Sun, J. Sprent // The Journal of experimental medicine. – 1997. – Vol. 185. – No. 12. – P. 2089-2094. DOI: 10.1084/jem.185.12.2089
208. Trombetta, E.S. Cell biology of antigen processing *in vitro* and *in vivo* / E.S. Trombetta, I. Mellman // Annu. Rev. Immunol. – 2005. – Vol. 23. – P. 975-1028. DOI: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538.
209. Tu, F.P. Effect of oral immunization with *Aeromonas hydrophila* ghosts on protection against experimental fish infection / F.P. Tu, W.H. Chu, X.Y. Zhuang, C.P. Lu // Letters in Applied Microbiology. – 2010. – Vol. 50. – No. 1. – P. 13-17. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02746.x.
210. Verma, S.K. Plague vaccine development: Current research and future trends / S.K. Verma, U. Tuteja // Front. Immunol. – 2016. – Vol. 7. – P. 1 – 8. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00602.
211. Vetter, V. Understanding modern-day vaccines: what you need to know / V. Vetter, G. Denizer, L.R. Friedland, J. Krishnan, M. Shapiro // Annals of medicine. – 2018. – Vol. 50. – No. 2. – P. 110-120. DOI: 10.1080/07853890.2017.1407035.
212. Vilte, D.A. A systemic vaccine based on *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts (BGs) reduces the excretion of *E. coli* O157:H7 in calves / D.A. Vilte, M. Larzábal, U.B. Mayr, S. Garbaccio, M. Gammella, B.C. Rabinovitz, F. Delgado, V. Meikle, R.J. Cantet, P. Lubitz, W. Lubitz, A. Cataldi, E.C. Mercado // Veterinary Immunology and Immunopathology. – 2012. – Vol. 146. – No. 2. – P. 169-176. DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.03.002.
213. Vinod, N. Generation of a novel *Staphylococcus aureus* ghost vaccine and examination of its immunogenicity against virulent challenge in rats / N. Vinod, S. Oh, H.J. Park, J.M. Koo, C.W. Choi, S.C. Kim // Infection and immunity. – 2015. – Vol. 83. – No. 7. – P. 2957-2965. DOI: 10.1128/IAI.00009-15.

214. Wake, A. The effect of an iron drug on host response to experimental plague infection / A. Wake, H. Morita, M. Yamamoto // Japanese Journal of Medical Science and Biology. – 1972. – Vol. 25. – No. 2. – P. 75-84. DOI: 10.7883/yoken1952.25.75.

215. Walker, R.V. Studies on the immune response of guinea pigs to the envelope substance of *Pasteurella pestis*. I. Fluorescent antibody studies of cellular and tissue response in mice and guinea pigs to large doses of fraction I / R.V. Walker // J. Immunol. – 1962A. – Vol. 88. – P. 155–163.

216. Walker, R.V. Studies on the immune response of guinea pigs to the envelope substance of *Pasteurella pestis*. II. Fluorescent antibody studies of cellular and tissue response in mice and guinea pigs to large doses of fraction I / R.V. Walker // J. Immunol. – 1962B. – Vol. 88. – P. 164–173.

217. Walker, R.V. Studies on the Immune Response of Guinea Pigs to the Envelope Substance of *Pasteurella Pestis*: III. Immunounresponsiveness to High Concentrations of Fraction I in Oil // The Journal of Immunology. – 1962C. – Vol. 88. – No. 2. – P. 174-183.

218. Wang, I.N. Holins, the protein clocks of bacteriophage infections / I.N. Wang, D.L. Smith, R. Young // Ann. Rev. Microbiol. – 2000. – Vol. 54. – P. 799-825. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.799.

219. Wang, Q. Generation of a novel *Streptococcus agalactiae* ghost vaccine and examination of its immunogenicity against virulent challenge in tilapia / Q. Wang, X. Wang, X. Wang, R. Feng, Q. Luo, J. Huang // Fish & shellfish immunology. – 2018. – Vol. 81. – P. 49-56. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.06.055.

220. Wang, R. Generation and use of *Edwardsiella ictaluri* ghosts as a vaccine against enteric septicemia of catfish (ESC) / R.H. Wang, T.Y. Xiao, L.B. Zeng, X.Y. Liu, Y. Zhou, J. Ma // Aquaculture. – 2016. – Vol. 456. – P. 9-15. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.01.017.

