

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-59-66

УДК 615.371

М.Е. Платонов, Н.А. Липатникова, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов

**Бактериальные вакцины с регулируемой отсроченной аттенуацией***ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск, Российская Федерация*

На протяжении чуть более 200 лет с момента открытия Э. Дженнера вакцинация продолжает оставаться ведущей стратегией эффективной защиты от инфекционных болезней, однако выпускаемые в настоящее время коммерческие живые аттенуированные и инактивированные вакцины обладают целым рядом серьезных недостатков. Бактериальные штаммы в живых вакцинах должны быть полностью аттенуированы, сохраняя при этом высокую степень иммуногенности. Однако большинство используемых в настоящее время способов аттенуации делают потенциальные вакцинные штаммы более восприимчивыми к воздействию защитных механизмов хозяина, снижая способность сохраняться в организме вакцинируемого индивидуума в количествах и в течение сроков, достаточных для формирования длительного и напряженного иммунитета. Инактивация же микроорганизмов с помощью различных химических реагентов и/или физических факторов, лежащая в основе получения убитых вакцин, может с высокой долей вероятности нарушить нативную конформацию эпитопов антигенов, расположенных на поверхности бактериальной клетки, что ведет к снижению иммуногенности. В обзоре рассмотрена перспективная биотехнологическая платформа для разработки вакцин на основе методологии регулируемой отсроченной экспрессии и репрессии генов, разработанная для решения указанных выше противоречий.

**Ключевые слова:** вакцина, регулируемая отсроченная аттенуация, лизис, регулируемый отсроченный синтез антигенов.

*Корреспондирующий автор:* Липатникова Надежда Алексеевна, e-mail: n.a.lipatnikova@mail.ru.

*Для цитирования:* Платонов М.Е., Липатникова Н.А., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Бактериальные вакцины с регулируемой отсроченной аттенуацией. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; 1:59–66. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-59-66  
*Поступила 29.11.2023. Принята к публ. 08.12.2023.*

M.E. Platonov, N.A. Lipatnikova, S.V. Dentovskaya, A.P. Anisimov

**Bacterial Vaccines with Regulated Delayed Attenuation***State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation*

**Abstract.** Over the past 200 years since the moment of E. Jenner's discovery, vaccination continues to be the leading strategy for protection against infectious diseases, but commercially available live attenuated and inactivated vaccines have a number of serious drawbacks. Bacterial strains should be completely attenuated in live vaccines, while maintaining a high degree of immunogenicity. However, the majority of attenuation methods currently used makes potential vaccine strains more susceptible to the action of various host defenses, reducing the ability to persist in the body of the vaccinated individual in quantities and for periods sufficient for formation of long-term and intense immunity. Inactivation of microorganisms underlying the production of killed vaccines, applying various reagents and /or physical factors, can disrupt the native conformation of antigenic epitopes located on bacterial cell surface, which leads to a decrease in immunogenicity. This review examines a promising biotechnological platform for the development of vaccines based on the methodology of regulated delayed gene expression and repression of genes, which was developed to resolve the above-mentioned contradictions.

**Key words:** vaccine, regulated delayed attenuation, regulated delayed lysis, regulated delayed antigen synthesis.

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

**Funding:** The work was supported by the Russian Science Foundation grant 23-15-00132.

*Corresponding author:* Nadezhda A. Lipatnikova, e-mail: n.a.lipatnikova@mail.ru.

*Citation:* Platonov M.E., Lipatnikova N.A., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Bacterial Vaccines with Regulated Delayed Attenuation. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 1:59–66. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-59-66  
*Received 29.11.2023. Accepted 08.12.2023.*

Platonov M.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3946-1755>  
Lipatnikova N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8400-5276>

Dentovskaya S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1996-8949>  
Anisimov A.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5499-7999>

Репрессия и индукция синтеза белков у прокариот обеспечивают адаптацию к меняющимся условиям существования и экономии энергетических затрат: энзимы синтезируются, когда в них возникает потребность, и перестают продуцироваться при прекращении необходимости их синтеза. Приспособление к изменяющимся условиям окру-

жающей среды обеспечивается тремя типами генов прокариот: конститутивные экспрессируются постоянно, независимо от метаболического состояния организма; индуцируемые увеличивают свою экспрессию на два порядка и более при добавлении в среду культивирования субстрата фермента, кодируемого таким геном; репрессируемые кодируют ферменты

метаболических путей, продукция которых завершается при добавлении в среду культивирования конечного продукта этих путей [1, 2].

Бактериальные штаммы в живых вакцинах должны быть полностью аттенуированы, сохраняя при этом высокую степень иммуногенности. Однако большинство способов аттенуации патогенов делают потенциальные вакцинные штаммы более восприимчивыми по сравнению со штаммами дикого типа к воздействию различных защитных механизмов хозяина, ухудшая их способность прикрепляться, проникать и эффективно колонизировать лимфоидные ткани, в которых происходит процессинг антигенов, определяющий уровень и тип защитного иммунного ответа [3]. В конце 2010-х гг. исследовательская группа американского микробиолога R. Curtiss 3rd разработала на модели сальмонелл идеологию и методологию конструирования живых бактериальных вакцин с помощью регулируемой отсроченной экспрессии генов [4]. Предпринятая авторами попытка создать вакцинные штаммы, обладающие большинством свойств вирулентных штаммов дикого типа, обеспечивающие эффективную колонизацию лимфоидных тканей без проявления симптомов заболевания или развития состояния носительства, оказалась успешной в значительной степени благодаря принципу отсроченности. Первое направление исследований было основано на регуляции генов, продукты которых принимают участие в синтезе липополисахарида (ЛПС) [5].

