

УДК 614.4:616.98:579.841.95

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ЖИВЫХ ТУЛЯРЕМИЙНЫХ ВАКЦИН – ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2021 г. М. И. Кормилицына*

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

*e-mail: mkormilits@mail.ru

Поступила в редакцию 29.04.2021 г.

После доработки 28.07.2021 г.

Принята к публикации 28.07.2021 г.

Francisella tularensis – этиологический агент туляремии, природноочаговой инфекции человека и животных. Этот патогенный микроорганизм обладает высокой инфекционностью, может вызывать летальную инфекцию. Разработанный советскими учеными более 70 лет назад аттенуированный туляремиальный штамм 15 Гайского до сих пор остается единственным для производства живой вакцины, с помощью которой в свое время удалось резко снизить заболеваемость туляремией в СССР. Предмет данного обзора – история создания применяемых в настоящее время двух живых вакцин на основе аттенуированного вакцинного штамма 15 Гайского, их преимущества и недостатки. В статье представлены пути конструирования новых аттенуированных мутантов, дефектных в генах, ответственных за вирулентность, в качестве кандидатов в новые вакцинные штаммы туляремиального микроба.

Ключевые слова: туляремия, *Francisella*, вакцина, аттенуированный штамм, иммуногенность, вирулентность

DOI: 10.31857/S0042132421060041

ВВЕДЕНИЕ

Туляремия – опасная природноочаговая зоонозная инфекция, которая широко распространена в странах умеренного климатического пояса Старого и Нового Света. Возбудитель туляремии был впервые выделен в 1911 г. в округе Туляре, Калифорния, США (Олсуфьев, 1975; Olsufiev, Meshcheryakova, 1983). Возбудитель инфекции – *Francisella tularensis*, по современной классификации, входит в группу наиболее опасных патогенных агентов из-за многообразия механизмов и путей заражения, его высокой инфекционности, 100%-ной восприимчивости человека к инфекции при небольших инфицирующих дозах: 10–50 туляремиальных клеток при аэрогенном (АЭ) заражении вызывают туляремию (Saslaw et al., 1961). Он отнесен к так называемым критическим биологическим агентам категории А, учитывая легкость его распространения (Dennis et al., 2001). Самые высокие уровни смертности (30–60 и даже до 80% при отсутствии лечения) зарегистрированы от легочной формы туляремии, как при первичном вдыхании, так и при вторичном гематогенном распространении (Darling et al., 2002; Ellis et al., 2002; Broekhuijsen et al., 2003).

Возбудитель туляремии принадлежит семейству Francisellaceae роду *Francisella*. В пределах ви-

да *F. tularensis* различают четыре подвида (subspecies – ssp.): *tularensis* (неарктический) – наиболее патогенный, *mediaasiatica* (среднеазиатский), *holarctica* (голарктический), который представлен тремя биоварами: *japonica*, *I Ery*^s и *II Ery*^r, а также малопатогенный для человека *novicida/novicida-like* (Мещерякова и др., 1995; Olsufiev, Meshcheryakova, 1983; Sjöstedt, 2005).

Ранее было констатировано, что летальная доза штаммов *F. tularensis* ssp. *tularensis*, вызывающая гибель 100% (LD₁₀₀) экспериментальных животных (мышей, морских свинок, кроликов), а также человека составляла от 1 до 10 колониеобразующих единиц (КОЕ) (Олсуфьев, 1975; Ellis et al., 2002). Однако позднее было выявлено, что представители внутривидовых групп (субпопуляция/генотип/клад) A1 (A1a и A1b) и A2 различаются по патогенности для человека и экспериментальных животных (Kugeler et al., 2009; Molins et al., 2010, 2014). Так, штаммы A1b оказались намного более вирулентны, чем A1a и A2, при внутрикожном (ВК) заражении мышей и, главное, для человека. Смертность для человека, вызванная A1b-, A1a- и A2-генотипами, составляла 24, 14 и 0% соответственно (Petersen, Molins, 2010).

Штаммы *F. tularensis* ssp. *holarctica* высоко патогенны для мышей и морских свинок: при под-

кожном введении (ПК) LD₁₀₀ составляет 1–10 КОЕ, умеренно патогенны для кроликов – LD₁₀₀ > 10⁸–10⁹ КОЕ (Олсуфьев, Мешчерякова, 1982; Olsufiev, Meshcheryakova, 1983). Доза, введенная ПК и выраженная в LD₅₀ (с летальностью 50%), для человека – менее 10³ КОЕ (Ellis et al., 2002).

Представители *F. tularensis* ssp. *mediaasiatica* обладают умеренной патогенностью для человека, но несколько большей степенью патогенности для кроликов (LD₅₀ > 10⁶ КОЕ), чем голарктический подвид, и занимают промежуточное положение между ssp. *tularensis* и ssp. *holarctica* (Олсуфьев, 1975; Sandström et al., 1992; Ellis et al., 2002; Timofeev et al., 2020).

Условно патогенный возбудитель – *F. tularensis* ssp. *novicida* вызывает туляремиеподобное заболевание у лиц с иммунодефицитным статусом или имеющих другие проблемы со здоровьем (Larson et al., 1955; Hollis et al., 1989; Petersen, Schrieffer, 2005; Sjöstedt, 2005). Этот возбудитель имеет ряд генетических и фенотипических различий, которые ставят под сомнение его таксономическое положение, в связи с этим ряд авторов предлагают рассматривать его как отдельный вид *F. novicida* (Kingry, Petersen, 2014; Rowe, Huntley, 2015).

Отмечено, что только штаммы *F. tularensis* трех подвидов являются главными этиологическими агентами туляремии человека, тогда как представители подвида *novicida* вирулентны для мышей и авирулентны для человека (Ellis et al., 2002; Sunagar et al., 2016).

