

Разработка сальмонеллезной вакцины на основе слабоацилированного липополисахарида *Salmonella enterics Enteritidis*: биотехнология получения, структурные, серологические и иммуногенные характеристики препарата

О.И.Науменко¹, Б.И.Алхазова¹, С.В.Коробова¹, А.А.Мироненко¹, П.А.Стряхнин¹, Н.А.Разваляева¹, В.А.Ледов¹, В.И.Шмиголь¹, И.Ю.Курбатова¹, И.А.Казаков¹, И.В.Анкудинов¹, М.Э.Головина¹, Н.Н.Карцев², Э.А.Светоч², П.Г.Апарин¹, И.А.Дятлов²

¹ООО «ГРИТВАК», Москва, Российская Федерация;

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Инвазивная нетифоидная сальмонеллезная болезнь является ведущей причиной смертности и заболеваемости в развивающихся странах, а *Salmonella enterica Enteritidis* – один из наиболее распространенных во всем мире штаммов нетифоидной сальмонеллы, способный вызывать летальные инвазивные и системные инфекции. В настоящее время в клинической практике отсутствуют вакцины для профилактики сальмонеллезной инфекции, вызванной *S. Enteritidis*. Цель. Разработка технологии получения и иммунологическая оценка нетоксичного липополисахарида (ЛПС) *S. Enteritidis* для создания на его основе кандидатного вакцинного препарата против сальмонеллезной инфекции.

Материалы и методы. ЛПС получали методом фенольной экстракции, обрабатывали ферментами для удаления примесей белка и нуклеиновых кислот, далее ультрацентрифугировали. Для снижения токсичности полученного ЛПС его деацетилювали. Далее проводили физико-химическую и биологическую характеристику полученного ЛПС.

Результаты. Получен нетоксичный высокоочищенный ЛПС *S. Enteritidis*, не обладающий пирогенностью в фармакопейном тесте на кроликах. Структура и подлинность антигена подтверждены методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса и масс-спектрометрии. Препарат специфически распознавался сыворотками животных, содержащими антитела к фактору 9 (тивелоза) или 12 О-антигена *S. Enteritidis*. Иммунизация лабораторных животных полученным вакцинным ЛПС вызывала образование специфических антител IgM и IgG. Максимальное количество сывороточных антител достигалось после третьего введения антигена.

Заключение. Разработана технология, позволяющая получать нетоксичный высокоочищенный и иммуногенный ЛПС *S. Enteritidis* в промышленных масштабах. Это позволит создать вакцину против сальмонеллезной инфекции и сократить социально-экономический ущерб, наносимый заболеванием.

Ключевые слова: *Salmonella enterica Enteritidis*, липополисахарид, деацетилюрование, масс-спектрометрия, ядерно-магнитный резонанс, высокоэффективная жидкостная хроматография, вакцина

Для цитирования: Науменко О.И., Алхазова Б.И., Коробова С.В., Мироненко А.А., Стряхнин П.А., Разваляева Н.А., Ледов В.А., Шмиголь В.И., Курбатова И.Ю., Казаков И.А., Анкудинов И.В., Головина М.Э., Карцев Н.Н., Светоч Э.А., Апарин П.Г., Дятлов И.А. Разработка сальмонеллезной вакцины на основе слабоацилированного липополисахарида *Salmonella enterics Enteritidis*: биотехнология получения, структурные, серологические и иммуногенные характеристики препарата. Бактериология. 2024; 9(4): 15–24. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-15-24

Development of a salmonella vaccine based on low acylated lipopolysaccharide *Salmonella enterics Enteritidis*: biotechnology process development, structural, serological and immunogenic characteristics of the preparation

O.I.Naumenko¹, B.I.Alkhazova¹, S.V.Korobova¹, A.A.Mironenko¹, P.A.Stryakhnin¹, N.A.Razvalyayeva¹, V.A.Ledov¹, V.I.Shmigol¹, I.Yu.Kurbatova¹, I.A.Kazakov¹, I.V.Ankudinov¹, M.E.Golovina¹, N.N.Kartsev², E.A.Svetoch², P.G.Aparin¹, I.A.Dyatlov²

Для корреспонденции:

Коробова Светлана Вячеславовна, кандидат биологических наук, иммунолог ООО «ГРИТВАК»

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Статья поступила 15.11.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Svetlana V. Korobova, PhD in Biological Sciences, immunologist, GRITVAK LLC

Address: 24 Kashirskoye highway, Moscow, 115478, Russian Federation

The article was received 15.11.2024, accepted for publication 25.12.2024

¹GRITVAK LLC, Moscow, Russian Federation;

²The State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor, Obolensk, Moscow region, Russian Federation

Invasive none-typhoid salmonella disease is the main cause of death and morbidity in developing countries. *Salmonella enterica* Enteritidis is one of the most widespread strains of non-typhoid salmonella worldwide. It is cause of lethal invasive and systemic infections. Currently, there are no vaccines in clinical practice to prevent salmonella infection caused by *S. Enteritidis*.

Objective. Goals and objectives. Development of technology for the production of nontoxic lipopolysaccharide (LPS) from *S. Enteritidis* and its immunological evaluation to create a candidate vaccine preparation against salmonella infection.

Materials and methods. LPS was obtained by phenolic extraction, treated with enzymes to remove impurities of protein and nucleic acids, then ultracentrifugated. Then LPS was deacetylated to reduce its toxicity. Next, the physico-chemical and biological characteristics of the obtained LPS were carried out.

Results. Non-toxic, highly purified LPS *S. Enteritidis* was obtained. The structure and identity have been confirmed by NMR and mass spectrometry. LPS was specifically recognized by animal sera containing antibodies to factor 9 (tyvelose) or 12 of the *S. Enteritidis* O-antigen. Immunization of laboratory animals with the obtained LPS caused the induction of specific IgM and IgG antibodies. The maximum rate of serum antibodies was reached after the third administration of the antigen.

Conclusion. Technology that allows to obtain non-toxic, highly purified and immunogenic *S. Enteritidis* LPS on an industrial scale has been developed. This will make it possible to create a vaccine against *S. Enteritidis*, and reduce the socio-economic damage caused by this infection.

Key words: *Salmonella enterica* Enteritidis, lipopolysaccharide, deacetylation, mass spectrometry, nuclear magnetic resonance, high-performance liquid chromatography, vaccine

For citation: Naumenko O.I., Alkhazova B.I., Korobova S.V., Mironenko A.A., Stryakhnin P.A., Razvalyayeva N.A., Ledov V.A., Shmigol V.I., Kurbatova I.Yu., Kazakov I.A., Ankudinov I.V., Golovina M.E., Kartsev N.N., Svetoch E.A., Aparin P.G., Dyatlov I.A. Development of a salmonella vaccine based on low acylated lipopolysaccharide *Salmonella enterica* Enteritidis: biotechnology process development, structural, serological and immunogenic characteristics of the preparation. Bacteriology. 2024; 9(4): 15–24. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-15-24

Род *Salmonella* принадлежит к семейству *Enterobacteriaceae* и включает грамотрицательные, не образующие спор, факультативно-анаэробные бактерии, являющиеся основным возбудителем сальмонеллезной инфекции во всем мире, передаваемым пищевым путем заражения [1]. Род *Salmonella* состоит всего из двух видов: *S. enterica* и *S. bongori* [2].

Инвазивная нетифоидная сальмонеллезная болезнь (iNTS) является ведущей причиной смертности и заболеваемости в развивающихся странах, а *S. enterica* Enteritidis (*S. Enteritidis*) – один из наиболее распространенных во всем мире штаммов нетифоидной сальмонеллы, способный вызывать летальные инвазивные и системные инфекции [3]. Нетифоидная *S. Enteritidis* занимает ведущее место в этиологии сальмонеллеза в России и является доминирующим серовариантом, вызывающим пищевые токсикоинфекции человека [4, 5]. Например, в 2023 г. в Москве были выявлены случаи заражения *S. Enteritidis* после употребления продукции в кафе быстрого питания [6]. В группе риска при сальмонеллезной инфекции находятся младенцы, пожилые люди и люди с ослабленным иммунитетом, которые могут заболеть после приема всего одной клетки зараженного организма [7].

В последние десятилетия отмечается рост количества антибиотико-резистентных штаммов бактерии [8], а первые случаи были выявлены еще в начале 1960-х гг. к антибиоту хлорамфениколу [9]. Поэтому вакцинация является одним из эффективных способов предотвращения распространения заболеваний, вызываемых сальмонеллами.