**Конструирование штаммов с регулируемым обратимым переключением синтеза липополисахарида (S-ЛПС) на продукцию липоолигосахаридов (R-ЛПС, ЛОС).** Липополисахарид – основной фактор патогенности *Salmonella enterica* Typhimurium, состоящий из липида А, корового олигосахаридов и полисахарида О-боковых цепей. Известно более 2600 сероваров *S. enterica*, причем чуть менее 200 из них вызывают заболевания у домашних животных и людей. Различные серовары сальмонелл продуцируют иммунологически гетерогенные О-полисахаридные цепи S-ЛПС, которые служат основой для серотипирования. В то же время структура корового олигосахаридов R-ЛПС практически идентична у всех серотипов *S. enterica* [6], делая эту форму молекулы привлекательной в качестве компонента вакцинных препаратов. Для переключения иммунного ответа с антигенно разнообразных О-боковых цепей на гомологичные, иммунологически родственные, структурно подобные и перекрестно-реагирующие у всех сальмонелл поверхностные эпитопы корового олигосахаридов ЛОС, был получен набор мутантов, дефектных по генам *wbaP*, *wzy*, *wzz*, *waaK*, *waaJ*, *waaI*, *waaB*, *waaG*, конститутивно синтезирующих липоолигосахарид (ЛОС), ЛПС без О-полисахаридных цепей [7, 8].

Показано, что делеция генов, отвечающих за присоединение в молекуле ЛПС остатков внешнего кора и О-полисахаридных цепей в молекуле ЛПС

*S. enterica* Typhimurium, ведет к утрате жизнеспособности мутантного штамма в организме хозяина. В то же время мутант  $\Delta wzy$  (делеция гена О-антиген лигазы), сохраняющий одно звено О-антигена, способен стимулировать оптимальный защитный иммунитет при оральном, интраназальном или внутрибрюшинном заражении гомологичным вирулентным штаммом [7].

В отличие от указанных выше мутаций, ведущих к конститутивному синтезу ЛОС, отсутствие функционирующего гена *pmi*, отвечающего за синтез маннозофосфоизомеразы, необходимой для взаимного превращения фруктозо-6-фосфата и маннозо-6-фосфата, не вызывает прекращения синтеза полноразмерного S-ЛПС на средах, содержащих маннозу [9]. Штаммы с делецией гена *pmi*, выращенные в присутствии маннозы, синтезируют полноразмерный S-ЛПС, но теряют О-полисахаридные цепи примерно через семь поколений роста в среде, лишенной маннозы, или в тканях вакцинируемого, поскольку нефосфорилированная манноза, необходимая для синтеза S-ЛПС с О-антигеном, недоступна [7, 10].

Мутанты сальмонелл  $\Delta galE$ , дефектные по продукции UDP-галактозо-4-эпимеразы, которая катализирует взаимное превращение UDP-глюкозы и UDP-галактозы, а еще опосредует включение галактозы в О-боковую цепь S-ЛПС, также продуцируют S- или R-форму ЛПС в зависимости от присутствия в среде культивирования субстрата UDP-галактозо-4-эпимеразы-галактозы [11].

Сальмонеллезная живая оральная вакцина должна колонизировать лимфоидную ткань кишечника на время, достаточное для развития иммунного ответа, но при этом быть полностью авирулентной. Этим критериям отвечают как мутанты  $\Delta pmi$ , так и  $\Delta galE$ , синтезирующие R-ЛПС в отсутствие маннозы или галактозы соответственно, но продуцирующие полноразмерные S-ЛПС, когда манноза или галактоза присутствует в среде роста. Колонизационная способность мутантов  $\Delta pmi$  и  $\Delta galE$ , выращенных на маннозе/галактозе, обеспечивается наличием S-ЛПС, тогда как аттенуация связана с отсроченным переходом к синтезу R-формы ЛПС.

Штаммы сальмонелл, продуцирующие ЛПС без О-полисахаридных цепей, более чувствительны к фагоцитозу и цитотоксичности, опосредованной комплементом, поэтому *pmi*-мутант, защищенный на первых этапах взаимодействия с организмом хозяина полноразмерным S-ЛПС, достоверно превосходит по протективности штаммы, конститутивно продуцирующие ЛОС, защищая от гибели мышей, инфицированных 1000 LD<sub>50</sub> вирулентного штамма дикого типа. Семи генераций бактерий  $\Delta pmi$  *in vivo* оказалось достаточно для формирования напряженного иммунитета.

*Shigella flexneri* – ведущий этиологический агент бактериальной дизентерии – серьезной проблемы общественного здравоохранения. Создана новая вакцина против шигеллеза, основанная на системах

регулируемого отсроченного синтеза О-антигена *S. flexneri* 2a (Sf2a) и регулируемой отсроченной экспрессии аттенуирующего фенотипа для его презентации рекомбинантным аттенуированным штаммом *S. Typhimurium*. В хромосому штамма встроили каскады  $araC P_{BAD} lacI$  и  $araC P_{BAD} wbaP$ , что привело к постепенному истощению фермента ундекапринилфосфат-галактозофосфоизомеразы WbaP. Вектор экспрессии, кодирующий биосинтез О-антигена *S. flexneri* Sf2a под контролем LacI-репрессуемого промотора  $P_{tcc}$ , сохранялся в вакцинном штамме сальмонеллы посредством селекции, независимой от антибиотика. В присутствии экзогенной арабинозы вакцинный штамм сальмонеллы синтезировал нативный S-ЛПС в результате экспрессии WbaP. Более того, арабиноза поддерживала экспрессию LacI, тем самым подавляя выработку О-антигена *S. flexneri* Sf2a. Отсутствие арабинозы *in vivo* подавляло синтез нативного S-ЛПС и индуцировало синтез О-антигена *S. flexneri* Sf2a, что обеспечивало при оральном введении напряженный продолжительный Sf2a-специфичный иммунитет на мышинной модели [12].

Логично предположить, что данный способ отсроченной аттенуации будет работать и на других грамотрицательных бактериях, патогенных при условии синтеза полноразмерных молекул S-ЛПС (*Escherichia coli* [13], *Brucella abortus* [14], *Vibrio cholerae* [15] и др.). Однако есть и патогенные грамотрицательные бактерии, дикий тип которых синтезирует R-ЛПС без О-боковых цепей: *Yersinia pestis* [16], *Brucella ovis*, *Brucella canis* [14], *Bordetella pertussis* [17] и др., для аттенуации которых были предложены альтернативные методы, изложенные ниже.