Выяснение механизмов взаимодействия патоген–хозяин – одна из важнейших проблем, лежащая в основе разработки эффективных средств защиты человека от туляремии. Стратегия туляремийного микроорганизма как факультативного внутриклеточного патогена состоит в способности инфицировать, выживать и распространяться внутри различных типов эукариотических клеток: макрофагов, дендритных клеток, полиморфноядерных нейтрофилов, гепатоцитов, эндотелиальных и альвеолярных эпителиальных клеток II типа (Celli, Zahrt, 2013). Чтобы успешно инфицировать человеческие моноциты/макрофаги, *F. tularensis* покидает фагосому, реплицируется в цитозоле, а затем лизирует клетку перед началом нового цикла повторного заражения (Gillette et al., 2014). Существуют различия при фагоцитозе клеток вирулентного и вакцинного штамма. Так, штамм *F. tularensis* подвида *tularensis* Schu S4 растет в ~100 раз лучше в эпителиальных клетках дыхательных путей, чем живой вакцинный штамм LVS (live vaccine strain) (Jones et al., 2014). Исследования патогенеза экспериментальной туляремии проводились в основном на мышах. При ВК и АЭ заражении *F. tularensis* быстро распространяется в лимфатические узлы, селезенку, печень, костный мозг и легкие, размножаясь в этих орга-

нах (Олсуфьев, 1975; Jia, Horwitz, 2018). Размножение *F. tularensis*, особенно ssp. *tularensis*, в тканях не вызывает, а, скорее всего, подавляет иммунный ответ (цитокиновые реакции) в моноцитах человека, что, вероятно, способствует его повышенной патогенности (Jia, Horwitz, 2018).

Защита макроорганизма от факультативного внутриклеточного микроорганизма *F. tularensis* обеспечивается, главным образом, клеточноопосредованным, а также антигенспецифическим гуморальным иммунитетом. Накапливаются данные о том, что антитела могут играть определенную роль в контроле инфекции, так как *F. tularensis* имеет и внеклеточную фазу (например, в плазме крови), с помощью которой он распространяется в организме инфицированных хозяев (Ray et al., 2009; Hong et al., 2013; Sunagar et al., 2016; Jia, Horwitz, 2018).

Проблема специфической профилактики туляремии, особенно вызванной высоковирулентными туляремийными штаммами, остается актуальной до настоящего времени. За последнее десятилетие накоплен большой опыт в конструировании и исследовании живых аттенуированных штаммов *F. tularensis*, создающих защиту экспериментальных животных против, главным образом, респираторной туляремийной инфекции. Однако высокоэффективной вакцины, защищающей как от штаммов *F. tularensis* подвида *holarctica*, так и от высоковирулентных штаммов подвида *tularensis*, до настоящего времени не было создано. Данный обзор сосредоточен на исследованиях в области разработки высокоиммуногенных аттенуированных штаммов – кандидатов в живые туляремийные вакцины.

СПОНТАННО АТТЕНУИРОВАННЫЕ ШТАММЫ *F. tularensis*

Приоритет в успешной разработке живой туляремийной вакцины принадлежит советским ученым М.М. Эльберту, Н.А. Гайскому, Б.Я. Файбичу и др., которые в середине прошлого века использовали отбор аттенуированных (ослабленных) вариантов путем многочисленных пассажей их родительских штаммов на искусственных питательных средах (Емельянова, 1963; Олсуфьев, 1975). Б.Я. Эльберт и Н.А. Гайский выделили ослабленный по вирулентности штамм “Москва” среди музейных культур. Его иммуногенные свойства, реактогенность были проверены на экспериментальных животных. Штамм был успешно испытан на добровольцах и показал безвредность и высокую иммуногенность, но в дальнейшем он не был сохранен. Другие кандидаты в вакцинные штаммы были получены Н.А. Гайским с соавторами лабораторным путем из ослабленных по степени вирулентности штаммов в 1940–1950 гг.

Один из них — эффективный вакцинный штамм 15 Гайского оказался нестабильным и снизил свои протективные свойства. Вариант этого штамма, названный 15 НИИЭГ, был восстановлен В.П. Моторной в 1953 г. интратестикулярными пассажами через организм морских свинок (Олсуфьев, 1975). Заболеваемость туляремией в СССР составляла около 100 тыс. человек в 1941—1945 гг. После массовой иммунизации населения в 1946 г. эффективной живой вакциной началось ее резкое снижение, и с 1950 г. она удерживалась в среднем на уровне 100—200 случаев (Олсуфьев, 1975).

Вакцинный штамм 15 НИИЭГ служит основой для производства живой туляремийной вакцины, которая обеспечивает длительный и напряженный иммунитет против инфекции. Эта живая вакцина остается до настоящего времени единственным иммунопрофилактическим средством против туляремии, ее используют для вакцинации населения энзоотичных территорий и групп риска на территории России и стран СНГ. Так, в РФ в последние годы вакцинируют и ревакцинируют около 1 млн человек ежегодно (О состоянии..., 2017).

В 1956 г. вакцинный штамм 15 НИИЭГ в лиофильном состоянии был передан в США. Один из его вариантов, выделенных из голубых колоний (иммуногенный SR-тип), пассировали 5 раз через организм мышей для повышения иммуногенности (Conlan, 2011). Этот штамм получил название: живой вакцинный штамм LVS (live vaccine strain). Вакцина на основе LVS используется для иммунопрофилактики ограниченного контингента людей при опасности заражения туляремией (Mulligan et al., 2017). Новые партии LVS исследуются на людях по следующим свойствам: безопасность, реактогенность и иммуногенность возрастающих доз вакцинации, разные способы введения (El Sahly et al., 2009; Mulligan et al., 2017). Хотя LVS не был лицензирован для использования в США и Европейском союзе, это единственная вакцина на настоящий момент, которая, как было показано, является достаточно безопасной и эффективной для людей. Существует мнение, что новая вакцина должна быть более безопасной, чем LVS, и в то же время обеспечивать защиту против полностью вирулентных *F. tularensis* ssp. *tularensis*, сопоставимую или более высокую, по сравнению с LVS (Jia, Horwitz, 2018).

