

Оригинальная статья

УДК:577.112:576.3:612.017.12:616.932-092.9

<https://doi.org/10.21886/2219-8075-2023-14-3-66-72>

Профилактическая эффективность препаратов везикул наружных мембран атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы

А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, О.В. Дуванова, Е.С. Шипко, А.А. Труфанова, И.А. Иванова,
В.В. Евдокимова

Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Автор, ответственный за переписку: Анна Владимировна Филиппенко, filippenko.annushka@mail.ru

Аннотация. Цель исследования: оценка эффективности и целесообразности применения везикул наружных мембран атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы для профилактики экспериментальной холеры. Материалы и методы. Для получения везикул использовали атоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor 18950 (ctxAB-tcpA-) и 18780 (ctxAB-tcpA+), выделенные из воды поверхностных водоёмов. Протективные свойства полученных препаратов оценивали на модели генерализованной формы холеры у белых мышей и модели изолированной петли тонкого кишечника взрослого кролика. Результаты: показано, что везикулы наружных мембран, выделенные из атоксигенных штаммов холерного вибриона, обладают протективным действием и препятствуют развитию инфекции у экспериментальных животных при заражении их вирулентным штаммом холеры. Наибольшую эффективность полученные препараты проявляют при парентеральном двукратном, с интервалом в семь дней, введении, предотвращая гибель всех взятых в эксперимент белых мышей и развитие патогенетических процессов в тонком кишечнике взрослых кроликов. Выводы: полученные данные свидетельствуют о формировании у животных выраженной иммунной защиты от заболевания, а также о возможности использования данных структур для создания профилактических противохолерных препаратов.

Ключевые слова: везикулы наружных мембран, *Vibrio cholerae*, протективные свойства, специфическая профилактика холеры, вакцина

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Дуванова О.В., Шипко Е.С., Труфанова А.А., Иванова И.А., Евдокимова В.В. Профилактическая эффективность препаратов везикул наружных мембран атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы. *Медицинский вестник Юга России*. 2023;14(3):66-72. DOI 10.21886/2219-8075-2023-14-3-66-72

Preventive efficacy of preparations of vesicles of external membranes of atoxygenic strains of *Vibrio cholerae* O1 serogroup

A.V. Filippenko, N.D. Omelchenko, O.V. Duvanova, E.S. Shipko, A.A. Trufanova, N.I. Pasyukova,
I.A. Ivanova, V.V. Evdokimova

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russia

Corresponding author: Anna V. Filippenko, filippenko.annushka@mail.ru.

Abstract: Purpose: To evaluate the effectiveness and expediency of using vesicles of the outer membranes of atoxygenic strains of *Vibrio cholerae* O1 serogroup for the prevention of experimental cholera. **Materials and methods:** atoxygenic strains of *V. cholerae* O1 El Tor 18950 (ctxAB-tcpA-) and 18780 (ctxAB-tcpA+) isolated from the water of surface reservoirs were used to obtain vesicles. The protective properties of the obtained drugs were evaluated using a model of generalized cholera in white mice and a model of an isolated loop of the small intestine of an adult rabbit. **Results:** it has been shown that vesicles of the outer membranes isolated from atoxygenic strains of *V. cholerae* have a protective effect and prevent the development of infection in experimental animals when infected with a virulent strain of cholera. The obtained drugs are most effective when administered parenterally twice, with an interval of seven days, preventing the death of all white mice taken in the experiment and the development of pathogenetic processes in the small intestine of adult rabbits. **Summary:** the data obtained indicates the formation of pronounced immune protection against the disease in animals, as well as the possibility of using these structures to create preventive anti-cholera drugs.

Keywords: vesicles of external membranes, *Vibrio cholerae*; protective properties, specific prevention of cholera, vaccine/

Financing. The study did not have sponsorship.

For citation: Filippenko A.V., Omelchenko N.D., Duvanova O.V., Shipko E.S., Trufanova A.A., Pasyukova N.I., Ivanova I.A., Evdokimova V.V. Preventive efficacy of preparations of vesicles of external membranes of atoxygenic strains of *Vibrio cholerae* O1 serogroup. *Medical Herald of the South of Russia*. 2023;14(3):66-72. DOI 10.21886/2219-8075-2023-14-3-66-72.