**Регулируемая отсроченная аттенуация *in vivo*.** Второй способ достижения регулируемой отсроченной аттенуации *in vivo* основан на использовании арабинозо-зависимой регуляторной каскады  $araC P_{BAD}$  для замены промоторов генов *fur*, *crp*, *phoPQ*, *rpoS* и т.д., ограниченная по времени экспрессия которых обеспечивает развитие доброкачественного вакцинального процесса без перехода его в инфекционный [18]. После колонизации лимфоидных тканей белки Fur, Crp, PhoPQ и/или RpoS перестают синтезироваться из-за отсутствия арабинозы, так что аттенуация постепенно проявляется *in vivo*, предотвращая развитие инфекционного процесса. Методологию регулируемой отсроченной аттенуации можно комбинировать с мутагенезом других генов, кодирующих факторы патогенности или генов домашнего хозяйства, что может повысить степень безопасности разрабатываемых живых вакцин.

Два мутантных штамма *Y. pestis* KIM5+, мутант  $\Delta crp$  и мутант с арабинозозависимой регулируемой экспрессией *crp* с отсроченным отключением ( $araC P_{BAD} crp$ ), были сконструированы и охарактеризованы *in vitro* с последующей оценкой степени утраты вирулентности, иммуногенности и защит-

ной эффективности на мышах. Оба штамма были существенно аттенуированы при подкожном способе введения.  $LD_{50}$  мутантов  $crp \Delta crp$  и  $araC P_{BAD}$  были примерно в  $10^6$  и  $10^4$  раз выше, чем у *Y. pestis* KIM5+, соответственно, что указывает на значительную аттенуацию обоих штаммов. Мыши, однократно подкожно вакцинированные мутантом  $\Delta crp$ , были полностью защищены от гибели при заражении  $3,6 \cdot 10^7$  КОЕ *Y. pestis* дикого типа и значительно защищены (выживаемость 80 %) от легочного заражения  $1,2 \cdot 10^4$  КОЕ. У мышей, вакцинированных  $3,0 \cdot 10^4$  КОЕ мутанта  $crp araC P_{BAD}$ , отмечали полную защиту от подкожного заражения и частичную защиту (выживаемость 70 %) от легочного заражения. Это свидетельствует о том, что арабинозозависимая регулируемая экспрессия *crp* является эффективной стратегией аттенуации *Y. pestis* при сохранении высокой иммуногенности, что ведет к защите от легочной и бубонной форм чумы [19].

*Y. pestis* уклоняется от системы врожденного иммунитета путем синтеза тетраацилированного липида А со слабой активностью, стимулирующей Toll-подобный рецептор 4 (TLR4), при 37 °C, тогда как гексаацилированный липид А, мощный агонист TLR4, образуется при более низких температурах. Синтез лауроилтрансферазы LpxL *E. coli*, переносящей вторичную лауратную цепь в 2'-положение липида А, у *Y. pestis* приводит к образованию гексаацилированного липида А при 37 °C, что ведет к значительному ослаблению вирулентности [20]. Показано, что штамм *Y. pestis*, в котором экспрессия *crp* находится под контролем регулируемого арабинозой промотора  $araC P_{BAD}$ , снизил свою вирулентность на 4–5 порядков по сравнению с исходным штаммом дикого типа. Чтобы еще больше снизить вирулентность мутанта, в хромосому под контролем промотора гена *crp* встроили ген *lpxL E. coli*. Рекомбинантный штамм *Y. pestis*  $\chi 10030(pCD1Ap)$  ( $\Delta lpxP32::PlpxL lpxL \Delta Pcrp21::TT araC P_{BAD} crp$ ) при 37 °C также продуцировал гексаацилированный липид А и был значительно более аттенуирован, чем штаммы, несущие каждую мутацию отдельно.  $LD_{50}$  мутанта для мышей при подкожном или интраназальном введении была  $>10^7$  раз и  $>10^4$  раз выше, чем у штамма дикого типа, соответственно. Мыши, однократно иммунизированные мутантом подкожно, были полностью защищены от подкожного заражения  $3,6 \cdot 10^7$  КОЕ штамма *Y. pestis* дикого типа и значительно защищены (выживаемость 80 %) от аэрозольного заражения  $1,2 \cdot 10^4$  КОЕ. Интраназальная иммунизация также обеспечила значительную защиту от гибели при заражении вирулентным штаммом подкожно и аэрозольно [21].

Регулятор поглощения железа (Fur) является важным глобальным регулятором транскрипции грамотрицательных бактерий. Сконструирован штамм возбудителя эдвардсиеллеза рыб, *Edwardsiella piscicida*, обладающий свойствами вирулентного штамма дикого типа во время иммунизации, эф-



фективно колонизирующий лимфоидные ткани, а затем проявляющий регулируемую отсроченную аттенуацию *in vivo*, что предотвращает развитие инфекции. Регулируемая отсроченная аттенуация *in vivo* основана на замене промотора гена *fur* жестко регулируемой кассетой *araC P<sub>araBAD</sub>*. После колонизации лимфоидных тканей мутантом *E. piscicida* белок Fur перестает синтезироваться из-за отсутствия арабинозы; аттенуация постепенно проявляется *in vivo*, предотвращая развитие заболевания. По сравнению со штаммом J118 дикого типа,  $\chi$ 16012 демонстрирует замедленный рост и повышенную продукцию сидерофоров в отсутствие арабинозы. Уровни генов мРНК, регулируемых *fur*, анализировали в условиях истощения или избытка железа в штаммах дикого типа и *fur*-мутантных штаммах. Колонизационная способность штамма *E. piscicida*  $\chi$ 16012 при введении рыбкам Данио превосходила аналогичный показатель для штамма  $\chi$ 16001 с мутацией  $\Delta fur$ , что обеспечивало лучшую защиту при заражении вирулентным штаммом [22].

#### Регулируемый отсроченный лизис *in vivo*.

Одна из основных проблем использования живых вакцинных штаммов заключается в неконтролируемом выживании – способности сохраняться в иммунизированном животном в течение длительного периода времени и/или продолжительно выделяться из организма для колонизации окружающей среды. Разработка живых вакцинных штаммов, самоограничивающих свое существование *in vivo*, – одна из основных задач, решаемых технологической платформой, основанной на отсроченном запрограммированном лизисе всех без исключения бактериальных клеток, введенных в ходе иммунизации, и соответственно их тотальной гибели.

