

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-6-15

УДК 616.9:612.017.1

Н.В. Аронова¹, Н.В. Павлович¹, М.В. Цимбалистова¹, С.Н. Головин², А.С. Анисимова¹

РОЛЬ ВЕЗИКУЛ НАРУЖНЫХ МЕМБРАН ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ПАТОГЕНЕЗЕ И ИММУНОГЕНЕЗЕ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

¹ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация;
²ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

В обзоре проведен анализ литературы, посвященной современным представлениям о феномене везикуляции и его биологической роли у патогенных бактерий – возбудителей особо опасных инфекций человека. Обобщены данные о продукции, строении, композиционном составе и функциях везикул наружных мембран (OMV – outer membrane vesicles) бактерий. В последние годы резко возрос интерес исследователей к образованию сферических структур (так называемых пузырьков или везикул) из внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Такие структуры окружены двойным слоем фосфолипидной мембраны, внешний слой которой обогащен молекулами липополисахарида. Внутреннее пространство везикул может включать различные антигены, рецепторы, адгезины, токсины, ферменты, порины и др. Образование везикул наружными мембранами бактерий признано нормальным физиологическим проявлением жизнедеятельности бактерий, направленным на адаптацию к условиям окружающей среды. Изучение биологической роли OMV показало их связь с патогенезом и иммуногенезом заболеваний бактериальной природы. В обзоре приведены сведения об особенностях индукции, композиционном составе OMV и их участии в процессах пато- и иммуногенеза тяжелых инфекций, обусловленных ПБА I–II групп – грамотрицательными возбудителями чумы, туляремии, бруцеллеза, сапа, мелиоидоза, холеры, а также о формировании экстрацеллюлярных везикул у грамположительного возбудителя сибирской язвы. Особое внимание в обзоре уделено проблеме разработки безопасных и эффективных вакцинных препаратов нового поколения на основе бактериальных везикул.

Ключевые слова: везикулы наружной мембраны, особо опасные инфекции, патогенез, иммуногенез, вакцины.

Корреспондирующий автор: Аронова Надежда Валентиновна, e-mail: info@tularemia.ru.

Для цитирования: Аронова Н.В., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Головин С.Н., Анисимова А.С. Роль везикул наружных мембран возбудителей особо опасных инфекций в патогенезе и иммуногенезе инфекционного процесса. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:6–15. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-6-15

Поступила 02.10.2020. Отправлена на доработку 09.11.2020. Принята к публ. 02.04.2021.

N.V. Aronova¹, N.V. Pavlovich¹, M.V. Tsimbalistova¹, S.N. Golovin², A.S. Anisimova¹

The Role of Outer Membrane Vesicles of Agents of Particularly Dangerous Infections in the Pathogenesis and Immunogenesis of Infectious Process

¹Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

²Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The literature review is devoted to the modern concepts of the vesiculation phenomenon and its biological role in pathogenic bacteria – causative agents of particularly dangerous human infections. Data on the production, structure, composition, and functions of the outer membrane vesicles (OMV) of bacteria have been summarized. In recent years, the interest of researchers in the formation of spherical structures (so called bubbles or vesicles) from outer membrane of gram-negative bacteria has significantly increased. Such structures are surrounded by the double layer of a phospholipid membrane, the outer layer of which is enriched with lipopolysaccharide molecules. The inner space of vesicles could include various antigens, receptors, adhesins, toxins, enzymes, porins, etc. The formation of vesicles by the outer membranes of bacteria is recognized as a normal physiological manifestation of bacterial activity aimed at adaptation to environmental conditions. The investigation of the biological role of OMV showed their connection with the pathogenesis and immunogenesis of bacterial diseases. The review provides information on the peculiarity of induction, OMV composition and their participation in the processes of patho- and immunogenesis of severe infections caused by groups I–II PBA – the gram-negative causative agents of plague, tularemia, brucellosis, glanders, melioidosis, cholera, and formation of extracellular vesicles in a gram-positive anthrax pathogen. The particular attention is paid to the issue of developing safe and effective next-generation vaccine preparations based on bacterial vesicles.

Key words: outer membrane vesicles, particularly dangerous infections, pathogenesis, immunogenesis, vaccines.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Nadezda V. Aronova, e-mail: info@tularemia.ru.

Citation: Aronova N.V., Pavlovich N.V., Tsimbalistova M.V., Golovin S.N., Anisimova A.S. The Role of Outer Membrane Vesicles of Agents of Particularly Dangerous Infections in the Pathogenesis and Immunogenesis of Infectious Process. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:6–15. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-6-15

Received 02.10.2020. Revised 09.11.2020. Accepted 02.04.2021.

Aronova N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7772-9276>
Pavlovich N.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8287-4294>
Tsimbalistova M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4091-649X>

Golovin S.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1929-6345>
Anisimova A.S., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4010-2138>

Исследование патогенеза, иммуногенеза и факторов вирулентности возбудителей особо опасных болезней (ООИ) всегда являлось приоритетным направлением в изучении бактериальных инфекций. Однако, несмотря на достигнутые успехи, некоторые аспекты взаимодействия «паразит – хозяин» до сих пор остаются до конца не выясненными. Сложность изучения этих вопросов обусловлена тем, что вирулентность бактерий реализуется сложным действием целого набора детерминант, экспрессирующихся преимущественно *in vivo*. Большинство известных факторов вирулентности возбудителей особо опасных инфекций: чумы, туляремии, бруцеллеза, холеры и др. – в значительной мере связаны со строением и функциями поверхностных структур бактерий [1, 2]. Так, клеточная стенка бактерий участвует во многих метаболических и биосинтетических процессах, в трансформации энергии и активном транспорте веществ, выполняет рецепторную и барьерную функции. Более того, именно поверхностные структуры микробной клетки осуществляют первый этап взаимодействия с защитными факторами хозяина, модулируя их ответ и обеспечивая свое выживание в неблагоприятных условиях макроорганизма. У многих вирулентных бактерий компоненты наружных мембран ответственны за токсический эффект и развитие тяжелого инфекционного процесса, т.е. они играют важную роль в реализации патогенного потенциала возбудителей инфекционных заболеваний [3].

В последние годы резко возрос интерес исследователей к явлению отшнуровывания от внешней мембраны грамотрицательных бактерий так называемых «пузырьков» или везикул (OMV – outer membrane vesicles), которое в зарубежной литературе получило название «блеббинг». Впервые образование таких структур описано у кишечной палочки и возбудителя холеры в 1966–1967 гг. [4, 5]. В 1999 г. T.J. Beveridge опубликовал работу, где обобщил разрозненные данные и показал существование процесса везикуляции у широкого круга грамотрицательных бактерий [6]. Образование везикул наружной мембраны признали нормальным физиологическим проявлением жизнедеятельности бактерий, не связанным с их деградацией. Дальнейшее изучение биологической роли везикул наружных мембран показало их связь с пато- и иммуногенезом заболеваний бактериальной природы [7–9]. Позже появились работы о наличии блеббинга и у грамположительных бактерий, что свидетельствует об универсальности этого явления для функционирования микробной клетки [10].

Как установлено, везикулы грамотрицательных бактерий представляют собой отпочковывающиеся во внешнюю среду участки наружной мембраны с захватом части периплазматического содержимого [8]. Такие структуры окружены двойным слоем фосфолипидной мембраны, внешний слой которой обога-

щен молекулами липополисахарида (ЛПС). Кроме того, как в составе мембраны, так и во внутреннем пространстве везикулы могут содержать биологически активные молекулы, например различные антигены, токсины, ферменты, порины, адгезины и рецепторы [7, 11]. Ранее считалось, что OMV несут только компоненты мембран и содержимое периплазматического пространства, однако позднее было обнаружено, что в «пузырьках» могут находиться цитоплазматические белки, а также РНК и ДНК микроба [12].

Отделившись от бактериальной клетки, везикулы служат транспортными средствами для передачи факторов колонизации, патогенности и модуляции защитного ответа хозяина. Как показано, OMV осуществляют доставку токсинов к клеткам-мишеням, что является мощным механизмом вирулентности [13]. Преимущества такой системы секреции разнообразны и направлены на максимальную колонизацию экологической ниши, будь то организм хозяина, условия микробного сообщества или окружающей среды. В частности, везикулы создают защиту белковым компонентам (бактериальным ферментам или токсинам) от действия внешних протеаз чужеродного происхождения. Во-вторых, содержимое OMV представляет собой концентрированную форму факторов бактериальной клетки в их нативной конформации и окружении, формируя паттерны биологически активных молекул (PAMPs), что существенно повышает эффективность их воздействия. В-третьих, бактерии могут дистанционно воздействовать на среду обитания, без непосредственного присутствия в точке взаимодействия, что энергетически более выгодно, увеличивает скорость колонизации и обеспечивает большую устойчивость патогена к факторам неспецифической защиты хозяина. Наконец, присутствие на поверхности везикул рецепторов или адгезинов позволяет осуществлять адресное взаимодействие со специфическими мишенями [11].