Введение

В процессе жизнедеятельности у всех грамотрицательных бактерий образуются везикулы наружных мембран (OMVs) — сферические структуры диаметром от 20 до 300 нм [1, 2]. Установлено, что молекулы белковой и липополисахаридной природы, расположенные на наружной мембране микроба, являются мишенями для компонентов врождённого (неспецифического) иммунитета, а также проявляют свойства протективных антигенов и участвуют в формировании специфического антибактериального иммунитета [3]. Поэтому исследования по изучению иммуногенных и протективных свойств везикул наружных мембран различных возбудителей активно ведутся во всём мире. Для профилактики менингококковой инфекции, вызываемой *Neisseria meningitidis* серогруппы В, лицензирована и успешно используется в клинической практике вакцина Bexsero (Италия), состоящая из везикул наружных мембран [3]. В литературных источниках приводятся доказательства формирования эффективного иммунитета к различным бактериальным инфекциям при использовании вакцинных препаратов на основе везикул наружных мембран *Escherichia coli* [4], *Neisseria gonorrhoeae* [5], *Burkholderia pseudomallei* [6], *Salmonella typhimurium* [7], *Helicobacter pylori* [8], *Neisseria meningitidis* [9], *Brucella abortus* [10], *Klebsiella pneumoniae* [11], *Bordetella pertussis* [12] и т.д.

Показано, что везикулярные вакцины имеют ряд важных преимуществ: они безопасны, но обладают свойствами целой бактериальной клетки, антигены на их поверхности находятся в нативном состоянии. Кроме того, они не требуют холодной цепи и буферного раствора, что делает их применение экономически выгодным и перспективным [13].

Как и все грамотрицательные бактерии, холерные вибрионы способны выделять везикулы наружных мембран — образования сферической формы от 20 до 200 нм, которые транспортируют различные факторы вирулентности возбудителя, в том числе и холерный токсин (ХТ), к клеткам эпителия тонкого кишечника [14–16].

Об эффективности использования OMVs холерного вибриона в качестве средства специфической профилактики холеры свидетельствуют эксперименты, проведённые зарубежными учеными. Так S. Schild с соавт. [17] обнаружили у мышей, рождённых от матерей, иммунизированных препаратами OMVs токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* E7946 O1 El Tor Inaba и *V. cholerae* O395 O1 Ogawa, наличие противохолерных иммуноглобулинов (Ig) класса G в количестве, достаточном для полной защиты новорождённых от колонизации холерных вибрионов, что свидетельствовало о возможности передачи пассивного гуморального иммунитета к возбудителю холеры. При этом в фекалиях иммунизированных самок регистрировались специфические IgA и IgG1, подтверждающие индукцию иммунного ответа в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). Интересно, что включение в состав OMVs холерных вибрионов гетерологичного антигена (периплазматической щелочной фосфатазы *E. coli*) и последующая интраназальная иммунизация ими индуцировала у мышей специфический иммунный ответ против гетерологичного антигена. Полученные данные свидетельствуют о потенциальной возможности

использования везикул для доставки различных антигенов при разработке новых вакцин [17]. N. Roy с соавт. [18] было выявлено, что OMVs *V. cholerae* значительно менее реактогенны, чем живые и убитые при нагревании бактерии, а пероральная иммунизация такими препаратами может индуцировать долгосрочный иммунитет. A.L. Bishop с соавт. [19] выявили, что иммунизация мышей везикулами наружных мембран холерных вибрионов O1 серогруппы Инаба или Огава обеспечивает защиту тонкого кишечника животных от колонизации *V. cholerae* O1 обоих серотипов. Этими же авторами показано, что OMVs *V. cholerae* O1 или O139 серогрупп не обеспечивают перекрёстную серогрупповую защиту, а использование смеси везикул наружных мембран, выделенных от холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, обеспечивают защиту животных от заражения этими штаммами. Другими учеными обнаружено [20], что введение OMVs *V. cholerae* или энтеротоксигенной кишечной палочки (ETEC) вызывало формирование видоспецифичного иммунитета, а комбинации везикул этих бактерий — высокого иммунного ответа против обоих патогенов.

R. Sinha с соавт. [21] создали экспериментальную противохолерную вакцину (CPMV), смешав везикулы наружных мембран пяти вирулентных штаммов *V. cholerae*. Показано, что четырёхкратная пероральная иммунизация CPMVs индуцировала у мышей специфические В- и Т-клеточные реакции, выработку сывороточных противохолерных антител класса G, A, M, sIgA на слизистых оболочках, а также секрецию цитокинов, характерных для Th2 и Th17 иммунных ответов. Иммунизированные этой вакциной взрослые мыши и их потомство были защищены от заражения вирулентными штаммами *V. cholerae*.

M. Sedaghat и соавт. [22] продемонстрировали, что пероральная вакцинация мышей OMVs и, особенно, в комбинации с клиническим штаммом *V. cholerae*, выделенным от больного холерой (WC-OMVs), обеспечивает защиту от заражения вирулентными штаммами холеры. Наибольшая эффективность WC-OMVs, по мнению авторов, может быть связана либо с увеличением количества протективных антигенов, либо с адьювантными свойствами везикул.