221. Wang, S. A safe non-toxic *Brucella abortus* ghosts induce immune responses and confer protection in BALB/c mice / S. Wang, Z. Li, J. Zhang, L. Xi, Y. Cui, W. Zhang, J. Zhang, H. Zhang // Molecular Immunology. – 2020. – Vol. 124. – P. 117-124. DOI: 10.1016/j.molimm.2020.06.002.

222. Wang, X. Induction of protective antiplague immune responses by self-adjuvanting bionanoparticles derived from engineered *Yersinia pestis* / X. Wang, A.K. Singh,

X. Zhang, W. Sun // *Infection and immunity*. – 2020. – Vol. 88. – No. 5. – P. e00081-20. DOI: 10.1128/IAI.00081-20.

223. Wang, X. Mice orally vaccinated with *Edwardsiella tarda* ghosts are significantly protected against infection / X. Wang, C. Lu // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27. – No. 10. – P. 1571-1578. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.01.002.

224. Warshakoon, H.J. Potential adjuvant properties of innate immune stimuli / H.J. Warshakoon, J.D. Hood, M.R. Kimbrell, S. Malladi, W.Y. Wu, N. Shukla, G. Agnihotri, D. Sil, S.A. David // *Human vaccines*. – 2009. – Vol. 5. – No. 6. – P. 381-394. DOI: 10.4161/hv.5.6.8175.

225. Wen, J. Updating the NLRC₄ inflammasome: from bacterial infections to autoimmunity and cancer / J. Wen, B. Xuan, Y. Liu, L. Wang, L. He, X. Meng, T. Zhou, Y. Wang // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 702527. DOI: 10.3389/fimmu.2021.702527.

226. Witte, A. Dynamics of PhiX174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli* / A. Witte, G. Wanner, M. Sulzner, W. Lubitz // *Archives of microbiology*. – 1992. – Vol. 157. – P. 381-388. DOI: 10.1007/BF00248685.

227. Witte, A. Endogenous transmembrane tunnel formation mediated by phiX174 lysis protein E / A. Witte, G. Wanner, U. Bläsi, G. Halfmann, M. Szostak, W. Lubitz // *J. Bacteriol.* – 1990. Vol. 172. – No.7. – P. 4109-14. DOI: 10.1128/jb.172.7.4109-4114.1990.

228. Witte, A. PhiX174 protein E-mediated lysis of *Escherichia coli* / A. Witte, U. Bläsi, G. Halfmann, M. Szostak, G. Wanner, W. Lubitz // *Biochimie*. – 1990. – Vol. 72. – No. 2-3. – P. 191-200. DOI: 10.1016/0300-9084(90)90145-7.

229. Won, G. A novel approach for construction of an inactivated typhoid vaccine candidate that effectively augments both humoral and cellular immune responses / G. Won, B. Kim, J.H. Lee // *Vaccine*. – 2017. – Vol. 35. – No. 25. – P. 3333-3341. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.04.084.

230. Won, G. A novel method to generate *Salmonella* Typhi Ty21a ghosts exploiting the λ phage holin-endolysin system / G. Won, B. Kim, J.H. Lee // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – No. 29. – P. 48186. DOI: 10.18632/oncotarget.18383.

231. Won, G. A novel *Salmonella* strain inactivated by a regulated autolysis system and expressing the B subunit of Shiga toxin 2e efficiently elicits immune responses and confers protection against virulent Stx2e-producing *Escherichia coli* / G. Won, T.H. Kim,

J.H. Lee // BMC Veterinary Research. – 2016. – Vol. 13. – P. 1-11. DOI: 10.1186/s12917-017-0962-2.

232. Won, G. A *Salmonella* Typhi ghost induced by the *E* gene of phage ϕ X174 stimulates dendritic cells and efficiently activates the adaptive immune response / G. Won, S. Eo, S. Park, J. Hur, J. Lee // Journal of Veterinary Science. – 2018. – Vol. 19. – No. 4. – P. 536-542. DOI: 10.4142/jvs.2018.19.4.536.