Образование везикул является регулируемым индуцибельным процессом, направленным на выживание и адаптацию бактерий к изменяющимся условиям среды. При возникновении стрессовых воздействий (обедненная питательная база, изменение температуры, защита от фагов и антимикробных веществ, агрессивная среда макроорганизма) микробы отвечают повышением уровня везикуляции [7]. Следует обратить особое внимание, что при одинаковых условиях у патогенных бактерий процесс везикуляции идет более интенсивно по сравнению с непатогенными микроорганизмами. Так, энтеротоксигенная *Escherichia coli* (ETEC) продуцирует примерно в 10 раз больше везикул, чем непатогенная кишечная палочка [14]. Лейкотоксичные штаммы *Actinobacillus actinomycetemcomitans* образуют в 25 раз больше везикул, чем нелейкотоксичные [15].

Согласно экспериментальным данным некоторых исследователей, в макроорганизме бактерии с гипервезикуляцией имеют существенные преимущества в выживаемости [7].

С помощью формирования и высвобождения везикул из бактериальной клетки значительно возрастает способность патогена к преодолению механизмов природного и адаптивного иммунитета хозяина. Например, связывание нормальных или специфических антител везикулами при инфекционном процессе сопровождается уменьшением опсонизации живых микробов, что приводит к увеличению их резистентности к бактерицидному действию сыворотки и снижению эффективности фагоцитоза [7]. Взаимодействие OMV с клетками хозяина может подавлять нормальный или индуцировать патологический цитокиновый ответ на внедрение инфекционного агента, обеспечивая ему благоприятные условия для пролиферации и приживания в тканях-мишенях [7, 13].

Как установлено, биологическая активность везикул определяется их композиционным составом, который, в свою очередь, зависит как от вида микроорганизма, так и от условий их образования (макроорганизм, питательные среды с различным составом и др.) [7]. Интересно, что бактериальная клетка может варьировать включением тех или иных компонентов в везикулы, обеспечивая либо усугубление тяжести течения инфекционного процесса, либо индукцию выраженного иммунного ответа. Например, фракция ЛПС в составе везикул может обладать повышенным токсическим потенциалом по сравнению с ЛПС бактериальной клетки. В литературе описаны как модификации химической структуры везикулярных ЛПС, так и избирательные включения в OMV более токсичной субпопуляции молекул липополисахарида [7]. Кроме того, «пузырьки» содержат более высокую концентрацию биополимера, являясь как ключевыми источниками ЛПС для активации воспаления, так и «приманками», связывающими растворимые факторы защиты макроорганизма [7, 13]. Показано также, что они могут уменьшать уровень мембраносвязанной экспрессии CD14 на поверхностях макрофагов, приводя к снижению их способности запускать продукцию цитокинов, т.е. непосредственно участвовать в патогенезе инфекции [13].

Разнообразный набор антигенов белковой и липополисахаридной природы, которые несут в себе везикулы, может индуцировать адаптивный иммунитет (образование специфических антител, активацию клеток иммунологической памяти и т.д.). В связи с этим в настоящее время ведутся интенсивные исследования по созданию вакцин на основе бактериальных OMV. Везикулярные препараты обладают еще рядом преимуществ: биобезопасность, внутренняя адьювантность, представление антигенов в максимально нативной конформации и отсутствие воздействия на микробиоту хозяина [16]. Иллюстрацией успехов в этом направлении является разработка и

внедрение в клиническую практику везикулярной вакцины против менингококков [17].

Таким образом, анализ данной литературы убедительно свидетельствует о важном вкладе везикул бактерий в патогенез и иммуногенез инфекционного процесса. В связи с этим актуальным является изучение данного явления у возбудителей особо опасных инфекций человека, многие факторы вирулентности которых до настоящего времени не идентифицированы.

Холера. Наибольшее количество исследований блеббинга у возбудителей особо опасных инфекций относятся к возбудителю холеры – *Vibrio cholerae*. Как уже упоминалось, еще в 1967 г. S.N. Chatterjee и J. Das с помощью электронной микроскопии обнаружили многочисленные выпячивания мембраны у холерных вибрионов и присутствие отпочкованных от мембраны сферических мешочков (sac-like structures) диаметром преимущественно 600–800 Å [5]. Авторы предположили, что этот процесс является секреторным механизмом *V. cholerae* и связан с выделением холерного токсина. В настоящее время установлено, что такие факторы вирулентности холерного вибриона, как холерный токсин и гемолизин, выделяются бактериальной клеткой как в свободном виде через систему секреции 2-го типа, так и ассоциированными с везикулами наружной мембраной [18–20]. Эти способы доставки токсина к мишеням не являются конкурентными, так как реализуются разными механизмами взаимодействия с рецепторами организма хозяина. С помощью OMV *V. cholerae* секретирует и другие биологически активные протеазы, которые могут играть роль в цитотоксических и воспалительных реакциях [21, 22]. Система выделения факторов агрессии с помощью везикул позволяет снизить реакцию макроорганизма на биологически активные молекулы живой микробной клетки, обеспечивая ей преимущества в выживании *in vivo*. Так, например, OMV *V. cholerae* (в том числе и несущие цитолизин) индуцируют продукцию микроРНК miR-146a, которая подавляет реакции врожденного иммунного ответа и предотвращает развитие воспаления в слизистой оболочке кишечника. В противоположность этому, свободная форма токсина, наоборот, выражено стимулирует образование воспалительных факторов, таких как интерлейкин-8 (IL-8), фактор некроза опухоли-α (TNF-α), CCL20, IL-1β и IRAK2в [23]. Помимо детерминант вирулентности, OMV холерного вибриона содержат белки с другими биологическими функциями: способствующие росту бактериальных клеток, участвующие в кишечной колонизации у кроликов и в образовании матрицы биопленки, а также различные субстраты секреторной системы 2-го типа [24]. OMV *V. cholerae* несут в себе также молекулы ЛПС и РНК [25]. T. Song *et al.* (2008) установили, что процесс формирования везикул у возбудителя холеры может регулироваться посредством малой РНК, получившей название VrrA (*Vibrio regulatory RNA of OmpA*), которая активируется в от-

вет на стресс бактериальной оболочки [26]. Действие этой регуляторной мРНК направлено на подавление производства белка OmpA, что приводит к повышению продукции везикул у холерного вибриона. Другая группа исследователей (F.G. Zingl *et al.*, 2020) установила, что на ранней стадии инфекции у млекопитающих происходит подавление транспортера фосфолипидов VacJ/Yrb, приводящее к стимуляции блеббинга *V. cholerae*. Гипервезикуляция позволяет быстро изменить состав бактериальной мембраны, накапливая в ней модифицированный глицином липополисахарид (ЛПС) и уменьшая количество порина OmpT. Такая адаптация повышает устойчивость бактерий к антимикробным пептидам и желчи, что способствует колонизации кишечника хозяина [27].

Важной функцией везикул холерного вибриона является также их участие в образовании биопленки [28]. Однако роль OMV в экологии *V. cholerae* этим не исчерпывается. Известно, что холерные вибрионы способны выживать и размножаться симбиотически в водной свободноживущей амебе *Acanthamoeba castellanii*, которая может выполнять функцию хозяина для *V. cholerae* в окружающей среде [29]. Согласно данным S.P. Valeru *et al.* (2014), гипервезикулирующий мутант *V. cholerae* с нарушением синтеза белка A (OmpA) наружной мембраны не только достоверно увеличивал выживание вибрионов при совместном культивировании с амебами, но и подавлял жизнеспособность *A. castellanii*, даже при их обработке бесклеточной везикулярной фракцией. Таким образом, OMV могут являться фактором вирулентности для простейших [30]. Кроме того, показано, что везикулы *V. cholerae* могут играть роль ловушек и защищать бактерии от лизиса фагами [31].