Таким образом, все вышеизложенное свидетельствует о возможности применения везикул наружных мембран для специфической профилактики холеры. Однако экспериментальные разработки, касающиеся создания вакцин на основе OMVs холерных вибрионов, были проведены с использованием вирулентных штаммов *V. cholerae*. Работа с такими штаммами требует особого режима с соблюдением усиленных мер безопасности, что затрудняет получение вакцинных препаратов. Кроме того, в везикулах, полученных из токсигенных штаммов, может находиться ХТ — основной фактор патогенности возбудителя холеры. Показано, что большая часть ХТ секретируется в OMV-ассоциированной форме и находится исключительно внутри везикул [16]. В отличие от свободного ХТ, секретируемого через систему секреции II типа, OMV-ассоциированный ХТ защищен от деградации кишечными протеазами, что позволяет ему дольше находиться в кишечном тракте и сохранять токсичность [15].

Цель исследования — оценка эффективности и целесообразности применения везикул наружных мембран атоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы для профилактики экспериментальной холеры.

Материалы и методы

Для получения препаратов везикул использовали штаммы *V. cholerae* O1 El Tor 18950 (*ctxAB tcpA*), 18780 (*ctxAB tcpA*⁺), выделенные из воды поверхностных водоёмов. Культуры выращивали при 37°C 18 часов на агаре Мартена (рН 7.6). Из суточной агаровой культуры делали 1 млрд взвесь по стандарту мутности в 3 мл физиологического раствора (рН 7.8) и 0,5 мл взвеси засеивали в 25 мл бульона LB. Штаммы культивировали с дополнительной аэрацией (шуттелированием) 120–130 качаний в минуту на шуттеле (Incubator shaker, serious 25, США) 18 часов при 37°C. Из выросшей культуры засеивали по 0,5 мл в 4 флакона среды LB по 250 мл и выращивали 18 часов с аэрацией.

После обеззараживания мертиолятом натрия 1:10000 культуру, выращенную в питательной жидкой среде, центрифугировали при 6000 об./мин. 25 минут на холоде на центрифуге (Beckman, model J2-21, США). Полученные надосадки попеременно фильтровали через мембраны с диаметром пор 0,45 мкм и 0,22 мкм. Концентрировали препараты в 10 раз на ультрафильтрационной установке (Amicon) с последующим центрифугированием образцов при 45000g в течение 2 часов. Для дальнейшего исследования осадок растворяли в 500 мкл физиологического раствора (рН 7.8). Количество белка в полученных препаратах составляло 400–500 мкг/мл. Детекцию белка проводили на приборе (Bio Rad). Готовые препараты хранили при -20°C.

Наличие везикул в препаратах подтверждали методом ТЭМ с помощью электронного цифрового микроскопа Jeol JEM 1011. Все манипуляции выполняли согласно МУ 1.3.3103–13 [23]. Было обнаружено присутствие сферических везикул размерами около 40–200 нм.

Оценка специфической стерильности препаратов с помощью бактериологического метода показала их биологическую безопасность.

Анализ белков препаратов везикул осуществляли в ПААГ-электрофорезе в присутствии SDS по методике U.K. Laemmli [24]. Наличие липополисахарида (ЛПС) в составе препаратов везикул определяли методом прямого варианта иммуноферментного анализа (ИФА), который осуществляли общепринятым методом в 96-луночных плоскодонных серологических планшетах (Costar) [25].

Протективную способность полученных везикул наружных мембран оценивали на модели белых мышей (16–20 г в возрасте 6–10 недель) и на модели взрослых кроликов (1,5–2 кг). При работе с экспериментальными животными руководствовались международными принципами, изложенными в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» ETS N 123 (Страсбург, 1986), Приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 № 199Н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». На все эксперименты получено положительное заключение Комиссии по биоэтике при

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, протокол заседания №2 от 17.01.2022 г.

Белых мышей иммунизировали парентерально (внутримышечно) однократно и двукратно (с интервалом в семь дней) полученными препаратами OMVs в дозе 2,5 и 5 мкг белка. Контрольным животным вводили физиологический раствор в том же объёме (0,2 мл) и по той же схеме. Через две недели после последней иммунизации у опытных и контрольных животных вызывали генерализованную форму холеры [26]. Результаты эксперимента учитывали только при гибели всех контрольных животных в течение суток.