233. Won, G. F18+ *Escherichia coli* flagellin expression in *Salmonella* has immunoadjuvant effects in a ghost vaccine candidate containing *E. coli* Stx2eB, FedF and FedA against porcine edema disease / G. Won, J.H. Lee // Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. – 2018. – Vol. 58. – P. 44-51. DOI: 10.1016/j.cimid.2018.08.003.

234. Won, G. Improved lysis efficiency and immunogenicity of *Salmonella* ghosts mediated by co-expression of λ phage holin-endolysin and ϕ X174 gene E / G. Won, I.A. Hajam, J.H. Lee // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – No. 1. – P. 45139. DOI: 10.1038/srep45139.

235. Won, G. Multifaceted immune responses and protective efficacy elicited by a recombinant autolyzed *Salmonella* expressing FliC flagellar antigen of F18+ *Escherichia coli* / G. Won, J.H. Lee // Vaccine. – 2016a. – Vol. 34. – No. 50. – P. 6335-6342. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.10.066.

236. Won, G. Potent immune responses induced by a *Salmonella* ghost delivery system that expresses the recombinant Stx2eB, FedF, and FedA proteins of the *Escherichia coli*-producing F18 and Shiga toxin in a murine model and evaluation of its protective effect as a porcine vaccine candidate / G. Won, J.H. Lee // Veterinary Quarterly. – 2017a. – Vol. 37. – No. 1. – P. 81-90. DOI: 10.1080/01652176.2017.1308040.

237. Worsham, P.L. Construction of defined F1 negative mutants of virulent *Yersinia pestis* / P.L. Worsham, M.P. Stein, S.L. Welkos // Contributions to microbiology and immunology. – 1995. – Vol. 13. – P. 325-328.

238. Wu, X. Production of bacterial ghosts from Gram-positive pathogen *Listeria monocytogenes* / X. Wu, X. Ju, L. Du, J. Yuan, L. Wang, R. He, Z. Chen // Foodborne pathogens and disease. – 2017. – Vol. 14. – No. 1. – P. 1-7. DOI: 10.1089/fpd.2016.2184.

239. Xia, P. Research progress on Toll-like receptor signal transduction and its roles in antimicrobial immune responses / P. Xia, Y. Wu, S. Lian, L. Yan, X. Meng, Q. Duan, G.

Zhu // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2021. – Vol. 105. – P. 5341-5355. DOI: 10.1007/s00253-021-11406-8.

240. Xia, S.L. Enhanced protective immunity of the chimeric vector-based vaccine rAdV-SFV-E2 against classical swine fever in pigs by a *Salmonella* bacterial ghost adjuvant / S. Xia, J. Lei, M. Du, Y. Wang, X. Cong, G. Xiang, L. Li, S. Yu, E. Du, S. Liu, Y. Sun, H. Qiu // Veterinary Research. – 2016. – Vol. 47. – P. 1-7. DOI: 10.1186/s13567-016-0346-9.

241. Yan, M. Different concentrations of *Edwardsiella tarda* ghost vaccine induces immune responses in vivo and protects *Sparus macrocephalus* against a homologous challenge / M. Yan, J. Liu, Y. Li, X. Wang, H. Jiang, H. Fang, Z. Guo, Y. Sun // Fish & shellfish immunology. – 2018. – Vol. 80. – P. 467-472. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.06.034.

242. Yazdanpanah, Y. Efficacy trials of Plague Vaccines: Endpoints, trial design, site selection / Y. Yazdanpanah // Proceedings of the WHO Workshop. – 2018.

243. Yi, K. Development and evaluation of an improved mouse model of meningococcal colonization / K. Yi, D.S. Stephens, I. Stojiljkovic // Infection and immunity. – 2003. – Vol. 71. – No. 4. – P. 1849-1855. DOI: 10.1128/iai.71.4.1849-1855.2003.

244. Young, R.Y. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation / R.Y. Young // Microbiological reviews. – 1992. – Vol. 56. – No. 3. – P. 430-481. DOI: 10.1128/mr.56.3.430-481.1992.

245. Young, R.Y. Phages will out: strategies of host cell lysis / R.Y. Young, N. Wang, W.D. Roof // Trends in microbiology. – 2000. – Vol. 8. – No. 3. – P. 120-128. DOI: 10.1016/s0966-842x(00)01705-4.