Анализ результатов исследований везикул *V. cholerae* позволил определить новое перспективное направление – создание на их основе вакцинного препарата. Активная работа ученых в этой области принесла несомненные успехи. Например, доказано, что иммунизация мышей везикулами наружной мембраны вызывает у них длительный иммунитет, полностью защищающий от повторного заражения [32, 33]. Установлено, что протективные антитела после иммунизации везикулярной вакциной направлены против O-антигена и обеспечивают подавление подвижности вибрионов. Интересно отметить, что для ограничения моторики вибрионов требовались именно антитела типа G [34]. В настоящее время продолжается работа по поиску способов снижения нежелательных эффектов OMV-вакцины *V. cholerae*. Как уже обнаружено, обработка препарата ретиноидной кислотой уменьшала токсические и воспалительные реакции на везикулярную вакцину, но не влияла на ее иммуногенность [35].

Чума. В отличие от холерного вибриона, данные о роли везикуляции в жизнедеятельности других возбудителей особо опасных инфекций весьма ограничены. Возможно, это объясняется трудностями изучения внутриклеточных инфекционных агентов,

которыми являются возбудители чумы, туляремии, бруцеллеза, сапа и мелиоидоза. Например, только относительно недавно описана продукция везикул наружной мембраны у чумного микроба [36, 37]. Как оказалось, *Yersinia pestis* образует везикулы со средним размером около 100 нм, содержащие связанные с вирулентностью белки наружной мембраны, в том числе адгезин Ail, внешний фимбриальный F1-антиген и каталитически активную протеазу Pla, которая способна активировать плазминоген и деградацию α 2-антиплазмина [37]. J.L. Eddy *et al.* (2014) показали, что количество белков, ассоциированных с OMV, высвобождаемых *Y. pestis*, значительно повышается при 37 °C по сравнению с 26 °C, а также увеличивается в ответ на мембранный стресс и мутации в генах, кодирующих RseA, Hfq и липопротеин Брауна (Lpp). Кроме того, авторы показали, что OMV *Y. pestis* способны связываться с компонентами внеклеточного матрикса, такими как фибронектин и ламинин. Эти данные предполагают, что *Y. pestis* может продуцировать OMV во время инфекции млекопитающих, а секреция Pla через высвобождение OMV способна оказывать влияние на исход инфекции посредством взаимодействий с такими субстратами Pla, как плазминоген и лиганд Fas [37]. Установлено также достоверное повышение везикуляции у чумного микроба при воздействии таких неблагоприятных факторов, как бактериофаг Покровской и гентамицин [38].

В настоящее время проводятся исследования по созданию на основе везикул противочумного вакцинного препарата [39, 40]. Одна из вакцин разрабатывается на основе высокостабильных микровезикул безвредной комменсальной бактерии человека *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bt). Рекомбинантный штамм Bt специально сконструирован для экспрессии основных протективных антигенов возбудителя чумы – фракции 1 (F1) и LcrV (V-антигена). Исследователи показали, что везикулы полученного штамма Bt стабильно содержали F1 в мембранном слое и V-антиген в их просвете. Более того, антигены представлены в активной иммуногенной форме, так как введение вакцинных OMV интраназально приматам (*Macaca fascicularis*) вызывало нарастание титра специфических иммуноглобулинов IgG в крови и IgA в верхних и нижних дыхательных путях. Пул выявленных антител содержал фракцию, обладающую бактерицидными свойствами в отношении *Y. pestis*. Вакцинный препарат также характеризовался высокой стабильностью, термостойкостью и возможностью безыгольной доставки [39]. Другим перспективным вакцинным кандидатом является препарат везикул из мутантного гипервезикулирующего штамма чумного микроба, содержащего адьювантный малотоксичный липид A (монофосфорил липид A, MPLA). Помимо этого, авторы повысили иммуногенность мутанта с помощью введения плазмидного вектора, повышающего продукцию LcrV-антигена *Y. pestis* и уменьшающего количество

мышинного токсина и активатора плазминогена Pla. Вакцинация OMV, содержащими MPLA и повышенное количество LcrV, стимулировала клеточный и гуморальный иммунный ответ, а также обеспечивала полную защиту мышей от подкожного заражения $8 \cdot 10^5$ КОЕ и интраназального заражения вирулентным *Y. pestis* $5 \cdot 10^3$ КОЕ [40].

Туляремия. *Francisella tularensis* является возбудителем тяжелого заболевания широкого круга хозяев, включая человека. Однако, несмотря на многолетние исследования, вопросы высокой патогенности туляремиального микроба открыты, а факторы вирулентности не идентифицированы. До настоящего времени остается проблемным вопрос о том, что при скудной обсемененности организма кролика животные погибают от заражения 1 м.к. *F. tularensis* subsp. *tularensis* (*nearctica*) [41]. В связи с этим одним из подходов к решению проблемы может быть выяснение роли везикул туляремиального микроба в патогенезе и иммуногенезе туляремиальной инфекции. Большинство исследований везикул франциселл выполнены на слабопатогенном подвиде *F. tularensis* subsp. *novicida* или вакцинном штамме *F. tularensis* [42–44]. Отличительной особенностью продукции везикул туляремиального микроба является наличие двух видов OMV. Показано, что бактерии формируют не только сферические OMV, характерные для многих микробов, но и нетипичные палочковидные структуры, обозначаемые как tubes. Биологическая роль этих образований в настоящее время точно не установлена, однако, предположительно, они могут играть роль при взаимодействии с клетками хозяина [43]. Результаты наших экспериментов по изучению продукции везикул возбудителем туляремии при различных условиях культивирования (питательные среды, температура выращивания) подтвердили образование у *F. tularensis* мембранных образований в виде сфер и трубочек.

Согласно данным W.D. McCaig *et al.* (2013), процесс образования везикул у франциселл и их состав являются регулируемыми и зависят от фазы роста культуры, среды выращивания, наличия клеток хозяина и других факторов [43]. Исследования регуляции образования OMV показали, что дефицит цистеина и других незаменимых аминокислот приводит к повышенному блеббингу, тогда как гиповезикулирующие мутанты являются дефектными в ответе на этот сигнал. Таким образом, аминокислотное голодание, с которым сталкивается франциселла во время инвазии в клетке хозяина, может регулировать выработку этих мембранных структур [45]. Интересные данные получены С. Siebert *et al.* (2019), которые обнаружили, что нарушение утилизации железа (делеция в гене *fupA/B*, кодирующим Fer-Utilization Protein) приводит к повышенному образованию везикул и резистентности к фторхинолонам и гентамицину как у мутанта вакцинного штамма (*F. tularensis* LVS), так и у мутанта высоковирулентного штамма subsp. *tularensis* Schu [46]. На модели дефектного по

утилизации железа штамма LVS авторы показали, что везикулы являются ключевым элементом формирования биопленки, которая и обеспечивает, по их мнению, антибиотикоустойчивость к хинолонам и, возможно, персистенцию возбудителя [46]. OMV туляремиального микроба содержат большое количество биологически активных молекул: ЛПС, различные ферменты, а также белки, участвующие в процессах патогенеза и выживания внутри клеток хозяина [42, 43, 47]. Например, липаза FtlA *F. tularensis* с доказанной ролью в инфицировании клеток хозяина *in vivo* секретируется во внеклеточную среду как компонент везикул наружной мембраны [47]. При дальнейшем анализе с помощью электронной микроскопии установлено, что FtlA-содержащие OMV прикреплены к мембране клетки-хозяина. Эти данные свидетельствуют о том, что липаза FtlA способствует адгезии и проникновению *F. tularensis* внутрь клеток макроорганизма [47]. Важная роль везикул в развитии патогенеза туляремиальной инфекции продемонстрирована в опубликованной в 2019 г. работе J. Klimentova *et al.* [48]. При моделировании условий среды макроорганизма во время воспаления (высокая температура и низкий pH) авторы наблюдали у клинического изолята *F. tularensis* subsp. *holarctica* увеличение в несколько раз скорости образования везикул и значительное изменение содержания белка. Протеомный анализ показал, что в композиции белков, избирательно включенных в состав везикул в ответ на стрессовые условия, присутствуют известные факторы вирулентности *F. tularensis*, связанные с внутриклеточным переносом этих бактерий. Выраженные изменения также наблюдались в количестве белков, участвующих в биосинтезе и метаболизме структурных компонентов ЛПС (О-антигена, липида А), фосфолипидов и жирных кислот [48].

