

# Разработка кандидатных вакцин против инфекции, вызванной шига-токсин-продуцирующими *Escherichia coli*. Часть 1

Э.А.Светоч, И.А.Дятлов, Н.Н.Карцев, Б.В.Ерусланов, М.Е.Канашенко, Н.К.Фурсова

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

Шига-токсин-продуцирующие штаммы *Escherichia coli* (STEC) вызывают тяжелые и опасные для жизни человека заболевания – геморрагический колит (ГК) и ассоциированный с ним гемолитико-уремический синдром (ГУС). Применение антибактериальных этиотропных средств лечения при этих заболеваниях противопоказано. Вакцинные препараты против ГК и ГУС человека отсутствуют. В обзоре представлены материалы по конструированию различных типов кандидатных вакцин против шига-токсин-продуцирующих штаммов *E. coli* и оценке их иммуногенных и протективных свойств в экспериментах на лабораторных и сельскохозяйственных животных. Рассматриваются перспективы использования в практике инактивированных корпускулярных и живых (векторных) вакцин, липополисахаридных, ДНК-вакцин и нановакцин, вакцин на основе бактериальных клеточных оболочек (теней), а также вакцин, создаваемых методами обратной вакцинологии.

**Ключевые слова:** STEC, геморрагический колит, иммунодоминантные антигены, шига-токсины, *EspA*, *EspB*, *Tir*, интимин, *IgG*, *slgA*

**Для цитирования:** Светоч Э.А., Дятлов И.А., Карцев Н.Н., Ерусланов Б.В., Канашенко М.Е., Фурсова Н.К. Разработка кандидатных вакцин против инфекции, вызванной шига-токсин-продуцирующими *Escherichia coli*. Часть 1. Бактериология. 2020; 5(2): 56–70. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-56-70

## Development of candidate vaccines against infection caused by shiga-toxin producing *Escherichia coli*. Part 1

E.A.Svetoch, I.A.Dyatlov, N.N.Kartsev, B.V.Eruslanov, M.E.Kanashenko, N.K.Fursova

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) strains cause serious and life-threatening diseases, hemorrhagic colitis (HC) and associated hemolytic uremic syndrome (HUS). Antibacterial etiotropic therapy against these diseases are not recommended. There are no vaccines against human HA and HUS. The review provides materials on the design of various types of candidate vaccines against STEC strains and assessment of their immunogenic and protective properties in experiments on laboratory and farm animals. The prospects for the use of inactivated corpuscular and live (vector) vaccines, lipopolysaccharide vaccines, DNA vaccines and nanovaccines, vaccines based on bacterial cell membranes (ghost), as well as vaccines created by reverse vaccinology methods in practice are considered.

**Key words:** STEC, hemorrhagic colitis, immunodominant antigens, shiga toxins, *EspA*, *EspB*, *Tir*, intimine, *IgG*, *slgA*

**For citation:** Svetoch E.A., Dyatlov I.A., Kartsev N.N., Eruslanov B.V., Kanashenko M.E., Fursova N.K. Development of candidate vaccines against infection caused by shiga-toxin producing *Escherichia coli*. Part 1. Bacteriology. 2020; 5(2): 56–70. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-56-70

Пищевые инфекции, вызываемые шига-токсин-продуцирующими штаммами *Escherichia coli* (STEC), являются весьма актуальной проблемой для общественного здравоохранения многих стран мира, включая высокоразвитые [1–3]. Начиная с 1990-х гг. заболевания, обусловленные STEC-штаммами, регистрируются и в Российской

Федерации [4–6]. Шига-токсин-продуцирующие *E. coli* чаще всего вызывают обычную, водянистую диарею, которая протекает в легкой форме, и тяжелые формы болезни – геморрагическую диарею (геморрагический колит (ГК)) и гемолитико-уремический синдром (ГУС). Наибольшую опасность представляет ГУС, при котором у больного раз-

### Для корреспонденции:

Фурсова Надежда Константиновна, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
Телефон: (4967) 36-0079  
E-mail: fursova@obolensk.org

Статья поступила 06.08.2020 г., принята к печати 15.09.2020 г.

### For correspondence:

Nadezhda K. Fursova, leader researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0079  
E-mail: fursova@obolensk.org

The article was received 06.08.2020, accepted for publication 15.09.2020

виваются тромбоцитопения, гемолитическая анемия, поражения эпителиальных клеток микрососудов и несостоятельность (почечная недостаточность) выделительной системы. У значительной части пациентов отмечаются нарушения центральной нервной системы (раздражительность, латергия, судороги, ступор, кома и др.). Желудочно-кишечные осложнения в острой стадии ГУС проявляются в виде перфорации желудка, некроза и панкреатита. Особенно болезнь опасна для детей и лиц пожилого возраста. Смертность при развившемся ГУС составляет 5–15% [7]. Использование этиотропных средств для лечения ГК и ГУС противопоказано, поскольку их применение вызывает лизис клеток STEC в кишечнике человека и, как следствие, дополнительный выброс шига-токсинов в кровеносную систему, который усугубляет тем самым течение патологического процесса у больного. Кроме того, антибиотики могут индуцировать переход умеренного бактериофага, несущего в своем геноме гены шига-токсинов, из неактивной фазы (фаг интегрирован в хромосоме) в литическую, что также может способствовать накоплению шига-токсинов в организме больного. Поэтому лечение ГУС является всего лишь поддерживающим, симптоматическим и предполагает контроль у больного баланса жидкости и электролитов. К сожалению, сейчас отсутствуют методические подходы, которые могли бы предотвратить развитие ГУС у инфицированных детей [7].

Шига-токсин-продуцирующие *E. coli* включают в себя группу энтерогеморрагических штаммов (ЕНЕС), для которых характерны наличие в геноме генов синтеза шига-токсинов двух типов, Stx1 и Stx2, интимина (*Eae*), энтерогемолизина (*Ehx*) и других факторов вирулентности, и группу не-ЕНЕС эшерихий, в геноме которых отсутствуют гены синтеза интимина (*eae*-гены) и энтерогемолизина (*ehx*-гены). Классическим представителем ЕНЕС-группы является серотип *E. coli* O157:H7, наиболее опасный патоген, с которым связаны крупные вспышки пищевых инфекций, зарегистрированные в разное время в Японии, США, Англии, Германии и др. странах. В эти эпидемические вспышки были вовлечены сотни и тысячи человек, во всех случаях среди больных ГУС отмечалась гибель [1–3, 7].

Кроме серотипа *E. coli* O157:H7, спорадические и вспышечные случаи ГК могут вызвать *E. coli* других серогрупп, среди которых наиболее часто встречаются серогруппы O26, O55, O103, O111, O121 и O145. *E. coli* указанных серогрупп вызывают менее тяжелые формы болезни, однако обусловленные ими ГК и ГУС также могут сопровождаться гибелью больных [8, 9]. В настоящее время специалисты отмечают увеличивающуюся эпидемиологическую значимость указанных выше серогрупп *E. coli*. Эта тенденция делает весьма насущным для эпидемиологической службы постоянный мониторинг этиологической структуры ГК и ГУС в Российской Федерации.

Представителем не-ЕНЕС шига-токсин-продуцирующих *E. coli* является новый гибридный высокопатогенный и опасный для человека, резистентный ко многим антибиотикам, штамм серотипа O104:H4, вызвавший в 2011 г. в Германии крупную эпидемическую вспышку, охватившую более 4000 человек, сопровождавшуюся развитием у больных тяжелых форм ГУС [10, 11]. При этой вспышке от ГУС погибли

54 человека. Столь тяжелые последствия вспышки ярко демонстрируют неготовность современной медицины эффективно бороться с пищевой инфекцией, обусловленной шига-токсин-продуцирующими *E. coli*.

Как известно, основным источником STEC-штаммов являются сельскохозяйственные (крупный рогатый скот, свиньи, козы, овцы, птица) и дикие животные [12–14]. В последние годы установлено, что дополнительным естественным резервуаром *E. coli* O157:H7 и *Salmonella* spp. являются сельскохозяйственные растения, такие, например, как салаты, петрушка, укроп, редис и др., в тканях которых возбудитель не только сохраняется, но и размножается [15]. Этим, по всей вероятности, и объясняется факт увеличения в последние годы числа вспышек ГК среди людей после употребления зеленых растений или их семян.

Основные меры борьбы с ГК – это предупреждение носительства животными возбудителей ГК и предупреждение распространения ЕНЕС от животных с фекалиями во внешнюю среду, на молочные, мясные и другие продукты, а также в питьевую воду. Большое значение имеют предпринимаемые меры по деконтаминации пищевого сырья, полуфабрикатов, готовых продуктов и питьевой воды от шига-токсин-продуцирующих эшерихий. К сожалению, перечисленные меры далеко не всегда позволяют предохранить пищевое сырье и продукты питания от обсемененности их STEC культурами, а значит, и предотвратить заражение человека, употреблявшего контаминированную патогеном некачественно приготовленную пищу. Следует отметить низкую заражающую дозу *E. coli* O157:H7 для человека, которая составляет 100–1000 живых клеток [7].

Учитывая эпидемическую значимость и тяжелые последствия пищевой инфекции, вызываемой шига-токсин-продуцирующими штаммами *E. coli*, невозможность применения этиотропных средств для лечения ГК и ГУС, во многих странах мира (США, Канаде, европейских странах, Японии, Аргентине, Китае и некоторых других) активно проводят научные поиски по созданию специфических вакцинных препаратов для профилактики носительства STEC-штаммов сельскохозяйственными животными и для защиты человека от STEC-инфекции. Начиная с 1990-х гг. исследователи разрабатывают самые разные типы вакцин: корпускулярные убитые (бактерины), живые вакцины, вакцины на основе клеточных оболочек (теней), вакцины на основе полисахаридов (ПС) и липополисахаридов (ЛПС), ДНК-вакцины, нановакцины, вакцины, создаваемые на основе методов обратной вакцинологии, и субъединичные рекомбинантные вакцины [16–20].

Поскольку для конструирования большинства перечисленных выше вакцин в качестве иммунодоминантных антигенов в настоящее время используют небольшое число известных факторов патогенности ЕНЕС – адгезины и шига-токсины, ниже мы приводим их краткую характеристику.

Адгезию ЕНЕС-штаммов к эпителию кишечного тракта обеспечивают ряд структурных и секреторных компонентов клетки: группа протеинов системы III типа секреции (Т3SS), пили, фимбрии, жгутики, белки-аутотраспортеры и белки внешней мембраны [21–24]. Среди перечисленных компонентов большое внимание уделяется транслоцирующим и эффекторным протеинам Т3SS, которые обеспечивают ад-

гезию возбудителя к клеткам эпителия слизистой кишечника и одновременно поражают микроворсинки эпителия. Процесс адгезии и поражение микроворсинок известен как феномен «прикрепления и сглаживания» (*attaching and effacing* – A/E). В процессе A/E патоген крепко присоединяется к энтероцитам и вызывает гибель их микроворсинок.

Белки T3SS кодируются генами, локализованными на островке патогенности хромосомы EHEC (~30–35 тыс. п.н.), названном локусом сглаживания энтероцитов (*locus of enterocyte effacement* – LEE). На этом же генетическом локусе находится и ген *eae*, контролирующий синтез интимина – белка внешней мембраны клетки, основного адгезина EHEC [25, 26].

Для конструирования кандидатных вакцин против EHEC-патогенов в подавляющем большинстве случаев используют белки T3SSEspA, EspB, Tir и интимины, играющие ключевую роль в адгезии и колонизации клетками EHEC кишечного тракта человека и животных. Важно заметить, что в сыворотке крови людей, переболевших ГК и ГУС, ко всем перечисленным выше антигенам обнаруживают специфические антитела [27, 28].