Во многих рекомбинантных аттенуированных вакцинных штаммах бактерий протективный антиген, кодируемый клонированным геном, остается в цитоплазме микроорганизма, что препятствует его контакту с клетками лимфоидных тканей иммунизируемого. Клеткам иммунизированного животного или человека-хозяина приходится затрачивать энергетические ресурсы, чтобы высвободить этот цитоплазматический антиген [5]. Система регулируемого отсроченного лизиса *in vivo* решает и эту проблему.

Система состоит из двух частей. Первым компонентом является штамм *S. Typhimurium*  $\chi$ 8937 с делецией гена *asdA* и регулируемой арабинозой экспрессией гена *murA*. Оба гена необходимы для синтеза пептидогликана. Вторым компонентом является плазмида pYA3681, которая кодирует регулируемую арабинозой экспрессию генов *murA* и *asdA*, а также C2-регулируемый синтез антисмысловых мРНК *asdA* и *murA*, транскрибируемых с промотора P<sub>R</sub> бактериофага P22. В хромосоме присутствует бактериофаговый ген *c2*, регулируемый арабинозой. Штамм *S. Typhimurium*  $\chi$ 8937(pYA3681) демонстрирует арабинозозависимый рост. При инвазии в ткани хозяина или в среде, свободной от арабинозы, транскрип-

ция *asdA*, *murA* и *c2* прекращается, а концентрации продуктов генов снижаются из-за клеточного деления. Падение концентрации C2 приводит к активации P<sub>R</sub>, что ведет к синтезу антисмысловой мРНК, блокирующей трансляцию любых остаточных мРНК *asdA* и *murA*.

Пневмококки, *Streptococcus pneumoniae*, выделяются из носоглотки у 5–90 % здоровых людей, но в то же время могут вызывать (преимущественно у детей) синуситы, бронхиты, эндокардиты, артриты, пневмонию, менингит и сепсис. За последние годы были лицензированы мультивалентные вакцины, направленные против растущего числа сероваров *S. pneumoniae* (7-, 10-, 13-, 15-, 20-, 23-валентных). Использование конъюгированных полисахаридно-белковых вакцин сыграло решающую роль в снижении заболеваемости инвазивной пневмококковой инфекцией, но появление новых, не входящих в состав вакцины сероваров патогена свидетельствует о нецелесообразности бесконечного увеличения компонентов вакцины и необходимости введения в ее состав антигенов, общих для всех *S. pneumoniae*. Иммунодоминантный  $\alpha$ -спиральный домен PspA *S. pneumoniae* Rx1 был клонирован в штамме *S. Typhimurium*  $\chi$ 8937 с регулируемым отсроченным лизисом. У орально иммунизированных мышей продуцировались антитела к PspA и белкам внешней мембраны сальмонелл. Через 21 сутки в тканях хозяина не было обнаружено жизнеспособных клеток вакцинного штамма. Данная система может быть использована и с другими граммотрицательными возбудителями опасных и особо опасных бактериальных инфекций, для которых желательно биологическое сдерживание неконтролируемого размножения вакцинного штамма [23].

Штаммы живой рекомбинантной аттенуированной вакцины на основе сальмонелл обладали значительным потенциалом для индукции защитного иммунитета против микобактерий туберкулеза за счет презентации антигенов *Mycobacterium tuberculosis*: секретируемого 6 кДа белка (ESAT-6) и белка 10 (CFP-10). Оральная иммунизация мышей штаммом *S. Typhimurium*  $\chi$ 11021, сконструированным для проявления регулируемого отсроченного лизиса и регулируемого отсроченного синтеза антигенов *in vivo*, вызывала значительно более сильные гуморальные и клеточные иммунные ответы, а также обеспечивала большую степень защиты от аэрозольного заражения *M. tuberculosis*, чем штаммы с конститутивной продукцией протективных антигенов [24]. Аналогичную закономерность наблюдали и при оценке иммуногенности векторных штаммов сальмонелл, несущих иммунодоминантные антигены *Streptococcus suis* [25].

На сегодняшний день существует только одна коммерческая вакцина против некротического энтерита кур, основанная на  $\alpha$ -токсине *Clostridium perfringens*. Однако недавние исследования показали, что токсин NetB, а не  $\alpha$ -токсин, является наиболее

важным фактором патогенности возбудителя этого заболевания, но только иммунный ответ на оба этих токсина может обеспечить некоторую защиту от инфекции. В качестве основы вакцины использовали аттенуированный сальмонеллезный штамм, лизирующий после 6–10 раундов репликации в организме хозяина-курицы. В него были встроены гены, кодирующие С-концевой фрагмент  $\alpha$ -токсина и слитый белок GST-NetB. Птиц иммунизировали вакцинными штаммами, продуцирующими каждый белок индивидуально, смесью двух штаммов или одним штаммом, продуцирующим оба белка. Иммунизация штаммами, продуцирующими индивидуальные белки, не обеспечивала защиты, но иммунизация смесью штаммов, продуцирующих белки, или одним штаммом, продуцирующим оба белка, защищала инфицированных животных от гибели. Вакцинный штамм, синтезирующий как С-концевой фрагмент  $\alpha$ -токсина, так и GST-NetB, был способен вызывать усиление выработки кишечных антител IgA, IgY и IgM и достоверно защищать бройлеров, зараженных *C. perfringens*, от гибели [26].

**Отсроченный лизис *in vivo*, регулируемый с помощью чувства кворума.** В начале XXI в. описано межклеточное общение бактерий, названное термином «кворум сенсинг» или «чувство кворума» (в оригинале – quorum sensing) [27]. Общение и координация действий сочленов бактериальных сообществ осуществляется с помощью специальных сигнальных молекул, выделяемых в окружающую среду всеми бактериями. При увеличении скученности бактерий растет и концентрация сигнальных молекул до определенного порогового уровня, при достижении которого начинается или прекращается экспрессия целого ряда генов, регулируемых сигнальными молекулами чувства кворума.