Первой вакциной против сальмонеллезной инфекции – брюшного тифа – являлась убитая цельноклеточная брюшнотифозная вакцина, разработанная Wright в 1897 г. [10]. Современная брюшнотифозная Vi-полисахаридная вакцина ВИАВВАК была разработана предприятием «ГРИТВАК» и внедрена в практику здравоохранения России [11]. Однако лицензированных вакцин против нетифоидных сальмонел-

лезов iNTS в настоящее время нет, несмотря на частоту и тяжесть инфекционного заболевания.

В течение XX века предпринимались неоднократные попытки получить живые аттенуированные сальмонеллезные вакцины. Однако достижение правильного баланса между иммуногенностью и безопасностью остается серьезной проблемой живых iNTS-вакцин [12]. Вследствие отсутствия в клетках нетифоидных сальмонелл дополнительных сильных иммуногенов, например капсульных антигенов, разработанные инактивированные цельноклеточные вакцины, антигенные фракции, выделенные из возбудителя, также оказались неэффективными [13].

Вместе с тем активность в области разработки вакцин против сальмонелл в последние годы существенно увеличилась. Современные разработки сальмонеллезных вакцин уделяют большее внимание использованию полисахаридов как основы вакцинных конструкций, например в препаратах на основе гликоконъюгатов.

Технология гликоконъюгации [14] представляет собой одну из наиболее передовых стратегий разработки вакцины против iNTS [15]. Примером современного варианта гликоконъюгированной вакцины является препарат на основе «утяжеленного» О-полисахарида-COPS, состоящего из части кор-ОПС (COPS) липополисахарида (ЛПС) *S. Enteritidis*, конъюгированного с белком флагеллина из гомологичного штамма [16, 17]. В настоящее время также проводятся исследования, направленные на получение везикулярных сальмонеллезных вакцин (OMV-вакцин) путем создания рекомбинантных штаммов, продуцирующих везикулы внешней мембраны клетки [18].

За патогенное действие грамотрицательных бактерий отвечают «заякоренные» во внешней мембране клеточной стенки молекулы ЛПС, представляющие собой гетерогенные макромолекулы, состоящие из трех доменов: липида А – консервативного участка молекулы ЛПС, проявляющего свойства эндотоксина; центрального олигосахарида (кóра),

несущего антигена, общие для ЛПС большинства представителей семейства *Enterobacteriaceae*, и высоковариабельного дистального участка, определяющего бактериальный серовар – О-специфического полисахарида (О-антигена), построенного из повторяющихся олигосахаридных звеньев [19]. Таким образом, ЛПС остается основой для создания вакцин против граммотрицательной инфекции.

В предыдущих исследованиях нами была открыта возможность получения клинически применимого ЛПС за счет рационального снижения эндотоксичности (детоксикации) молекулы ЛПС без снижения иммуногенности, т.е. возможности индуцировать выработку О-специфических антител [20]. Получение клинически применимого ЛПС может быть реализовано за счет детоксикации молекулы ЛПС путем О-деацелирования липида А. С другой стороны, важно сохранить иммуногенный потенциал молекулы ЛПС, т.е. возможность индуцировать выработку О-специфических антител, и для этого чрезвычайно важно, чтобы структура О-антигена оставалась неизменной.

Целью данной работы являлась разработка биотехнологического процесса получения нетоксичного слабоацелированного ЛПС *S. enteritidis* и его иммунологическая оценка для создания на его основе кандидатного вакцинного препарата против сальмонеллезной инфекции.

Материалы и методы

Бактериальный штамм и условия культивирования. Типовые штаммы *S. Enteritidis* AV11 были выращены до поздней логарифмической фазы в жидкой питательной минеральной среде в течение 12 ч и сконцентрированы до 1 л.

Выделение и деградация нативного ЛПС. Из полученного концентрата центрифугированием отделяли бактериальные клетки, из которых были выделены ЛПС по методу фенольной экстракции, предложенной Westphal [21], с последующим диализом и лиофилизацией. Полученный высушенный препарат растворяли в 0,05 М буфере TRIS при pH 7,2, содержащем по 0,01% CaCl_2 и MgCl_2 . К полученному раствору добавляли РНКазу (Sigma-Aldrich) и ДНКазу (Sigma-Aldrich) и перемешивали при 37°C в течение 16 ч. Реакционную смесь обрабатывали протеиназой К (Sigma-Aldrich) в течение 2 ч при 55°C. Очищенные ЛПС *S. Enteritidis* были подвергнуты препаративному ультрацентрифугированию (29 000 об./мин) в течение 3 ч и лиофилизированы.

Частичное деацелирование ЛПС. Полученный сухой ЛПС растворяли в 8,3%-м водном растворе аммиака и перемешивали при 30°C в течение 8 ч, а затем охлаждали до 5–10°C. Полученный раствор нейтрализовали добавлением уксусной кислоты, высаживали в спирт, а осадок отделяли центрифугированием с повторной промывкой этанолом. Полученный осадок, содержащий конечный продукт – деацелированный ЛПС (дЛПС), растворяли в воде и лиофилизировали.

SDS-PAGE-электрофорез. Проводили на 12%-м акриламидном геле с додецилсульфатом натрия по методу Laemmli [22] с использованием системы электрофореза Bio-Rad Mini-Protean. Гели окрашивали азотнокислым серебром.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Проводили на хроматографе Agilent 1260 Infinity

(Agilent, США) с рефрактометрическим детектором с использованием колонки TOSOH BIOSCIENCE TSK-GEL G3000PW, 7,5 mm ID x 30,0 cm L (Sigma-Aldrich, США) в 0,2 М PBS-буфере с pH 7,4 и концентрацией образцов дЛПС *S. Enteritidis* – 50 мкг/мл и 500 мкг/мл (после гидролиза). Калибровку колонки проводили с помощью декстранов T250, T70, T40, T10 и T5 с молекулярными массами 250, 70, 40, 10 и 5 кДа соответственно.

Масс-спектрометрия. Масс-спектры высокого разрешения образцов липида А с ионизацией электрораспылением измеряли в режиме отрицательных ионов с использованием прибора micrOTOF II (Bruker Daltonics).

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Перед съемкой спектров ЯМР образцы лиофилизировали из 99,9% D_2O и исследовали в виде раствора в 99,95% D_2O . Спектр ЯМР регистрировали на спектрометре Avance II 600 MHz (Bruker, Германия) при 50°C с использованием 3-триметилсилилпропаноата натрия-2,2,3,3-d 4 (δ Н 0) в качестве эталона для калибровки.

Определение пирогенности. Проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи XIV, ОФС. 1.2.4.0005.15 «Пирогенность» [23]. Исследуемые препараты разводили в апиrogenном 0,9%-м растворе хлорида натрия до концентрации 0,025 мкг/мл и вводили внутривенно трем кроликам породы шиншилла массой 2–3 кг (питомник лабораторных животных «Андреевка») из расчета 1 мл препарата на 1 кг массы животного. Ректальную температуру кроликов измеряли трижды в течение 3 мин с интервалом в 1 ч.

Иммуноферментный анализ (ИФА) для определения специфической активности дЛПС *S. Enteritidis*. дЛПС *S. Enteritidis* сорбировали в 96-луночной планшете (Greiner, США) в последовательных разведениях от 50 до 0,4 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). После инкубации (5 ч при 37°C) и отмывки (3 раза ФСБ/ 0,05% (v/v) Твин-20 (Sigma-Aldrich, США) – ФСБ-Т) в лунки вносили полиспецифическую сыворотку кролика, содержащую антитела к фактору 9 или 12 О-антигену *S. Enteritidis* (СПБНИИВС, Россия) в рабочем разведении в ФСБ-Т/ 1% (m/v) бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Sigma-Aldrich, США), инкубировали 1 ч при 37°C. Планшет отмывали 3 раза ФСБ-Т и вносили конъюгат козьих антител против IgG кролика, меченных пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) в ФСБ-Т/ 1% (m/v) БСА, инкубировали 1 ч при 37°C. Планшет отмывали 3 раза ФСБ-Т, вносили субстрат тетраметилбензидин (ТМБ) (Sigma-Aldrich, США), инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали, добавляя в лунки 5%-й раствор серной кислоты. Оптическую плотность (ОП) измеряли на фотометре iMark (Biorad, США) при длине волны 450 нм.