Белок EspA – полипептид размером 25кДа, являющийся основным структурным компонентом большой филаментозной органеллы, транзиторно экспрессирующийся на поверхность клеток EHEC. Эта органелла выполняет функцию первичного связывания патогена с мембраной клетки хозяина, образуя между ними своеобразный «мост». По образованному белком EspA «мосту» происходит транслокация эффекторных секреторных белков T3SSEspB и EspD, а также Tir-белка – рецептора для основного адгезина клеток EHEC интимина [27, 29, 30].

Белки EspB (37 кДа) и EspD (39 кДа) – полипептиды, которые обеспечивают формирование в плазматической мембране хозяйской клетки пор (транслоконов), через которые происходит доставка эффекторных белков патогена в цитоплазму эукариотической клетки. Кроме того, полипептид EspB транслоцируется в цитоплазму хозяйской клетки, где выполняет функцию триггера, «спускового крючка» процесса A/E и образования пьедесталоподобной структуры для клетки патогена [27, 29, 30].

Еще один секреторный протеин системы T3SS – Tir-белок (80 кДа), который транслоцируется вначале в цитоплазму эпителиальной клетки хозяина, а затем, после его фосфорилирования протеиназой А, встраивается в мембрану этой клетки и служит, как уже указывалось выше, рецептором для основного адгезина клеток EHEC – интимина. Присоединение интимина к Tir-белку обеспечивает прочную связь клетки патогена с клеткой хозяина. В результате описанных событий происходит образование пьедестала для клетки патогена, что в свою очередь вызывает гибель микроворсинок клеток эпителия, а возможно, и гибель (слищивание) самих клеток эпителия [31].

Интимин (Eae) – протеин (94–97 кДа), экспрессируемый клеткой и локализуемый на поверхности ее внешней мембраны. Интимин играет, как уже отмечалось, ключевую роль во взаимодействии с эукариотической клеткой. Рецептор-связывающая активность интимина с Tir-белком обеспечивается С-концевой последовательностью пептида величиной 280–300 аминокислотных остатков (Int280, Int300), кото-

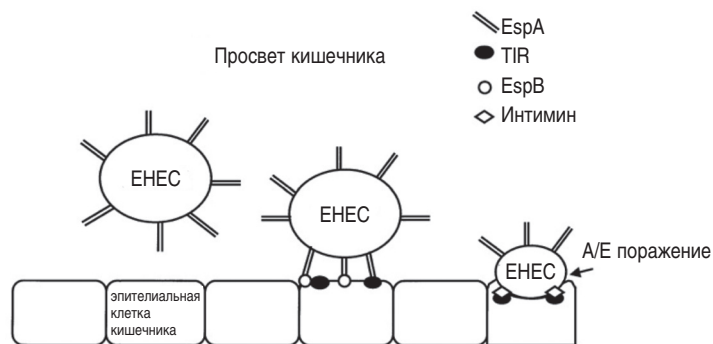


Рис. 1. Диаграмма формирования A/E-поражения кишечного эпителия [27].

рая, как правило, и используется в качестве антигена при разработке прототипа вакцинных препаратов. По степени гетерогенности С-концевой последовательности на сегодня различают 17 типов интиминов, среди которых интимин-γ1 чаще других ассоциирован с высоковирулентными эпидемическими штаммами EHEC, вызывающими вспышки ГК и ГУС. Именно интимин типа γ1 используют при конструировании вакцин [32]. На рис. 1 представлена модель участия пептидов EspA, EspB, Tir и интимина в формировании поражения эпителия кишечника с помощью механизма A/E.

Вторым целевым патогенетическим фактором STEC-штаммов, против которого должна защищать разрабатываемая вакцина, являются продуцируемые ими шига-токсины. Шига-токсины – это главная причина тяжелых поражений у человека: ГК и потенциально опасного для жизни ГУС.

STEC продуцируют два типа шига-токсинов: шига-токсин типа I (Stx1) и шига-токсин типа II (Stx2). Stx1 практически идентичен Stx *Shigella dysenteriae*, в то время как Stx2 лишь на 60% идентичен Stx1. Антитела против Stx1 не нейтрализуют Stx2 и наоборот. Stx2 в 1000 раз токсичнее шига-токсина Stx1 как в опытах *in vitro*, так и *in vivo*. Важно отметить, что оба шига-токсина, Stx1 и Stx2, имеют по несколько субтипов, незначительно различающихся по антигенной структуре, но существенно различающихся по биологическим свойствам, в частности по видовой специфичности и по степени тяжести вызываемых ими патологий. У людей при тяжелых спорадических случаях и вспышках болезней чаще всего выделяют шига-токсины субтипов Stx2a, Stx2c, реже Stx2d [33–36].

Шига-токсины Stx1 и Stx2 принадлежат семейству AB5-токсинов с молекулярной массой 70 кДа. Они состоят из одной копии энзиматически активной субъединицы А (32 кДа) и пяти субъединиц В (7,7 кДа), каждая из которых несет на себе три связывающих с рецептором сайта (рис. 2).

Рецептором для обоих шига-токсинов является гликолипид глоботриаозилцерамид (Gb3), в большом количестве присутствующий в эндотелии сосудов почек, печени и других органов (рис. 3). Проникая через слизистую кишечника в кровеносное русло, шига-токсины связываются с помощью В-субъединицы с рецептором Gb3 клеток мишеней и посредством N-гликозидазной активности субъединицы А вызывают их гибель. У крупного рогатого скота, основного носителя STEC-штаммов, шига-токсины не вызывают повреждений и гибели клеток кишечного эпителия и других органов, однако



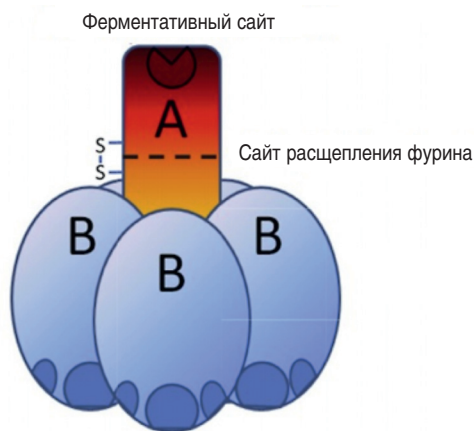


Рис. 2. Схема строения шига-токсина (Stx) и шига-подобного токсина, показывающая наличие пяти связывающих (B) субъединиц и одной ферментативной (A) субъединицы [35].

экспериментально показано, что шига-токсины способны супрессировать иммунную систему животных и тем самым увеличивать сроки носительства ЕНЕС или делать его постоянным [37]. Здесь же уместно отметить еще одно важное свойство шига-токсинов: они способствуют колонизации патогеном кишечного тракта, тем самым увеличивая микробную нагрузку на макроорганизм и утяжеляя течение инфекции [38].

Синтез шига-токсинов Stx1 и Stx2 кодируется локусом генов Stx1 и Stx2, локализованных в геноме лямбдоидного умеренного фага, встроенного в хромосому STEC-клеток. Под влиянием различных стресс-факторов, например температуры, антибиотиков, бактериофаг может перейти в литическую фазу и трансдуцироваться в гетерологичные клетки *E. coli* и в клетки других видов энтеробактерий [34, 35]. Учитывая ведущую роль шига-токсинов в патогенезе ГК и ГУС, создание вакцины, способной нейтрализовать их токсическую и колонизационную активность, является, пожалуй, важнейшим критерием успешности будущего вакцинного препарата против STEC-инфекции.

### Корпускулярные инактивированные (убитые) вакцины

Корпускулярные убитые вакцины довольно широко используют в ветеринарной практике для профилактики бакте-

риальных инфекций, в том числе колибактериоза (колидиарии и колисепсиса) у сельскохозяйственных животных. Реже убитые корпускулярные вакцины используют в медицине. Этот тип вакцин, используемый для борьбы с носительством животными ЕНЕС-штаммов серотипа *E. coli* O157:H7, основного возбудителя ГК и ГУС у человека, можно разделить на две группы: вакцины, в которых используют инактивированные интактные клетки *E. coli* O157:H7, и вакцины, в которых применяют генетически модифицированные штаммы *E. coli* O157:H7.

В Российской Федерации для профилактики колибактериоза сельскохозяйственных животных применяют убитую корпускулярную вакцину, в состав которой включены интактные клетки доминирующих в стране патогенных серотипов *E. coli*, включая *E. coli* O157:H7 (поливалентная вакцина). К сожалению, данные о влиянии этой вакцины на носительство животными (крупным рогатым скотом и свиньями) ЕНЕС-штаммов *E. coli* O157:H7 отсутствуют [39]. В то же время в работах Sharma et al. [40] убедительно продемонстрирована эффективность убитой вакцины, приготовленной на основе цельных клеток *E. coli* O157:H7, мутантных по гену *hha*, контролирующему функцию гена *lar*, главного регулятора экспрессии белков Т3SS. Цельные мутантные клетки, введенные бычкам внутримышечно вместе с водно-масляным адьювантом, существенно снижали выделение *E. coli* O157:H7 с фекалиями.

Интересной представляется работа Schaut et al. [41] по вакцинации бычков инактивированной формалином культурой Stx2 негативного, дефектного по *hha*-гену штамма *E. coli* O157:H7. В эксперименте было показано, что внутримышечная иммунизация инактивированными клетками полученного мутанта индуцировала у животных клеточный и гуморальный (сывороточный и мукозальный) иммунные ответы на соматический антиген O157. Важно отметить, что экстракты фекалий иммунизированных животных были способны блокировать адгезию патогена к эпителиальным клеткам кишечника и тем самым контролировать выделение патогена во внешнюю среду. Авторы делают заключение о возможности использования сконструированного ими мутанта *E. coli* O157:H7 в качестве корпускулярной инактивированной вакцины.

### Живые вакцины

Живые аттенуированные вакцины для профилактики STEC-инфекции привлекают исследователей простотой и дешевизной биотехнологического процесса их производства, а также возможностью как перорального, так и парентерального применения. Пероральный способ доставки вакцины особенно важен для индуцирования местного мукозального иммунитета, играющего решающую роль в защите макроорганизма от возбудителей кишечных инфекций. При разработке экспериментальных живых вакцин против ЕНЕС-штамма *E. coli* O157:H7, ведущего возбудителя ГК и ГУС, исследователи использовали как аттенуированные штаммы *E. coli* O157:H7, так и аттенуированные штаммы *Salmonella* и *Mycobacterium bovis* (штамм BCG). Аттенуированные штаммы в данном случае выступают в качестве векторов-носителей протективных антигенов ЕНЕС-штаммов (векторные вакцины).

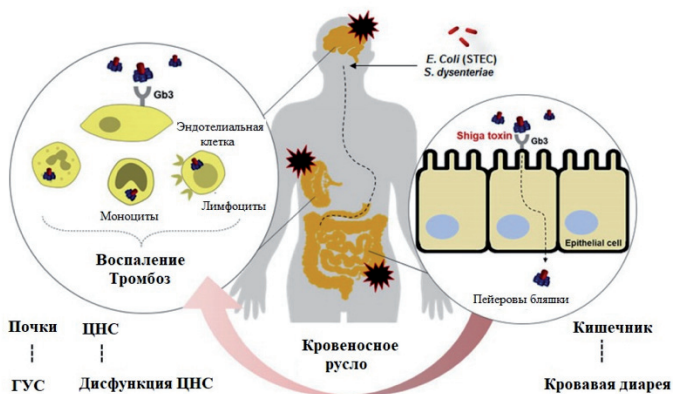


Рис. 3. Пути распространения шига-токсина в организме человека и его поражающее действие на органы-мишени [36].