246. Yu, H. Flagellin/TLR₅ responses induce mucus hypersecretion by activating EGFR via an epithelial cell signaling cascades / H. Yu, X. Zhou, S. Wen, Q. Xiao // Experimental cell research. – 2012. – Vol. 318. – No. 6. – P. 723-731. DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.12.016.

247. Yu, S. Enhancement of bacteriolysis of Shuffled phage PhiX174 gene *E* / S.Y. Yu, W. Peng, W. Si, L. Yin, S.G. Liu, H.F. Liu, H.L. Zhao, C.L. Wang, Y.H. Chang, Y.Z. Lin // Virology Journal. – 2011. – Vol. 8. – P. 1-6. DOI: 10.1186/1743-422X-8-206.

248. Zariri, A. Biosynthetically engineered lipopolysaccharide as vaccine adjuvant / A. Zariri, P. van der Ley // Expert review of vaccines. – 2015. – Vol. 14. – No. 6. – P. 861-876. DOI: 10.1586/14760584.2015.1026808.

249. Zeng, L. Mucosal adjuvants: Opportunities and challenges / L. Zeng // Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2016. – Vol. 12. – No. 9. – P. 2456-2458. DOI: 10.1080/21645515.2016.1181236.

250. Zhang, C. Bacterial ghost as delivery vehicles loaded with DNA vaccine induce significant and specific immune responses in common carp against spring viremia of carp virus / C. Zhang, Z. Zhao, J. Li, K.G. Song, K. Hao, J. Wang, B. Zhu // Aquaculture. – 2019. – Vol. 504. – P. 361-368. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.02.021.

251. Zhang, X. An auto-inducible *Escherichia coli* lysis system controlled by magnesium / X. Zhang, Z. Pan, Q. Fang, J. Zheng, M. Hu, X. Jiao // Journal of microbiological methods. – 2009. – Vol. 79. – No. 2. – P. 199-204. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.09.001.

252. Zhang, X. Isolation and characterization of a novel virulent phage of *Lactobacillus casei* ATCC 393 / X. Zhang, Y. Lan, W. Jiao, Y. Li, L. Tang, Y. Jiang, W. Cui, X. Qiao // Food and environmental virology. – 2015. – Vol. 7. – P. 333-341. DOI: 10.1007/s12560-015-9206-4.

253. Zhang, X. Toll-like receptor 4-related immunostimulatory polysaccharides: Primary structure, activity relationships, and possible interaction models / X. Zhang, C. Qi, Y. Guo, W. Zhou, Y. Zhang // Carbohydrate polymers. – 2016. – Vol. 149. – P. 186-206. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.04.097.

254. Zhu, W. Efficient production of safety-enhanced *Escherichia coli* ghosts by tandem expression of PhiX 174 mutant gene E and staphylococcal nuclease A gene / W. Zhu, Y. Zhang, X. Liu // Microbiological Research. – 2015. – Vol. 176. – P. 7-13. DOI: 10.1016/j.micres.2015.03.011.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

а) статьи в рецензируемых журналах:

1. **Вагайская, А.С.** Моделирование экспериментальной чумы в условиях лаборатории уровня биобезопасности 2 / **А.С. Вагайская**, А.С. Трунякова, Т.И. Комбарова, С.В. Дентовская // Проблемы особо опасных инфекций. – 2021. – №. 4. – С. 46–53. **Scopus**;
2. Dentovskaya, S.V. Peptidoglycan-free bacterial ghosts confer enhanced protection against *Yersinia pestis* infection / S.V. Dentovskaya, **A.S. Vagaiskaya**, M.E. Platonov, A.S. Trunyakova, S.A. Kotov, E.A. Krasil'nikova, G.M. Titareva, E.M. Mazurina, T.V. Gapel'chenkova, R.Z. Shaikhutdinova, S.A. Ivanov, T.I. Kombarova, V.N. Gerasimov, V.N. Uversky, A.P. Anisimov // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 10. – No. 1. – P. 51. DOI: 10.3390/vaccines10010051. **WoS Q1**;
3. Дентовская, С.В. К вопросу о критериях перевода аттенуированных штаммов *Yersinia pestis* из I в III группу патогенности (опасности) / С.В. Дентовская, А.С. Трунякова, **А.С. Вагайская**, М.Е. Платонов, Е.А. Тюрин, А.П. Анисимов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022 г. - № 2. – С. 20-26. **Scopus**;
4. Платонов, М.Е. Эффективность фаговых литических ферментов при получении бактериальных теней / М.Е. Платонов, **А.С. Вагайская**, А.С. Трунякова, Д.В. Гриненко, В.Н. Герасимов, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2022. – Т 40. – № 3. – С. 26-31 **WoS**;
5. Вагайская, А.С. Бактериальные тени возбудителей особо опасных инфекций / А.С. Вагайская, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023. – № 1. – С. 17-26. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-17-26. **Scopus**;