Иммуногенность дЛПС. дЛПС *S. Enteritidis* вводили внутривенно (в/в) мышам (СВА × С57В1/6)F1 трехкратно с интервалом в 14 дней в разовой иммунизирующей дозе 50 мкг. Сыворотки для ИФА отбирали на 14-е сутки после каждого введения препарата из ретроорбитального синуса. Антиген-нативный ЛПС *S. Enteritidis* сорбировали в карбонат-бикарбонатном буфере в лунках 96-луночной планшеты в концентрации 40 мкг/мл в течение 2 ч при 37°C. После инкубации и отмывки (3 раза ФСБ-Т) в лунки вносили ФСБ/ 1% (m/v) БСА и инкубировали ночь при 4°C. Планшет отмывали 3 раза ФСБ-Т и вносили сыворотки с определяемыми

антителами в разведении 1:100 в ФСБ-Т/ 1% (m/v) БСА и титровали с шагом понижения концентрации в 2 раза. Инкубировали 1 ч при 37°C. После отмывки (3 раза ФСБ-Т) в лунки вносили конъюгаты козьих антител против IgG, или IgM, или IgA мыши с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) в рабочем разведении в ФСБ/ 1% (m/v) БСА и инкубировали 1 ч при 37°C. После удаления конъюгатов и отмывки (3 раза ФСБ-Т) в лунки вносили субстрат ТМБ и инкубировали 20 мин при 37°C. Реакцию останавливали, внося в лунки стоп-реагент для ТМБ (10%-й раствор серной кислоты). Колориметрические измерения ОП проводили на фотометре iMark при двух длинах волн: 450 и 630 нм. Результаты представляли в виде среднего геометрического конечных титров $\pm$ стандартное отклонение.

Результаты исследования

Разработан полный биотехнологический процесс получения кандидатного сальмонеллезного вакцинного препарата на основе низкотоксичного ЛПС *S. Enteritidis*. Основные стадии пилотного процесса представлены на рис. 1. Технологический процесс разработан в соответствии с требованиями надлежащей производственной практики и включает целый ряд точек внутрипроцессного контроля (наличие примесей белков и нуклеиновых кислот, пирогенность, подлинность – ЯМР-спектроскопия).

Выделение, очистка и детоксикация ЛПС из биомассы *S. Enteritidis*. Методом фенольной экстракции, предложенной Westphal, из сконцентрированных до 1 л клеточных культур *S. Enteritidis* AV116, выращенных в минеральной среде М9 в течение 12 ч, были выделены ЛПС. Полученные ЛПС *S. Enteritidis* были обработаны ДНКазой и РНКазой для очистки от примеси нуклеиновых кислот, а затем протеиназой К для удаления примесных белков. Количество примесей нуклеиновых кислот и белков в ЛПС *S. Enteritidis* составило не более 1% (примеси нуклеиновых кислот – 0,68%; примеси белков – 0,8%).

Очищенный ЛПС *S. Enteritidis* был подвергнут препаративному ультрацентрифугированию (29 000 об./мин) в течение 3 ч. По данным SDS-электрофореза после лиофилизации супернатанта с высоким выходом были получены ЛПС *S. Enteritidis*, содержащие в мажоре длинноцепные О-полисахариды (рис. 2), т.е. являющиеся высокомолекулярными.

Полученный ЛПС *S. Enteritidis* был подвергнут мягкому щелочному гидролизу с целью детоксикации (деацилирования) по липиду А [24].

Физико-химическая характеристика ЛПС *S. Enteritidis*. Физико-химическая характеристика полученного дЛПС проводилась с целью подтверждения сохранности его структуры после деацилирования, а также подлинности.

Спектр ¹H ЯМР 3-ацилированного О-полисахарида *S. Enteritidis* AV116 показал 4 основных аномерных сигнала при 4,89–5,27 м.д., сложную кольцевую область, 2 сигнала при 2,05 и 1,81 м.д. и 2 синглета, соответствующие Н-6 6-дезоксисахаров. Полученные протонные химические сдвиги хорошо согласуются с ранее опубликованными данными ЯМР капсульного полисахарида *S. Enteritidis* (рис. 3) [25].

По результатам проведенных исследований ЯМР-спектроскопии образец ЛПС *S. Enteritidis* AV116 содержит

тетрасахаридное повторяющееся О-звено. Отсутствие пиков Glc2Ac в слабом поле при 5,0 ppm (аномер глюкозы) и 2,0 (ацетатный заместитель) свидетельствует, что ЛПС *S. Enteritidis* AV116 имеет полностью негликозилированную регулярную полисахаридную цепь тетрасахарида, идентичную другому штамму той же серогруппы *S. Pullorum* 11 (рис. 4).

Полученные сигналы в спектрах ЛПС были по существу идентичны сигналам в спектрах исходного ОПС, указывая на то, что деацилирование не изменяло структуру повторяющегося звена О-полисахарида, а значит, мы достигли значительного снижения эндотоксичности (рис. 5) [24].

Структуру липида А детоксицированных ЛПС *S. Enteritidis* оценивали с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением в режиме отрицательных ионов. Согласно проведенному анализу, препарат содержал в основном триацильные производные липида А, о чем свидетельствует пик при m/z 1053,67, принадлежащий липиду А из ЛПС *S. Enteritidis*, содержащему одну лауроильную группу и две 3-гидроксимиристоильные группы (рис. 6).

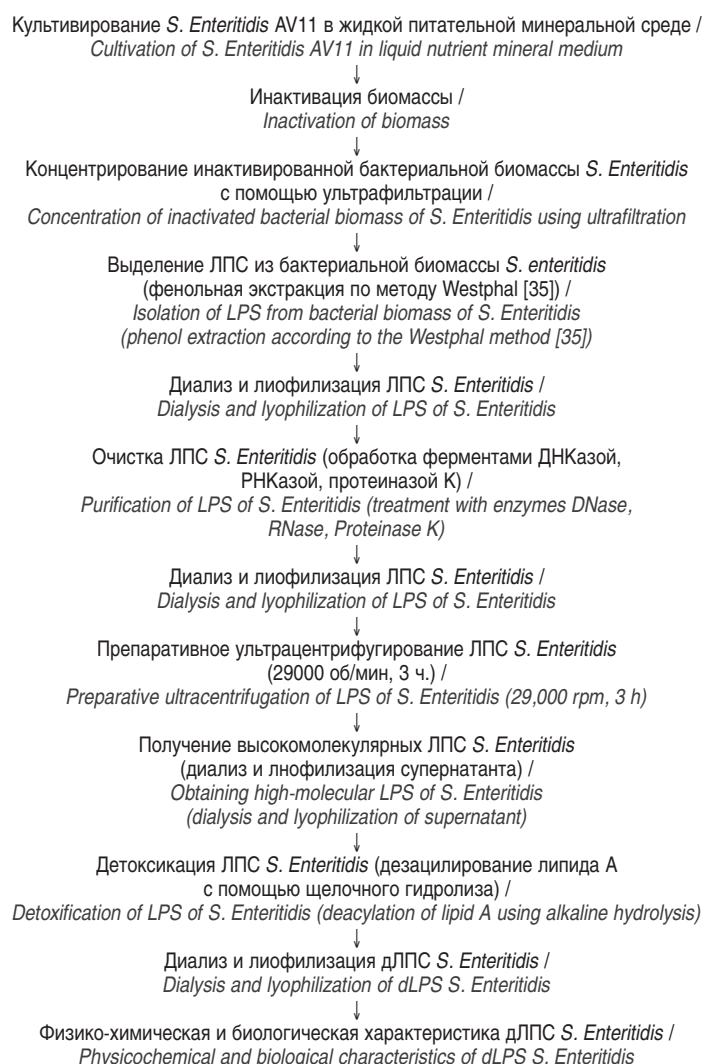


Рис. 1. Схема стадий биотехнологического процесса выделения и очистки дЛПС из бактериальной биомассы *S. Enteritidis*.
Fig. 1. A scheme of the biotechnological process stages for isolation and purification of LPS from the bacterial biomass of *S. enteritidis*.



Рис. 2. Результаты SDS-электрофореза ЛПС *S. Enteritidis*. А – нативный ЛПС, Б – очищенный ЛПС.

Fig. 2. Results of SDS electrophoresis of *S. Enteritidis* LPS. А – native LPS, Б – purified LPS.