В настоящее время предпринимаются попытки получения бесклеточной туляремиальной везикулярной вакцины, где в качестве продуцента предложен гипервезикулирующий мутант *E. coli*, в который рекомбинирован 17-kb кластер генов от *F. tularensis* subsp. *tularensis* (тип А) Schu S4 [49]. Авторами получены везикулы, несущие на своей поверхности О-полисахарид туляремиального микроба, который является как фактором вирулентности туляремиального микроба, так и специфическим антигеном, индуцирующим В-клеточный ответ. Иммунизация мышей BALB/c препаратом вызывала индукцию сывороточных антител IgG и IgA дыхательного тракта, специфичных к О-полисахариду *F. tularensis*. Более того, зарегистрированы увеличение средней продолжительности жизни животных при заражении *F. tularensis* Schu S4 и полная защита при заражении вакцинным штаммом [49].

Бруцеллез. Везикулы у бруцелл впервые были обнаружены С. Gamaso *et al.* в 1987 г. [50], однако роль OMV в жизнедеятельности этих микроорганизмов до сих пор изучена недостаточно. Так, в диссертационной работе М.М. Сальниковой (2013) показа-

но, что в ответ на действие тетрациклина вакцинный штамм *Brucella abortus* 82 отвечает повышенной везикуляцией, позволяющей ему приспособиться к негативному воздействию антибиотика и сохранить жизнеспособность. Имеются данные о том, что кроме адаптации к факторам внешней среды везикулы *B. abortus* способствуют интернализации бактерий в человеческие моноциты и подавляют их врожденный иммунный ответ, что, несомненно, способствует длительной персистенции бруцелл в клетках хозяина [51]. Некоторые исследователи предполагают, что везикулы наружной мембраны могут участвовать в проявлении гестационных осложнений бруцеллеза [52].

При изучении композиционного состава ОМВ бруцелл с помощью протеомного анализа показано наличие в их составе широкого спектра известных белков-иммуногенов [53]. Установлена также важная роль включения полноценного ЛПС в состав везикул, что обеспечивает им устойчивость к агрессивным факторам среды и сохранение иммуногенного потенциала ОМВ [54]. Разным исследовательским группам удалось доказать, что везикулы как *B. melitensis*, так и *B. abortus* стимулировали индукцию иммунных реакций у мышей: пролиферативный ответ и продукцию IFN γ спленоцитами, выработку высоких титров специфических антител, реакции клеточного иммунитета и протекцию от заражения вирулентными штаммами [55–57]. Поэтому ОМВ бруцелл являются перспективными кандидатами для создания противобруцеллезной вакцины.

Сап и мелиоидоз. *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* – возбудители таких тяжелых заболеваний человека, как сап и мелиоидоз, патогенетические особенности которых изучены недостаточно. В последние годы появились работы, посвященные изучению процессов везикуляции у этих бактерий. Как установлено, везикулы *B. pseudomallei* имеют размер от 50 до 250 нм и содержат ЛПС, капсульный полисахарид и разнообразные белки, в том числе и иммуногенные [58], что дало основания рассматривать их в качестве вакцинных кандидатов. В настоящее время не существует лицензированной вакцины против сапа и мелиоидоза, поэтому ее разработка весьма актуальна. Результаты экспериментов продемонстрировали, что иммунизация мышей и макак-резусов везикулами *B. pseudomallei* индуцирует выработку у них специфических защитных антител и клеточного иммунитета, а также обеспечивает значительную защиту мышей от аэрозольного заражения и острого летального сепсиса [59, 60]. На модели макак-резусов было продемонстрировано, что везикулярная вакцина, стимулируя выработку специфических антител, не обладает токсичностью и реактогенностью для лабораторных животных [61]. Более того, иммунизация ОМВ возбудителя мелиоидоза давала защиту у мышей и нечеловекообразных приматов против аэрозольного заражения близкородственным патогеном *B. mallei* – возбудителем сапа [62]. В качестве вакцины против

B. mallei исследованы также ОМВ из аттенуированных штаммов другого близкородственного микроба – *B. thailandensis*. Полученный везикулярный препарат оказался наиболее перспективным даже по сравнению с везикулами *B. pseudomallei*. Он вызывал наибольший антительный ответ и обеспечивал полную протекцию мышей от аэрозольной инфекции [63].

Сибирская язва. Долгое время считалось, что способностью к продукции везикул обладают только граммотрицательные бактерии. Однако в последние годы появляется все больше работ, посвященных изучению внеклеточных образований у грамположительных бактерий. Они имеют в своей основе другой биогенез и строение, но выполняют аналогичные функции [10]. Так, экстрацеллюлярные везикулы (EV) возбудителя сибирской язвы (*Bacillus anthracis*) имеют двойную мембрану и диаметр от 50 до 150 нм [64]. Авторы установили, что эти образования могут включать компоненты токсина и антролизин. Более того, токсинсодержащие везикулы визуализированы и внутри макрофагов, инфицированных *B. anthracis*. Это может свидетельствовать в пользу их участия в патогенезе инфекционного процесса. На основе EV сибиреязвенного микроба предпринята попытка разработки везикулярной вакцины. Показано, что иммунизация мышей везикулярным препаратом эффективно индуцировала у них продукцию IgM и удлиняла среднюю продолжительность жизни после заражения *B. anthracis* Sterne strain [64].

Таким образом, одним из подходов к пониманию некоторых нерешенных проблем инфектологии может явиться изучение везикулярного аппарата патогенных бактерий и его роли в патогенезе инфекционных заболеваний. Это исследовательское направление, на наш взгляд, обладает большим научным потенциалом. Анализ данной литературы показывает, что везикулы обеспечивают бактериям условия, предохраняющие их от воздействия защитных механизмов хозяина. На примере многих бактерий показано, что процесс везикуляции является общебиологическим и интенсифицируется в макроорганизме. Нельзя исключить, что именно везикулы являются триггером развития инфекции, принимая на себя первый удар мощных факторов природного иммунитета хозяина. В частности, адсорбируя на себе нормальные иммуноглобулины сыворотки крови, ОМВ снижают бактерицидное действие мембраноатакующего комплекса сыворотки на живую микробную клетку и эффективность ее фагоцитоза. Модулируя иммунные реакции, везикулы могут подавлять цитокиновый ответ и определять беспрепятственную диссеминацию бактерий к тканям-мишеням. Как известно, возбудители особо опасных инфекций человека обладают выраженной цитокинингибирующей активностью, что позволяет им уклоняться от неспецифической защиты хозяина на первых этапах инфекции. На более поздних эта-

пах везикулы могут участвовать в развитии «цитокинетического хаоса». Запуск везикулами необратимого каскада патологических реакций, возможно, в некоторых случаях объясняет слабую эффективность этиотропной терапии даже при использовании антибактериальных препаратов, активных в отношении патогена.

Особое место в исследованиях везикул занимает оценка перспективности их использования в качестве вакцинных кандидатов. Уже имеются данные об успешном клиническом применении везикулярной вакцины против менингококков. Экспериментальные испытания на биологических моделях OMV-препаратов из различных бактерий, включая возбудителей ООИ, продемонстрировали их безопасность и выраженные протективные свойства. Таким образом, доказана целесообразность дальнейших исследований по созданию вакцин нового поколения на основе везикул наружных мембран.