Генетически аттенуированные патогенные бактерии все чаще рассматриваются в качестве кандидатов вакцин. Однако недостаточная аттенуация ограничивает практическое применение этого подхода. Многие патогены используют чувство кворума для уклонения от защитных механизмов хозяина. Высказано предположение о возможности манипулирования чувством кворума для снижения патогенности бактериальных штаммов [28]. Для проверки этой гипотезы модифицировали систему чувства кворума вакцинного штамма *V. cholerae*, добавив «второй уровень» аттенуации. Увеличение степени аттенуации являлось результатом экспрессии гена лизиса *E* фага  $\phi$ X174 на сбалансированной летальной плазмиде под контролем регулируемого чувством кворума промотора гена *luxC*. Для контролируемой чувством кворума экспрессии гена лизиса *E* и позитивной селекции плазмиды *in vivo* у штамма-хозяина были удалены гены *cqsA* и *thyA*, кодирующие синтазу холерного аутоиндуктора 1 (CAI-1) и тимидилатсинтазу соответственно, а рекомбинантные гены *cqsA* и *thyA* под контролем промотора холерного токсина были клонированы на плазмиде для транс-комплементации

мутаций. Полученный штамм экспрессировал CAI-1 в среде АК1 (условия, стимулирующие синтез холерного токсина [29]), но не в среде LB. Кроме того, он обладал повышенной способностью образовывать биопленку в среде LB по сравнению со средой АК1, где CAI-1 синтезируется для подавления образования биопленки. Индукция гена лизиса *E* с помощью чувства кворума ограничивала рост до более низкой плотности клеток в среде АК1, кишечнике мышесосунков или в среде LB, дополненной экзогенным CAI-1. Микроскопическое исследование выявило присутствие теней клеток *V. cholerae* при высокой плотности бактерий. Таким образом было показано, что можно манипулировать чувством кворума, чтобы аттенуировать живой вакцинный вектор, ограничить возможность его попадания в окружающую среду и уменьшить его последующее неконтролируемое распространение [28].

Цитированная выше публикация наводит на мысль о том, что использованный в ней методический подход является вариантом иммунизации бактериальными тенями, но образование теней происходит не *in vitro*, а в организме вакцинируемого.

**Регулируемый отсроченный синтез протективных антигенов.** Для усиления иммунного ответа на рекомбинантные аттенуированные вакцинные штаммы сальмонелл за счет снижения побочных эффектов, вызванных высоким уровнем синтеза целевого протективного антигена, разработана система регулируемого отсроченного синтеза антигена (regulated delayed antigen synthesis). Система включает хромосомный ген-репрессор *lacI*, экспрессируемый с арабинозо-регулируемого промотора *araC*  $P_{BAD}$ . *LacI* регулирует экспрессию плазмидного промотора  $P_{trc}$ , который управляет синтезом антигена. В присутствии арабинозы образуется *LacI*, который связывается с  $P_{trc}$ , блокируя синтез антигена. *In vivo*, в среде с низким содержанием арабинозы, концентрация *LacI* снижается с каждым делением клеток, что позволяет увеличить синтез антигена. Для оптимизации системы и для сравнения изменили сайт связывания рибосомы *lacI*, стартовый кодон и/или состав кодонов, чтобы сконструировать штаммы  $\chi$ 9095,  $\chi$ 9959 и  $\chi$ 9241c регулируемым отсроченным синтезом антигена *PspA* *S. pneumoniae*, синтезирующие различные количества *LacI*, и, в качестве контроля, штамм  $\chi$ 9555 с конститутивным синтезом *PspA*. Все штаммы с отсроченным синтезом *PspA* индуцировали высокие титры антилиполисахаридных антител, что указывает на отсутствие влияния экспрессии *lacI* на способность индуцировать иммунный ответ. Штамм  $\chi$ 9241 индуцировал значительно более высокие титры антител IgG и IgA против *PspA*, чем штамм  $\chi$ 9555, который конститутивно экспрессировал *PspA*. Титры антител против *PspA* обратно коррелировали с уровнем синтеза *LacI*. Штамм  $\chi$ 9241 также продемонстрировал значительно большую защитную эффективность против заражения вирулентным штаммом *S. pneumoniae*. Эти результаты позво-

ляют предположить, что регулируемый отсроченный синтез антигена целесообразно использовать для повышения иммуногенности рекомбинантных вакцинных штаммов [30].

Шигатоксин-продуцирующая *E. coli* (STEC) – этиологический агент пищевых кишечных инфекций, вызывающий геморрагический колит и гемолитико-уремический синдром (ГУС). Поскольку вакцины недоступны, а лечение антибиотиками не рекомендуется, так как оно способствует появлению симптомов ГУС, решающее значение для борьбы с заболеванием человека имеет контроль обсемененности STEC кишечника коров, являющихся основным резервуаром инфекции. На модели мышей была изучена адаптация аттенуированного мутанта *ΔaroA* штамма *S. Typhimurium* для предотвращения кишечной колонизации STEC. Химерный антиген, образованный комбинацией пептидов STEC EspA36-192, Intimin653-935, Tir 258-361 и флагеллина H7 352-374 (E1TH7), был сконструирован и сшит с сигнальной последовательностью β-лактамазы, управляющей секрецией химерного антигена в бактериальное периплазматическое пространство. Трехкратное пероральное введение *ΔaroA*-ST(E1TH7) стимулировало как слизистые, так и гуморальные иммунные реакции, которые защищали мышей от оральной экспериментальной инфекции STEC. Примечательно, что сывороточные антитела были способны не только связывать химерный антиген E1TH7, но и блокировать образование актинового пьедестала, запускаемое системой секреции третьего типа у энтеропатогенной *E. coli* [31].

Использование промоторов, отсрочивающих продукцию протективных антигенов, уменьшает вероятность того, что сверхэкспрессия вакцинным штаммом во время введения уменьшит способность вакцины эффективно колонизировать лимфоидные ткани и, таким образом, снизит иммуногенность. Фактически такое «перепроизводство» антигенов может способствовать ослаблению вакцинных штаммов почти так же, как перепроизводство селективного маркера *Asd* способствует снижению вирулентности [5].