Также защитное действие препаратов везикул оценивали на модели взрослых кроликов. Животных иммунизировали парентерально (внутримышечно) однократно и двукратно (с интервалом в семь дней) препаратами везикул по 150 мкг белка в объёме 0,5 мл. Контрольным кроликам вводили физиологический раствор в том же объёме и по той же схеме. Протективную активность препаратов изучали с помощью модели перевязанной петли тонкого кишечника взрослых кроликов [27]. О развитии экспериментальной холеры судили по наличию холерогенного и энтеропатогенного эффектов в опытной петле тонкого кишечника. Об энтеропатогенном эффекте свидетельствовали развитие отёка слизистой и подслизистой оболочек, кровоизлияния и некроза покровного эпителия ворсин кишечника, о холерогенном — растянутая опытная петля (в результате выпота тканевой жидкости и электролитов в просвет кишечника). Наличие/отсутствие холерогенного эффекта определяли, рассчитывая коэффициент растяжения петли по формуле

$$\text{коэффициент растяжения петли (K)} = \frac{\text{объём жидкости}}{\text{длина петли}},$$

где значение $K > 1,0$

свидетельствует о наличии холерогенного эффекта.

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием Microsoft Excel 2010 и StatSoft Statistica Windows 10.01. Эксперименты проводили в трёх повторностях, после чего определяли значения доверительных интервалов среднеарифметического (M) для уровня достоверности (P) 95%. Проводили сравнение совокупностей по качественным признакам с помощью критерия Фишера. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Проведена оценка наличия на мембране выделенных везикул основных протективных антигенов — белков и ЛПС. Показано, что в препаратах, полученных из штаммов *V. cholerae* O1 18950 и 18780, присутствуют белковые полосы на уровне маркера молекулярной массы 40 и 45 кДа в первом препарате и 38 и 40 кДа во втором, что соответствует молекулярному весу белков наружной мембраны, относящимся к семейству омпинов (поринным белкам наружной мембраны OmpT, OmpU). Также в этих двух препаратах была выявлена минорная полоса около

Таблица / Table 1

Эффективность однократного и двукратного введения препаратов везикул холерного вибриона на модели белых мышей
Efficacy of single and double administration of vibrio cholera vesicles in a model of white mice

Препараты везикул <i>Vesicle preparations</i>	Количество мышей в каждом эксперименте <i>Number of mice in each experiment</i>	Доза препарата (мкг) <i>The dose of the drug (mcg)</i>	Выживаемость животных <i>Animal survival (%)</i>	
			При однократном введении <i>Single introduction</i>	При двукратном введении <i>Double introduction</i>
<i>V. cholerae</i> O1 <i>El Tor</i> 18950	20	2,5	13,3±2,0	48,3±2,89*
	20	5	23,3±2,6	100±0,0* **
<i>V. cholerae</i> O1 <i>El Tor</i> 18780	20	2,5	11,7±2,9	43,3±2,89*
	20	5	23,4±2,2	98,3±1,9* **
Интактные животные <i>Intact animals</i>	20	-	0	0

Примечание: * — достоверное отличие от показателя при однократном введении; ** — достоверное отличие от показателя при иммунизации более низкой дозой.

Note: * — a significant difference from the indicator with a single injection; ** — a significant difference from the indicator for immunization with a lower dose.

Таблица / Table 2

Влияние препаратов OMVs на развитие патогенетической картины экспериментальной холеры у взрослых кроликов
The effect of OMVs preparations on the development of the pathogenetic picture of experimental cholera in adult rabbits

Препараты везикул <i>Vesicle preparations</i>	Наличие признаков развития экспериментальной холеры <i>The presence of signs of the development of experimental cholera</i>			
	Однократное введение <i>Single introduction</i>		Двукратное введение <i>Double introduction</i>	
	Энтеропатогенный (степень выраженности) <i>Enteropathogenic (degree of severity)</i>	Холерогенный (K>1) <i>Cholerogenic (K>1)</i>	Энтеропатогенный (степень выраженности) <i>Enteropathogenic (degree of severity)</i>	Холерогенный (K>1) <i>Cholerogenic (K>1)</i>
<i>V. cholerae</i> O1 <i>El Tor</i> 18950	Средняя <i>Average</i>	1,28±0,1	Отсутствует <i>Absent</i>	0,25±0,18
<i>V. cholerae</i> O1 <i>El Tor</i> 18780	Сильная <i>Strong</i>	1,19±0,12	Отсутствует <i>Absent</i>	0,34±0,21
Интактные животные <i>Intact animals</i>	Сильная <i>Strong</i>	1,33±0,14	Сильная <i>Strong</i>	1,27±0,17

66,2 кДа. Наличие ЛПС, согласно результатам проведённого ИФА, подтверждено во всех исследуемых препаратах везикул.