Вакцина на основе штамма 15 НИИЭГ и его клон LVS обладает рядом недостатков. Отмечено, что вакцинный штамм 15 НИИЭГ (или LVS) при нескольких пассажах на питательной среде диссоциирует и образует КОЕ разного фенотипа: иммуногенный SR-тип КОЕ (голубые, гладкие, непрозрачные), более крупных по размеру, чем вирулентной культуры S-типа; неиммуногенный

R-тип (серые, шероховатые, плоские прозрачные); смешанный тип КОЕ (Олсуфьев, 1975; Gunn, Ernst, 2007). Накопление неиммуногенных R-клеток остается проблемой различных производственных серий или лотов (партий) туляремийной вакцины, что влияет на качество вакцины. Достаточно высокий уровень иммуногенности вакцинного штамма достигается пассированием культуры через организм высокочувствительных животных или *in vitro* через макрофаги либо их прямым отбором на среде для того, чтобы в популяции преобладали иммуногенные клетки (SR-тип). В связи с этим некоторые штаммы-продуценты живой вакцины могут обладать относительно высокой реактогенностью и вызывать побочные эффекты для макроорганизма (лимфадениты, лихорадку и др.). Обнаружено, что вакцина LVS с относительно высокой остаточной вирулентностью сохраняет реактогенность для людей и животных после ВК или АЭ введения (Jia, Horwitz, 2018). Из-за отсутствия генетической стабильности существует потенциальный риск появления мутаций и реверсии в вирулентную форму. Таким образом, продуцент живой вакцины — штамм 15 НИИЭГ (в том числе и LVS) требует постоянного контроля и при необходимости коррекции его иммунобиологических свойств. Защита, создаваемая этими вакцинами, не абсолютная. При высокой эффективности вакцины против заражения голарктическими штаммами *F. tularensis* отмечено, что вакцинный штамм 15 (LVS) не обеспечивал полную защиту экспериментальных животных от инфекции, вызванной вирулентными штаммами *F. tularensis* неарктического подвида (Олсуфьев, Емельянова, 1962). Выявлено, что LVS создавал недостаточный уровень защиты людей от последующего АЭ заражения высоковирулентным штаммом *F. tularensis* ssp. *tularensis*, а уровень протекции зависел от комбинации дозы и способа вакцинации (McCrumb, 1961; Saslaw et al., 1961; Hornick, Eigelsbach, 1966). Применение живой вакцины является небезопасным для групп риска — людей с формирующимся (дети) и ослабленным иммунитетом.

Кандидаты в вакцинные штаммы должны быть способными сохраняться в организме хозяина в течение достаточного периода времени для индукции эффективного иммунного ответа. О персистенции вакцинного штамма 15/10 (синоним 15 НИИЭГ) свидетельствует ассоциация бактерий с клоногенными кроветворными клетками КОЕс-7 в костном мозге с длительностью более 4 мес. (Санин и др., 1994). Подтверждением персистенции может быть длительность клеточного ответа у привитых людей (более 20 лет), о чем свидетельствовали данные, полученные при использовании реакций бласттрансформации лимфоцитов, лейкоцитолита и кожной аллергической пробы с тулярином (Савельева и др., 1992). Персистенция

живых туляремиальных клеток играет положительную роль в противотуляремиальной защите человека, стимулируя врожденный и адаптивный иммунитет.

Другие спонтанно аттенуированные штаммы

Американские исследователи выявили штаммы *F. tularensis* со свойствами потенциально вакцинных, их аттенуация была результатом длительного хранения на искусственных питательных средах (Downs, Woodward, 1949; Eigelsbach et al., 1951). Среди них штамм Schu S_{I-II} (подвид *tularensis*) был значительно ослаблен для мышей и оказался высокоиммуногенным для морских свинок, по сравнению с LVS. Однако авторы посчитали, что вакцинные штаммы Schu S_{I-II}, как и LVS, имеют высокую остаточную вирулентность для мышей, исключаящую их применение на людях (Eigelsbach, Downs, 1961). В 1955 г. Скродски и Томашунас (по: Емельянова, 1963) таким же методом получили три иммуногенных штамма *F. tularensis* со сниженной вирулентностью, причем их свойства отвечали требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам в бывшем СССР. Скринирование коллекционных штаммов *Francisella* выявило спонтанный аттенуированный мутант *F. tularensis* ssp. *tularensis* (родительский штамм Schu S4), названный FSC043 с LD₅₀ > 10⁸ КОЕ при ВК иммунизации (10²–10⁸ КОЕ), который защищал мышей (BALB/c) от высоковирулентного штамма ssp. *tularensis* FSC033 при ВК или АЭ заражении 10³ или 10¹ КОЕ. Отмечено, что иммунизация FSC043 более эффективна, чем иммунизация LVS, особенно против АЭ заражения (Twine et al., 2005). Позднее был расшифрован механизм его аттенуации (в гене *pdpC*), мутант показал минимальную внутриклеточную репликацию и не вызывал клеточную цитотоксичность (Lindgren et al., 2014).

В лаборатории туляремии Центрального института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР был получен аттенуированный штамм *F. tularensis* ssp. *tularensis* Schu № 7, эффективный против заражения высоковирулентными штаммами этого подвида (Емельянова, Олсуфьев, 1962). Этот кандидат в вакцинный штамм соответствовал всем требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам. При этом он создавал достаточно высокий иммунитет против АЭ заражения родительским штаммом *F. tularensis* ssp. *tularensis*, в отличие от штамма 15 НИИЭГ, в опытах на домашних кроликах — адекватной биологической модели для изучения протективных свойств вакцинных штаммов неарктического подвида. LD₅₀ вирулентного штамма В399А Cole для кроликов, предварительно иммунизированных ПК (10⁸ КОЕ) штаммами Schu

№ 7 и 15 НИИЭГ (контроль), составляла 1.6 × 10⁵ и 6 × 10⁴ КОЕ соответственно (28 сут — срок наблюдения).

Основой для создания новых вакцин могут быть два штамма *F. tularensis* (ts42), обладающие чувствительностью к температуре культивирования выше 41°C: штамм 15/10 № 83, полученный методом отбора температурочувствительных клонов из вакцинного штамма 15 НИИЭГ, а также уникальный природный изолят *F. tularensis* ssp. *holarctica* № 268, выделенный из воды, с фенотипом чувствительности к 42°C. Эти два штамма имели низкую остаточную вирулентность для мышей, были авирулентными для морских свинок, в то же время обладали высокой иммуногенностью, защищая экспериментальных животных от заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* ssp. *holarctica* 503 (в дозе 10³ КОЕ). Более того штамм № 268, десятикратно пассированный через организм мыши, не изменил свою вирулентность для мышей (Kormilitsyna, Meshcheryakova, 1996).