б) тезисы научных конференций

6. Дентовская, С.В. Протективная активность «бактериальных теней» *Yersinia pestis* / С.В. Дентовская, М.Е. Платонов, **А.С. Вагайская**, А.С. Трунякова, С.А. Иванов, А.П. Анисимов // Материалы XIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И.Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» IV Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» VI Всероссийского

- симпозиума «Папилломавирусная инфекция и рак: эпидемиология, диагностика, вакцинопрофилактика». 2021. С. 184.
7. Anisimov, A.P. *Yersinia pestis* bacterial ghosts / A.P. Anisimov, M.E. Platonov, **A.S. Vagaïskaya**, T.V. Gapel'chenkova, S.A. Ivanov, R.Z. Shaikhutdinova, A.S. Trunyakova, V.N. Gerasimov, S.V. Dentovskaya // Abstract book of the 24th International Scientific Conference “Current issues on zoonotic diseases” dedicated to the 90th anniversary of the National Center for Zoonotic Diseases. Editor-in-chief: N.Tsogbadrakh. NCZD Ulaanbaatar. 2021. P. 15.
 8. **Вагаïская, А.С.** Оценка протективности бактериальных теней *Yersinia pestis* с различной степенью деградации пептидогликана / **А.С. Вагаïская**, М.Е. Платонов, А.С. Трунякова, С.А. Иванов, Р.З. Шайхутдинова, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены Материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. Москва, 2022. С. 46-49.
 9. **Vagaïskaya, A.S.**, Evaluation of Protective Efficacy of a Novel Inactivated *Yersinia pestis* Ghost Vaccine Against Virulent Challenge in Mice and Guinea Pigs / **A.S. Vagaïskaya**, M.E. Platonov, A.P. Anisimov // Материалы Международного симпозиума “Yersinia 14” 26–28 сентября 2022 г. Санкт-Петербург, Российская Федерация. 2022. С. 78.
 10. Анисимов А.П. Прототип модульной вакцины на основе бактериальных теней *Yersinia pestis* / А.П. Анисимов, **А.С. Вагаïская**, Р.Х. Жумакаев, С.В. Дентовская // Материалы VII Национального конгресса бактериологов опубликованы в журнале «Бактериология». – 2022. – Т. 7. – № 4. – С. 90.
 11. **Вагаïская А.С.** Прототип полигостальной трехкомпонентной вакцины для профилактики чумы / **А.С. Вагаïская**, А.С. Трунякова, Е.А. Красильникова, Е.М. Мазурина, П.Х. Копылов, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Материалы VIII Национального конгресса бактериологов 27-28 сентября 2023 г. Москва, Российская Федерация, 2023. С. 25.
 12. Дентовская С.В. Обоснование выбора штамма чумного микроба для получения бактериальных теней / С.В. Дентовская, **А.С. Вагаïская**, А.С. Трунякова, Е.А. Красильникова, Е.М. Мазурина, А.П. Анисимов // Материалы VIII

Национального конгресса бактериологов 27-28 сентября 2023 г. Москва, Российская Федерация, 2023. С. 41.

13. Трунякова А.С. Использование модели бубонной чумы при тестировании кандидатных вакцинных препаратов в УББ 2 лаборатории / А.С. Трунякова, **А.С. Вагайская**, Е.М. Мазурина, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Материалы VIII Национального конгресса бактериологов 27-28 сентября 2023 г. Москва, Российская Федерация, 2023. С. 134.