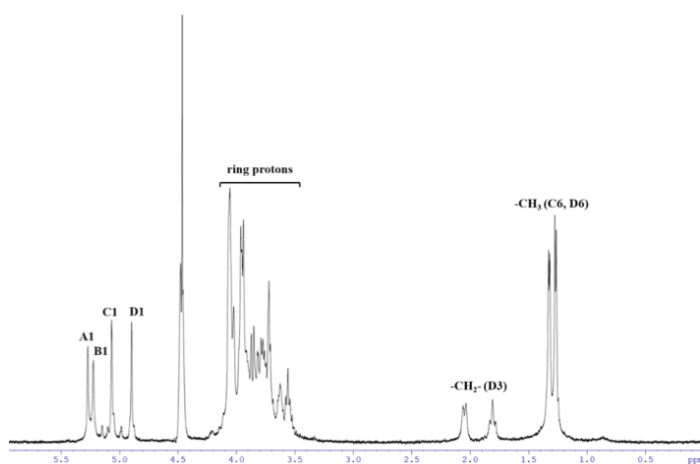


Рис. 3. ¹H ЯМР-спектр ЛПС *S. Enteritidis* AV116. Цифры относятся к атомам углерода в моносахаридных остатках, обозначенных следующим образом: А – Man, В – Gal, С – Rha, D – Tyv.

Fig. 3. ¹H NMR LPS spectrum of *S. Enteritidis* AV116. The numbers refer to carbon atoms in monosaccharide residues, designated as follows: А – Man, В – Gal, С – Rha, D – Tyv.

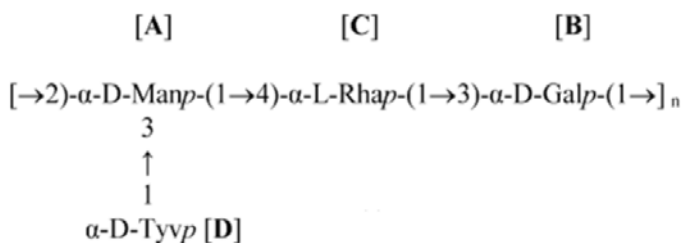


Рис. 4. Структура тетрасахарида *S. Enteritidis* AV116, идентичная *S. Pullorum* 11 [26].

Fig. 4. The tetrasaccharide structure of *S. Enteritidis* AV 116 is identical to *S. Pullorum* 11 [26].

По данным SDS-электрофореза полученный дЛПС *S. Enteritidis* в мажоре содержит высокомолекулярную фракцию, однако при попытке определить молекулярную массу полученного дЛПС *S. Enteritidis* при помощи гель-проникающей ВЭЖХ было установлено, что, исходя из времени выхода первого пика, все полученные препараты в 0,2 М PBS-буфере с pH 7,4 образуют высокомолекулярные комплексы – мицеллы (рис. 7А); второй пик – гораздо менее

высокомолекулярный, но также не исключено мицеллообразование. Поэтому было принято решение выделить О-полисахарид из дЛПС *S. Enteritidis* с помощью гидролиза в 2%-й уксусной кислоте при до выпадения осадка липида А, который в дальнейшем был удален ультрацентрифугированием.

По новым данным ВЭЖХ О-полисахарид, выделенный из дЛПС-K8, элюируется в виде пика с максимумом в области 34,888 кДа ($T_{\max} = 12,18$ мин) (рис. 7Б). Исходя из молекулярных масс можно оценить длину О-ПС-K8 *S. enteritidis* – 42–44 повторяющихся звеньев.

Иммунобиологическая характеристика вакцинного антигена ЛПС *S. Enteritidis*. Для оценки эндотоксичности дЛПС *S. Enteritidis* (триацелированной формы) проводили тест на пирогенность на кроликах, т.к. пирогенность является ключевым критерием безопасности ЛПС грамотрицательных бактерий. Препарат считается апиrogenным, если он не вызывает подъема температуры ни у одного из трех подопытных кроликов более чем на 0,5°C по сравнению с исходной температурой, а сумма подъемов температур у трех подопытных кроликов не превышает 1,2°C. При проверке пирогенности *in vivo* все препараты дЛПС *S. Enteritidis* в дозе 0,025 мкг/кг не вызывали подъема температуры ни у одного из трех подопытных кроликов более чем на 0,2°C по сравнению с исходной температурой, а сумма подъемов температур у трех подопытных кроликов не превышала +0,5°C (рис. 8), что соответствует критериям апиrogenности.

Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что степень ацилирования липида А оказывает влияние на параметры эндотоксичности всей молекулы ЛПС [27]. Таким образом, детоксицированные по липиду А триацельные производные ЛПС *S. Enteritidis* являются апиrogenными и низкоэндотоксичными.

Специфическую активность определяли в прямом ИФА по способности дЛПС распознаваться специфическими антителами к *S. Enteritidis*. Препарат адсорбировали на твердую фазу планшетов, далее добавляли специфическую сыворотку (моноспецифическую сыворотку кролика, содержащая антитела к фактору 9 (тивелоза) или 12 О-антигена *S. Enteritidis*). Полученный комплекс проявляли с помощью конъюгата козьих антител к IgG кролика, меченных пероксидазой хрена. В качестве контроля использовали сыворотку интактного кролика (рис. 9).

Как видно из рис. 8, ОП сывороток, содержащих антитела к фактору 9 или 12 О-антигена *S. Enteritidis*, была выше по сравнению с ОП интактных сывороток. Это свидетельствует о специфичности проведенной реакции, а также о сохранности антигенных детерминант у полученного препарата.

Антитела являются ключевым компонентом протективного иммунного ответа против *Salmonella*. Поэтому нами было проведена оценка способности полученного ЛПС вызывать образование специфических антител IgG и IgM. Оценку выполняли на лабораторных животных – мышах линии F1 (CBA × C57Bl/6)F1). Животных иммунизировали 3 раза с интервалом 14 дней в дозе 50 мкг дЛПС/животное. На 14-й день после каждого введения антигена собирали сыворотку и определяли образование специфических антител (рис. 9).

дЛПС *S. Enteritidis* вызывал образование специфических антител IgG и IgM уже после первого введения. Последующие

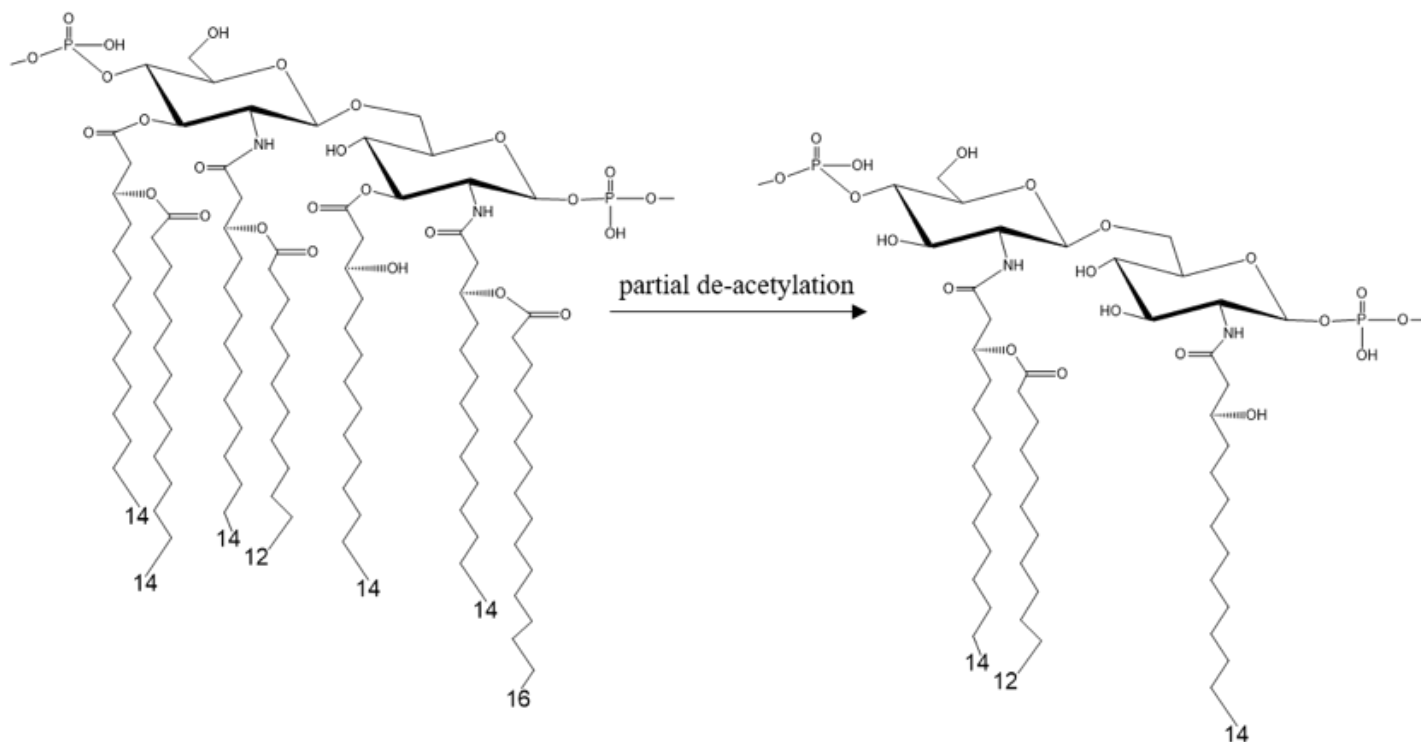


Рис. 5. Схема частичного дезацелирования липида А из ЛПС *S. Enteritidis* AV116, в результате которого отщепляются 4 жирные кислоты.