Был предложен (Айкимбаев и др., 2006) аттенуированный штамм *F. tularensis* ssp. *mediaasiatica* 240, перспективный для создания туляремиальной вакцины. Этот ослабленный штамм был получен методом культивирования на искусственных питательных средах штамма *F. tularensis* среднеазиатского подвида № 240 с отбором SR-вариантов КОЕ и с воздействием на него иммунной сыворотки по методу Н.А. Гайского. Аттенуированный штамм 240 обладал остаточной вирулентностью для белых мышей: LD₅₀ = 2134 КОЕ, авирулентностью для морских свинок (при ПК заражении в дозах 5 × 10⁸–10⁹ КОЕ), иммуногенностью, слабой реактогенностью и стабильностью свойств.

Антибиотикоустойчивые аттенуированные мутанты F. tularensis

Одним из недостатков известных вакцинных штаммов является отсутствие маркеров (например, антибиотикорезистентности) для дифференциации их от диких штаммов. Спонтанные антибиотикоустойчивые мутанты *F. tularensis* с ослабленной вирулентностью были получены в качестве кандидатов в вакцинные штаммы.

Из клонов аттенуированного штамма среднеазиатского подвида *F. tularensis* ssp. *mediaasiatica* 240 со свойствами вакцинного отобран устойчивый к рифампицину вариант со сниженной остаточной вирулентностью, стабильными аттенуированными свойствами — *F. tularensis* ssp. *mediaasiatica* 240, *rif-R*, который предложен в качестве перспективной туляремиальной вакцины (Куница, 2012). Остаточная вирулентность этого рифампициноустойчивого штамма среднеазиатского подвида

для белых мышей более чем в 17 раз ниже таковой используемого в настоящее время производственного вакцинного штамма 15 НИИЭГ, при этом протективная активность штамма оказалась очень высокой. Для защиты белых мышей от заражения туляремией достаточно введения единичных клеток штамма *F. tularensis* ssp. *mediaasiatica* 240, *rif*-R. Предлагаемый в качестве вакцины штамм способен защитить животных от доз почти в 2 раза больших, чем штамм 15 НИИЭГ. Напряженность иммунитета, вызванного заявляемым штаммом, выше, а реактогенность штамма значительно ниже используемого производственного штамма 15 НИИЭГ.

В качестве кандидата в вакцинные штаммы *F. tularensis* подвида *tularensis* разработан антибиотикорезистентный штамм B399A-Cole Str^r 2500/к (устойчивый к стрептомицину) для защиты от высоковирулентных штаммов (Кормилицына и др., 2006). Получение мутантов высоковирулентного штамма B399A-Cole, резистентных к стрептомицину, проводили по двум мутациям: 1) отбор клонов, условно зависимых от стрептомицина, 2) выделение из них стрептомициннезависимых мутантов — ревертантов (с отбором по морфологии КОЕ крупного типа на среде без стрептомицина). Таким образом, после двух мутаций, приводящих к стрептомицинустойчивости, получен аттенуированный штамм, обладающий антигенной активностью, иммуногенностью для белых мышей и домашних кроликов, безвредностью для морских свинок и домашних кроликов, стабильностью по основным биологическим признакам. Причем штамм B399A-Cole Str^r 2500/к создавал более надежную защиту кроликов в условиях как ПК, так и АЭ заражения высоковирулентным штаммом *F. tularensis* ssp. *tularensis* B399A-Cole, по сравнению с вакцинным штаммом 15 НИИЭГ. Так, в опытах на кроликах, иммунизированных ПК (10^8 КОЕ) потенциально вакцинным штаммом B399A-Cole Str^r 2500/к и через 28 сут зараженных различными дозами штамма B399A-Cole, LD₅₀ вирулентного штамма составляла $\sim 10^5$ КОЕ, а для иммунизированных штаммом 15 НИИЭГ LD₅₀ $\sim 7 \times 10^3$ КОЕ (срок наблюдения — 1 мес.). Недостаток этого кандидата в вакцинные штаммы — относительно высокая остаточная вирулентность (LD₅₀ — 355 КОЕ) при ПК введении его мышам. Геном этого штамма с измененной вирулентностью не расшифрован.

КОНСТРУИРОВАНИЕ АТТЕНУИРОВАННЫХ МУТАНТОВ *F. tularensis*

В последние десятилетия направляются большие усилия (особенно за рубежом) на разработку новой лицензируемой вакцины против туляремии. Поиск новых вакцинных штаммов в основ-

ном ведется в двух направлениях с использованием в качестве основы: 1) известных вакцинных штаммов (15 НИИЭГ или LVS); 2) вирулентных *F. tularensis* штаммов, преимущественно подвида *tularensis*, с целью конструирования генетически расшифрованных, стабильных, ослабленных мутантов, имеющих сниженную реактогенность, с высокими протективными свойствами.

Факторы патогенности туляремийного микроба

Факторы патогенности играют важную роль в разработке аттенуированных мутантов *F. tularensis* трех подвидов. Они могут работать в ходе инфекции либо индивидуально, либо сообща. Удаление одного из этих компонентов может привести или не привести микроорганизм в состояние авирулентности. Расшифровка геномов некоторых вирулентных штаммов *F. tularensis* и вакцинных — LVS, 15 НИИЭГ показала различия в генах, кодирующих факторы патогенности, при значительном сходстве их геномов. В геноме LVS отмечено 7 генов, являющихся возможной причиной аттенуации родительского штамма (Rohmer et al., 2006). При сравнении геномов 15 НИИЭГ и LVS выявлены 5 общих уникальных единичных нуклеотидных замен и 2 делеции, которые отличают оба вакцинных штамма от всех остальных штаммов *F. tularensis* и влияют на повышение степени аттенуации этих вакцинных штаммов (Нарышкина и др., 2020).

Francisella использует множество стратегий для противодействия врожденным защитным механизмам хозяина, включая экспрессию пилей IV типа, модификацию липоолигосахаридов, кислые фосфатазы, использование рецептора комплекта (CR3) для подавления иммунного ответа и систему секреции VI типа, кодируемую в острове патогенности FPI (*Francisella* pathogenicity island).

Поверхностные структуры

Бактериальные адгезины (пили, фимбрии, капсульные белки и др.) обеспечивают микроорганизму и макроорганизму возможность находиться в тесном контакте.