В 2009 г. Liu et al. [42] с помощью передачи суицидного вектора в клетки *E. coli* O157:H7 получили вариант штамма с делецией *ler*-гена, центрального регулятора генов секреторных белков системы T3SS, отвечающих за A/E-эффект патогена. Путем пассажа на питательной среде из *ler*-варианта *E. coli* O157:H7 был элиминирован профаг с генами синтеза шига-токсинов Stx1 и Stx2. Этот штамм, обозначенный как F25, не продуцировал шигатоксинов и был неvirulentным для мышей BALB/c. Далее в штамм F25 была трансформирована плазида с мутантными генами А-субъединиц шигатоксинов Stx1 и Stx2, кодирующими соответствующие нетоксичные белки обоих токсинов. Полученный штамм *E. coli* O157:H7(F105), так же как и штамм F25, был нетоксичным для Vero-клеток и мышей. Животные, которым внутривенно инъецировали этот штамм, продолжали нормально расти и прибавлять в весе, у них не было отмечено каких-либо признаков болезни. Вакцинированные штаммами F25 и F105 мыши, после их внутривенного заражения virulentным штаммом *E. coli* O157:H7 EDL933, в 55 и 70% случаев соответственно оставались живыми; все контрольные (невакцинированные) мыши после заражения погибли. После интрагастральной вакцинации штаммами F25 и F105 у мышей сформировался мукозальный иммунитет: при пероральном заражении клетками *E. coli* O157:H7 EDL933 у животных отмечали резкое снижение концентрации патогена в кишечном содержимом, все мыши остались живыми; все контрольные (невакцинированные) животные погибли на 4-й день после заражения. Интрагастральная вакцинация штаммами F25 и F105 индуцировала у беременных мышей развитие колострального (пассивного) иммунитета: мышата, родившиеся от вакцинированных матерей, после перорального их заражения штаммом *E. coli* O157:H7 EDL933 выжили в 75 и 83% случаев соответственно; среди контрольных мышат, родившихся от невакцинированных матерей, живыми остались 17%. Авторы работы делают заключение, что сконструированные ими аттенуированные штаммы *E. coli* O157:H7 F25 и F105 могут быть использованы в качестве оральной вакцины против ЕНЕС-штаммов *E. coli* O157:H7.

Gu et al. [43] для защиты мышей BALB/c от *E. coli* O157:H7 EDL933 использовали аттенуированный рекомбинантный штамм *Salmonella*, экспрессирующий слитный белок, состоящий из трех протективных антигенов ЕНЕС: EspA, интимина из 300 (Int300) аминокислот и В-субъединицы шига-токсина Stx2 – Stx2В. Пероральная вакцинация мышей рекомбинантным штаммом *Salmonella* в дозе 1–4 × 10<sup>8</sup> КОЕ индуцировала у животных образование высоких титров сывороточных IgG и в меньшей степени – мукозальных секреторных IgA (sIgA), обнаруживаемых в фекалиях. Иммунизированные мыши на протяжении длительного времени (>70 дней) были защищены от перорального заражения смертельной дозой штамма *E. coli* O157:H7 EDL933. Было показано также, что местный мукозальный иммунитет, индуцированный у мышей рекомбинантной живой вакциной, может быть активирован однократным подкожным введением чистого препарата слитного EspA + Int300 + Stx2В белка даже спустя 70 дней после первичной пероральной иммунизации. Авторы работы считают, что сконструированный ими штамм *Salmonella*, продуцирующий протективные антигены ЕНЕС, является

альтернативой другим типам вакцин, создаваемых для профилактики ЕНЕС-инфекции.

Oliveira et al. [19] сконструировали живую пероральную вакцину на основе аттенуированного штамма *Salmonella typhimurium*, экспрессировавшего основной адгезин ЕНЕС, интимин-γ. Вакцина индуцировала у мышей образование высоких титров специфических анти-интимин-мукозальных sIgA-антител и подавляла колонизационную активность патогена: у иммунизированных животных после перорального заражения штамм *E. coli* O157:H7 быстрее элиминировался из кишечника по сравнению с контрольными (неиммунизированными) мышами. Авторы считают, что описанная ими живая рекомбинантная вакцина может быть с успехом использована для снижения носительства ЕНЕС-штаммов у животных.

Fujii et al. [44] в качестве векторной живой вакцины против шига-токсин-продуцирующих *E. coli* применили сконструированный ими рекомбинантный штамм *M. bovis* (BCG), продуцирующий протективный антиген В-субъединицы шига-токсина Stx2. Двукратная интраперитонеальная иммунизация этим штаммом мышей BALB/c в дозе 10<sup>7</sup> КОЕ индуцировала у животных высокие титры специфических (анти-Stx2) сывороточных IgG- и мукозальных sIgA-антител. Иммунизированные живой вакциной в дозах 10<sup>7</sup> и 10<sup>6</sup> КОЕ мыши в 57 и 63% соответственно остались живыми после перорального заражения их смертельной дозой шига-токсин-продуцирующего (Stx2d) штамма *E. coli*; продолжительность жизни погибших иммунизированных мышей была намного больше, чем у контрольных (неиммунизированных). Сывороточные IgG и мукозальные sIgA анти-Stx2 антитела сохранялись у иммунизированных мышей на протяжении 2 мес. Авторы работы полагают, что рекомбинантный штамм *M. bovis* BCG, экспрессирующий белок субъединицы В шига-токсина Stx2, может рассматриваться как потенциальная вакцина против STEC-инфекции.

Представленные выше результаты свидетельствуют, что аттенуированные ЕНЕС-штаммы *E. coli* O157:H7 и векторные вакцины на основе аттенуированных штаммов *Salmonella* и *M. bovis* (BCG) позволяют, в зависимости от способа их применения, индуцировать у животных как системный, так и местный интестинальный иммунные ответы, способные предотвратить адгезию патогена и последующую колонизацию им кишечника и обеспечить защиту макроорганизма от шига-токсинов.

#### **Вакцины на основе клеточных оболочек (теней)**

Одним из сравнительно новых научных направлений разработки вакцин для профилактики STEC-инфекции является использование оболочек (теней) бактериальных клеток (bacterial ghosts – BG), сохранивших целлюлярную морфологию и все нативные структуры, характерные для живой клетки патогена. В BG в неповрежденной форме присутствуют даже такие чувствительные и хрупкие структуры, как пили и фимбриии. Важно заметить, что в BG в неденатурированном виде сохраняются все иммунодоминантные антигены, способные индуцировать в макроорганизме системный и мукозальный иммунные ответы. ЛПС, связанные с внешней мембраной клеточной оболочки, обладают минимальной токсичностью по сравнению с химически очищенными препаратами ЛПС и поэтому не являются лимитирую-

щими для использования бактериальных теней в качестве вакцин [45].

Препараты BG получают путем передачи в целевые клетки грамотрицательных патогенов плазмидных ДНК с генами E бактериофага PhiX174 и с генами термостабильной нуклеазы *Staphylococcus aureus* (SNUC), активность которых в клетках-реципиентах индуцируются либо температурой, либо химическими препаратами. Ген E кодирует мембранный протеин из 91 аминокислоты, который способен внедряться во внешнюю и внутреннюю мембраны бактериальной клетки и формировать в клеточной стенке специфические туннели (поры), через которые происходит выход содержимого клетки. В свою очередь, SNUC в комбинации с белком E полностью разрушает одно- и двухцепочные нуклеотидные последовательности бактерий и вирусов. Таким образом, BG грамотрицательных патогенов не могут являться источником генов вирулентности и антибиотикорезистентности для других видов кишечных бактерий при пероральном введении их в макроорганизм. Следует также отметить, что BG, рассматриваемые в качестве возможных вакцин, не требуют для повышения иммуногенного ответа дополнительного введения адъювантов, поскольку сами обладают мощными адъювантными свойствами [45]. Следующим важным свойством BG, которое привлекает внимание исследователей, является их способность быть носителями (векторами) гетерологичных протективных антигенов, которые экспрессируются на поверхности клеточной стенки еще живой бактерии при передаче ей соответствующих генетических детерминант. Сегодня клеточные оболочки (тени), в том числе несущие гетерологичные антигены, получены для многих важных для человека и животных патогенов: *Francisella tularensis*, *Brucella melitensis*, энтеропатогенных и энтерогеморрагических *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Mannheimia haemolytica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* и др. [46].

Первые исследования, посвященные разработке вакцины против ЕНЕС на основе BG, были опубликованы в 2005 г. Maур et al. [46]. Работа была выполнена на штамме *E. coli* O157:H7, продуцирующим шига-токсины Stx1 и Stx2. Для получения BG авторы использовали литический протеин E бактериофага PhiX174, а для деградации ДНК штамма – нуклеазу SNUC. Индукцию экспрессии гена E в культуре клеток *E. coli* O157:H7, выращенных в ферментере, осуществляли повышением температуры от 28 до 42°C, экспрессию гена нуклеазы SNUC – добавлением изопропил-β-D-тиогалактопиринозида (IPTG). Полученные клеточные оболочки штамма *E. coli* O157:H7 не содержали каких-либо детерминант патогенности и антибиотикорезистентности. Для оценки протективных и иммуногенных свойств BG опытных мышей иммунизировали одно-двукратно интрагастрально в дозе 1 мг/мышь лиофильно высушенных BG, что соответствовало 4,8 × 10<sup>9</sup> единиц BG. На 55-й день после иммунизации мыши были заражены гетерологичным штаммом *E. coli* O157:H7 в дозе 1 × 10<sup>8</sup> КОЕ. Как показали результаты эксперимента, мыши, иммунизированные BG однократно, после интрагастрального заражения выжили в 86% случаев, при двукратной иммунизации – в 93,9% случаях, в то время как в контрольных (неиммунизированных) группах живыми оста-

лись 26,7 и 30% животных соответственно. Через 7 дней после заражения в фекалиях выживших иммунизированных животных *E. coli* O157:H7 не обнаруживали. BG *E. coli* O157:H7 индуцировали у животных образование специфических сывороточных IgG, в то время как sIgG определяли и в сыворотке крови, и в содержимом кишечника. У иммунизированных мышей был также отмечен повышенный уровень секреции клетками селезенки γ-интерферона. Таким образом, интрагастральная иммунизация мышей препаратом BG *E. coli* O157:H7 индуцировала у животных системный и местный мукозальный иммунные ответы, которые обеспечивали защиту животных от перорального заражения их клетками штамма *E. coli* O157:H7.

В другой работе Maур et al. [47] были испытаны иммуногенные и протективные свойства BG вирулентного штамма *E. coli* O157:H7 при ректальном способе введения антигена. Как показали результаты эксперимента, однократная доза вакцины (1 мг) без применения адъюванта индуцировала у животных специфический системный и мукозальный иммунные ответы: высокие титры IgG (1:2000 и выше) были обнаружены в сыворотке крови, но не в кишечном содержимом; в то же время мукозальные sIgA обнаруживали в сыворотке крови и содержимом кишечника в титрах 1:80 и 1:60 соответственно. Было показано также, что ректальная вакцинация даже одной дозой BG индуцировала у животных 100%-ю защиту от перорального заражения двумя летальными дозами LD<sub>50</sub> гетерологичного штамма *E. coli* O157:H7. В заключение авторы высказывают предположение, что ректальный способ введения вакцины на основе BG может быть эффективным и безопасным и при иммунизации детей против ЕНЕС-инфекции; не исключено, что эффективной может оказаться даже однократная ректальная вакцинация.