Fig. 5. A scheme of lipid A partial acylation from LPS *S. Enteritidis* F M 116, as a result of which 4 fatty acids are cleaved off.

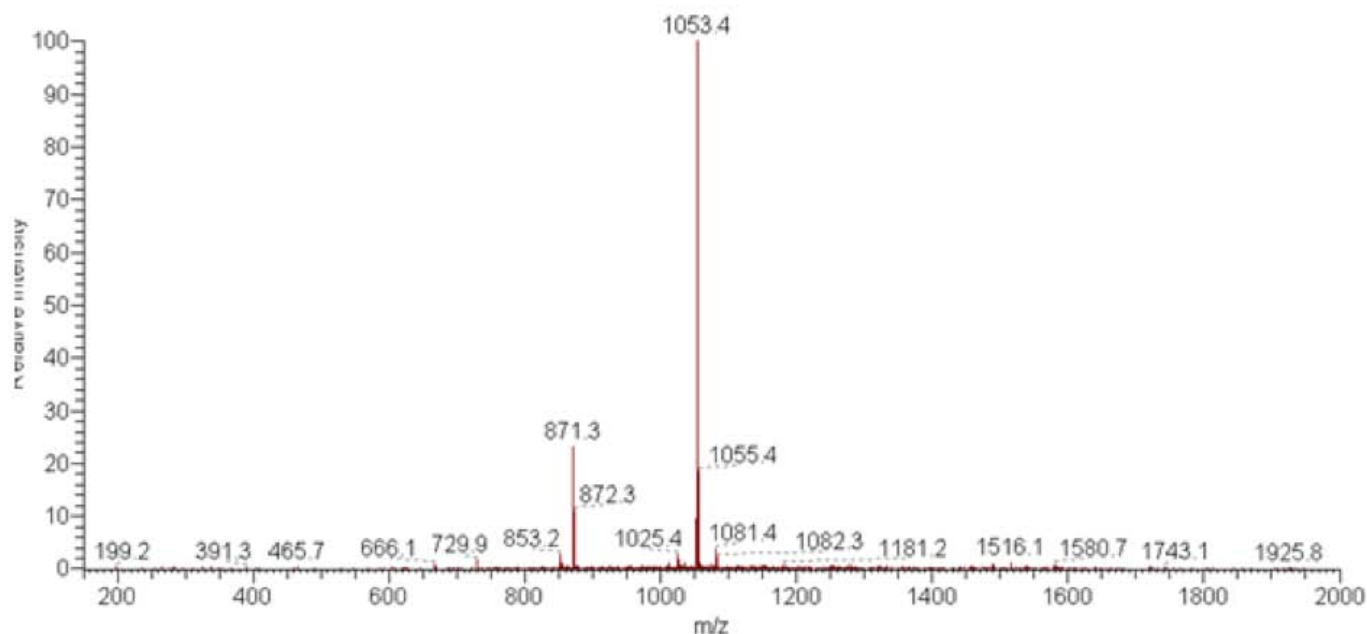


Рис. 6. Масс-спектр липида А, полученного из дЛПС *S. Enteritidis* AV116. m/z 871 соответствует дезацелированному липиду А; m/z 1053 – триацелированному липиду А.

Fig. 6. Mass spectrum of lipid A obtained from *S. Enteritidis* AV116 dLPS. m/z 871 corresponds to diacylated lipid A; m/z 1053 corresponds to triacylated lipid A.

введения ЛПС приводили к увеличению титра антител, максимум достигался после третьего введения. Титр специфических антител IgG составил 10 ± 5 после первого введения, 91 ± 18 после второго введения и 1244 ± 249 после третьего введения. Титр специфических антител IgM составил 38 ± 8 после первого введения, 200 ± 23 после второго введения и 1689 ± 338 после третьего введения. Специфические антитела IgA не определялись во всех группах. Как видно из полученных данных, нет значительной разницы в титрах спе-

цифических антител IgG и IgM во всех группах (рис. 10). Таким образом, модифицированный ЛПС имеет высокую иммунологическую активность.

Обсуждение

ЛПС являются консервативными патоген-ассоциированными молекулярными паттернами грамотрицательных энтеробактерий, и их можно рассматривать в качестве целевых

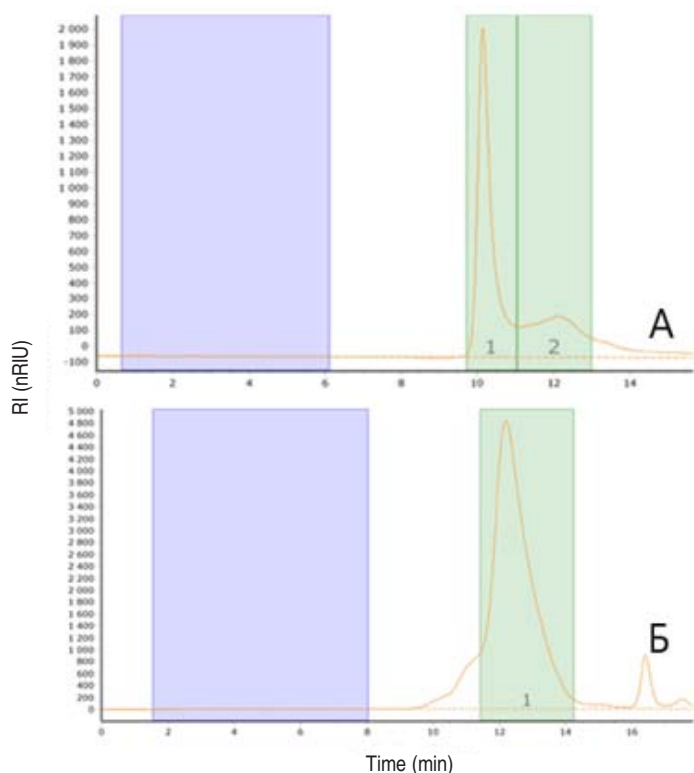


Рис. 7. Результаты ВЭЖХ дЛПС (А) и О-полисахарида (Б) *S. Enteritidis* в 0,2 М PBS-буфере с pH 7,4.

Fig. 7. Results of HPLC of dLPS(A) and OPS (Б) of *S. Enteritidis* in 0.2 M PBS buffer with pH 7.4.

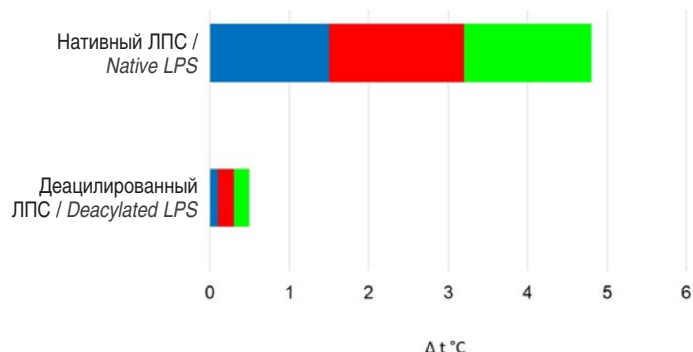


Рис. 8. Характеристика пирогенности нативного и деацелированного ЛПС *S. Enteritidis*. Столбики разных цветов отражают пирогенный ответ каждого из трех кроликов.

Fig. 8. Pyrogenicity characteristics of the native and deacylated *S. Enteritidis* LPS. Blocks of different colours represent individual febrile response of each of three rabbits.