При изучении протективности полученных препаратов везикул в тесте активной защиты мышей выявлено, что однократная иммунизация OMVs *V. cholerae* O1 *El Tor* 18950 и *V. cholerae* O1 *El Tor* 18780 недостаточно эффективно защитила животных от гибели после заражения вирулентными штаммами холеры как при использовании иммунизирующей дозы 2,5 мкг, так и 5 мкг (табл. 1).

Двукратная иммунизация везикулами *V. cholerae* в дозе 2,5 мкг достоверно способствовала увеличению защитной эффективности препаратов, предотвращая гибель около 50% животных в группе, получавших везикулы штамма *V. cholerae* O1 *El Tor* 18950, и около 45 % мышей, иммунизированных препаратом OMVs *V. cholerae* O1 *El Tor* 18780.

Лучшие результаты на этой экспериментальной модели получены нами при двукратном применении препаратов в дозе 5 мкг. Данная схема обеспечивала

выживаемость 100% белых мышей из группы примированных OMVs *V. cholerae* O1 El Tor 18950 и практически всех животных, вакцинированных везикулами *V. cholerae* O1 El Tor 18780 (табл. 1)

Анализ результатов профилактической эффективности изучаемых везикул *V. cholerae* O1 El Tor 18950 и *V. cholerae* O1 El Tor 18780 на модели взрослых кроликов показал, что однократное введение препаратов в дозе 150 мкг не защищало животных от развития симптомов холеры в тонком кишечнике, как и в случае однократного применения препаратов при моделировании генерализованной формы холеры у мышей.

Увеличение протективной активности было зарегистрировано нами только после двукратной иммунизации животных. У кроликов опытных групп в опытной и контрольной изолированных петлях тонкого кишечника отсутствовали энтеропатогенный и холерогенный эффекты ($K < 1,0$). При этом у животных контрольной группы опытные петли были растянуты жидкостью (холерогенный эффект) и наблюдались отёк более глубоко лежащих тканей, кровоизлияния и некрозы покровного эпителия ворсин (энтеропатогенный эффект) (табл. 2).

Обсуждение

Результаты проведённых экспериментов свидетельствуют о том, что везикулы, выделенные из атоксигенных штаммов холерных вибрионов, обладают протективной способностью и защищают животных от развития экспериментальной холеры. Наибольшую эффективность полученные препараты в изученных дозах проявляют при двукратном парентеральном введении, предотвращая гибель всех взятых в эксперимент белых мышей и развитие патогенетических процессов в тонком кишечнике взрослых кроликов.

Полученные данные подтверждаются нашими предыдущими исследованиями, посвящёнными изучению протективной активности наружных мембран холерных вибрионов, выделенных из атоксигенных штаммов *V. cholerae*. Было выявлено наличие иммуногенной и протективной активности у наружных мембран холерного вибриона, выделенных щадящими методами из штамма *V. cholerae* El tor 18950 (*ctx*, *tcp*, *OmpT*⁺, *OmpU*, *OmpW*⁺). Двукратная иммунизация белых мышей (по 10 мкг) и взрослых кроликов (по 700 мкг) этим препаратом предотвращала развитие холеры у экспериментальных

животных, заражённых вирулентными штаммами возбудителя, причём этот эффект сохранялся до пяти месяцев поствакцинального периода (срок наблюдения) [28]. Показано, что наличие защитной способности штамма *V. cholerae* O1 El Tor 18950 было обусловлено повышенной продукцией на его мембране белка *OmpT*, обладающего высокой иммуногенностью и протективностью [29]. Полученные в рамках данной работы везикулы наружных мембран, в том числе и из этого штамма, обладали хорошим защитным эффектом при гораздо более низких дозах (5 мкг/мышь и 150 мкг/кролик). Это свидетельствует о сохранении нативной структуры основных протективных антигенов — ЛПС и белков наружной мембраны, входящих в состав везикул [13], — и обеспечивает им большую протективную способность по сравнению с препаратами наружных мембран.

В отличие от зарубежных авторов, получавших экспериментальные препараты везикул из вирулентных штаммов холерных вибрионов [17–22], что требует соблюдения особых мер безопасности и контроля токсичности препаратов из-за наличия в них ХТ как основного фактора патогенности холерного вибриона, нами выделены OMVs из авирулентных (атоксигенных) штаммов холерных вибрионов и показано их протективное действие при экспериментальной холере. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования этих везикул для специфической профилактики холеры и могут быть полезны при разработке новых вакцинных препаратов против этой инфекции.