В то же время многие вопросы о везикуляции у бактерий, особенно патогенных, остаются открытыми. В первую очередь это относится к композиционному составу и его влиянию на биологические свойства везикул. Например, при каких внешних условиях везикулы обогащены протективными антигенами или токсическими субстанциями. Недостаточно изучен вопрос о различиях в процессе везикуляции у вирулентных и авирулентных штаммов возбудителей инфекций человека. В настоящее время очевидно, что биология микробной клетки *in vitro* и *in vivo* существенно отличается. При этом установлено, что образование OMV наиболее интенсивно идет в организме хозяина, что создает определенные трудности в изучении феномена. В связи с этим поиск экспериментальных моделей, наиболее приближенных к макроорганизму, является актуальным, а исследование везикулярного аппарата патогенных бактерий – перспективным.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

- Rowe H.M., Huntley J.F. From the outside-in: The *Francisella tularensis* envelope and virulence. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2015; 5:94. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00094.
- Подладчикова О.Н. Современные представления о молекулярных механизмах патогенеза чумы. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2017; 3:33–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-33-40.
- Livorsi D.J., Stenehjem E., Stephens D.S. Virulence factors of gram-negative bacteria in sepsis with a focus on *Neisseria meningitidis*. *Contrib. Microbiol.* 2011; 17:31–47. DOI: 10.1159/000324008.
- Knox K.W., Vesik M., Work E. Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1966; 92(4): 1206–17. DOI: 10.1128/JB.92.4.1206-1217.1966.
- Chatterjee S.N., Das J. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. *J. Gen. Microbiol.* 1967; 49(1):1–11. DOI: 10.1099/00221287-49-1-1.
- Beveridge T.J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 1999; 181(16):4725–33. DOI: 10.1128/JB.181.16.4725-4733.1999.
- Ellis T.N., Kuehn M.J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010; 74(1):81–94. DOI: 10.1128/MMBR.00031-09.
- Yoon H. Bacterial outer membrane vesicles as a delivery system for virulence regulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 26(8):1343–7. DOI: 10.4014/jmb.1604.04080.
- Луста К.А., Кондашевская М.В. Участие внеклеточных мембранных нановезикул бактерий в патологических процессах. *Вестник новых медицинских технологий.* Электронное издание. 2019; 2. Публикация 3–5. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2019-2/3-5.pdf> (дата обращения 03.04.2019). DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16306.
- Шендеров Б.А., Сеница А.В., Захарченко М.М., Ткаченко Е.И. Внеклеточные везикулы (экзосомы) и их роль в биологии бактерий и реализации их патогенного потенциала. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2020; 7:118–30. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-179-7-118-130.
- Kulp A., Kuehn M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64:163–84. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073413.
- Tran F., Boedicker J.Q. Genetic cargo and bacterial species set the rate of vesicle-mediated horizontal gene transfer. *Sci. Rep.* 2017; 7(1):8813. DOI: 10.1038/s41598-017-07447-7.
- Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes. Dev.* 2005; 19(22):2645–55. DOI: 10.1101/gad.1299905.
- Rueter C., Bielaszewska M. Secretion and delivery of intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence factors via outer membrane vesicles. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020; 10:91. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00091.
- Lai C.H., Listgarten M.A., Hammond B.F. Comparative ultrastructure of leukotoxic and non-leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol. Res.* 1981; 16(4):379–89. DOI: 10.1111/j.1600-0765.1981.tb00989.x.
- Wang S., Gao J., Wang Z. Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2019; 11(2):e1523. DOI: 10.1002/wnan.1523.
- Pizza M., Bekkat-Berkani R., Rappuoli R. Vaccines against meningococcal diseases. *Microorganisms.* 2020; 8(10):1521. DOI: 10.3390/microorganisms8101521.
- Elluri S., Enow C., Vdovikova S., Rompikuntal P.K., Dongre M., Carlsson S., Pal A., Uhlin B.E., Wai S.N. Outer membrane vesicles mediate transport of biologically active *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) from *V. cholerae* strains. *PLoS One.* 2014; 9(9):e106731. DOI: 10.1371/journal.pone.0106731.
- Rasti E.S., Schappert M.L., Brown A.C. Association of *Vibrio cholerae* 569B outer membrane vesicles with host cells occurs in a GM1-independent manner. *Cell Microbiol.* 2018; 20(6):e12828. DOI: 10.1111/cmi.12828.
- Rasti E.S., Brown A.C. Cholera toxin encapsulated within several *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba outer membrane vesicles lacks a functional B-subunit. *Toxins (Basel).* 2019; 11(4):207. DOI: 10.3390/toxins11040207.
- Rompikuntal P.K., Vdovikova S., Dupertuy M., Johnson T.L., Åhlund M., Lundmark R., Oscarsson J., Sandkvist M., Uhlin B.E., Wai S.N. Outer membrane vesicle-mediated export of processed PrtV protease from *Vibrio cholerae*. *PLoS One.* 2015; 10(7):e0134098. DOI: 10.1371/journal.pone.0134098.
- Mondal A., Tapader R., Chatterjee N.S., Ghosh A., Sinha R., Koley H., Saha D.R., Chakrabarti M.K., Wai S.N., Pal A. Cytotoxic and inflammatory responses induced by outer membrane vesicle-associated biologically active proteases from *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2016; 84(5):1478–90. DOI: 10.1128/IAI.01365-15.
- Bitar A., Aung K.M., Wai S.N., Hammarström M.-L. *Vibrio cholerae* derived outer membrane vesicles modulate the inflammatory response of human intestinal epithelial cells by inducing microRNA-146a. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):7212. DOI: 10.1038/s41598-019-43691-9.
- Altindis E., Fu Y., Mekalanos J.J. Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014; 111(15):E1548–56. DOI: 10.1073/pnas.1403683111.
- Sjöström A.E., Sandblad L., Uhlin B.E., Wai S.N. Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA. *Sci. Rep.* 2015; 5:15329. DOI: 10.1038/srep15329.
- Song T., Mika F., Lindmark B., Liu Z., Schild S., Bishop A., Zhu J., Camilli A., Johansson J., Vogel J., Wai S.N. A new *Vibrio cholerae* RNA modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* 2008; 70(1):100–11. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06392.x.
- Zingl F.G., Kohl P., Cakar F., Leitner D.R., Mitterer F., Bonnington K.E., Rechberger G.N., Kuehn M.J., Guan Z., Reidl J., Schild S. Outer membrane vesiculation facilitates surface exchange and *in vivo* adaptation of *Vibrio cholerae*. *Cell Host Microbe.* 2020; 27(2):225–37.e8. DOI: 10.1016/j.chom.2019.12.002.
- Fong J.N.C., Yildiz F.H. Biofilm matrix proteins. *Microbiol. Spectr.* 2015; 3(2). DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014.
- Abd H., Saeed A., Weintraub A., Nair G.B., Sandström G. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007; 60(1):33–9. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00254.x.