Определение роли пилевых генов *F. tularensis* — сложных адгезинов, вовлеченных в важные взаимодействия клетки хозяина с патогенными туляремийными бактериями, должно включать вопросы их влияния на выживание и передачу туляремийной инфекции при различных природных условиях. Кластер пилевых генов *Francisella* IV типа, как оказалось, содержит 14 генов, включающих различные белки наружной, внутренней мембраны, АТФазы и пилевые субъединичные белки. Поверхностные волокна составлены из 5–6 субъединиц белков пилинов PilE1–PilE6 (Ark, Mann, 2011). Делеция по пилевым генам *pilE5* (*pilE*) и

pilE6 (fimT) не влияла на вирулентность штамма Schu S4, тогда как мутанты LVS (*LVSΔpilE5* и *LVSΔpilE6*) демонстрировали значительную аттенуацию для мышей BALB/c (>70%), по сравнению с родительским LVS (Ark, Mann, 2011). Ген *pilA (pilE1)* требуется для полной вирулентности штаммов *F. tularensis* как *ssp. holarctica*, так и *ssp. tularensis* (Salomonsson et al., 2009; Forslund et al., 2010). Выявлено, что аттенуация штаммов LVS, а также 15 НИИЭГ, его вариантов и большинства авирулентных штаммов *F. tularensis ssp. holarctica* — результат потери полноценных генов *pilA (pilE1)* и *FTT_0918* (FTT0918 — белок наружной мембраны 58 кДа, участвующий в метаболизме железа) (Кормилицына и др., 2010, 2013; Salomonsson et al., 2009).

Многие исследователи сфокусировали свои усилия на капсуле туляремиального микроба, так как она требуется для протективного иммунитета и всей его вирулентной стратегии (Rowe, Huntley, 2015). Состав капсулы может отличаться у подвидов *tularensis* и *holarctica*, включая LVS (Bandara et al., 2011; Barker et al., 2016). *F. tularensis* продуцирует два отдельных внеклеточных компонента: капсульный О-антиген и капсулоподобный комплекс, которые функционируют аналогично традиционной капсуле (Catanzaro, Inzana, 2020). Капсулоподобный комплекс представляет собой гетерогенную совокупность гликопротеинов, белков и, возможно, везикул и трубочек наружной мембраны. Полисахариды капсульного О-антигена идентичны липополисахаридной субъединице О-антигена (Apicella et al., 2010; Bandara et al., 2011; Rowe, Huntley, 2015; Catanzaro, Inzana, 2020). Полноструктурный липополисахарид (ЛПС) функционирует в качестве каркаса для капсулы, и таким образом осуществляется взаимодействие между ЛПС и капсулой, необходимой для наружной мембраны (Rasmussen et al., 2014). Предполагают, что мишенями комплемент-опсонизации являются ЛПС и капсула, которые защищают микроорганизм от смертельной активности сывороточного комплемента, одновременно стимулируя поглощение туляремиальных бактерий клетками хозяина и противодействуя их поглощению фагоцитами (Lindemann et al., 2011; Jones et al., 2014). Штаммы, лишенные О-антигена, как капсулы, так и ЛПС, обычно чувствительны к сыворотке крови и ослаблены *in vivo* (Gunn, Ernst, 2007; Catanzaro, Inzana, 2020). Капсульный О-антиген также не содержит олигосахарид внутреннего ядра, который присутствует в ЛПС. Продemonстрировано также, что KdhAB — двухкомпонентная Kdo-гидролаза (первая глюкоза, соединяющая липид А с остальными олигосахаридами ядра) играет важную роль в патогенности бактерий LVS (Okap et al., 2013; Catanzaro, Inzana, 2020). Тем не менее, полностью не ясна дифференциальная роль капсульного О-антигена и О-антигена ЛПС в виру-

лентности и резистентности к защитным средствам хозяина (Catanzaro, Inzana, 2020).

Показано, что фазовые вариации LVS — от голубого до серого — включают структурные модификации О-антигена ЛПС — ядра и липида А и влияют на внутримакрофагальную выживаемость и протективную способность против заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* (Soni et al., 2010). ЛПС серого варианта КОЕ имел драматические изменения. Выявлено (Soni et al., 2010), что потеря двух важных гликозилтрансферазных генов липида А — *flmF2 (FTL_1611)* и *flmK (FTL_1609)* вызывает авирулентность для экспериментальных мышей и, возможно, играет роль в раннем клиренсе и отсутствии развития защитного иммунного ответа против заражения вирулентным штаммом *F. tularensis*. Понимание механизма перехода фазы вариации от голубой до серой может привести к тому, что будущая туляремиальная вакцина будет более стабильной и эффективной.

Мутации в генах, вовлекаемых в биосинтез капсулы, были исследованы с целью получения живых вакцинных штаммов. Выяснено, что одни гены (*wbtA1*, *wbtA2*, *wbtC*, *wbtI*, *wbtM* и *FTL_0708*) востребованы для продукции капсулы, другие (*capB*, *capC*, *lpxL*, *wbtK*, *FTT_0706* и *FTT_0673-0674*) — нет (Apicella et al., 2010). Прерывание работы гена *wzy*, ответственного за полимеразу О-антигена, также нарушает формирование капсульного О-антигена и ЛПС (Rasmussen et al., 2015). Мутанты *F. tularensis*, дефектные по генам, вовлеченным в предполагаемый синтез капсулы и мембраны, оказались аттенуированными для мышей. Некоторые из мутантов с дефектными генами: *capBC (FTL_1416, FTT_0805, FTT_0806)*, *wzy (FTL_0598)*, *FTL_0057, FTL_0325, FTL_0291, wbtC (FTT_1462c)* обладали определенным уровнем защиты против заражения вирулентными штаммами (Jia et al., 2010; Michell et al., 2010; Kim et al., 2012; Twine et al., 2012b; Mahawar et al., 2013).

Отмечено, что способ иммунизации мутантом и путь последующего заражения вирулентным штаммом влиял на эффективность защиты. Введенный ПК мышам мутант Schu S4 *ΔcapB* создавал 100%-ную защиту от такого же способа заражения вирулентным штаммом Schu S4 (Michell et al., 2010); интраназальная (ИН) вакцинация мышей LVS *ΔcapB* обеспечивала 100%-ный иммунитет против ИН введения вирулентного штамма *F. tularensis* Schu S4 ($10 \times LD_{50}$), а при ВК иммунизации ни одно животное не выжило (Jia et al., 2010) (табл. 1).