Итак, вакцинация – одна из самых успешных и экономически эффективных мер здравоохранения. Современная разработка вакцин основывается на знаниях и опыте, накопленных за последние 200 лет, и использовании самых передовых технологий молекулярной микробиологии. Расширение наших знаний о механизмах работы иммунной системы и взаимодействий хозяина с патогеном позволило перейти от эмпирического, основанного во многом на интуиции и везении, к более рациональному научно обоснованному дизайну вакцин. Вакцины с одинаковыми целевыми объектами могут быть разработаны на совершенно разных биотехнологических платформах, а одна и та же платформа может лежать в основе создания иммунопрофилактических препаратов против разных патогенов. По сути дела, R. Curtiss 3rd *et al.*

предлагают различные варианты базового носителя (вектора) на основе аттенуированных штаммов сальмонелл, добавление к которому иммунодоминантных антигенов возбудителя целевой инфекции позволяет получить безопасную и эффективную модульную вакцину. В большинстве случаев кажущаяся простота разработки модульных вакцин соответствует действительности, но надо быть готовым к неожиданным результатам и обязательно проверять данные, полученные *in silico*, в экспериментах на лабораторных животных.

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

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 23-15-00132.

#### Список литературы

1. Маркова Ю.А., Беловежец Л.А., Алексеенко А.Л. Вариабельность ферментативного аппарата энтеробактерий в зависимости от температуры культивирования. *Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология»*. 2008; 1(1):18–21.
2. Рыжкова (Иордан) Е.П. Альтернативные ферменты как особая стратегия адаптации у прокариот (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2017; 53(5):435–48. DOI: 10.7868/S0555109917050142.
3. Kotsias F., Cebrian I., Alloati A. Antigen processing and presentation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2019; 348:69–121. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2019.07.005.
4. Curtiss R. 3rd, Wanda S.Y., Gunn B.M., Zhang X., Tinge S.A., Ananthnarayan V., Mo H., Wang S., Kong W. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains with regulated delayed attenuation *in vivo*. *Infect. Immun.* 2009; 77(3):1071–82. DOI: 10.1128/IAI.00693-08.
5. Curtiss R. 3rd, Zhang X., Wanda S.Y., Kang H.Y., Konjufca V., Li Y., Gunn B., Wang S., Scarpellini G., Lee I.S. Induction of host immune responses using *Salmonella*-vectored vaccines. In: Brogden K.A., Minion F.C., Cornick N.A., Stanton T.B., Zhang Q., Nolan L.K., Wannemuehler M.J., editors. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*. 4<sup>th</sup> ed. Washington D.C.: ASM Press; 2007. P. 297–313. DOI: 10.1128/9781555815851.
6. Raetz C.R.H., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 2002; 71:635–700. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
7. Kong Q., Yang J., Liu Q., Alamuri P., Roland K.L., Curtiss R. 3rd. Effect of deletion of genes involved in lipopolysaccharide core and O-antigen synthesis on virulence and immunogenicity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* 2011; 79(10):4227–39. DOI: 10.1128/IAI.05398-11.
8. Hoare A., Bittner M., Carter J., Alvarez S., Zaldivar M., Bravo D., Valvano M.A., Contreras I. The outer core lipopolysaccharide of *Salmonella enterica* serovar Typhi is required for bacterial entry into epithelial cells. *Infect. Immun.* 2006; 74(3):1555–64. DOI: 10.1128/IAI.74.3.1555-1564.2006.
9. Mäkelä P.H., Stocker B.A. How genes determine the structure of the *Salmonella* lipopolysaccharide. *J. Gen. Microbiol.* 1969; 57(3):vi.
10. Collins L.V., Attridge S., Hackett J. Mutations at *rfa* or *pmi* attenuate *Salmonella* Typhimurium virulence for mice. *Infect. Immun.* 1991; 59(3):1079–85. DOI: 10.1128/iai.59.3.1079-1085.1991.
11. Huang T., Gu D., Guo Y., Li A., Kang X., Jiao X., Pan Z. *Salmonella* Enteritidis GalE protein inhibits LPS-induced NLRP3 inflammasome activation. *Microorganisms*. 2022; 10(5):911. DOI: 10.3390/microorganisms10050911.
12. Su H., Liu Q., Wang S., Curtiss R. 3rd, Kong Q. Regulated delayed *Shigella flexneri* 2a O-antigen synthesis in live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induces comparable levels of protective immune responses with constitutive antigen synthesis system. *Theranostics*. 2019; 9(12):3565–79. DOI: 10.7150/thno.33046.
13. Szalo I.M., Taminiau B., Mainil J. *Escherichia coli* lipopolysaccharide: structure, biosynthesis and roles. *Ann. Med. Vet.* 2006; 150(2):108–24.
14. Cardoso P.G., Macedo G.C., Azevedo V., Oliveira S.C. *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb. Cell Fact.* 2006; 5:13. DOI: 10.1186/1475-2859-5-13.