30. Valeru S.P., Shanan S., Alossimi H., Saeed A., Sandström G., Abd H. Lack of outer membrane protein a enhances the release of outer membrane vesicles and survival of *Vibrio cholerae* and suppresses viability of *Acanthamoeba castellanii*. *Int. J. Microbiol.* 2014; 2014:610190. DOI: 10.1155/2014/610190.
31. Reyes-Robles T., Dillard R.S., Cairns L.S., Silva-Valenzuela C.A., Housman M., Ali A., Wright E.R., Camilli A. *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection. *J. Bacteriol.* 2018; 200(15):e00792-17. DOI: 10.1128/JB.00792-17.
32. Adriani R., Mousavi Gargari S.L., Nazarian S., Sarvary S., Noroozi N. Immunogenicity of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles secreted at various environmental conditions. *Vaccine.* 2018; 36(2):322–30. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.09.004.
33. Sedaghat M., Siadat S.D., Mirabzadeh E., Keramati M., Vaziri F., Shafiei M., Shahcheraghi F. Evaluation of antibody responses to outer membrane vesicles (OMVs) and killed whole cell of *Vibrio cholerae* O1 El Tor in immunized mice. *Iran J. Microbiol.* 2019; 11(3):212–9.
34. Wang Z., Lazinski D.W., Camilli A. Immunity provided by an outer membrane vesicle cholera vaccine is due to O-antigen-specific antibodies inhibiting bacterial motility. *Infect. Immun.* 2016; 85(1):e00626–16. DOI: 10.1128/IAI.00626-16.
35. Sinha R., Howlader D.R., Ta A., Mitra S., Das S., Koley H. Retinoic acid pre-treatment down regulates *V. cholerae* outer membrane vesicles induced acute inflammation and enhances mucosal immunity. *Vaccine.* 2017; 35(28):3534–47. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.05.036.
36. Kolodziejek A.M., Caplan A.B., Bohach G.A., Paszczynski A.J., Minnich S.A., Hovde C.J. Physiological levels of glucose induce membrane vesicle secretion and affect the lipid and protein composition of *Yersinia pestis* cell surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(14):4509–14. DOI: 10.1128/AEM.00675-13.
37. Eddy J.L., Gielda L.M., Caulfield A.J., Rangel S.M., Latham W.W. Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis*. *PLoS One.* 2014; 9(9):e107002. DOI: 10.1371/journal.pone.0107002.
38. Дудина Л.Г., Малкова М.А., Чернядьев А.В., Литвинец С.Г., Бывалов А.А. Влияние специфических бактериофагов и гентамицина на морфологию и вирулюообразование бактерий *Yersinia pestis* EV. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 2:50–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-50-54.
39. Carvalho A.L., Miquel-Clópez A., Wegmann U., Jones E., Stentz R., Telatin A., Walker N.J., Butcher W.A., Brown P.J., Holmes S., Dennis M.J., Williamson E.D., Funnell S.G.P., Stock M., Carding S.R. Use of bioengineered human commensal gut bacteria-derived microvesicles for mucosal plague vaccine delivery and immunization. *Clin. Exp. Immunol.* 2019; 196(3):287–304. DOI: 10.1111/cei.13301.
40. Wang X., Singh A.K., Zhang X., Sun W. Induction of protective antiplague immune responses by self-adjuncting bionanoparticles derived from engineered *Yersinia pestis*. *Infect Immun.* 2020; 88(5):e00081-20. DOI: 10.1128/IAI.00081-20.
41. Олсуфьев Н.Г., Руднев Г.П., редакторы. Туляремия. М.: Медгиз; 1960. 460 с.
42. Pierson T., Matrakas D., Taylor Y.U., Manyam G., Morozov V.N., Zhou W., van Hoek M.L. Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *J. Proteome Res.* 2011; 10(3):954–67. DOI: 10.1021/pr1009756.
43. McCaig W.D., Koller A., Thanassi D.G. Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida*. *J. Bacteriol.* 2013; 195(6):1120–32. DOI: 10.1128/JB.02007-12.
44. Champion A.E., Bandara A.B., Mohapatra N., Fulton K.M., Twine S.M., Inzana T.J. Further characterization of the capsule-like complex (CLC) produced by *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*: protective efficacy and similarity to outer membrane vesicles. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2018; 8:182. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00182.
45. Sampath V., McCaig W.D., Thanassi D.G. Amino acid deprivation and central carbon metabolism regulate the production of outer membrane vesicles and tubes by *Francisella*. *Mol. Microbiol.* 2018; 107(4):523–41. DOI: 10.1111/mmi.13897.
46. Siebert C., Lindgren H., Ferré S., Villers C., Boisset S., Perard J., Sjöstedt A., Maurin M., Brochier-Armanet C., Couté Y., Renesto P. *Francisella tularensis*: FupA mutation contributes to fluoroquinolone resistance by increasing vesicle secretion and biofilm formation. *Emerg. Microbes Infect.* 2019; 8(1):808–22. DOI: 10.1080/22221751.2019.1615848.
47. Chen F., Cui G., Wang S., Nair M.K.M., He L., Qi X., Han X., Zhang H., Zhang J.-R., Su J. Outer membrane vesicle-associated lipase FtlA enhances cellular invasion and virulence in *Francisella tularensis* LVS. *Emerg. Microbes Infect.* 2017; 6(7):c66. DOI: 10.1038/emi.2017.53.
48. Klimentova J., Pavkova I., Horcickova L., Bavlovic J., Kofronova O., Benada O., Stulik J. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* releases differentially loaded outer membrane vesicles under various stress conditions. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2304. DOI: 10.3389/fcimb.2019.02304.
49. Chen L., Valentine J.L., Huang C.J., Endicott C.E., Moeller T.D., Rasmussen J.A., Fletcher J.R., Boll J.M., Rosenthal J.A., Dobruchowska J., Wang Z., Heiss C., Azadi P., Putnam D., Trent M.S., Jones B.D., DeLisa M.P. Outer membrane vesicles displaying engineered glycotopes elicit protective antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2016; 113(26):E3609–18. DOI: 10.1073/pnas.1518311113.
50. Gamazo C., Moriyon I. Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infect. Immun.* 1987; 55(3):609–15. DOI: 10.1128/IAI.55.3.609-615.1987.
51. Pollak C.N., Delpino M.V., Fossati C.A., Baldi P.C. Outer membrane vesicles from *Brucella abortus* promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. *PLoS One.* 2012; 7(11):e50214. DOI: 10.1371/journal.pone.0050214.
52. Zavattieri L., Ferrero M.C., Alonso Paiva I.M., Sotelo A.D., Canellada A.M., Baldi P.C. *Brucella abortus* proliferates in decidualized and non-decidualized human endometrial cells inducing a proinflammatory response. *Pathogens.* 2020; 9(5):369. DOI: 10.3390/pathogens9050369.
53. Avila-Calderón E.D., Lopez-Merino A., Jain N., Peralta H., López-Villegas E.O., Sriranganathan N., Boyle S.M., Witonsky S., Contreras-Rodríguez A. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012:352493. DOI: 10.1155/2012/352493.
54. Avila-Calderón E.D., Medina-Chávez O., Flores-Romo L., Hernández-Hernández J.M., Donis-Maturano L., López-Merino A., Arellano-Reynoso B., Aguilera-Arreola M.G., Ruiz E.A., Gomez-Lunar Z., Witonsky S., Contreras-Rodríguez A. Outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* modulate immune response and induce cytoskeleton rearrangement in peripheral blood mononuclear cells. *Front Microbiol.* 2020; 11:556795. DOI: 10.3389/fmicb.2020.556795.
55. Kaur G., Singh S., Sunil Kumar B.V., Mahajan K., Verma R. Characterization and immunogenicity of outer membrane vesicles from *Brucella abortus*. *J. Immunoassay Immunochem.* 2016; 37(3):261–72. DOI: 10.1080/15321819.2015.1132231.
56. Bagheri Nejad R., Yahyaraeyat R., Es-Haghi A., Nayeri Fasayi B., Zahraei Salehi T. Induction of specific cell-mediated immune responses and protection in BALB/c mice by vaccination with outer membrane vesicles from a *Brucella melitensis* human isolate. *APMIS.* 2019; 127(12):797–804. DOI: 10.1111/apm.12997.
57. Golshani M., Amani M., Amirzadeh F., Nazeri E., Davar Siadat S., Nejadi-Moheimani M., Arsang A., Bouzari S. Evaluation of Poly(I:C) and combination of CpG ODN plus Montanide ISA adjuvants to enhance the efficacy of outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Brucella melitensis* infection in mice. *Int. Immunopharmacol.* 2020; 84:106573. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106573.
58. Nieves W., Heang J., Asakrah S., Höner zu Bentrop K., Roy C.J., Morici L.A. Immunospecific responses to bacterial elongation factor Tu during *Burkholderia* infection and immunization. *PLoS One.* 2010; 5(12):e14361. DOI: 10.1371/journal.pone.0014361.
59. Nieves W., Asakrah S., Qazi O., Brown K.A., Kurtz J., Aucoin D.P., McLachlan J.B., Roy C.J., Morici L.A. A naturally derived outer-membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary *Burkholderia pseudomallei* infection. *Vaccine.* 2011; 29(46):8381–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.058.
60. Nieves W., Petersen H., Judy B.M., Blumentritt C.A., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Torres A.G., Morici L.A. A *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine provides protection against lethal sepsis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2014; 21(5):747–54. DOI: 10.1128/CI.00119-14.
61. Petersen H., Nieves W., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Morici L.A. Evaluation of a *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine in nonhuman primates. *Proceedings Vaccinol.* 2014; 8:38–42. DOI: 10.1016/j.provac.2014.07.007.
62. Baker S.M., Davitt C.J.H., Motyka N., Kikendall N.L., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Morici L.A. A *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine provides cross protection against inhalational glanders in mice and non-human primates. *Vaccines (Basel).* 2017; 5(4):49. DOI: 10.3390/vaccines5040049.
63. Norris M.H., Khan M.S.R., Chirakul S., Schweizer H.P., Tuanyok A. Outer membrane vesicle vaccines from biosafe surrogates prevent acute lethal glanders in mice. *Vaccines (Basel).* 2018; 6(1):5. DOI: 10.3390/vaccines6010005.
64. Rivera J., Cordero R.J., Nakouzi A.S., Frases S., Nicola A., Casadevall A. *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010; 107(44):19002–7. DOI: 10.1073/pnas.1008843107.