Иммуногенные и протективные свойства BG *E. coli* O157:H7 были изучены и в экспериментах на телятах [48]. Животных иммунизировали препаратом BG подкожно в дозе 10 мг дважды с промежутком между инъекциями в 21 день. Спустя 2 нед. после вакцинации в сыворотке крови животных обнаруживали высокие титры специфических анти-BG IgG-антител; однако IgG-антитела отсутствовали в слюне и фекалиях. Мукозальные специфические sIgA в низких титрах детектировали в слюне иммунизированных телят, в сыворотке крови и в фекалиях их не выявляли. Несмотря на то, что в кишечном содержимом и в сыворотке крови sIgA не были обнаружены, иммунизированные животные, после их перорального заражения, по сравнению с контрольными (неиммунизированными) были лучше защищены от колонизации штаммом *E. coli* O157:H7: продолжительность выделения патогена у иммунизированных телят была существенно короче, чем у контрольных животных (11 дней против 15 дней); концентрация клеток *E. coli* O157:H7 в содержимом фекалий иммунизированных телят была ниже более чем на 50% по сравнению с контрольными животными. Описанный феномен частичной защиты телят от колонизации штаммом *E. coli* O157:H7 авторы объясняют низким содержанием специфических мукозальных sIgA, которые не удалось детектировать в данном эксперименте. Авторы, на основании полученных данных, предложили гипотезу, по которой наличие в слюне анти-BG-антител может свидетельствовать о



присутствии их на слизистой кишечника, что и обеспечивает защиту животных от ЕНЕС.

Cai et al. [20] испытали иммуногенные и протективные свойства кандидатной рекомбинантной вакцины rSOBGs, полученной на основе BG клеток *E. coli* O157:H7 EDL933, во внешнюю мембрану которых были встроены протеины нетоксичной субъединицы A2 и субъединицы B1 шига-токсинов Stx2 и Stx1 соответственно. Препаратами rSOBGs дважды интрагастрально иммунизировали мышей BALB/c в дозе 0,1 мг/мышь, что соответствовало  $1 \times 10^8$  КОЕ живого микроба. Иммунизированных мышей заражали интрагастрально или интраперитонеально различными дозами клеток гомологичного и гетерологичного штаммов *E. coli* O157:H7. Показано, что рекомбинантная вакцина rSOBGs индуцировала у иммунизированных животных образование в сыворотке крови IgG/sIgA Stx-специфических антител, а также строго специфических IgG/sIgA-антител к интимину, основному адгезину ЕНЕС. Группы иммунизированных rSOBGs вакциной животных после их перорального заражения живыми клетками *E. coli* O157:H7 или лизатами *E. coli* O157:H7 были лучше защищены, чем группа животных, иммунизированная препаратом OBGs без протеина StxA-StxB: от дозы 500 LD<sub>50</sub> живых клеток *E. coli* O157:H7 в первом случае выжило 52% животных от числа зараженных, во втором – только 12%. При заражении иммунизированных вакциной rSOBGs животных двумя дозами LD<sub>50</sub> живых клеток и 5 дозами LD<sub>50</sub> лизированных клеток *E. coli* O157:H7 выживаемость составила 73,3%, что гораздо больше процента выживших мышей, иммунизированных OBGs. В опытах *in vitro* сыворотка мышей, иммунизированных rSOBGs, обладала нейтрализующей активностью против шига-токсинов *E. coli* O157:H7. Кроме того, результаты гистологических исследований показали, что иммунизация животных rSOBGs снижает или ингибирует повреждающее действие адгезии патогена (A/E-эффекта) и его шига-токсинов на организм животных. Следовательно, кандидатная рекомбинантная вакцина rSOBGs индуцировала у животных как антиоксидантную, так и антиадгезивную защиту от ЕНЕС-инфекции. Авторы считают, что сконструированная ими кандидатная вакцина rSOBGs может быть эффективной и для защиты детей от ЕНЕС.

Таким образом, клеточные оболочки (тени) вирулентных штаммов ЕНЕС, а также оболочки клеток с дополнительно интегрированными в них рекомбинантными протективными антигенами сегодня могут рассматриваться в качестве перспективной иммунодоминантной конструкции при создании вакцин против STEC/ЕНЕС для перорального и ректального их применения.

### Липополисахаридные вакцины

Липополисахариды грамотрицательных бактерий являются гетерогенными молекулами, состоящими из трех доменов: липида А, определяющего эндотоксичность молекулы ЛПС, О-специфического ПС, определяющего бактериальную сероспецифичность, и связующего их олигосахаридную кору. ЛПС *E. coli* O157:H7, наряду с шига-токсинами, являются важным фактором патогенности возбудителя, участвуя в индукции и патогенезе ГК и ГУС [49, 50]. В многочисленных исследованиях на животных было установлено,

что только при совместном введении ЛПС и Stx2 наблюдаются клинические симптомы ГУС [51, 52]. Для ЛПС доказана также роль в адгезии патогенов: в опытах на различных видах животных было показано, что дефектные по ЛПС штаммы *E. coli* O157:H7 имели сниженную адгезивную и колонизационную активности [53], а антитела против ЛПС на 95% предотвращали адгезию гомологичных штаммов *E. coli* серогрупп O111 и O157 к клеткам эпителия кишечника человека *in vitro* [54].

Важное значение ЛПС в патогенезе ГК и ГУС – веское основание для изучения этих макромолекул в качестве целевых протективных антигенов при разработке липополисахаридных или субъединичных вакцин против ГК и ГУС. Следует отметить, что у больных и переболевших ГК и ГУС людей, включая детей, в сыворотке крови обнаруживают высокие титры специфических антител против ЛПС STEC-возбудителей [55, 56], что свидетельствует о высокой антигенной активности этого клеточного компонента.

В 1994 г. Konadu et al. [57], основываясь на положительном опыте по созданию липополисахаридных вакцин против *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, провели эксперименты по иммунизации мышей BALB/c конъюгатами полисахарида (О-антигена) *E. coli* O157:H7 с белками-носителями: бычьим сывороточным альбумином, инактивированным экзотоксином *Clostridium welchii* и рекомбинантным экзопротеином *Pseudomonas aeruginosa*. Было показано, что подкожная иммунизация мышей конъюгатами ПС индуцировала у них образование специфических IgG с бактерицидной активностью против *E. coli* O157:H7. Полученные результаты позволили авторам заключить, что сывороточные IgG против ЛПС способны трансудироваться из крови в кишечник и инактивировать в нем инокулом *E. coli* O157:H7, тем самым предотвращая развитие инфекции.

Высказанное положение нашло дальнейшее развитие в работе Robins et al. [58] и представлено в виде гипотезы, по которой антиполисахаридные IgG являются главным иммуноглобулиновым компонентом секреторных жидкостей организма, включая его кишечник. Эти IgG, по мнению авторов, и обеспечивают инактивацию инокулома патогена на эпителиальной поверхности кишечника. О трансудации специфических IgG из плазмы крови и последующей адсорбции их на слизистой кишечника было сообщено в 2003 г. в работе Meckelein et al. [59]. Важная защитная роль антител против STEC продемонстрирована Paton et al. [54], которые показали, что поликлональные антитела против ЛПС O111 и O157 на 95% блокировали адгезию гомологичных штаммов *E. coli* O111:H- и O157:H- к эпителиальным клеткам кишечника человека.

В 1998 г. Konadu et al. [60] и в 2006 г. Ahmed et al. [61] провели успешные испытания вакцины, приготовленной на основе конъюгата полисахарида O157 и рекомбинантного экзопротеина *P. aeruginosa*, на взрослых волонтерах и 2–5-летних детях. И в том, и в другом случаях вакцина была безопасной и индуцировала у привитых уже в первые недели после вакцинации высокие титры специфических сывороточных IgG, обладающих бактерицидной активностью против *E. coli* O157:H7; специфические IgG-антитела у вакцинированных сохранялись на протяжении нескольких месяцев.

К сожалению, дальнейшая информация о судьбе разработанных этими коллективами вакцин отсутствует.

В работах аргентинских исследователей [62] также представлены данные, свидетельствующие о целесообразности использования специфических O111-полисахаридов (O-антигена) в качестве целевого антигена для конструирования вакцины против разных патотипов *E. coli* серогруппы O111 – энтеропатогенных (EPEC), энтерогеморрагических (EHEC) и энтероагрегативных (EAEC), различающихся по антигенной структуре и набору факторов патогенности.

Обращают на себя внимание результаты исследований Ademokoya et al. [63], которые показали, что интрагастральная и парентеральная иммунизация белых крыс препаратами ЛПС *E. coli* O157:H7 в одинаковой степени эффективно снижали концентрацию патогена в печени, селезенке, подвздошной кишке и фекалиях иммунных животных и в 70% случаев защищала их от перорального заражения смертельной дозой *E. coli* O157:H7 при 100%-й гибели контрольных (невакцинированных) животных.

В то же время Conlan et al. [64, 65] в своих исследованиях не получили доказательств, что образовавшиеся после подкожной иммунизации мышей BALB/c конъюгатом полисахарида ЛПС *E. coli* O157:H7 специфические анти-O157-антитела могут трансудироваться из кровяного русла на слизистую кишечника: ни разу IgG против O157 не были обнаружены в фекалиях иммунизированных животных. Не детектировались IgG против антигена O157 и в фекалиях мышей, которым внутривентриально вводили моноклональные IgG в дозе 1 мг/мышь. Внутривентриальная иммунизация не защищала мышей от колонизации *E. coli* O157:H7 после их интрагастрального заражения. Авторы работы считают, что парентеральная иммунизация не является подходящей для борьбы с кишечной инфекцией *E. coli* O157:H7, однако не исключают, что после оптимизации такой способ иммунизации может оказаться вполне эффективным.

### ДНК-вакцины

Конструирование ДНК-вакцин – одно из современных научных направлений, используемых для создания средств специфической защиты человека от инфекционных заболеваний. ДНК-вакцины имеют ряд преимуществ перед другими вакцинными препаратами. Они, как полагают, наиболее безопасны для человека, поскольку в их составе отсутствуют бактериальные клетки или какие-либо их компоненты, способные отрицательно повлиять на макроорганизм. ДНК-вакцины содержат только известную ДНК и относительно просты в производстве. Плазмидные ДНК, используемые в вакцине, очень стабильны и устойчивы к экстремальным температурам и другим внешним факторам, что важно для хранения и транспортировки вакцинных препаратов. Особенностью ДНК-вакцин является их способность индуцировать иммунный ответ на ранней стадии жизни человека или животных, активируя созревание иммунной системы макроорганизма. Важно отметить также, что иммунный ответ на «генетическую вакцину» может быть повышен путем одновременного их введения с плазмидными ДНК, экспрессирующими различные цитокины, другие факторы, стимулирующие иммунный ответ, например гранулоцитмакрофагальный колониестимулирующий фактор, фактор роста и др. [66–68].

ДНК-вакцины обычно представлены бактериальными плазмидами, несущими в своем составе эукариотические гены, обеспечивающие экспрессию протективных антигенов целевого патогена в эукариотической клетке.

В первой работе, посвященной получению ДНК-вакцины против ГУС, вызываемого STEC-штаммами, Carozzo A. et al. [69] сконструировали две эукариотические плазмиды, в одной из которых присутствовали гены В-субъединицы шига-токсина Stx2 (Stx2B), в другой – гены Stx2B вместе с deletированным геном Stx2A, детерминирующим синтез нетоксичного протеина А-субъединицы. Полученной ДНК-вакциной иммунизировали внутримышечно новорожденных и взрослых мышей BALB/c; отдельным группам животных одновременно с ДНК-вакциной вводили и плазмидную ДНК с генами фактора роста (pGM-CSF), способным повышать у животных гуморальный ответ. Результаты эксперимента показали, что обе «генетические вакцины», введенные мышам, индуцировали у взрослых и новорожденных животных анти-токсический иммунитет: мыши были защищены от заражения их нативным шига-токсином Stx2. Нейтрализующая активность сыворотки крови иммунизированных животных была продемонстрирована также в опыте *in vitro* на культуре клеток Vero.