15. Chatterjee S.N., Chaudhuri K. Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. I. Physical and chemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta*. 2003; 1639(2):65–79. DOI: 10.1016/j.bbdis.2003.08.004.
16. Книрель Ю.А., Анисимов А.П. Липополисахарид чумного микроба *Yersinia pestis*: структура, генетика, биологические свойства. *Acta Naturae*. 2012; 4(3):49–61.
17. Ray A., Redhead K., Selkirk S., Poole S. Variability in LPS composition, antigenicity and reactivity of phase variants of *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1991; 63(2-3):211–17. DOI: 10.1016/0378-1097(91)90088-r.
18. Curtiss R. 3rd, Wanda S.Y., Gunn B.M., Zhang X., Tinge S.A., Ananthnarayan V., Mo H., Wang S., Kong W. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains with regulated delayed attenuation in vivo. *Infect. Immun.* 2009; 77(3):1071–82. DOI: 10.1128/IAI.00693-08.
19. Sun W., Roland K.L., Kuang X., Branger C.G., Curtiss R. 3rd. *Yersinia pestis* with regulated delayed attenuation as a vaccine candidate to induce protective immunity against plague. *Infect. Immun.* 2010; 78(3):1304–13. DOI: 10.1128/IAI.01122-09.
20. Montminy S.W., Khan N., McGrath S., Walkowicz M.J., Sharp F., Conlon J.E., Fukase K., Kusumoto S., Sweet C., Miyake K., Akira S., Cotter R.J., Goguen J.D., Lien E. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nat. Immunol.* 2006; 7(10):1066–73. DOI: 10.1038/ni1386.
21. Sun W., Six D., Kuang X., Roland K.L., Raetz C.R.H., Curtiss R. 3rd. A live attenuated strain of *Yersinia pestis* KIM as a vaccine against plague. *Vaccine*. 2011; 29(16):2986–98. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.01.099.
22. Swain B., Powell C.T., Curtiss R. 3rd. Pathogenicity and immunogenicity of *Edwardsiella piscicida* ferric uptake regulator (Fur) mutations in zebrafish. *Fish Shellfish Immunol.* 2020; 107(Pt. B):497–510. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.10.029.
23. Kong W., Wanda S.Y., Zhang X., Bollen W., Tinge S.A., Roland K.L., Curtiss R. 3rd. Regulated programmed lysis of recombinant *Salmonella* in host tissues to release protective antigens and confer biological containment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008; 105(27):9361–6. DOI: 10.1073/pnas.0803801105.
24. Juárez-Rodríguez M.D., Yang J., Kader R., Alamuri P., Curtiss R. 3rd, Clark-Curtiss J.E. Live attenuated *Salmonella* vaccines displaying regulated delayed lysis and delayed antigen synthesis to confer protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 2012; 80(2):815–31. DOI: 10.1128/IAI.05526-11.
25. Ji Z., Shang J., Li Y., Wang S., Shi H. Live attenuated *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis vaccine vector displaying regulated delayed attenuation and regulated delayed antigen synthesis to confer protection against *Streptococcus suis* in mice. *Vaccine*. 2015; 33(38):4858–67. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.07.063.
26. Jiang Y., Mo H., Willingham C., Wang S., Park J.Y., Kong W., Roland K.L., Curtiss R. 3rd. Protection against necrotic enteritis in broiler chickens by regulated delayed lysis *Salmonella* vaccines. *Avian Dis.* 2015; 59(4):475–85. DOI: 10.1637/11094-041715-Reg.
27. Greenberg E.P. Bacterial communication and group behavior. *J. Clin. Invest.* 2003; 112(9):1288–90. DOI: 10.1172/JCI20099.
28. Silva A.J., Benitez J.A., Wu J.H. Attenuation of bacterial virulence by quorum sensing-regulated lysis. *J. Biotechnol.* 2010; 150(1):22–30. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.07.025.
29. Iwanaga M., Yamamoto K. New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22(3):405–8. DOI: 10.1128/jcm.22.3.405-408.1985.
30. Wang S., Li Y., Scarpellini G., Kong W., Shi H., Baek C.H., Gunn B., Wanda S.Y., Roland K.L., Zhang X., Senechal-Willis P., Curtiss R. 3rd. *Salmonella* vaccine vectors displaying delayed antigen synthesis in vivo to enhance immunogenicity. *Infect. Immun.* 2010; 78(9):3969–80. DOI: 10.1128/IAI.00444-10.
31. Iannino F., Uriza P.J., Duarte C.M., Pepe M.V., Roset M.S., Briones G. Development of a *Salmonella*-based oral vaccine to control intestinal colonization of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in animals. *Vaccine*. 2022; 40(8):1065–73. DOI: 10.1016/j.vaccine.2022.01.032.
4. Curtiss R. 3rd, Wanda S.Y., Gunn B.M., Zhang X., Tinge S.A., Ananthnarayan V., Mo H., Wang S., Kong W. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains with regulated delayed attenuation in vivo. *Infect. Immun.* 2009; 77(3):1071–82. DOI: 10.1128/IAI.00693-08.
5. Curtiss R. 3rd, Zhang X., Wanda S.Y., Kang H.Y., Konjufca V., Li Y., Gunn B., Wang S., Scarpellini G., Lee I.S. Induction of host immune responses using *Salmonella*-vectored vaccines. In: Brogden K.A., Minion F.C., Cornick N.A., Stanton T.B., Zhang Q., Nolan L.K., Wannemuehler M.J., editors. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*. 4th ed. Washington D.C.: ASM Press; 2007. P. 297–313. DOI: 10.1128/9781555815851.
6. Raetz C.R.H., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 2002; 71:635–700. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.
7. Kong Q., Yang J., Liu Q., Alamuri P., Roland K.L., Curtiss R. 3rd. Effect of deletion of genes involved in lipopolysaccharide core and O-antigen synthesis on virulence and immunogenicity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* 2011; 79(10):4227–39. DOI: 10.1128/IAI.05398-11.
8. Hoare A., Bittner M., Carter J., Alvarez S., Zaldivar M., Bravo D., Valvano M.A., Contreras I. The outer core lipopolysaccharide of *Salmonella enterica* serovar Typhi is required for bacterial entry into epithelial cells. *Infect. Immun.* 2006; 74(3):1555–64. DOI: 10.1128/IAI.74.3.1555-1564.2006.
9. Mäkelä P.H., Stocker B.A. How genes determine the structure of the *Salmonella* lipopolysaccharide. *J. Gen. Microbiol.* 1969; 57(3):vi.
10. Collins L.V., Attridge S., Hackett J. Mutations at *rfc* or *pml* attenuate *Salmonella* Typhimurium virulence for mice. *Infect. Immun.* 1991; 59(3):1079–85. DOI: 10.1128/iai.59.3.1079-1085.1991.
11. Huang T., Gu D., Guo Y., Li A., Kang X., Jiao X., Pan Z. *Salmonella* Enteritidis GalE protein inhibits LPS-induced NLRP3 inflammasome activation. *Microorganisms*. 2022; 10(5):911. DOI: 10.3390/microorganisms10050911.
12. Su H., Liu Q., Wang S., Curtiss R. 3rd, Kong Q. Regulated delayed *Shigella flexneri* 2a O-antigen synthesis in live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induces comparable levels of protective immune responses with constitutive antigen synthesis system. *Theranostics*. 2019; 9(12):3565–79. DOI: 10.7150/thno.33046.
13. Szalo I.M., Taminiau B., Mainil J. *Escherichia coli* lipopolysaccharide: structure, biosynthesis and roles. *Ann. Med. Vet.* 2006; 150(2):108–24.
14. Cardoso P.G., Macedo G.C., Azevedo V., Oliveira S.C. *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb. Cell Fact.* 2006; 5:13. DOI: 10.1186/1475-2859-5-13.
15. Chatterjee S.N., Chaudhuri K. Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. I. Physical and chemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta*. 2003; 1639(2):65–79. DOI: 10.1016/j.bbdis.2003.08.004.
16. Книрель Ю.А., Анисимов А.П. [Lipopolysaccharide of plague microbe *Yersinia pestis*: structure, genetics, biological properties]. *Acta Naturae*. 2012; 4(3):49–61.
17. Ray A., Redhead K., Selkirk S., Poole S. Variability in LPS composition, antigenicity and reactivity of phase variants of *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1991; 63(2-3):211–17. DOI: 10.1016/0378-1097(91)90088-r.
18. Curtiss R. 3rd, Wanda S.Y., Gunn B.M., Zhang X., Tinge S.A., Ananthnarayan V., Mo H., Wang S., Kong W. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains with regulated delayed attenuation in vivo. *Infect. Immun.* 2009; 77(3):1071–82. DOI: 10.1128/IAI.00693-08.
19. Sun W., Roland K.L., Kuang X., Branger C.G., Curtiss R. 3rd. *Yersinia pestis* with regulated delayed attenuation as a vaccine candidate to induce protective immunity against plague. *Infect. Immun.* 2010; 78(3):1304–13. DOI: 10.1128/IAI.01122-09.
20. Montminy S.W., Khan N., McGrath S., Walkowicz M.J., Sharp F., Conlon J.E., Fukase K., Kusumoto S., Sweet C., Miyake K., Akira S., Cotter R.J., Goguen J.D., Lien E. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nat. Immunol.* 2006; 7(10):1066–73. DOI: 10.1038/ni1386.
21. Sun W., Six D., Kuang X., Roland K.L., Raetz C.R.H., Curtiss R. 3rd. A live attenuated strain of *Yersinia pestis* KIM as a vaccine against plague. *Vaccine*. 2011; 29(16):2986–98. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.01.099.
22. Swain B., Powell C.T., Curtiss R. 3rd. Pathogenicity and immunogenicity of *Edwardsiella piscicida* ferric uptake regulator (Fur) mutations in zebrafish. *Fish Shellfish Immunol.* 2020; 107(Pt. B):497–510. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.10.029.
23. Kong W., Wanda S.Y., Zhang X., Bollen W., Tinge S.A., Roland K.L., Curtiss R. 3rd. Regulated programmed lysis of recombinant *Salmonella* in host tissues to release protective antigens and confer biological containment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008; 105(27):9361–6. DOI: 10.1073/pnas.0803801105.