References

- Rowe H.M., Huntley J.F. From the outside-in: The *Francisella tularensis* envelope and virulence. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2015; 5:94. DOI: 10.3389/fcimb.2015.00094.
- Podladchikova O.N. [Modern views on molecular mechanisms of plague pathogenesis]. *Problemy Osobo Opasnykh*

- Infectious [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (3):33–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-33-40.
3. Livorsi D.J., Stenehjem E., Stephens D.S. Virulence factors of gram-negative bacteria in sepsis with a focus on *Neisseria meningitidis*. *Contrib. Microbiol.* 2011; 17:31–47. DOI: 10.1159/000324008.
 4. Knox K.W., Vesk M., Work E. Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1966; 92(4): 1206–17. DOI: 10.1128/JB.92.4.1206-1217.1966.
 5. Chatterjee S.N., Das J. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. *J. Gen. Microbiol.* 1967; 49(1):1–11. DOI: 10.1099/00221287-49-1-1.
 6. Beveridge T.J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 1999; 181(16):4725–33. DOI: 10.1128/JB.181.16.4725-4733.1999.
 7. Ellis T.N., Kuehn M.J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010; 74(1):81–94. DOI: 10.1128/MMBR.00031-09.
 8. Yoon H. Bacterial outer membrane vesicles as a delivery system for virulence regulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016; 26(8):1343–7. DOI: 10.4014/jmb.1604.04080.
 9. Lusta K.A., Kondashevskaya M.V. [Participation of extracellular membrane nanovesicles of bacteria in pathological processes]. *Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologii. [Bulletin of New Medical Technologies]*. Electronic edition. 2019; 2. Publication 3–5. (Cited 03 Apr 2019). [Internet]. Available from: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2019-2/3-5.pdf>. DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16306.
 10. Shenderov B.A., Sinitsa A.V., Zakharchenko M.M., Tkachenko E.I. [Extracellular vesicles (exosomes) and their role in bacterial biology and the realization of their pathogenic potential]. *Ekspieriment'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya [Experimental and Clinical Gastroenterology]*. 2020; 7:118–30. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-179-7-118-130.
 11. Kulp A., Kuehn M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64:163–84. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073413.
 12. Tran F., Boedicker J.Q. Genetic cargo and bacterial species set the rate of vesicle-mediated horizontal gene transfer. *Sci. Rep.* 2017; 7(1):8813. DOI: 10.1038/s41598-017-07447-7.
 13. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes. Dev.* 2005; 19(22):2645–55. DOI: 10.1101/gad.1299905.
 14. Rueter C., Bielaszewska M. Secretion and delivery of intestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence factors via outer membrane vesicles. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020; 10:91. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00091.
 15. Lai C.H., Listgarten M.A., Hammond B.F. Comparative ultrastructure of leukotoxic and non-leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol. Res.* 1981; 16(4):379–89. DOI: 10.1111/j.1600-0765.1981.tb00989.x.
 16. Wang S., Gao J., Wang Z. Outer membrane vesicles for vaccination and targeted drug delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2019; 11(2):e1523. DOI: 10.1002/wnan.1523.
 17. Pizza M., Bekkat-Berkani R., Rappuoli R. Vaccines against meningococcal diseases. *Microorganisms*. 2020; 8(10):1521. DOI: 10.3390/microorganisms8101521.
 18. Elluri S., Enow C., Vdovikova S., Rompikuntal P.K., Dongre M., Carlsson S., Pal A., Uhlin B.E., Wai S.N. Outer membrane vesicles mediate transport of biologically active *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) from *V. cholerae* strains. *PLoS One*. 2014; 9(9):e106731. DOI: 10.1371/journal.pone.0106731.
 19. Rasti E.S., Schappert M.L., Brown A.C. Association of *Vibrio cholerae* 569B outer membrane vesicles with host cells occurs in a GM1-independent manner. *Cell Microbiol.* 2018; 20(6):e12828. DOI: 10.1111/cmi.12828.
 20. Rasti E.S., Brown A.C. Cholera toxin encapsulated within several *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba outer membrane vesicles lacks a functional B-subunit. *Toxins (Basel)*. 2019; 11(4):207. DOI: 10.3390/toxins11040207.
 21. Rompikuntal P.K., Vdovikova S., Duperthuy M., Johnson T.L., Åhlund M., Lundmark R., Oscarsson J., Sandkvist M., Uhlin B.E., Wai S.N. Outer membrane vesicle-mediated export of processed PrtV protease from *Vibrio cholerae*. *PLoS One*. 2015; 10(7):e0134098. DOI: 10.1371/journal.pone.0134098.
 22. Mondal A., Tapader R., Chatterjee N.S., Ghosh A., Sinha R., Koley H., Saha D.R., Chakrabarti M.K., Wai S.N., Pal A. Cytotoxic and inflammatory responses induced by outer membrane vesicle-associated biologically active proteases from *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2016; 84(5):1478–90. DOI: 10.1128/IAI.01365-15.
 23. Bitar A., Aung K.M., Wai S.N., Hammarström M.-L. *Vibrio cholerae* derived outer membrane vesicles modulate the inflammatory response of human intestinal epithelial cells by inducing microRNA-146a. *Sci. Rep.* 2019; 9(1):7212. DOI: 10.1038/s41598-019-43691-9.
 24. Altindis E., Fu Y., Mekalanos J.J. Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2014; 111(15):E1548–56. DOI: 10.1073/pnas.1403683111.
 25. Sjöström A.E., Sandblad L., Uhlin B.E., Wai S.N. Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA. *Sci. Rep.* 2015; 5:15329. DOI: 10.1038/srep15329.
 26. Song T., Mika F., Lindmark B., Liu Z., Schild S., Bishop A., Zhu J., Camilli A., Johansson J., Vogel J., Wai S.N. A new *Vibrio cholerae* RNA modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* 2008; 70(1):100–11. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06392.x.
 27. Zingl F.G., Kohl P., Cakar F., Leitner D.R., Mitterer F., Bonninger K.E., Rechberger G.N., Kuehn M.J., Guan Z., Reidl J., Schild S. Outer membrane vesiculation facilitates surface exchange and *in vivo* adaptation of *Vibrio cholerae*. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(2):225–37.e8. DOI: 10.1016/j.chom.2019.12.002.
 28. Fong J.N.C., Yildiz F.H. Biofilm matrix proteins. *Microbiol. Spectr.* 2015; 3(2). DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014.
 29. Abd H., Saeed A., Weintraub A., Nair G.B., Sandström G. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007; 60(1):33–9. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00254.x.
 30. Valeru S.P., Shanani S., Alossimi H., Saeed A., Sandström G., Abd H. Lack of outer membrane protein a enhances the release of outer membrane vesicles and survival of *Vibrio cholerae* and suppresses viability of *Acanthamoeba castellanii*. *Int. J. Microbiol.* 2014; 2014:610190. DOI: 10.1155/2014/610190.
 31. Reyes-Robles T., Dillard R.S., Cairns L.S., Silva-Valenzuela C.A., Housman M., Ali A., Wright E.R., Camilli A. *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection. *J. Bacteriol.* 2018; 200(15):e00792-17. DOI: 10.1128/JB.00792-17.
 32. Adriani R., Mousavi Gargari S.L., Nazarian S., Sarvary S., Noroozi N. Immunogenicity of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles secreted at various environmental conditions. *Vaccine*. 2018; 36(2):322–30. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.09.004.
 33. Sedaghat M., Siadat S.D., Mirabzadeh E., Keramati M., Vaziri F., Shafiei M., Shahcheraghi F. Evaluation of antibody responses to outer membrane vesicles (OMVs) and killed whole cell of *Vibrio cholerae* O1 El Tor in immunized mice. *Iran J. Microbiol.* 2019; 11(3):212–9.
 34. Wang Z., Lazinski D.W., Camilli A. Immunity provided by an outer membrane vesicle cholera vaccine is due to O-antigen-specific antibodies inhibiting bacterial motility. *Infect. Immun.* 2016; 85(1):e00626–16. DOI: 10.1128/IAI.00626-16.
 35. Sinha R., Howlader D.R., Ta A., Mitra S., Das S., Koley H. Retinoic acid pre-treatment down regulates *V. cholerae* outer membrane vesicles induced acute inflammation and enhances mucosal immunity. *Vaccine*. 2017; 35(28):3534–47. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.05.036.
 36. Kolodziejek A.M., Caplan A.B., Bohach G.A., Paszczynski A.J., Minnich S.A., Hovde C.J. Physiological levels of glucose induce membrane vesicle secretion and affect the lipid and protein composition of *Yersinia pestis* cell surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(14):4509–14. DOI: 10.1128/AEM.00675-13.
 37. Eddy J.L., Gielda L.M., Caulfield A.J., Rangel S.M., Latham W.W. Production of outer membrane vesicles by the plague pathogen *Yersinia pestis*. *PLoS One*. 2014; 9(9):e107002. DOI: 10.1371/journal.pone.0107002.
 38. Dudina L.G., Malkova M.A., Chernyad'ev A.V., Litvinets S.G., Byvalov A.A. [Effect of bacteriophages and gentamycin on morphology and vesicle formation of bacterial]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (2):50–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-50-54.
 39. Carvalho A.L., Miquel-Clopés A., Wegmann U., Jones E., Stentz R., Telatin A., Walker N.J., Butcher W.A., Brown P.J., Holmes S., Dennis M.J., Williamson E.D., Funnell S.G.P., Stock M., Carding S.R. Use of bioengineered human commensal gut bacteria-derived microvesicles for mucosal plague vaccine delivery and immunization. *Clin. Exp. Immunol.* 2019; 196(3):287–304. DOI: 10.1111/cei.13301.
 40. Wang X., Singh A.K., Zhang X., Sun W. Induction of protective antiplague immune responses by self-advjuvating bio-nanoparticles derived from engineered *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 2020; 88(5):e00081-N.G. DOI: 10.1128/IAI.00081-20.
 41. Olsuf'ev N.G., Rudnev G.P., editors. [Tularemia]. Moscow: "Medgiz"; 1960. 460 p.
 42. Pierson T., Matrakas D., Taylor Y.U., Manyam G., Morozov V.N., Zhou W., van Hoek M.L. Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *J. Proteome Res.* 2011; 10(3):954–67. DOI: 10.1021/pr1009756.
 43. McCaig W.D., Koller A., Thanassi D.G. Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida*. *J. Bacteriol.* 2013; 195(6):1120–32. DOI: 10.1128/JB.02007-12.
 44. Champion A.E., Bandara A.B., Mohapatra N., Fulton K.M., Twine S.M., Inzana T.J. Further characterization of the capsule-like complex (CLC) produced by *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*: protective efficacy and similarity to outer membrane vesicles. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2018; 8:182. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00182.