Аналогичная описанной выше работа была выполнена Bentancor H. et al. [70], которые клонировали полный ген субъединицы В и deletированный ген субъединицы А2 шига-токсина Stx2 в составе эукариотической плазмиды pGM-CSF, кодирующей мышинный гранулоцит-макрофагальный колониестимулирующий фактор. Полученная ДНК-вакцина индуцировала в организме мышей образование специфических сывороточных анти-Stx2-антител IgG. В опытах *in vivo* и *in vitro* была продемонстрирована анти-токсическая активность вакцины: иммунизированные животные были защищены от заражения их шига-токсином Stx2, а сыворотка крови иммунных мышей обладала нейтрализующей шига-токсин Stx2 активностью и защищала клетки Vero от гибели.

Иранские исследователи [68] встроили в эукариотическую плазмиду три гена, кодирующие синтез протективных антигенов EHEC: секреторного протеина EspA, интимина Eae и Tir-белка. При иммунизации мышей полученной ДНК-вакциной в сыворотке крови животных обнаруживали специфические антитела ко всем трем антигенам; мыши, иммунизированные этой вакциной, были защищены от перорального заражения их смертельными дозами штамма *E. coli* O157:H7, то есть ДНК-вакцина в данном случае обеспечивала животным ярко выраженную антиколониционную защиту.

В последнее время благодаря биоинформационному анализу в геномах штаммов *E. coli* O157:H7 были выявлены новые иммунодоминантные протективные антигены, которые исследователи с успехом использовали при конструировании ДНК-вакцины против EHEC-штаммов [18]. Так, например, идентифицированный с помощью информационного анализа ген *eseC*, кодирующий секреторный протеин T3SS-системы, будучи встроен в эукариотическую плазмиду, при интраназальной иммунизации мышей BALB/c индуцировал у животных образование специфических сывороточных IgG и мукозальных sIgA в кишечном тракте. У иммунизированных ДНК-вакциной мышей после их перорального заражения



штаммом *E. coli* O157:H7 отмечали существенное снижение количества клеток патогена в фекалиях, содержимом толстого кишечника и слепой кишки по сравнению с контрольными (невакцинированными) животными [18, 71]. При конструировании ДНК-вакцин были использованы и другие новые идентифицированные антигены ЕНЕС, показавшие при иммунизации животных хороший иммуногенный и протективный эффекты.

Таким образом, ДНК-вакцины, содержащие в своем составе рекомбинантные гены шига-токсинов и антигенов адгезии ЕНЕС-штаммов, при внутримышечной и интраназальной аппликации их лабораторным животным способны индуцировать у них системный антиоксидантный и мукозальный интестинальный антиколонизационный иммунные ответы и защитить животных от ЕНЕС-инфекции.

### Нановакцины

Создание вакцин против шига-токсин-продуцирующих *E. coli* на основе наночастиц, носителей протективных антигенов – одно из новейших и многообещающих научных направлений в данной области исследований. Для конструирования кандидатных нановакцин чаще всего используют два вида носителей: наночастицы природного полимера полисахарида хитозана и наночастицы неорганического золота.

Наночастицы хитозана (величиной 100–500 нм) отличаются высокой биосовместимостью с органами и клетками макроорганизма; они прочно связывают и удерживают на своей поверхности антигены белковой природы и защищают их от протеазной активности ферментов. Наночастицы хитозана хорошо прилипают к эпителиальным клеткам слизистых носоглотки и кишечного тракта и свободно проникают в ткани и клетки организма. Они нетоксичны, будучи введенные в организм, постепенно подвергаются биодеградации и элиминации [17, 72, 73]. Наночастицы хитозана обладают еще одним интересным свойством: для них характерна определенная антибактериальная активность, в том числе против *E. coli*. При конструировании вакцин наночастицы хитозана выполняют не только функцию носителя целевых антигенов, но и одновременно являются хорошими адъювантами: они существенно увеличивают гуморальный и клеточный иммунные ответы на вводимые в макроорганизм антигены. Аппликация нановакцин на основе хитозана может осуществляться различными способами: интраназально, перорально и парентерально (подкожно и внутримышечно). Важно отметить, что при пероральной доставке нановакцины способны индуцировать у животных образование мукозальных антител sIgA, обеспечивающих основную защиту кишечного тракта от колонизации его патогенами. Установлено также, что наночастицы хитозана способны пролонгировать иммуногенное действие мобилизованных на них антигенов. Еще одно преимущество «хитозановых нановакцин» – это сравнительно дешевый и простой способ их получения [73].

Наночастицы золота так же, как и наночастицы хитозана, прочно удерживают различные биологические макромолекулы на своей поверхности, в том числе иммунодоминантные антигены бактерий (рис. 4). Наночастицы золота нетоксичны, однако, в отличие от наночастиц хитозана, не обладают адъювантными свойствами. Их использование в качестве носителей протективных антигенов, как это будет по-

казано ниже, позволяет получать достаточно напряженный иммунный ответ и на антигены STEC.

В 2016 г. Doavi et al. [74] сообщили об успешном испытании вакцины против ЕНЕС штамма *E. coli* O157:H7, сконструированной на основе наночастиц хитозана с иммобилизованными на них молекулами антигена – трехвалентного рекомбинантного слитного белка из Eae-, Tir- и EspA-протеинов. Мышей линии BALB/c иммунизировали приготовленной нановакциной трехкратно интраназально, используя для этого электроспрей. Однократная доза антигена на мышью составляла 20 мкг, на весь цикл иммунизации – 60 мкг. Отдельную группу мышей иммунизировали интраперитонеально. Специфические титры IgG и sIgA определяли с помощью ИФА в сыворотке крови, фекалиях и смывах глаз опытных животных. Было показано, что трехкратная интраназальная иммунизация мышей индуцировала у них образование высоких титров специфических IgG и sIgA против всех трех антигенов, которые обнаруживали как в сыворотке крови, так и в содержимом кишечника; в незначительных количествах sIgA-антитела обнаруживали также в смывах глаз. При интраперитонеальном введении нановакцины секреторные sIgA в фекалиях не определялись.

У иммунизированных интраназально нановакциной мышей после их заражения клетками *E. coli* O157:H7 концентрация патогена на протяжении всего эксперимента в фекалиях животных была низкой, а на 8–9-й день после заражения возбудитель из фекалий уже не выделялся. Напротив, у контрольных (неиммунизированных) животных культуру *E. coli* O157:H7 из фекалий высевали в высокой концентрации (~1 × 10<sup>8</sup> КОЕ/г) на протяжении всех трех недель наблюдения. Авторы работы делают вывод, что интраназальный способ введения нановакцины на основе хитозана является весьма эффективным и может рассматриваться в качестве альтернативного другим методам аппликации нановакцин против ЕНЕС-инфекции.

Khanifer et al. [17] испытали эффективность нановакцины, сконструированной в выше рассмотренной работе Doavi et al. [74], при оральной, орально-интраперитонеальной и подкожной ее доставке мышам BALB/c. Животных иммунизировали четырехкратно, доза антигена при оральном однократном введении составляла 10 мкг/мышью, на весь цикл иммунизации – 40 мкг. При интраперитонеальной и подкожной иммунизации доза антигена на весь цикл составляла 10 мкг. Как показали результаты проведенного эксперимента, только оральная и орально-интраперитоне-

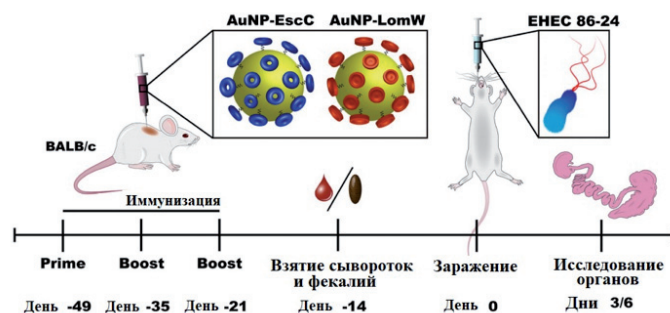


Рис. 4. Схема вакцинации мышей линии BALB/c и заражения штаммом ЕНЕС O157:H7, с последующим забором крови, фекалий и органов [76].

альная (трехкратное оральное + однократное интраперитонеальное введение антигена) вакцинация индуцировала у животных системный и мукозальный иммунные ответы. Высокие титры специфических IgG-антител против интимина, Tir- и EspA-протеинов были обнаружены только в сыворотке крови мышей. Напротив, мукозальные sIgA-антитела определялись как в сыворотке крови, так и в фекалиях иммунизированных животных. При интраперитонеальном и подкожном введении нановакцины у животных выявляли только сывороточные IgG, мукозальные sIgA в сыворотке крови иммунизированных животных отсутствовали. В опыте на культуре клеток Caco-2 было показано, что обработанные иммунной сывороткой клетки *E. coli* O157:H7 резко теряли свои адгезивные свойства, а животные, иммунизированные нановакциной орально или орально-интраперитонеально, были маловосприимчивы к пероральному заражению живой культурой *E. coli* O157:H7: концентрация патогена в кишечном содержимом у них была существенно ниже, чем у контрольных (неиммунизированных) животных, что свидетельствует о формировании у вакцинированных животных местного антиколонизационного мукозального иммунитета. На основании полученных данных Khanifer et al. делают заключение, что вакцина на основе наночастиц хитозана с иммобилизованным на них слитным белком (интимин + белки Tir и EspA) способна защитить животных от EHEC-штамма *E. coli* O157:H7. После всесторонней оценки преимуществ и рисков такой нановакцины она, по мнению авторов, может быть допущена до клинических испытаний.

Тот же коллектив иранских исследователей (Khanifer et al.) в 2019 г. [75] приготовил нановакцину на основе частиц хитозана, одна часть которых была нагружена слитным трипептидом (интимин + белки Tir и EspA), другая – рекомбинантным белком В-субъединицы шига-токсина Stx2. Мышей иммунизировали, как и в выше описанной статье, орально, орально-интраперитонеально и подкожно. Оральная однократная иммунизирующая доза антигена включала 100 мкг/мышь рекомбинантного трипептида и 100 мкг рекомбинантного пептида Stx2B. При интраперитонеальном и подкожном введении доза антигена составляла 15 + 15 мкг/мышь. Как показали исследования, оральная и орально-интраперитонеальная иммунизация мышей нановакциной индуцировала у животных образование высоких титров специфических sIgA-антител против слитного трипептида и протеина Stx2B, которые обнаруживали как в сыворотке крови, так и в содержимом кишечника животных. В значительно меньших титрах sIgA-антитела были выявлены в сыворотке крови и фекалиях у мышей, иммунизированных нановакциной подкожно. И наоборот, IgG в больших титрах присутствовали в сыворотке крови мышей, иммунизированных нановакциной подкожно, и в значительно меньшем – при иммунизации оральным путем. В опытах на клетках Vero было продемонстрировано, что сыворотка иммунизированных животных обладала нейтрализующей активностью в отношении токсина Stx2. Зараженные смертельной дозой шига-токсина Stx2 иммунизированные нановакциной мыши в 66% случаев остались живыми, в то время как все контрольные животные погибли. Нановакцина также существенно снижала и выделение *E. coli* O157:H7 с фекалиями у орально иммунизированных мышей после их перораль-

ного заражения. Таким образом, в работе было продемонстрировано, что нановакцина, полученная на основе частиц хитозана и иммунодоминантных антигенов EHEC, способна при пероральной иммунизации защитить животных как от шига-токсинов *E. coli*, так и от колонизации их кишечного тракта патогеном *E. coli* O157:H7.