Мутант LVS с делецией фрагмента гена *wbtA* (кодирует дегидратазу полисахарида О-антигена), введенный ВК, вызывал 100%-ную защиту мышей BALB/cByJ от ВК заражения 17 КОЕ штамма *F. tularensis* подвида *holarctica* FSC 108, но при ИН иммунизации — недостаточную протекцию (20%) против заражения 10 КОЕ штамма

Таблица 1. Протективные свойства генетически аттенуированных штаммов *F. tularensis*

<i>F. tularensis</i> (Ft) подвид <i>holartica</i> или <i>tularensis</i> , штамм, мутация (делеция/модификация) локуса гена	Модель животных	Способ вакцинации*, доза (КОЕ)	Заражение вирулентным штаммом подвида Ft, способ введения, доза (КОЕ)	% выживших животных (по сравнению с контролем LVS или 15 НИИЭГ)**	Источник
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 FTT_0918 (<i>lipA</i>)	Мыши BALB/c	ВК (10^5)	<i>tularensis</i> FSC033 1) ВК (5×10^2); 2) АЭ (~10)	1) 100 (100); 2) ~33 (0)	Twine et al., 2005
<i>Ft holartica</i> LVS FTL_1793 (<i>sodB</i>)	Мыши C57BL/6	ИН ($\sim 5 \times 10^3$)	<i>tularensis</i> Schu S4 ИН (14)	40 (0)	Bakshi et al., 2008
<i>Ft holartica</i> LVS FTL_0552 (<i>pmrA</i>)	Мыши 1) BALB/c; 2) C57BL/6	1) ИН (10^5); 2) ИН (10^4)	<i>tularensis</i> Schu S4 ИН (10^2)	1) 30; 2) 0	Sammons-Jackson et al., 2008
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 FTT_0893 и FTT_0894 (<i>purMCD</i>)	Мыши BALB/c	I: 1) ВК ($10^1 - 10^6$); 2) ИН ($10^1 - 10^6$). II: ИН (10^4)	<i>tularensis</i> Schu S4 I: ИН (5×10^2). II: 1) ВК (10^2 и 2×10^2); 2) ИН (10^2 и 2×10^2)	I: 1) 0 и 2) 10. II: 1) ~67 (100) и 100 (100); 2) ~14 (100) и 0 (0)	Pechous et al., 2008
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 FTT_1103 (<i>lipB</i>)	Мыши BALB/c	ИН (1×10^8)	<i>tularensis</i> Schu S4 ИН (95)	75	Qin et al., 2009
	Мыши C57BL/6	ИН 1) (2.6×10^7 и 1.3×10^8); 2) (2.6×10^8)	<i>tularensis</i> Schu S4 ИН 1) (37 и 68); 2) (68)	1) 100 и 100; 2) 50	
<i>Ft holartica</i> LVS FTL_1416 (<i>capB</i>)	Мыши BALB/c	1) ВК (10^6); 2) ИН (10^5)	<i>tularensis</i> Schu S4 ИН (10)	1) 0 (67); 2) 100 (100)	Jia et al., 2010
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 FTT_0918 (<i>lipA</i>) и FTT_0805 (<i>capB</i>)	Мыши BALB/c	1) ВК (10^5); 2) ПО (10^8)	<i>tularensis</i> Schu S4 АЭ (20)	1) 40 (0); 2) 0 (0)	Conlan et al., 2010
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 FTT_1769c (<i>clpB</i>)	Мыши I: BALB/c II: C3H/HeN	1) ВК (10^5); 2) ПО (10^8)	<i>tularensis</i> Schu S4 АЭ (20)	I: 1) 60 (0); 2) 40 (0). II: 1 и 2) 0 (0)	Conlan et al., 2010
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 FTT_1769c (<i>clpB</i>)	Мыши BALB/c	ВК (10^5)	<i>tularensis</i> Schu S4 1) ИН (10 , 10^2 , 10^3); 2) ВК (10^5)	1) 100 (30), 80 (0), 20 (0); 2) 100 (100)	Shen et al., 2010

Таблица 1. Продолжение

<i>F. tularensis</i> (Ft) подвид <i>holarctica</i> или <i>tularensis</i> , штамм, мутация (делеция/модификация) локуса гена	Модель животных	Способ вакцинации*, доза (КОЕ)	Заражение вирулентным штаммом подвита Ft, способ введения, доза (КОЕ)	% выживших животных (по сравнению с контролем LVS или 15 НИИЭГ)**	Источник
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 FTT_0805 (<i>capB</i>)	Мыши BALB/c	1) ПК (1.6×10^4 , 5, 6); 2) ПК (10^4)	<i>tularensis</i> Schu S4 1) ПК (1.2×10^2); 2) ПК (10^3)	1) 80–100; 2) 60 (100)	Michell et al., 2010
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 FTT_1181c (<i>ggt</i>)	Мыши BALB/c	ПК (8.75×10^3 , 4, 5, 6)	<i>tularensis</i> Schu S4 ПК (10^2 LD ₅₀)	100	Ireland et al., 2011
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 FTT_1769c (<i>clpB</i>)	Мыши 1) BALB/c; 2) C57BL/6	ВК (10^5)	<i>tularensis</i> Schu S4 АЭ (10^2)	1) ~75; 2) 0	Twine et al., 2012a
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 FTT_1462c (<i>wbtC</i>)	Мыши BALB/c	ВК (10^3 – 10^5)	<i>tularensis</i> Schu S4 1) ВК (10^3); 2) ИН (~20)	1) 100; 2) 0	Twine et al., 2012b
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 FTT_0918 (<i>fupA</i>)	Мыши C57BL/6J	ПК (~ 5×10^2 , ~ 2×10^3 и ~ 2×10^4)	<i>tularensis</i> Schu S4 ПК (5×10^2)	0–25	Ramakrishnan et al., 2012
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 FTT_0025 (<i>islE</i>) и FTT_0918 (<i>fupA</i>)	Мыши C57BL/6J	ПК 1) 37; 2) 397, 1588, 15880	<i>tularensis</i> Schu S4 ПК 1) (12); 2) (5×10^2)	1) 100; 2) 100	Ramakrishnan et al., 2012
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 FTT_0369c	Мыши BALB/c	1) ВК (50); 2) ИН (10); 3) ВК (5×10^4)	<i>tularensis</i> Schu S4 1) ВК (50), ИН (10); 2) ВК (50), ИН (10); 3) ИН (50 и 2×10^2)	1) 100, 90; 2) 50, 80; 3) 100 и 0	Rockx-Brouwer et al., 2012
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 FTT_1676	Мыши BALB/c	1) ВК (50); 2) ИН (10).	<i>tularensis</i> Schu S4 1) ВК (50), ИН (10); 2) ВК (50), ИН (10);	1) 100, 100; 2) 25, 50	Rockx-Brouwer et al., 2012
<i>Ft holarctica</i> FSC200 FTL_0094 (<i>clpB</i>)	Мыши BALB/c	1) ВК (10^5); 2) ВК (10^3 , 10^5 , 10^7)	<i>tularensis</i> Schu S4 1) ИН (86); 2) ИН (105)	1) 40 (0); 2) 0–20	Golovliov et al., 2013