Выводы

1. Препараты OMVs, выделенные из культур атоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor 18950 и *V. cholerae* O1 El Tor 18780, обладают протективной активностью в отношении токсигенных холерных вибрионов O1 серогруппы.
2. При использовании везикул имеет значение иммунизирующая доза и кратность введения препарата.
3. Двукратное внутримышечное применение OMVs (для белых мышей в дозе 5 мкг, взрослых кроликов в дозе 150 мкг) препятствовало развитию экспериментальной холеры у всех взятых в эксперимент животных.
4. Полученные данные свидетельствуют о возможности и перспективности использования данных препаратов для совершенствования специфической профилактики холеры.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Малкова М.А., Дудина Л.Г., Девришов Д.А., Бывалов А.А. Везикулообразование грамотрицательных бактерий (обзор литературы). *Advanced Science*. 2017;4:3. Malkova M.A., Dudina L.G., Devrishov D.A., Byvalov A.A. Vesicle formation of gram-negative bacteria (literature review). *Advanced Science*. 2017;4:3. (In Russ.) eLIBRARY ID: 32314449
2. Langlete P, Krabberød AK, Winther-Larsen HC. Vesicles From *Vibrio cholerae* Contain AT-Rich DNA and Shorter mRNAs That Do Not Correlate With Their Protein Products. *Front Microbiol*. 2019;10:2708. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02708>
3. Tani C, Stella M, Donnarumma D, Biagini M, Parente P, et al. Quantification by LC-MS(E) of outer membrane vesicle proteins of the Bexsero® vaccine. *Vaccine*. 2014;32(11):1273-9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.01.011>
4. Fantappiè L, de Santis M, Chiarot E, Carboni F, Bensi G, et al. Antibody-mediated immunity induced by engineered *Escherichia coli* OMVs carrying heterologous antigens in their lumen. *J Extracell Vesicles*. 2014;3. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24015>
5. Petousis-Harris H, Radcliff FJ. Exploitation of *Neisseria meningitidis* Group B OMV Vaccines Against *N. gonorrhoeae* to Inform the Development and Deployment of Effective Gonorrhea Vaccines. *Front Immunol*. 2019;10:683. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00683>