45. Sampath V., McCaig W.D., Thanassi D.G. Amino acid deprivation and central carbon metabolism regulate the production of outer membrane vesicles and tubes by *Francisella*. *Mol. Microbiol.* 2018; 107(4):523–41. DOI: 10.1111/mmi.13897.
46. Siebert C., Lindgren H., Ferré S., Villers C., Boisset S., Perard J., Sjöstedt A., Maurin M., Brochier-Armanet C., Couté Y., Renesto P. *Francisella tularensis*: FupA mutation contributes to fluoroquinolone resistance by increasing vesicle secretion and biofilm formation. *Emerg. Microbes Infect.* 2019; 8(1):808–22. DOI: 10.1080/22221751.2019.1615848.
47. Chen F., Cui G., Wang S., Nair M.K. M., He L., Qi X., Han X., Zhang H., Zhang J.-R., Su J. Outer membrane vesicle-associated lipase FtlA enhances cellular invasion and virulence in *Francisella tularensis* LVS. *Emerg. Microbes Infect.* 2017; 6(7):c66. DOI: 10.1038/emi.2017.53.
48. Klimentova J., Pavkova I., Horcickova L., Bavlovic J., Kofronova O., Benada O., Stulik J. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* releases differentially loaded outer membrane vesicles under various stress conditions. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2304. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02304.
49. Chen L., Valentine J.L., Huang C.J., Endicott C.E., Moeller T.D., Rasmussen J.A., Fletcher J.R., Boll J.M., Rosenthal J.A., Dobruchowska J., Wang Z., Heiss C., Azadi P., Putnam D., Trent M.S., Jones B.D., DeLisa M.P. Outer membrane vesicles displaying engineered glycotopes elicit protective antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2016; 113(26):E3609–18. DOI: 10.1073/pnas.1518311113.
50. Gamazo C., Moriyon I. Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infect. Immun.* 1987; 55(3):609–15. DOI: 10.1128/IAI.55.3.609-615.1987.
51. Pollak C.N., Delpino M.V., Fossati C.A., Baldi P.C. Outer membrane vesicles from *Brucella abortus* promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. *PLoS One.* 2012; 7(11):e50214. DOI: 10.1371/journal.pone.0050214.
52. Zavattieri L., Ferrero M.C., Alonso Paiva I.M., Sotelo A.D., Canellada A.M., Baldi P.C. *Brucella abortus* proliferates in decidualized and non-decidualized human endometrial cells inducing a proinflammatory response. *Pathogens.* 2020; 9(5):369. DOI: 10.3390/pathogens9050369.
53. Avila-Calderón E.D., Lopez-Merino A., Jain N., Peralta H., López-Villegas E.O., Sriranganathan N., Boyle S.M., Witonsky S., Contreras-Rodríguez A. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. *Clin. Dev. Immunol.* 2012; 2012:352493. DOI: 10.1155/2012/352493.
54. Avila-Calderón E.D., Medina-Chávez O., Flores-Romo L., Hernández-Hernández J.M., Donis-Maturano L., López-Merino A., Arellano-Reynoso B., Aguilera-Arreola M.G., Ruiz E.A., Gomez-Lunar Z., Witonsky S., Contreras-Rodríguez A. Outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* modulate immune response and induce cytoskeleton rearrangement in peripheral blood mononuclear cells. *Front Microbiol.* 2020; 11:556795. DOI: 10.3389/fmicb.2020.556795.
55. Kaur G., Singh S., Sunil Kumar B.V., Mahajan K., Verma R. Characterization and immunogenicity of outer membrane vesicles from *Brucella abortus*. *J. Immunoassay Immunochem.* 2016; 37(3):261–72. DOI: 10.1080/15321819.2015.1132231.
56. Bagheri Nejad R., Yahyaeyat R., Es-Haghi A., Nayeri Fasayi B., Zahraei Salehi T. Induction of specific cell-mediated immune responses and protection in BALB/c mice by vaccination with outer membrane vesicles from a *Brucella melitensis* human isolate. *APMIS.* 2019; 127(12):797–804. DOI: 10.1111/apm.12997.
57. Golshani M., Amani M., Amirzadeh F., Nazeri E., Davar Siadat S., Nejati-Moheimani M., Arsang A., Bouzari S. Evaluation of Poly(I:C) and combination of CpG ODN plus Montanide ISA adjuvants to enhance the efficacy of outer membrane vesicles as an acellular vaccine against *Brucella melitensis* infection in mice. *Int. Immunopharmacol.* 2020; 84:106573. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106573.
58. Nieves W., Heang J., Asakrah S., Höner zu Bentrup K., Roy C.J., Morici L.A. Immunospecific responses to bacterial elongation factor Tu during *Burkholderia* infection and immunization. *PLoS One.* 2010; 5(12):e14361. DOI: 10.1371/journal.pone.0014361.
59. Nieves W., Asakrah S., Qazi O., Brown K.A., Kurtz J., Aucoin D.P., McLachlan J.B., Roy C.J., Morici L.A. A naturally derived outer-membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary *Burkholderia pseudomallei* infection. *Vaccine.* 2011; 29(46):8381–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.058.
60. Nieves W., Petersen H., Judy B.M., Blumentritt C.A., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Torres A.G., Morici L.A. A *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine provides protection against lethal sepsis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2014; 21(5):747–54. DOI: 10.1128/CVI.00119-14.
61. Petersen H., Nieves W., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Morici L.A. Evaluation of a *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine in nonhuman primates. *Proceedia Vaccinol.* 2014; 8:38–42. DOI: 10.1016/j.provac.2014.07.007.
62. Baker S.M., Davitt C.J.H., Motyka N., Kikendall N.L., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Morici L.A. A *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine provides cross protection against inhalational glanders in mice and non-human primates. *Vaccines (Basel).* 2017; 5(4):49. DOI: 10.3390/vaccines5040049.
63. Norris M.H., Khan M.S.R., Chirakul S., Schweizer H.P., Tuanyok A. Outer membrane vesicle vaccines from biosafe surrogates prevent acute lethal glanders in mice. *Vaccines (Basel).* 2018; 6(1):5. DOI: 10.3390/vaccines6010005.
64. Rivera J., Cordero R.J., Nakouzi A.S., Frases S., Nicola A., Casadevall A. *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010; 107(44):19002–7. DOI: 10.1073/pnas.1008843107.

Authors:

Aronova N.V., Pavlovich N.V., Tsimbalistova M.V., Anisimova A.S. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.
Golovin S.N. Don State Technical University. 1, Gagarin square, Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation.

Об авторах:

Аронова Н.В., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Анисимова А.С. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.
Головин С.Н. Донской государственный технический университет. Российская Федерация, 344000, Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, 1.