Sanchez-Villamil et al. [76] разработали вакцину против *E. coli* O157:H7 на основе наночастиц золота, на которых были мобилизованы два пептида: EspC и LomW, обнаруженные у разных патотипов *E. coli* с помощью биоинформационного анализа их геномов. EspC – секреторный белок T3SS-системы, величиной 56 кДа, располагается на внешней мембране клетки и участвует в адгезии патогенов. Он присутствует не только в клетках EHEC, но и в клетках EPEC, вызывающих тяжелую диарею у детей. Антиген LomW (28 кДа) кодируется генами профага *E. coli* O157:H7, он локализован на внешней мембране клетки, как и антиген EspC. Помимо штаммов EHEC, этот антиген обнаружен у штаммов EAEC, также играющих важную роль в этиологии диарейных заболеваний. Антигены EspC и LomW хорошо инкорпорировались и ковалентно связывались с наночастицами золота (AuNPs), образуя стабильные и, как оказалось, иммуногенные структуры-нановакцины: AuNPEspC и AuNPLomW. Указанными вакцинами и их комбинацией вместе с адъювантами (гидроокись алюминия и детоксицированный холерный токсин) трехкратно иммунизировали мышей BALB/c подкожно. Суммарная доза антигенов на весь цикл иммунизации составила 10 мкг/мышь. Как показали результаты эксперимента, во всех трех группах животных, иммунизированных нановакцинами AuNP-EspC, AuNPLomW и AuNP-EspC+AuNP-LomW, на 3-и и 6-е сутки после интрагастрального заражения их штаммом *E. coli* O157:H7 в образцах содержимого толстого кишечника отмечали резкое снижение концентрации патогена по сравнению с контрольными (неиммунизированными) животными, что свидетельствовало о формировании у иммунизированных мышей мукозального антиколонизационного иммунитета. И действительно, у всех трех групп иммунизированных мышей обнаруживали высокие титры специфических анти-EspC- и анти-LomW-антител IgG и sIgA как в сыворотке крови, так и в содержимом кишечника животных. То есть, в данной работе получены уникальные данные: подкожная аппликация вакцины на основе наночастиц золота индуцирует у животных не только системный, но и мукозальный иммунные ответы, которые подавляют адгезивную и колонизационную активность патогена *E. coli* O157:H7. Более того, в экспериментах *in vitro* на культуре клеток кишечного эпителия человека (IECs, Caco-2) было продемонстрировано, что сыворотка крови мышей, иммунизированных нановакциной AuNP-EspC, в 98% случаев ингибировала не только адгезию EHEC *E. coli* O157:H7, но и клеток EPEC *E. coli* O127:H6, поскольку антиген EspC присутствует, как уже упоминалось выше, и у EHEC-, и у EPEC-штаммов. В то же время сыворотка крови животных, иммунизированных нановакциной AuNPLomW, ингибировала адгезию к клеткам IECs и Caco-2 и штамма EHEC *E. coli* O157:H7, и гибридного штамма EAEC/EHEC *E. coli* O104:H4. Сыворотка от животных, иммунизированных комбинацией AuNPEspC + AuNPLomW, ингибировала адгезию штаммов трех патотипов: EHEC, EPEC и EAEC/EHEC. Заклучая свою

работу, авторы предлагают использовать разработанную ими методологию получения нановакцины в качестве универсальной платформы для создания нановакцин для профилактики других кишечных инфекций.

В последние 10 лет для разработки вакцин против грам-отрицательных бактерий-патогенов активно используют везикулы их внешних мембран (OMV), образующихся при обработке клеток детергентами. Образовавшиеся везикулы – это наночастицы величиной 0,28–99 нм, содержащие в своем составе многие нативные антигены, включая различные токсины, обладающие иммуномодулирующими свойствами. Так, в работе Fingerman et al. [77] было продемонстрировано, что полученные из клеток вирулентного штамма *E. coli* O157:H7 обработкой диоксихелатом натрия и инактивированные глутаральдегидом везикулы внешней мембраны патогена обладали высокими протективными и иммуногенными свойствами. Мыши, вакцинированные OMV*i* подкожно дважды в дозе 10 мкг вместе с адьювантом гидроксида алюминия, в 100% случаев были защищены от смертельных доз шига-токсинов Stx1 и Stx2 и других токсических факторов *E. coli* O157:H7. Эти же препараты OMV*i* индуцировали у телят образование высоких титров сывороточных IgG. Дальнейшие исследования OMV*i* энтеробактерий позволят оценить, насколько перспективно использовать их для создания вакцинных препаратов против STEC-инфекции.

#### **Вакцины, создаваемые на основе методов обратной вакцинологии**

Анализ представленного выше материала показывает, что для разработки кандидатных вакцин против STEC-инфекции исследователи чаще всего используют весьма ограниченное число хорошо изученных протективных антигенов EHEC: белки EspA, EspB, Tir, интимин, а также нетоксичные дериваты шига-токсинов Stx1 и Stx2. Поэтому вполне логичными являются проводимые в настоящее время исследования по поиску новых иммунопротективных антигенов, способных индуцировать у человека и животных системный и мукозальный иммунные ответы и обеспечить эффективную защиту их от STEC-штаммов.

Одним из научных подходов, используемых в последнее время исследователями для поиска новых протективных антигенов для конструирования вакцины против STEC, являются методы обратной вакцинологии [17]. Суть этого подхода – идентификация протективных антигенов *in silico* путем сравнительного биоинформационного анализа геномов целевых патогенных бактерий между собой или между патогенными и непатогенными штаммами одного вида бактерий. Примером использования методов обратной вакцинологии при поиске новых антигенов EHEC является работа лаборатории Torres [17, 71]. Используя базы данных, авторы сравнили геномы двух EHEC-штаммов *E. coli* O157:H7 и двух непатогенных штаммов *E. coli* K12 и HS. В результате проведенного анализа геномов указанных четырех штаммов для последующего исследования было отобрано 65 генов *E. coli* O157:H7, отсутствующих у непатогенных эшерихий. Эти гены кодировали протеины, предположительно секретируемые клеткой во внешнюю среду или локализованные на ее внешней мембране. Все 65 гипотетических про-

теинов были подвергнуты иммуноинформационному анализу: у них были изучены физико-химические свойства, адгезивность, антигенность и наличие предполагаемых иммунодоминантных эпитопов. На основании полученных данных протеины были категорированы на три потенциально перспективные группы: протеины-кандидаты с высоким, средним и низким приоритетом. Далее из каждой названной группы было выбрано по три гена, которые были клонированы в плазмиде PAX1. ДНК полученных плазмид с генами предполагаемых протеинов использовали в качестве ДНК-вакцин, иммуногенные и протективные свойства которых были испытаны на мышах BALB/c. Животных вакцинировали плазмидными ДНК интраназально вместе с адьювантом – ДНК субъединицы В холерного токсина. Результаты эксперимента показали, что ДНК всех трех генов из группы высокого приоритета, кодирующих соответственно Lom-подобный протеин (pVAX3), гипотетический протеин субъединицы пилина (pVAX12) и фрагмент структурного протеина EscC системы T3SS (pVAXSb.2), индуцировали у животных продукцию специфических сывороточных IgG- и мукозальных sIgA-антител, а также повышенное количество Th2-зависимых цитокинов. За счет мукозальных sIgA у вакцинированных мышей после их перорального заражения клетками *E. coli* O157:H7 была существенно снижена концентрация патогена в кишечном содержимом по сравнению с контрольными (невакцинированными) животными. Наибольшая антиколониционная активность была отмечена у ДНК вакцины pVAXSb.2, детерминирующей синтез фрагмента структурного протеина EscC системы T3SS. Таким образом, с помощью биоинформационного анализа авторам удалось идентифицировать три новых протективных антигена у EHEC-штаммов *E. coli* O157:H7 – EscC, структурный белок системы T3SS, Lom-подобный протеин и протеин субъединицы пилина.

Принципы обратной вакцинологии в комбинации с протеомикой использованы и в работе Lo et al. [78]. Цель работы – поиск новых протективных антигенов *E. coli*, способных обеспечить перекрестную защиту человека и животных от инфекций, вызываемых разными патотипами *E. coli*. Используя биоинформационные методы, авторы провели сравнительный анализ 1700 геномов *E. coli* (62 полных и 1638 частично секвенированных). Исследованные штаммы были выделены в разные годы в различных географических зонах от людей и животных при различных патологиях: бактериемии, сепсисе, диарее, ГУС, маститах, менингитах, перитонитах, омфалитах, при инфекциях респираторного и уринарного трактов. Поиск генов, детерминирующих протективные антигены, осуществляли среди консервативных жизненно важных для бактериальной клетки генов, присутствующих более чем у 99% исследованных *E. coli*. В результате проведенного анализа были отобраны 4 гена, кодирующие протеины, предположительно локализованные на внешней мембране клетки. Все четыре гена были клонированы, а у детерминируемых ими протеинов были испытаны иммуногенные и протективные свойства. Оказалось, что среди четырех протеинов только протеин YneE индуцировал у вакцинированных мышей высокие уровни IgG и защиту животных от системной инфекции, вызванной UPEC-штаммом. Было установлено, что ген, детерминирующий протеин YneE, присутствует у



штаммов *E. coli* патотипов ETEC, EHEC, EAEC и UPEC. Этот белок был обнаружен в супернатантах культуральной жидкости *E. coli* всех четырех патотипов. Учитывая высокие иммуногенные и протективные свойства УпеЕ-протеина, его высокую консервативность, растворимость, а также факты экспрессии его в процессе инфекции у человека (по обнаружению специфических антител), авторы делают заключение, что протеин УпеЕ полностью отвечает требованиям кандидатных протективных антигенов и может использоваться при конструировании мультивалентных (против многих патотипов *E. coli*, включая EHEC) вакцин.

Краткий анализ представленных выше двух работ свидетельствует о больших перспективах методов обратной вакцинологии при разработке эффективных вакцин против различных бактериальных кишечных патогенов, включая шига-токсин продуцирующие штаммы *E. coli*.

### Заключение

В системе мер борьбы со STEC-инфекцией человека (ГК и ГУС) важная, если не решающая роль отводится разработке средств специфической профилактики – вакцинам, поскольку этиотропное лечение данной болезни противопоказано. Как следует из представленного в обзоре материала, в настоящее время исследователи разрабатывают различные вакцины: корпускулярные убитые, живые аттенуированные, вакцины на основе клеточных оболочек (тений), липополисахаридные вакцины, ДНК-вакцины и нановакцины. Субъединичные рекомбинантные вакцины будут рассмотрены во второй части обзора.

Все разрабатываемые кандидатные вакцины, по заключению их авторов, способны с той или иной степенью эффективности защитить лабораторных и сельскохозяйственных животных от STEC-штаммов. В такой ситуации исключительно важным представляется выбор типа вакцины, разрабатываемой для человека. Такой выбор, на наш взгляд, должен учитывать следующие факторы: для какой категории населения будет создаваться вакцина; какой вид адаптивного иммунитета предполагается получить у вакцинированного: системный, интестинальный мукозальный или колостральный; какой способ и число аппликаций вакцины будет применяться. Поскольку этиологическая структура ГК и ассоциированного с ним ГУС весьма сложная (инфекцию могут вызвать STEC-штаммы многих серогрупп), важно определиться, против каких возбудителей создается вакцина: или против небольшого числа доминирующих в том или ином регионе STEC, включая серотип *E. coli* O157:H7, или против любого STEC-штамма. Не последнюю роль в выборе типа вакцины играют сложность и стоимость биотехнологии ее производства. Наши приоритеты и наш взгляд на выбор типа вакцины против ГК и ГУС человека будут изложены во второй части обзора.

### Информация о финансировании

Исследование выполнено в рамках гранта Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2019-1671 от 31.10.2019 г.).

### Financial support

The study was carried out within the framework of a grant from the Ministry of Education and Science of Russia (Agreement No. 075-15-2019-1671 of October 31, 2019).