протективных антигенов при разработке вакцин против различных заболеваний, обусловленных возбудителями, относящимися к данной группе энтеробактерий. Гуморальный иммунный ответ, направленный к экспрессированному на ЛПС главному протективному соматическому О-антигену сальмонелл, определяет специфичность протективного иммунитета против сальмонеллезной инфекции и играет определяющую роль в формировании надежной защиты от сальмонелл. Нативный ЛПС вследствие входящего в его молекулу домена липида А является токсичным, пирогенным веществом, непригодным для приготовления вакцинных препаратов. Получение клинически применимого нетоксичного ЛПС может быть реализовано за счет детоксикации молекулы ЛПС путем О-деацелирования липида А.

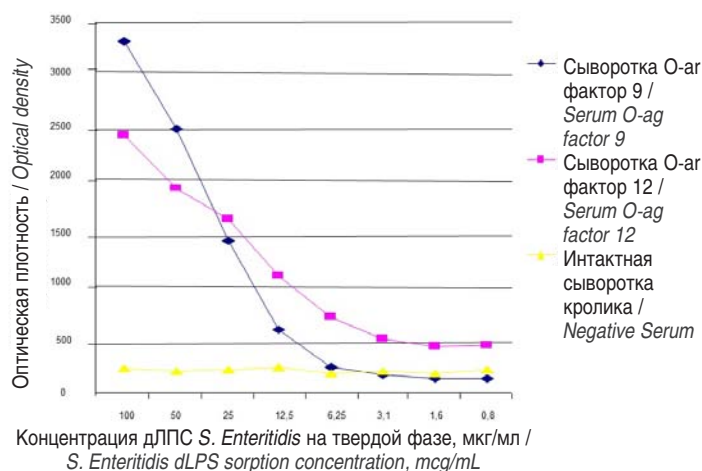


Рис. 9. Сероспецифическая активность дЛПС *S. Enteritidis*.

Fig. 9. Sera activity of *S. Enteritidis* dLPS.

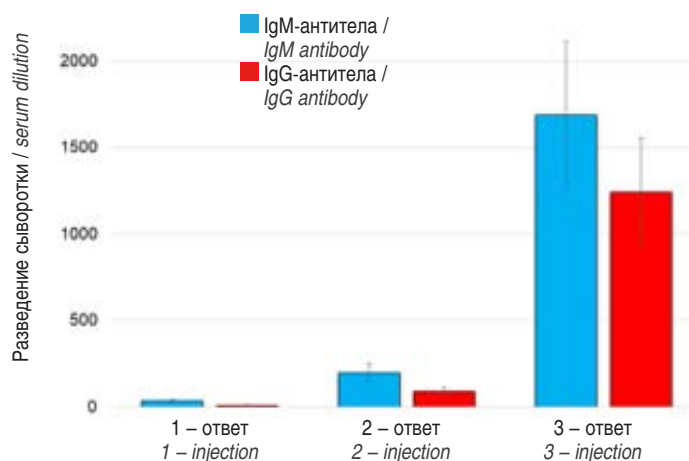


Рис. 10. Развитие специфического IgG- и IgM-ответа у мышей F1 (CBA x C57Bl/6)F1, иммунизированных дЛПС *S. Enteritidis*. Результаты представлены в виде разведения сывороток.

Fig. 10. Development of a specific IgG and IgM response in F1 (CBA x C57Bl/6)F1 mice immunized with dLPS from *S. Enteritidis*. The results are presented in the form of sera dilution.

Нами была разработана технология, позволяющая получить ЛПС из *S. Enteritidis* промышленного масштаба и снизить его эндотоксичность путем щелочного деацелирования ЛПС. Методами ЯМР и масс-спектрометрии были подтверждены сохранность структуры ЛПС *S. Enteritidis* и О-деацелирование липида А соответственно. Снижение эндотоксичности было подтверждено также в тесте пирогенности на кроликах. Сохранность антигенных детерминат была показана по распознаванию ЛПС *S. Enteritidis* моноспецифическими сыворотками к фактору 9 и 12 О-антигена *S. Enteritidis*.

Поскольку полученный дЛПС планируется использовать в качестве вакцинного препарата, нами было проведено исследование его иммуногенности. Антитела являются ключевым компонентом протективного иммунного ответа против *Salmonella*. Эффективность поствакцинального иммунного ответа зависит от полиспецифического иммунного ответа, т.е. активации образования различных классов и изотипов специфических антител, которые задействованы в разнообразных механизмах противобактериальной (сальмонел-

лезной) иммунной защиты. Профиль изотипа влияет на связывание антител с Fc-рецепторами и на эффективность активации комплемента. Это, в свою очередь, оказывает влияние на опсонофагоцитоз и на усиление внутриклеточных антибактериальных механизмов фагоцитов. В исследованиях на мышах было обнаружено, что поликлональные и моноклональные IgM к полисахаридным антигенам сальмонеллы обладают высокой защитной способностью, а в некоторых случаях и большей, чем IgG [28]. Проведенные нами исследования показали, что дЛПС *S. Enteritidis* вызывает образование специфических как IgG-, так и IgM-антител в примерно одинаковых титрах. Максимальные значения титров антител достигались после третьего введения.

Препарат низкодотоксичного триацильного дЛПС, включающего длинные LC (long chain) О-полисахаридные цепи, обладает более высоким профилем безопасности, так как включает преимущественно триацильные формы ЛПС по сравнению с везикулярными сальмонеллезными вакцинами, в которых используется генетически детоксифицированный пентаацильный ЛПС [29]. Другим проблемным моментом именно сальмонеллезных везикулярных вакцин является снижение длины О-полисахаридных цепей в препарате и, соответственно, риск утраты иммуногенности [30]. Разработанная технология получения препарата дЛПС обеспечивает внутрипроцессный контроль содержания высокомолекулярных длинноцепных форм дЛПС и, таким образом, контроль иммуногенности.

Современные исследования уделяют важное внимание исследованию тонкой химической структуры и нативности О-антигена *S. Enteritidis*, включая элементы молекулярного моделирования [31]. дЛПС содержит большой набор неалтерированных антигенных детерминант, включая полезные перекрестно реагирующие со всеми серотипами сальмонелл антигенные детерминанты кора типа R2B, в отличие от фрагментов ЛПС, таких как О-полисахарид и даже COPS, используемых для получения конъюгированных белково-полисахаридных сальмонеллезных вакцин. Таким образом, целый ряд оригинальных характеристик дЛПС *S. Enteritidis* свидетельствуют о перспективности его дальнейшего изучения и разработки.

Заключение

Разработка вакцины против *S. Enteritidis* может привести к существенному снижению заболеваемости прежде всего у тех групп лиц, которые проживают вблизи или трудятся на животноводческих фермах или вовлечены в агропроизводство, сотрудников пищевой промышленности, а также лиц, проживающих в эндемичных по данному возбудителю регионах, которые могут инфицироваться при употреблении зараженных яиц.