Таблица 1. Продолжение

<i>F. tularensis</i> (<i>Ft</i>) подвид <i>holarctica</i> или <i>tularensis</i> , штамм, мутация (делеция/модификация) локуса гена	Модель животных	Способ вакцинации*, доза (КОЕ)	Заражение вирулентным штаммом подвита <i>Ft</i> , способ введения, доза (КОЕ)	% выживших животных (по сравнению с контролем LVS или 15 НИИЭГ)**	Источник
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 <i>FTT_1769c</i> (<i>clpB</i>)	Мыши BALB/c	ВК (10^3 , 10^5 , 10^7)	<i>tularensis</i> Schu S4 1) ИН (10^5); 2) ВК (10^3)	1) ~60–100 (0); 2) 100 (100)	Golovliov et al., 2013
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 <i>FTT_1769c</i> (<i>clpB</i>)	Мыши BALB/c	ВК (10^5)	<i>tularensis</i> Schu S4 1) ВК (2×10^3); 2) ИН (75)	1) 100; 2) 100	Ryden et al., 2013
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 <i>FTT_1462c</i> (<i>wbtC</i>)	Мыши BALB/c	ВК (10^5)	<i>tularensis</i> Schu S4 1) ВК (2×10^3); 2) ИН (75)	1) ~71; 2) 0	Ryden et al., 2013
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 <i>FTT_1631c</i> (<i>glpX</i>)	Мыши BALB/c	ВК (10^5)	<i>tularensis</i> Schu S4 1) ВК (2×10^3); 2) ИН (75)	1) ~71; 2) 0	Ryden et al., 2013
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 <i>FTT_1181c</i> (<i>ggf</i>)	Мыши BALB/c	ВК (10^5)	<i>tularensis</i> Schu S4 1) ВК (2×10^3); 2) ИН (75)	1) 100; 2) ~67	Ryden et al., 2013
<i>Ft holarctica</i> LVS <i>FTL_0057</i> , <i>FTL_0291</i> , <i>FTL_0325</i>	Мыши BALB/c	ИН (10^7)	<i>tularensis</i> Schu S4 ИН (10^2)	100	Mahawar et al., 2013
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 <i>FTT0918-FTT0919</i> (<i>fupA-fupB</i>)	Мыши BALB/c	1) ВК (10); 2) ИН (10)	<i>tularensis</i> Schu S4 1) ВК (2.4×10^3); 2) ИН (25)	1) 100; 2) 25	Lindgren et al., 2014
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 <i>guaBA</i>	Кролики NZW	СК (1×10^9)	<i>tularensis</i> Schu S4 АЭ (10^3-10^4)	27 (0)	Reed et al., 2014
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 <i>FTT_0471</i> (<i>aroD</i>)	Кролики NZW	СК (1×10^9)	<i>tularensis</i> Schu S4 АЭ (10^3-10^4)	36 (0)	Reed et al., 2014
<i>Ft holarctica</i> FSC200 <i>dsbA</i>	Мыши BALB/c	ПК ($10-10^5$ и 10^7); ИН ($10-10^6$)	<i>tularensis</i> Schu S4 1) ПК (10^2); 2) ИН (10^2)	1) 70; 2) ~17	Straskova et al., 2015

Таблица 1. Окончание

<i>F. tularensis</i> (Ft) подвид <i>holartica</i> или <i>tularensis</i> , штамм, мутация (делеция/модификация) локуса гена	Модель животных	Способ вакцинации*, доза (КОЕ)	Заражение вирулентным штаммом подвита Ft, способ введения, доза (КОЕ)	% выживших животных (по сравнению с контролем LVS или 15 НИИЭГ)**	Источник
<i>Ft holartica</i> LVS FTL_0687 (<i>emrA</i>)	Мыши C57BL/6	ИН (~10 ⁶)	<i>tularensis</i> Schu S4 ИН (32)	15	Suresh et al., 2015
<i>Ft holartica</i> 15 НИИЭГ <i>purMCDN</i>	Мыши BALB/c	ПК (10 ⁶ –10 ⁸)	1) <i>holartica</i> 503 ПК (4 × 10 ³) и ИН (4 × 10 ⁴); 2) <i>tularensis</i> Schu ПК (4 × 10 ³) и ИН (4 × 10 ⁴)	1) 20–40 и 0; 2) 0–20 и 0	Мокриевич, 2016
<i>Ft holartica</i> FSC200 (<i>gapA</i>)	Мыши BALB/c	ПК (1.5 × 10 ² , 3 × 10 ² , 3 × 10 ⁵ , 3 × 10 ⁷)	<i>holartica</i> FSC200 ПК (3 × 10 ² КОЕ)	100	Pavkova et al., 2017
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 <i>fprB</i>	Мыши C57BL/6J	ИН 1) (7.3 × 10 ⁵); ИН 2) (1.1 × 10 ⁶)	<i>tularensis</i> Schu S4 1) ИН (7, 70, 162); 2) ИН (39, 78, 360)	1) 36; 2) 42	Balzano et al., 2018
<i>Ft tularensis</i> Schu P9 <i>pdpC</i>	Мыши C57BL/6J	ПК (10 ⁶)	<i>tularensis</i> Schu P9 ИН (10 ² LD ₅₀)	38	Tian et al., 2018
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 FTT_1029 (<i>dacD</i>)	Мыши BALB/c	ИН 1) 55, 2) 544	<i>tularensis</i> Schu S4 I: ИН (3); II: ИН (77)	I: 1 и 2) 100; II: 1) 40, 2) 100	Kijek et al., 2019
<i>Ft holartica</i> 15 НИИЭГ <i>iglC</i> и <i>recA</i>	Мыши BALB/c	ПК (10 ²)	<i>tularensis</i> Schu S4 ИН (3 × 10 ³)	30	Карцева и др., 2020
<i>Ft holartica</i> 15 НИИЭГ <i>sodB</i> и <i>recA</i>	Мыши BALB/c	ПК (10 ²)	<i>tularensis</i> Schu S4 ИН (3 × 10 ³)	70 (50)	Карцева и др., 2020
<i>Ft tularensis</i> Schu S4 FTT_0471 (<i>aroD</i>)	Мыши C57BL/6J	ИН 1) (5 × 10 ^{1–3}); 2) (1 × 10 ^{4–5})	<i>tularensis</i> Schu S4 ИН (10 ²)	1) ~87; 2) 100	Cunningham et al., 2020