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

### Литература/References

1. Majowicz SE, Scallan E, Jones-Bitton A, Sargeant JM, Stapleton J, Angulo FJ, et al. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathog Dis*. 2014;11(6):447-455. DOI: 10.1089/fpd.2013.1704
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Shiga-toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* (STEC/VTEC) infection. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019.
3. Lisboa LF, Szelewicki J, Lin A, Latonas S, Li V, Zhi S, et al. Epidemiology of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 in the Province of Alberta, Canada, 2009-2016. *Toxins (Basel)*. 2019;11(10):613. DOI: 10.3390/toxins11100613
4. Степаншин ЮГ, Светоч ЭА, Ерусланов БВ. Эпидемиологическая значимость и характеристика штаммов *Escherichia coli* O157:H7. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2005;2:16-21./Stepanshin YuG, Svetoch EA, Yeruslanov BV, Bannov VA, Borzenkov VN, Gusev VV. The Epidemiological significance and characteristics of *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiology and Infectious Diseases (Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni)*. 2005;2:16-21. (In Russian).
5. Кафтырева ЛА, Макарова МА, Коновалова ТА, Матвеева ЗН. Характеристика энтерогеморрагической *Escherichia coli* O145:H28, выделенной от пациента с гемолитико-уремическим синдромом. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013;5:100-104./Kaftyreva LA, Makarova MA, Konovalova TA, Matveeva ZN. Characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145:H28 isolated from a patient with hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2013;5:100-104. (In Russian).
6. Онищенко ГГ, Дятлов ИА, Светоч ЭА, Воложанцев НВ, Баннов ВА, Карцев НН, и др. Молекулярно-генетическая характеристика шига-токсин-продуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 г. Вестник Российской академии медицинских наук. 2015;70(1):70-81. DOI: 10.15690/vramn.v70i1.1234/Onishchenko GG, Dyatlov IA, Svetoch EA, Volozhantsev NV, Bannov VA, Kartsev NN, et al. Molecular-genetic Characterization of Shiga-Toxin Producing *Escherichia Coli* Isolated During a Food-Borne Outbreak in St. Petersburg in 2013. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk (Annals of the Russian academy of medical sciences)*. 2015;70(1):70-81. DOI: 10.15690/vramn.v70i1.1234 (In Russian).
7. Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol*. 2005;295(6-7):405-418. DOI: 10.1016/j.ijmm.2005.06.009
8. Marks HM, Tohamy SM, Tsui F. Modeling uncertainty of estimated illnesses attributed to non-O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its impact on illness cost. *J Food Prot*. 2013;76(6):945-952. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-12-409
9. Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, Strockbine NA. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J Infect Dis*. 2005;192(8):1422-1429. DOI: 10.1086/466536
10. Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer FD, et al. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enter-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol*. 2011;193(12):883-891. DOI: 10.1007/s00203-011-0725-6
11. Soon JM, Seaman P, Baines RN. *Escherichia coli* O104:H4 outbreak from sprouted seeds. *Int J Hyg Environ Health*. 2013;216(3):346-354. DOI: 10.1016/j.ijheh.2012.07.005

12. Степаншин ЮГ, Светоч ЭА, Ерусланов БВ, Баннов ВА, Борзенков ВН, Каврук ЛС. Бактерионосительство энтерогеморрагических эшерихий серовара O157:H7 у животных. Ветеринария. 2005;7:17-21./Stepanshin YuG, Svetoch EA, Eruslanov BV, Bannov VA, Borzenkov VN, Kavruk LS. Bakterionositel'stvo enterogemorragicheskikh esherikhii serovara O157:H7 u zhivotnykh. Veterinariya. 2005;7:17-21. (In Russian).
13. Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW 4th. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Adv Appl Microbiol. 2014;86:145-197. DOI: 10.1016/B978-0-12-800262-9.00003-2
14. Gonzalez AGM, Cerqueira AMF. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil. J Appl Microbiol. 2020;128(6):1568-1582. DOI: 10.1111/jam.14500
15. Manning SD, Motiwala AS, Springman AC, Qi W, Lacher DW, Ouellette LM, et al. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105(12):4868-4873. DOI: 10.1073/pnas.0710834105
16. Rojas-Lopez M, Monterio R, Pizza M, Desvaux M, Rosini R. Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Insights for Vaccine Development. Front Microbiol. 2018;9:440. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00440
17. Khanifar J, Hosseini RH, Kazemi R, Ramandi MF, Amani J, Salmanian AH. Prevention of EHEC infection by chitosan nano-structure coupled with synthetic recombinant antigen. J Microbiol Methods. 2019;157:100-107. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.01.002
18. Garcia-Angulo VA, Kalita A, Kalita M, Lozano L, Torres AG. Comparative genomics and immunoinformatics approach for the identification of vaccine candidates for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun. 2014;82(5):2016-2026. DOI: 10.1128/IAI.01437-13
19. Oliveira AF, Cardoso SA, Almeida FB, de Oliveira LL, Pitondo-Silva A, Soares SG, Hanna ES. Oral immunization with attenuated *Salmonella* vaccine expressing *Escherichia coli* O157:H7 intimin gamma triggers both systemic and mucosal humoral immunity in mice. Microbiol Immunol. 2012;56(8):513-522. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2012.00477.x
20. Cai K, Tu W, Liu Y, Li T, Wang H. Novel fusion antigen displayed-bacterial ghosts vaccine candidate against infection of *Escherichia coli* O157:H7. Sci Rep. 2015;5:17479. DOI: 10.1038/srep17479
21. McNeilly TN, Mitchell MC, Rosser T, McAteer S, Low JC, Smith DG, et al. Immunization of cattle with a combination of purified intimin-531, EspA and Tir significantly reduces shedding of *Escherichia coli* O157:H7 following oral challenge. Vaccine. 2010;28(5):1422-1428. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.10.076
22. Spears KJ, Roe AJ, Gally DL. A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. FEMS Microbiol Lett. 2006;255(2):187-202. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00119.x
23. Torres AG, Kaper JB. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. Infect Immun. 2003;71(9):4985-4995. DOI: 10.1128/iai.71.9.4985-4995.2003
24. Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from *espA*, *eae* and *tir* genes of *Escherichia coli* O157:H7. Vaccine. 2010;28(42):6923-6929. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.07.061
25. McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92(5):1664-1668. DOI: 10.1073/pnas.92.5.1664
26. Perna NT, Mayhew GF, Pósfai G, Elliott S, Donnenberg MS, Kaper JB, Blattner FR. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun. 1998;66(8):3810-3817. DOI: 10.1128/IAI.66.8.3810-3817.1998
27. Karpman D, Békássy ZD, Sjögren AC, Dubois MS, Karmali MA, Mascarenhas M, et al. Antibodies to intimin and *Escherichia coli* secreted proteins A and B in patients with enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. Pediatr Nephrol. 2002;17(3):201-211. DOI: 10.1007/s00467-001-0792-z
28. Li Y, Frey E, Mackenzie AM, Finlay BB. Human response to *Escherichia coli* O157:H7 infection: antibodies to secreted virulence factors. Infect Immun. 2000;68(9):5090-5095. DOI: 10.1128/iai.68.9.5090-5095.2000
29. Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, Knutton S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. Mol Microbiol. 1998;30(5):911-921. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.01144.x
30. Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, et al. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. EMBO J. 1998;17(8):2166-2176. DOI: 10.1093/emboj/17.8.2166
31. Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. Cell. 1997;91(4):511-520. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80437-7
32. Jerse AE, Kaper JB. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. Infect Immun. 1991;59(12):4302-4309. DOI: 10.1128/IAI.59.12.4302-4309.1991
33. Mainil J. *Escherichia coli* virulence factors. Vet Immunol Immunopathol. 2013;152(1-2):2-12. DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.09.032
34. Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW 4th. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Adv Appl Microbiol. 2014;86:145-197. DOI: 10.1016/B978-0-12-800262-9.00003-2
35. Bryan A, Youngster I, McAdam AJ. Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. Clin Lab Med. 2015;35(2):247-272. DOI: 10.1016/j.cll.2015.02.004
36. Jeong YJ, Park SK, Yoon SJ, Park YJ, Lee MS. Experimental *In Vivo* Models of Bacterial Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome. J Microbiol Biotechnol. 2018;28(9):1413-1425. DOI: 10.4014/jmb.1803.03012
37. Kerner K, Bridger PS, Köpf G, Fröhlich J, Barth S, Willems H, et al. Evaluation of biological safety *in vitro* and immunogenicity *in vivo* of recombinant *Escherichia coli* Shiga toxoids as candidate vaccines in cattle. Vet Res. 2015;46(1):38. DOI: 10.1186/s13567-015-0175-2
38. Robinson CM, Sinclair JF, Smith MJ, O'Brien AD. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. Version 2. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(25):9667-9672. DOI: 10.1073/pnas.0602359103
39. Галиакбарова АА, Пирожков МК. Выявление связи между иммуногенной и антигенной активностью вакцины против колибактериоза животных. Вестник Российского Университета Дружбы Народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2020;15(2):200-209. DOI: 10.22363/2312-797X-2020-15-2-200-209 / Galiakbarova AA, Pirozhkov MK. Relationship between immunogenic and antigenic activity of the vaccine against colibacteriosis of animals. RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries. 2020;15(2):200-209. DOI: 10.22363/2312-797X-2020-15-2-200-209 (In Russian).
40. Sharma VK, Schaut RG, Loving CL. Vaccination with killed whole-cells of *Escherichia coli* O157:H7 *hha* mutant emulsified with an adjuvant induced vaccine strain-specific serum antibodies and reduced *E. coli* O157:H7 fecal shedding in cattle. Vet Microbiol. 2018;219:190-199. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.04.003
41. Schaut RG, Boggiatto PM, Loving CL, Sharma VK. Cellular and Mucosal Immune Responses Following Vaccination with Inactivated Mutant of *Escherichia coli* O157:H7. Sci Rep. 2019;9(1):6401. DOI: 10.1038/s41598-019-42861-z
42. Liu J, Sun Y, Feng S, Zhu L, Guo X, Qi C. Towards an attenuated enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 vaccine characterized by a deleted *ler* gene and containing apathogenic Shiga toxins. Vaccine. 2009;27(43):5929-5935. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.07.097
43. Gu J, Ning Y, Wang H, Xiao D, Tang B, Luo P, et al. Vaccination of attenuated EIS-producing *Salmonella* induces protective immunity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* in mice. Vaccine. 2011;29(43):7395-7403. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.07.069
44. Fujii J, Naito M, Yutsudo T, Matsumoto S, Heatherly DP, Yamada T, et al. Protection by a recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin vaccine expressing Shiga toxin 2 B subunit against Shiga toxin-producing