## References

1. Markova Yu.A., Belovezhets L.A., Alekseenko A.L. [Variability of the enzymatic apparatus of enterobacteria depending on the cultivation temperature]. *Izvestiya Irkutskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya "Biologiya. Ekologiya"* [News of Irkutsk State University. Series "Biology. Ecology"] 2008; 1(1):18–21.
2. Ryzhkova (Jordan) E.P. [Alternative enzymes as a special adaptation strategy in prokaryotes (review)]. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* [Applied Biochemistry and Microbiology]. 2017; 53(5):435–48. DOI: 10.7868/S0555109917050142.
3. Kotsias F., Cebrian I., Alloati A. Antigen processing and presentation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2019; 348:69–121. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2019.07.005.

24. Juárez-Rodríguez M.D., Yang J., Kader R., Alamuri P., Curtiss R. 3rd, Clark-Curtiss J.E. Live attenuated *Salmonella* vaccines displaying regulated delayed lysis and delayed antigen synthesis to confer protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 2012; 80(2):815–31. DOI: 10.1128/IAI.05526-11.
25. Ji Z., Shang J., Li Y., Wang S., Shi H. Live attenuated *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis vaccine vector displaying regulated delayed attenuation and regulated delayed antigen synthesis to confer protection against *Streptococcus suis* in mice. *Vaccine*. 2015; 33(38):4858–67. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.07.063.
26. Jiang Y., Mo H., Willingham C., Wang S., Park J.Y., Kong W., Roland K.L., Curtiss R. 3rd. Protection against necrotic enteritis in broiler chickens by regulated delayed lysis *Salmonella* vaccines. *Avian Dis.* 2015; 59(4):475–85. DOI: 10.1637/11094-041715-Reg.
27. Greenberg E.P. Bacterial communication and group behavior. *J. Clin. Invest.* 2003; 112(9):1288–90. DOI: 10.1172/JCI20099.
28. Silva A.J., Benitez J.A., Wu J.H. Attenuation of bacterial virulence by quorum sensing-regulated lysis. *J. Biotechnol.* 2010; 150(1):22–30. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.07.025.
29. Iwanaga M., Yamamoto K. New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22(3):405–8. DOI: 10.1128/jcm.22.3.405-408.1985.
30. Wang S., Li Y., Scarpellini G., Kong W., Shi H., Baek C.H., Gunn B., Wanda S.Y., Roland K.L., Zhang X., Senechal-Willis P., Curtiss R. 3rd. *Salmonella* vaccine vectors displaying delayed antigen synthesis *in vivo* to enhance immunogenicity. *Infect. Immun.* 2010; 78(9):3969–80. DOI: 10.1128/IAI.00444-10.
31. Iannino F., Uriza P.J., Duarte C.M., Pepe M.V., Roset M.S., Briones G. Development of a *Salmonella*-based oral vaccine to control intestinal colonization of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in animals. *Vaccine*. 2022; 40(8):1065–73. DOI: 10.1016/j.vaccine.2022.01.032.

**Authors:**

Platonov M.E., Lipatnikova N.A., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: nfo@obolensk.org.

**Об авторах:**

Платонов М.Е., Липатникова Н.А., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org.