Разработанная нами технология получения низкотоксичных и иммуногенных дЛПС *S. enteritidis* позволит создать вакцину против этого возбудителя и сократить социально-экономический ущерб, вызываемый этой инфекцией.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectoral program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Grimont AD. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*. 2007;9.
2. Yue M, Liu D, Li X, Jin S, Hu X, Zhao X, et al. Epidemiology, Serotype and Resistance of *Salmonella* Isolates from a Children's Hospital in Hangzhou, Zhejiang, China, 2006–2021. *Infect Drug Resist*. 2022 Aug 22;15:4735–4748. DOI: 10.2147/IDR.S374658
3. Huo CX, Dhara D, Baliban SM, Tahmasebi Nick S, Tan Z, Simon R, et al. Synthetic and immunological studies of *Salmonella Enteritidis* O-antigen tetrasaccharides as potential anti-*Salmonella* vaccines. *Chem Commun (Camb)*. 2019 Apr 11;55(31):4519–4522. DOI: 10.1039/c8cc08622b
4. Percival SL, Williams DW. Chapter Ten – *Salmonella*. *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition) Microbiological Aspects and Risks*. UK, Academic Press. 2014;209–222.
5. Шубин ФН, Раков АВ, Кузнецова НА, Якубич ТВ, Снеткова ИП. Формирование заболеваемости населения сальмонеллезом, вызванным *Salmonella Enteritidis*, в районах с неполным обеспечением населения местной продукцией птицеводства. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017;1:61–67. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-1-61-67
6. Available at: rospotrebnadzor.ru/about/info/news_region/news_details_region.php?ELEMENT_ID=26055&sphrase_id=5177607
7. Punchihewage-Don AJ, Hawkins J, Adnan AM, Hashem F, Parveen S. The outbreaks and prevalence of antimicrobial resistant *Salmonella* in poultry in the United States: An overview. *Heliyon*. 2022 Nov 12;8(11):e11571. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e11571
8. Yoke-Kqueen C, Learn-Han L, Noorzaleha AS, Son R, Sabrina S, Jiun-Horng S, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from indigenous vegetables and poultry in Malaysia. *Lett Appl Microbiol*. 2008 Mar;46(3):318–24. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02311.x
9. Montville T, Matthews K. *Food Microbiology: An Introduction*. 2nd ed. Washington, USA, ASM Press, 2008.
10. Гремякова ТА, Фурсова НК, Степанов АВ. Вакцинация против брюшного тифа: результаты и перспективы. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 1997;6:11–16.
11. Лобзин ЮВ, Львов ВЛ, Каира АН, Маркина АА, Елкина СИ, Анкудинов ИВ, и др. Эпидемиологические особенности и иммунопрофилактика брюшного тифа (материал для подготовки лекции). *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2020;9(2):106–114. DOI: 10.33029/2305-3496-2020-9-2-106-114
12. Hindle Z, Chatfield SN, Phillimore J, Bentley M, Johnson J, Cosgrove CA, et al. Characterization of *Salmonella enterica* derivatives harboring defined *aroC* and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system (*ssaV*) mutations by immunization of healthy volunteers. *Infect Immun*. 2002 Jul;70(7):3457–67. DOI: 10.1128/IAI.70.7.3457-3467.2002
13. Карпунин ГИ, Шапиро НИ, Андриевская РА. Химические вакцины для профилактики кишечных инфекций: научное издание. Л.: Медицина, 1979.
14. Costantino P, Rappuoli R, Berti F. The design of semi-synthetic and synthetic glycoconjugate vaccines. *Expert Opin Drug Discov*. 2011 Oct;6(10):1045–66. DOI: 10.1517/17460441.2011.609554
15. Simon R, Levine MM. Glycoconjugate vaccine strategies for protection against invasive *Salmonella* infections. *Hum Vaccin Immunother*. 2012 Apr;8(4):494–8. DOI: 10.4161/hv.19158

16. Simon R, Tennant SM, Wang JY, Schmidlein PJ, Lees A, Ernst RK, et al. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis core O polysaccharide conjugated to H: g,m flagellin as a candidate vaccine for protection against invasive infection with *S. enteritidis*. Infect Immun. 2011 Oct;79(10):4240-9. DOI: 10.1128/IAI.05484-11
17. Nasrin S, Fuche FJ, Sears KT, Jones JA, Levine MM, Simon R, et al. Refinement of a Live Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Newport Vaccine with Improved Safety. Vaccines (Basel). 2021 Jan 16;9(1):57. DOI: 10.3390/vaccines9010057
18. Lei EK, Azmat A, Henry KA, Hussack G. Outer membrane vesicles as a platform for the discovery of antibodies to bacterial pathogens. Appl Microbiol Biotechnol. 2024 Feb 24;108(1):232. DOI: 10.1007/s00253-024-13033-5
19. Sánchez-Vargas FM, Abu-El-Haija MA, Gómez-Duarte OG. *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. Travel Med Infect Dis. 2011 Nov;9(6):263-77. DOI: 10.1016/j.tmaid.2011.11.001
20. Dyatlov IA, Svetoch EA, Mironenko AA, Eruslanov BV, Firstova VV, Fursova NK, et al. Molecular Lipopolysaccharide Di-Vaccine Protects from Shiga-Toxin Producing Epidemic Strains of *Escherichia coli* O157:H7 and O104:H4. Vaccines (Basel). 2022 Nov 1;10(11):1854. DOI: 10.3390/vaccines10111854
21. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol: water and further application of the procedure. Meth Carbohydr Chem. 1965;5:83-91.
22. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5. DOI: 10.1038/227680a0
23. Пирогенность. ОФС.1.2.4.0005.15. Государственная Фармакопея Российской Федерации, XIV издание. Т. 1. М.: Мин. Здрав. РФ. 2018;1227-1228.
24. Ledov VA, Golovina ME, Markina AA, Knirel YA, L'vov VL, Kovalchuk AL, et al. Highly homogenous tri-acylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against *Shigella flexneri* 2a infection. Vaccine. 2019 Feb 14;37(8):1062-1072. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.12.067
25. Snyder DS, Gibson D, Heiss C, Kay W, Azadi P. Structure of a capsular polysaccharide isolated from *Salmonella Enteritidis*. Carbohydr Res. 2006 Oct 16;341(14):2388-97. DOI: 10.1016/j.carres.2006.06.010
26. Brooks BW, Perry MB, Lutze-Wallace CL, Maclean LL. Structural characterization and serological specificities of lipopolysaccharides from *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum standard, intermediate and variant antigenic type strains. Vet Microbiol. 2008 Jan 25;126(4):334-44. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.07.022
27. Kusumoto S, Fukase K, Fukase Y, Kataoka M, Yoshizaki H, Sato K, et al. Structural basis for endotoxic and antagonistic activities: investigation with novel synthetic lipid A analogs. J Endotoxin Res. 2003;9(6):361-6. DOI: 10.1179/096805103225002737
28. Beal RK, Smith AL. Antibody response to *Salmonella*: its induction and role in protection against avian enteric salmonellosis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2007 Oct;5(5):873-81. DOI: 10.1586/14787210.5.5.873
29. Rossi O, Caboni M, Negrea A, Necchi F, Alfini R, Micoli F, et al. Toll-Like Receptor Activation by Generalized Modules for Membrane Antigens from Lipid A Mutants of *Salmonella enterica* Serovars Typhimurium and Enteritidis. Clin Vaccine Immunol. 2016 Apr 4;23(4):304-14. DOI: 10.1128/CVI.00023-16
30. De Benedetto G, Alfini R, Cescutti P, Caboni M, Lanzilao L, Necchi F, et al. Characterization of O-antigen delivered by Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMAs) vaccine candidates against nontyphoidal *Salmonella*. Vaccine. 2017 Jan 11;35(3):419-426. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.11.089
31. Gasperini G, Massai L, De Simone D, Raso MM, Palmieri E, Alfini R, et al. O-Antigen decorations in *Salmonella enterica* play a key role in eliciting functional immune responses against heterologous serovars in animal models. Front Cell Infect Microbiol. 2024 Feb 29;14:1347813. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1347813
2. Yue M, Liu D, Li X, Jin S, Hu X, Zhao X, et al. Epidemiology, Serotype and Resistance of *Salmonella* Isolates from a Children's Hospital in Hangzhou, Zhejiang, China, 2006-2021. Infect Drug Resist. 2022 Aug 22;15:4735-4748. DOI: 10.2147/IDR.S374658
3. Huo CX, Dhara D, Baliban SM, Tahmasebi Nick S, Tan Z, Simon R, et al. Synthetic and immunological studies of *Salmonella Enteritidis* O-antigen tetrasaccharides as potential anti-*Salmonella* vaccines. Chem Commun (Camb). 2019 Apr 11;55(31):4519-4522. DOI: 10.1039/c8cc08622b
4. Percival SL, Williams DW. Chapter Ten – *Salmonella*. Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition) Microbiological Aspects and Risks. UK, Academic Press. 2014;209-222.
5. Shubin FN, Rakov AV, Kuznetsova NA, Yakubich TV, Snetkova IP. Formation of population morbidity with salmonellosis caused by *Salmonella Enteritidis* in regions with incomplete supply of local poultry products. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2017;1:61-67. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-1-61-67 (In Russian).
6. Available at: rospotrebnadzor.ru/about/info/news_region/news_details_region.php?ELEMENT_ID=26055&sphrase_id=5177607
7. Punchedwage-Don AJ, Hawkins J, Adnan AM, Hashem F, Parveen S. The outbreaks and prevalence of antimicrobial resistant *Salmonella* in poultry in the United States: An overview. Heliyon. 2022 Nov 12;8(11):e11571. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e11571
8. Yoke-Kqueen C, Learn-Han L, Noorzaleha AS, Son R, Sabrina S, Jiun-Hong S, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from indigenous vegetables and poultry in Malaysia. Lett Appl Microbiol. 2008 Mar;46(3):318-24. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02311.x
9. Montville T, Matthews K. Food Microbiology: An Introduction. 2nd ed. Washington, USA, ASM Press, 2008.
10. Gremyakova TA, Fursova NK, Stepanov AV. Vaksinatziya protiv bryushnogo tifa rezul'taty i perspektivy. Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk. 1997;6:11-16. (In Russian).
11. Lobzin YuV, Lvov VL, Kaira AN, Markina AA, Elkina SI, Ankudinov IV, et al. Epidemiological features and immunization against typhoid fever. Infectious Diseases: News, Opinions, Training. 2020;9(2):106-114. DOI: 10.33029/2305-3496-2020-9-2-106-114 (In Russian).
12. Hindle Z, Chatfield SN, Phillimore J, Bentley M, Johnson J, Cosgrove CA, et al. Characterization of *Salmonella enterica* derivatives harboring defined *aroC* and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system (*ssaV*) mutations by immunization of healthy volunteers. Infect Immun. 2002 Jul;70(7):3457-67. DOI: 10.1128/IAI.70.7.3457-3467.2002
13. Karpukhin GI, Shapiro NI, Andrievskaya RA. Khimicheskie vaksiny dlya profilaktiki kishchechnykh infektsii: nauchnoe izdanie. L.: Meditsina Publ., 1979. (In Russian).
14. Costantino P, Rappuoli R, Berti F. The design of semi-synthetic and synthetic glycoconjugate vaccines. Expert Opin Drug Discov. 2011 Oct;6(10):1045-66. DOI: 10.1517/17460441.2011.609554
15. Simon R, Levine MM. Glycoconjugate vaccine strategies for protection against invasive *Salmonella* infections. Hum Vaccin Immunother. 2012 Apr;8(4):494-8. DOI: 10.4161/hv.19158
16. Simon R, Tennant SM, Wang JY, Schmidlein PJ, Lees A, Ernst RK, et al. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis core O polysaccharide conjugated to H: g,m flagellin as a candidate vaccine for protection against invasive infection with *S. enteritidis*. Infect Immun. 2011 Oct;79(10):4240-9. DOI: 10.1128/IAI.05484-11
17. Nasrin S, Fuche FJ, Sears KT, Jones JA, Levine MM, Simon R, et al. Refinement of a Live Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Newport Vaccine with Improved Safety. Vaccines (Basel). 2021 Jan 16;9(1):57. DOI: 10.3390/vaccines9010057
18. Lei EK, Azmat A, Henry KA, Hussack G. Outer membrane vesicles as a platform for the discovery of antibodies to bacterial pathogens. Appl Microbiol Biotechnol. 2024 Feb 24;108(1):232. DOI: 10.1007/s00253-024-13033-5