6. Nieves W, Asakrah S, Qazi O, Brown KA, Kurtz J, et al. A naturally derived outer-membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary Burkholderia pseudomallei infection. *Vaccine*. 2011;29(46):8381-9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.058>
7. Alaniz RC, Deatherage BL, Lara JC, Cookson BT. Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of Salmonella typhimurium that potentially activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. *J Immunol*. 2007;179(11):7692-701. Erratum in: *J Immunol*. 2008;180(5):3612. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7692>
8. Winter J, Letley D, Rhead J, Atherton J, Robinson K. Helicobacter pylori membrane vesicles stimulate innate pro- and anti-inflammatory responses and induce apoptosis in Jurkat T cells. *Infect Immun*. 2014;82(4):1372-81. <https://doi.org/10.1128/IAI.01443-13>
9. Durand V, Mackenzie J, de Leon J, Mesa C, Quesniaux V, et al. Role of lipopolysaccharide in the induction of type I interferon-dependent cross-priming and IL-10 production in mice by meningococcal outer membrane vesicles. *Vaccine*. 2009;27(13):1912-22. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.109>
10. Pollak CN, Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC. Outer membrane vesicles from Brucella abortus promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. *PLoS One*. 2012;7(11):e50214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050214>
11. Lee JC, Lee EJ, Lee JH, Jun SH, Choi CW, et al. Klebsiella pneumoniae secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. *FEMS Microbiol Lett*. 2012;331(1):17-24. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02549.x>
12. Asensio CJ, Gaillard ME, Moreno G, Bottero D, Zurita E, et al. Outer membrane vesicles obtained from Bordetella pertussis Tohama expressing the lipid A deacylase PagL as a novel acellular vaccine candidate. *Vaccine*. 2011;29(8):1649-56. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.12.068>
13. van der Pol L, Stork M, van der Ley P. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. *Biotechnol J*. 2015;10(11):1689-706. <https://doi.org/10.1002/biot.201400395>
14. Chatterjee D, Chaudhuri K. Association of cholera toxin with Vibrio cholerae outer membrane vesicles which are internalized by human intestinal epithelial cells. *FEBS Lett*. 2011;585(9):1357-62. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.017>
15. Zingl FG, Thapa HB, Scharf M, Kohl P, Müller AM, Schild S. Outer Membrane Vesicles of Vibrio cholerae Protect and Deliver Active Cholera Toxin to Host Cells via Porin-Dependent Uptake. *mBio*. 2021;12(3):e0053421. <https://doi.org/10.1128/mBio.00534-21>
16. Rasti ES, Schappert ML, Brown AC. Association of Vibrio cholerae 569B outer membrane vesicles with host cells occurs in a GM1-independent manner. *Cell Microbiol*. 2018;20(6):e12828. <https://doi.org/10.1111/cmi.12828>
17. Schild S, Nelson EJ, Bishop AL, Camilli A. Characterization of Vibrio cholerae outer membrane vesicles as a candidate vaccine for cholera. *Infect Immun*. 2009;77(1):472-84. <https://doi.org/10.1128/IAI.01139-08>
18. Roy N, Barman S, Ghosh A, Pal A, Chakraborty K, et al. Immunogenicity and protective efficacy of Vibrio cholerae outer membrane vesicles in rabbit model. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010;60(1):18-27. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00692.x>
19. Bishop AL, Schild S, Patimalla B, Klein B, Camilli A. Mucosal immunization with Vibrio cholerae outer membrane vesicles provides maternal protection mediated by antilipopolysaccharide antibodies that inhibit bacterial motility. *Infect Immun*. 2010;78(10):4402-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00398-10>
20. Leitner DR, Lichtenegger S, Temel P, Zingl FG, Ratzberger D, et al. A combined vaccine approach against Vibrio cholerae and ETEC based on outer membrane vesicles. *Front Microbiol*. 2015;6:823. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00823>
21. Sinha R, Koley H, Nag D, Mitra S, Mukhopadhyay AK, Chattopadhyay B. Pentavalent outer membrane vesicles of Vibrio cholerae induce adaptive immune response and protective efficacy in both adult and passive suckling mice models. *Microbes Infect*. 2015;17(3):215-27. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.10.011>
22. Sedaghat M, Siadat SD, Shahcheraghi F, Mirabzadeh Ardakani E, Keramati M, et al. Assessment of Mouse Ileal loop Protection against Clinically Isolated Vibrio cholerae Outer Membrane Vesicles as a Vaccine Candidate. *Arch Razi Inst*. 2021;75(4):451-461. <https://doi.org/10.22092/ari.2019.126909.1365>
23. МУ 1.3.3103-13 Организация работы лабораторий, использующих методы электронной и атомно-силовой микроскопии при исследовании культур микроорганизмов I—IV групп патогенности: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013. MU 1.3.3103-13 Organization of work of laboratories using methods of electron and atomic force microscopy in the study of cultures of microorganisms of pathogenicity groups I—IV: Guidelines. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2013. -20 p. (In Russ.).
24. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
25. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Бурша О.С. Иммуноферментные методы анализа в диагностике холеры. Клиническая лабораторная диагностика. 2016;5:303-307. Evdokimova VV, Alekseeva LP, Kretentchuk OF, Kruglikov VD, Arkhangelskaya IV, Bursha OS. The immune-enzyme techniques of analysis in diagnostic of cholera. *Klin Lab Diagn*. 2016;61(5):303-307. (In Russ.) <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307>
26. МУ 3.3.1.2075-06. 3.3.1. Вакцинопрофилактика. Основные требования к вакцинным штаммам холерного вибриона. Методические указания. Москва; 2006. MU 3.3.1.2075-06. 3.3.1. Vaccination. Basic requirements for vaccine strains of vibrio cholerae. Methodical instructions. Moscow;2006. (In Russ.).
27. Burrows W, Sack RB. Animal models of cholera. *Cholera. Philadelphia*. 1974;9:189-205.
28. Омельченко Н.Д., Мишанькин Б.Н., Иванова И.А., Дуванова О.В., Романова Л.В. и др. Изучение иммуногенных свойств наружных мембран холерного вибриона. Медицинская иммунология. 2015;17(3S):120-121. Omelchenko N.D., Mishankin B.N., Ivanova I.A., Duvanova O.V., Romanova L.V., et al. The study of the immunogenic properties of the outer membranes of the cholera vibrio. *Medical immunology*. 2015;17(3S):120-121. eLIBRARY ID: 24499179
29. Мишанькин Б.Н., Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Дуванова О.В., Романова Л.В. и др. Оценка перспективности использования мембранного белка OmpT для специфической профилактики экспериментальной холеры. Холе-

ра и патогенные для человека вибрионы. 2014;27:150-152.
Mishankin B.N., Ivanova I.A., Omelchenko N.D., Duvanova
O.V., Romanova L.V., et al. Evaluation of the prospects of
using ompT membrane protein for specific prevention of

experimental cholera. *Cholera and vibrios pathogenic to
humans*. 2014;27:150-152. (In Russ.).
eLIBRARY ID: 24643964