- Escherichia coli* in mice. Clin Vaccine Immunol. 2012;19(12):1932-1937. DOI: 10.1128/CVI.00473-12
45. Mayr UB, Walcher P, Azimpour C, Riedmann E, Haller C, Lubitz W. Bacterial ghosts as antigen delivery vehicles. Adv Drug Deliv Rev. 2005;57(9):1381-1391. DOI: 10.1016/j.addr.2005.01.027
  46. Mayr UB, Haller C, Haidinger W, Atrasheuskaya A, Bukin E, Lubitz W, Ignatyev G. Bacterial ghosts as an oral vaccine: a single dose of *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts protects mice against lethal challenge. Infect Immun. 2005;73(8):4810-4817. DOI: 10.1128/IAI.73.8.4810-4817.2005
  47. Mayr UB, Kudela P, Atrasheuskaya A, Bukin E, Ignatyev G, Lubitz W. Rectal single dose immunization of mice with *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts induces efficient humoral and cellular immune responses and protects against the lethal heterologous challenge. Microb Biotechnol. 2012;5(2):283-294. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00316.x
  48. Vilte DA, Larzábal M, Mayr UB, Garbaccio S, Gammella M, Rabinovitz BC, et al. A systemic vaccine based on *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts (BGs) reduces the excretion of *E. coli* O157:H7 in calves. Vet Immunol Immunopathol. 2012;146(2):169-176. DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.03.002
  49. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. Lancet. 2005;365(9464):1073-1086. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)71144-2
  50. Arenas J. The role of bacterial lipopolysaccharides as immune modulator in vaccine and drug development. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2012;12(3):221-235. DOI: 10.2174/187153012802002884
  51. Ikeda M, Ito S, Honda M. Hemolytic uremic syndrome induced by lipopolysaccharide and Shiga-like toxin. Pediatr Nephrol. 2004;19(5):485-489. DOI: 10.1007/s00467-003-1395-7
  52. Keepers TR, Psotka MA, Gross LK, Obrig TG. A murine model of HUS: Shiga toxin with lipopolysaccharide mimics the renal damage and physiologic response of human disease. J Am Soc Nephrol. 2006;17(12):3404-3414. DOI: 10.1681/ASN.2006050419
  53. Sheng H, Lim JY, Watkins MK, Minnich SA, Hovde CJ. Characterization of an *Escherichia coli* O157:H7 O-antigen deletion mutant and effect of the deletion on bacterial persistence in the mouse intestine and colonization at the bovine terminal rectal mucosa. Appl Environ Microbiol. 2008;74(16):5015-5022. DOI: 10.1128/AEM.00743-08
  54. Paton AW, Voss E, Manning PA, Paton JC. Antibodies to lipopolysaccharide block adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to human intestinal epithelial (Henle 407) cells. Microb Pathog. 1998;24(1):57-63. DOI: 10.1006/mpat.1997.0172
  55. Bitzan M, Moebius E, Ludwig K, Müller-Wiefel DE, Heesemann J, Karch H. High incidence of serum antibodies to *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in children with hemolytic-uremic syndrome. J Pediatr. 1991;119(3):380-385. DOI: 10.1016/s0022-3476(05)82049-9
  56. Li Y, Frey E, Mackenzie AM, Finlay BB. Human response to *Escherichia coli* O157:H7 infection: antibodies to secreted virulence factors. Infect Immun. 2000;68(9):5090-5095. DOI: 10.1128/iai.68.9.5090-5095.2000
  57. Konadu E, Robbins JB, Shiloach J, Bryla DA, Szu SC. Preparation, characterization, and immunological properties in mice of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide-protein conjugate vaccines. Infect Immun. 1994;62(11):5048-5054. DOI: 10.1128/IAI.62.11.5048-5054.1994
  58. Robbins JB, Schneerson R, Szu SC. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating the inoculum. J Infect Dis. 1995;171(6):1387-1398. DOI: 10.1093/infdis/171.6.1387
  59. Meckelein B, Externest D, Schmidt MA, Frey A. Contribution of serum immunoglobulin transudate to the antibody immune status of murine intestinal secretions: influence of different sampling procedures. Clin Diagn Lab Immunol. 2003;10(5):831-834. DOI: 10.1128/cdli.10.5.831-834.2003
  60. Konadu EY, Parke JC Jr, Tran HT, Bryla DA, Robbins JB, Szu SC. Investigational vaccine for *Escherichia coli* O157: phase 1 study of O157 O-specific polysaccharide-*Pseudomonas aeruginosa* recombinant exoprotein A conjugates in adults. J Infect Dis. 1998;177(2):383-387. DOI: 10.1086/514203. PMID: 9466525
  61. Ahmed A, Li J, Shiloach Y, Robbins JB, Szu SC. Safety and immunogenicity of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide conjugate vaccine in 2–5-year-old children. J Infect Dis. 2006;193(4):515-521. DOI: 10.1086/499821
  62. Andrade GR, New RR, Sant'Anna OA, Williams NA, Alves RC, Pimenta DC, et al. A universal polysaccharide conjugated vaccine against O111 *E. coli*. Hum Vaccin Immunother. 2014;10(10):2864-2874. DOI: 10.4161/21645515.2014.972145
  63. Ademokoya AA, Adebolu TT, Ogundare AO. Evaluation of the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157:H7 for prophylactic ability against diarrhoea caused by homologous organism in Wistar albino rats. Glob Adv Res J Med Med Sci. 2015;4(3):117-120.
  64. Conlan JW, Cox AD, KuoLee R, Webb A, Perry MB. Parenteral immunization with a glycoconjugate vaccine containing the O157 antigen of *Escherichia coli* O157:H7 elicits a systemic humoral immune response in mice, but fails to prevent colonization by the pathogen. Can J Microbiol. 1999;45(4):279-286.
  65. Conlan JW, KuoLee R, Webb A, Cox AD, Perry MB. Oral immunization of mice with a glycoconjugate vaccine containing the O157 antigen of *Escherichia coli* O157:H7 admixed with cholera toxin fails to elicit protection against subsequent colonization by the pathogen. Can J Microbiol. 2000;46(3):283-290.
  66. Moreno S, Timón M. DNA vaccination: an immunological perspective. Inmunología. 2004;23:41-55.
  67. Fioretti D, Iurescia S, Fazio VM, Rinaldi M. DNA vaccines: developing new strategies against cancer. J Biomed Biotechnol. 2010;2010:174378. DOI: 10.1155/2010/174378
  68. Shariati Mehr K, Mousavi SL, Rasooli I, Amani J, Rajabi M. A DNA vaccine against *Escherichia coli* O157:H7. Iran Biomed J. 2012;16(3):133-139. DOI: 10.6091/ibj.1059.2012
  69. Capozzo AV, Pistone Creydt V, Dran G, Fernández G, Gómez S, Bentancor LV, et al. Development of DNA vaccines against hemolytic-uremic syndrome in a murine model. Infect Immun. 2003;71(7):3971-3978. DOI: 10.1128/iai.71.7.3971-3978.2003
  70. Bentancor LV, Bilen M, Brando RJ, Ramos MV, Ferreira LC, Ghiringhelli PD, Palermo MS. A DNA vaccine encoding the enterohemorrhagic *Escherichia coli* Shiga-like toxin 2 A2 and B subunits confers protective immunity to Shiga toxin challenge in the murine model. Clin Vaccine Immunol. 2009;16(5):712-718. DOI: 10.1128/CVI.00328-08. Erratum in: Clin Vaccine Immunol. 2010;17(8):1291.
  71. Kalita A, Kalita M, Torres AG. Exploiting the power of OMICS approaches to produce *E. coli* O157 vaccines. Gut Microbes. 2014;5(6):770-774. DOI: 10.4161/19490976.2014.983769
  72. Hajizade A, Ebrahimi F, Salmanian A-H, Arpanaei A, Amani J. Nanoparticles in Vaccine Development. J Appl Biotech Rep. 2014;1(4):125-134.
  73. Sahdev P, Ochyl LJ, Moon JJ. Biomaterials for nanoparticle vaccine delivery systems. Pharm Res. 2014;31(10):2563-2582. DOI: 10.1007/s11095-014-1419-y
  74. Doavi T, Mousavi SL, Kamali M, Amani J, Fasihi Ramandi M. Chitosan-Based Intranasal Vaccine against *Escherichia coli* O157:H7. Iran Biomed J. 2016;20(2):97-108. DOI: 10.7508/ibj.2016.02.005
  75. Khanifar J, Salmanian AH, Haji Hosseini R, Amani J, Kazemi R. Chitosan nanostructure loaded with recombinant *E. coli* O157:H7 antigens as a vaccine candidate can effectively increase immunization capacity. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2019;47(1):2593-2604. DOI: 10.1080/21691401.2019.1629947
  76. Sanchez-Villamil JI, Tapia D, Torres AG. Development of a Gold Nanoparticle Vaccine against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. mBio. 2019;10(4):e01869-19. DOI: 10.1128/mBio.01869-19
  77. Fingerhann M, Avila L, De Marco MB, Vázquez L, Di Biase DN, Müller AV, et al. OMV-based vaccine formulations against Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains are both protective in mice and immunogenic in calves. Hum Vaccin Immunother. 2018;14(9):2208-2213. DOI: 10.1080/21645515.2018.1490381
  78. Lo AW, Moriel DG, Phan MD, Schulz BL, Kidd TJ, Beatson SA, Schembri MA. 'Omic' Approaches to Study Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence. Trends Microbiol. 2017;25(9):729-740. DOI: 10.1016/j.tim.2017.04.006



**Информация об авторах:**

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
 Телефон: (4967) 36-0079  
 E-mail: svetoch@obolensk.org

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
 Телефон: (4967) 36-0003  
 E-mail: dyatlov@obolensk.org

Карцев Николай Николаевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
 Телефон: (4967) 36-0079  
 E-mail: kartsev@obolensk.org

Ерусланов Борис Васильевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
 Телефон: (4967) 36-0079  
 E-mail: erus47@yandex.ru

Канашенко Мария Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24  
 Телефон: (4967) 36-0079  
 E-mail: kanashenko@obolensk.org

**Information about authors:**

Edward A. Svetoch, PhD, DSc (Veterinary Science), professor, chief researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology.  
 Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0079  
 E-mail: svetoch@obolensk.org

Ivan A. Dyatlov, Academician of the Russian Academy of Sciences, MD, PhD, DSc, professor, Director of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
 Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0003  
 E-mail: dyatlov@obolensk.org

Nikolay N. Kartsev, MD, PhD, senior researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
 Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0079  
 E-mail: kartsev@obolensk.org

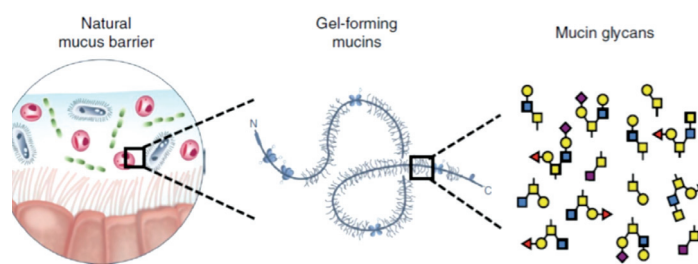
Boris V. Eruslanov, MD, PhD, DSc, leading researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
 Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0079  
 E-mail: erus47@yandex.ru

Maria E. Kanashenko, junior researcher of antimicrobial agents laboratory, molecular microbiology departments, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
 Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0079  
 E-mail: kanashenko@obolensk.org

**НОВОСТИ НАУКИ**

**Искусственная слизь и микробиом**

Слизь – это трехмерный гидрогель, в котором находится большая часть человеческого микробиома. Слизистая среда играет важную роль в дифференциации и поведении микробных фенотипов и позволяет создавать пространственные распределения. Нарушение регуляции слизи в дальнейшем связано с различными заболеваниями. Поэтому слизь является ключевым ингредиентом для изучения поведения комменсальной и патогенной микробиоты *in vitro*. Микроорганизмы, культивируемые в слизи, имеют фенотипы, существенно отличающиеся от тех, которые представлены в стандартных лабораторных средах. В работе обсуждается влияние слизи на микробиом и исследуется структура и гликозилирование муцинов – основных строительных блоков слизи. Изучается влияние гликанов на функцию муцина и разрабатываются различные подходы к конструированию синтетических муцинов, включая синтез основной цепи, конструкции муциново-мицетических гидрогелей и конструирование гликанов. Наконец, обсуждаются миметики муцина для 3D-культуры клеток *in vitro* и для модуляции структуры и функции микробного сообщества.



Werlang C., Cárcamo-Oyarce G., Ribbeck K.  
 Engineering mucus to study and influence the microbiome.  
 Nat Rev Mater. 2019;4(2):134-45.