References

19. Sánchez-Vargas FM, Abu-El-Haija MA, Gómez-Duarte OG. *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis*. 2011 Nov;9(6):263-77. DOI: 10.1016/j.tmaid.2011.11.001
20. Dyatlov IA, Svetoch EA, Mironenko AA, Eruslanov BV, Firstova VV, Fursova NK, et al. Molecular Lipopolysaccharide Di-Vaccine Protects from Shiga-Toxin Producing Epidemic Strains of *Escherichia coli* O157:H7 and O104:H4. *Vaccines (Basel)*. 2022 Nov 1;10(11):1854. DOI: 10.3390/vaccines10111854
21. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol: water and further application of the procedure. *Meth Carbohydr Chem*. 1965;5:83-91.
22. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5. DOI: 10.1038/227680a0
23. Pirogenost'. OFS.1.2.4.0005.15. Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiiskoi Federatsii, XIV izdanie. T. 1. Moscow: Min. Zdrav. RF. 2018;1227-1228. (In Russian).
24. Ledov VA, Golovina ME, Markina AA, Knirel YA, L'vov VL, Kovalchuk AL, et al. Highly homogenous tri-acylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against *Shigella flexneri* 2a infection. *Vaccine*. 2019 Feb 14;37(8):1062-1072. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.12.067
25. Snyder DS, Gibson D, Heiss C, Kay W, Azadi P. Structure of a capsular polysaccharide isolated from *Salmonella Enteritidis*. *Carbohydr Res*. 2006 Oct 16;341(14):2388-97. DOI: 10.1016/j.carres.2006.06.010
26. Brooks BW, Perry MB, Lutze-Wallace CL, Maclean LL. Structural characterization and serological specificities of lipopolysaccharides from *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum standard, intermediate and variant antigenic type strains. *Vet Microbiol*. 2008 Jan 25;126(4):334-44. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.07.022
27. Kusumoto S, Fukase K, Fukase Y, Kataoka M, Yoshizaki H, Sato K, et al. Structural basis for endotoxic and antagonistic activities: investigation with novel synthetic lipid A analogs. *J Endotoxin Res*. 2003;9(6):361-6. DOI: 10.1179/096805103225002737
28. Beal RK, Smith AL. Antibody response to Salmonella: its induction and role in protection against avian enteric salmonellosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007 Oct;5(5):873-81. DOI: 10.1586/14787210.5.5.873
29. Rossi O, Caboni M, Negrea A, Necchi F, Alfini R, Micoli F, et al. Toll-Like Receptor Activation by Generalized Modules for Membrane Antigens from Lipid A Mutants of *Salmonella enterica* Serovars *Typhimurium* and *Enteritidis*. *Clin Vaccine Immunol*. 2016 Apr 4;23(4):304-14. DOI: 10.1128/CI.00023-16
30. De Benedetto G, Alfini R, Cescutti P, Caboni M, Lanzilao L, Necchi F, et al. Characterization of O-antigen delivered by Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMAs) vaccine candidates against nontyphoidal *Salmonella*. *Vaccine*. 2017 Jan 11;35(3):419-426. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.11.089
31. Gasperini G, Massai L, De Simone D, Raso MM, Palmieri E, Alfini R, et al. O-Antigen decorations in *Salmonella enterica* play a key role in eliciting functional immune responses against heterologous serovars in animal models. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024 Feb 29;14:1347813. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1347813
- Курбатова Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук, оператор участка производства №1, ООО «ГРИТВАК»
- Казаков Игорь Александрович, начальник производственного участка №1 ООО «ГРИТВАК»
- Разваляева Надежда Алексеевна, биолог-физиолог отдела контроля качества ООО «ГРИТВАК»
- Анкудинов Игорь Веналиевич, кандидат биологических наук, главный бухгалтер, ООО «ГРИТВАК»
- Ледов Владимир Алексеевич, кандидат медицинских наук, клинический директор ООО «ГРИТВАК»
- Шмиголь Владимир Игоревич, кандидат биологических наук, директор по производству ООО «ГРИТВАК»
- Головина Марина Эдуардовна, кандидат биологических наук, исполнительный директор ООО «ГРИТВАК»
- Апарин Пётр Геннадьевич, доктор медицинских наук, генеральный директор ООО «ГРИТВАК»
- Светоч Эдуард Арсениевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
- Карцев Николай Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
- Дятлов Иван Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

- Olesya I. Naumenko, PhD in Chemical Sciences, Chemist, Structural Analyst, GRITVAK LLC
- Biana I. Alkhazova, Operator, GRITVAK LLC
- Anna A. Mironenko, PhD in Biological Sciences, Biochemist of the Clinical Laboratory, GRITVAK LLC
- Petr A. Stryakhnin, Leading Biotechnologist, GRITVAK LLC
- Irina Yu. Kurbatova, PhD in Biological Sciences, Operator of Production Site No 1, GRITVAK LLC
- Igor A. Kazakov, Head of Production Site No 1, GRITVAK LLC
- Nadezhda A. Razvalyayeva, Biologist-Physiologist of the Quality Control Department, GRITVAK LLC
- Igor V. Ankudinov, PhD in Biological Sciences, Chief Accountant, GRITVAK LLC
- Vladimir A. Ledov, MD, PhD, clinical director, GRITVAK LLC
- Vladimir I. Shmigol, PhD in Biological Sciences, director of production, GRITVAK LLC
- Marina E. Golovina, PhD in Biological Sciences, executive director, GRITVAK LLC
- Petr G. Aparin, MD, PhD, DSc, general director, GRITVAK LLC
- Eduard A. Svetoch, DSc in Veterinary Sciences, Professor, Chief Researcher of the Department of Molecular Microbiology of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
- Nikolay N. Kartsev, MD, PhD, Senior Researcher of the Department of Molecular Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
- Ivan A. Dyatlov, Academician of the Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DScs, Professor, Director of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Информация о соавторах:

- Науменко Олеся Игоревна, кандидат химических наук, химик, структурный аналитик ООО «ГРИТВАК»
- Алхазова Биана Игоревна, оператор ООО «ГРИТВАК»
- Мироненко Анна Александровна, кандидат биологических наук, биохимик клинической лаборатории ООО «ГРИТВАК»
- Стряхнин Пётр Алексеевич, ведущий биотехнолог, ООО «ГРИТВАК»