Информация об авторах

Филиппенко Анна Владимировна, младший науч-
ный сотрудник лаборатории иммунологии, Ростовский-
на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
Ростов-на-Дону, Россия; filippenko.annushka@mail.ru;
<https://orcid.org/0000-0002-1103-4244>

Омельченко Наталья Дмитриевна, к.м.н., старший на-
учный сотрудник лаборатории иммунологии, Ростовский-
на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
Ростов-на-Дону, Россия; natalya.omelchenko@yandex.ru;
<https://orcid.org/0000-0001-5208-7724>

Дуванова Ольга Викторовна, к.б.н., старший науч-
ный сотрудник лаборатории микробиологии холеры и
других ОКИ, Ростовский-на-Дону противочумный ин-
ститут Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия; olga_duvanova@mail.ru;
<https://orcid.org/0000-0002-1702-1620>

Шипко Елена Сергеевна, младший научный сотруд-
ник лаборатории микробиологии холеры и
других ОКИ, Ростовский-на-Дону противочумный ин-
ститут Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия; helena.shipman@gmail.com;
<https://orcid.org/0000-0002-8517-2789>

Труфанова Анастасия Александровна, млад-
ший научный сотрудник лаборатории иммуноло-
гии, Ростовский-на-Дону противочумный институт
Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия; nastyasia61@mail.ru;
<https://orcid.org/0000-0002-4770-5994>

Пасюкова Нина Ивановна, научный сотрудник ла-
боратории экспериментально-биологических моде-
лей и биологической безопасности, Ростовский-на-
Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
Ростов-на-Дону, Россия; plague@aaanet.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1525-5693>

Иванова Инна Александровна, к.б.н., ведущий на-
учный сотрудник с врио зав. лабораторией иммуно-
логии, Ростовский-на-Дону противочумный институт
Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия; ivanova_ia@antiplague.ru;
<https://orcid.org/0000-0001-7068-4071>

Евдокимова Вероника Вячеславовна, к.б.н. науч-
ный сотрудник лаборатории диагностических препа-
ратов, Ростовский-на-Дону противочумный инсти-
тут Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия; plague@aaanet.ru;
<https://orcid.org/0000-0001-5522-9097>

Information about the authors

Anna V. Filippenko, Junior Researcher, Laboratory of
Immunology, Rostov-on-Don Plague Control Research
Institute, Rostov-on-Don, Russia; filippenko.annushka@mail.ru;
<https://orcid.org/0000-0002-1103-4244>

Natalia D. Omelchenko, Cand. Sci. (Med.), Senior
Researcher Laboratory of Immunology, Rostov-on-
Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don,
Russia; natalya.omelchenko@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5208-7724>

Olga V. Duvanova, Cand. Sci. (Bio.), Senior Researcher
Laboratory of Microbiology of Cholera and other Acute
Intestinal Infections, Rostov-on-Don Plague Control Research
Institute, Rostov-on-Don, Russia; olga_duvanova@mail.ru;
<https://orcid.org/0000-0002-1702-1620>

Elena S. Shipko, Junior Researcher, Laboratory of
Microbiology of Cholera and other Acute Intestinal Infections,
Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-
on-Don, Russia; helena.shipman@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-8517-2789>

Anastasia A. Trufanova, Junior Researcher, Laboratory
of Immunology, Rostov-on-Don Plague Control Research
Institute, Rostov-on-Don, Russia; nastyasia61@mail.ru;
<https://orcid.org/0000-0002-4770-5994>

Nina I. Pasyukova, Researcher at the Laboratory of
Experimental Biological Models and Biological Safety,
Rostov-on-Don Plague Control Research Institute,
Rostov-on-Don, Russia; plague@aaanet.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1525-5693>

Inna A. Ivanova, Cand. Sci. (Bio.), Leading Researcher
with Acting Head of the Laboratory Immunology, Rostov-
on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-
Don, Russia; ivanova_ia@antiplague.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7068-4071>

Veronika V. Evdokimova, Cand. Sci. (Bio.), Researcher at
the Laboratory of Diagnostic Drugs, Rostov-on-Don Plague
Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia; plague@aaanet.ru;
<https://orcid.org/0000-0001-5522-9097>

Вклад авторов

Вклад авторов в написании работы равнозначен.

Authors' contribution

The contribution of the authors in writing the work is
equivalent.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

Authors declares no conflict of interest.

Поступила в редакцию / *Received*: 03.04.2023

Доработана после рецензирования / *Revised*: 11.04.2023

Принята к публикации / *Accepted*: 28.06.2023