Примечание: * ПК – подкожно, ВК – внутривенно, СК – скарификация, ВП – внутриперитонеально, ИН/АЭ/ПО – интраназально/аэрозольно/перорально (соответствующие воздушно-капельному, то есть аэрозольному заражению). Результаты бустерной иммунизации в таблице не включены. ** В скобках – % выживших контрольных животных, иммунизированных LVS или 15 НИИЭГ, после заражения таким же вирулентным штаммом.

Schu S4 подвида *tularensis* (Sebastian et al., 2007). Тройная ИН вакцинация мышей BALB/cByJ мутантом LVS с делецией фрагмента гена *wzu* (LVS::wzu) вызывала как гуморальный, так и клеточный иммунитет, а уровень защиты против ИН заражения 8 КОЕ штамма Schu S4 был ниже (84%), чем у родительского штамма (100%), тогда как LVS::Δ*wbtA* индуцировал только клеточный иммунитет и не защищал против ИН заражения штаммом Schu S4 (Kim et al., 2012). При использовании другого мутанта — Schu S4 Δ*wbtC* (*wbtC* кодирует биосинтез ЛПС) отмечено, что он защищал мышей от ВК введения штамма Schu S4, но не от АЭ (Twine et al., 2012b; Ryden et al., 2013) (табл. 1). Только бустерная вакцинация мутантом LVS с делецией локуса гена *kdhAB* (*KdhAB* — двухкомпонентная гидролаза Kdo, участвует в биосинтезе ЛПС) приводила к защите (90%) от ИН заражения малыми дозами вирулентного штамма Schu S4 (Okan et al., 2013). У мутантов Schu S4 *waalY* и *waalL*, потерявших капсулу и часть цепи О-антигена ЛПС, отмечены высокие протективные свойства при ИН заражении Schu S4 только в условиях бустерной иммунизации ими мышей BALB/c (Rasmussen et al., 2014).

Другие факторы вирулентности

Различные факторы вирулентности были изучены также для создания новых вакцинных штаммов *F. tularensis* — мутантов с повреждением генов: метаболизма питательных веществ (*purMCD*, *purMCDN*, *gapA*, *ggT*, *aro*), стресс-регуляции на оксидантный стресс (*sodB*, *emrA1*) и тепловой шок (*clpB*), белков мембраны (*FTL_0325*, *FTL_0057*, *FTL_0291*), образования дисульфидных связей (*dsbA*), липопroteина (*FTT_1103*), метаболизма железа (*FTT_0025* и *FTT_0918*), нуклеотидного биосинтеза гуанина (*guaBA*) и других функций (табл. 1). Например, аттенуированные мутанты при одном и том же способе (ПК) введения аттенуированного мутанта Schu S4 Δ*ggT* или FSC200 Δ*gapA* и последующего заражающего вирулентного штамма защищали экспериментальных животных в 100% случаев (табл. 1) (Ireland et al., 2011; Pavkova et al., 2017). Мыши, вакцинированные ПК или ВК мутантами *Ft ssp. holarctica* 15 Δ*purMCDN* или *Ft ssp. tularensis* Schu S4 Δ*purMCD*, имели неполную защиту или ее отсутствие при ИН заражении Schu (табл. 1) (Мокриевич, 2016; Pechous et al., 2008).

Много усилий прилагается к поиску аттенуированных мутантов *Francisella*, обеспечивающих оптимальную защиту против респираторного способа заражения высоковирулентными штаммами *F. tularensis*. Мутация в одном гене, ответственном за биосинтез ароматических аминокислот, — *aroD* высоковирулентного штамма Schu S4 привела не только к полной аттенуации *F. tularen-*

sis ssp. tularensis Schu S4 Δ*aroD*, но и к высоким его иммуногенным свойствам, выявляемым при ИН введении вирулентного штамма Schu S4 мышам (табл. 1) (Cunningham et al., 2020). Мыши, ИН вакцинированные делеционным мутантом Schu S4 *FTT1103*, имели иммунитет к ИН заражению штаммом Schu S4 в пределах 50–100% (табл. 1) (Qin et al., 2009). Недостаточная защита мышей от ИН заражения вирулентным штаммом Schu S4 также была отмечена (Suresh et al., 2015; Balzano et al., 2018) у мутантов LVS *emrA1* и Schu S4 Δ*fptB* (ген *fptB* кодирует фагосомальный транспортер) (табл. 1). Аналогичный результат был получен (Twine et al., 2005; Straskova et al., 2015) с использованием мутантов Schu S4 Δ*FTT0918* и Δ*dsbA*/FSC200 (табл. 1).

Отмечено, что комбинация иммунизирующих доз и количества введенных вирулентных туляремиальных бактерий штамма Schu S4 влияла на результат защиты мышей. Так, иммунизированные ИН малыми дозами мутанта Schu S4 *dacD* (*dacD* участвует в биосинтезе пептидогликана) животные были защищены от малых доз ИН заражения Schu S4 и частично от более высоких (табл. 1) (Kijek et al., 2019). Также при вакцинации мутантов Schu S4 Δ*FTT0369c* и Δ*FTT1676* показана защита животных от малых доз (10 и 50 КОЕ) ИН введения штамма Schu S4, но не от ИН заражения 2×10^2 КОЕ при испытании более иммуногенного мутанта Δ*FTT0369c* (табл. 1) (Rockx-Brouwer et al., 2012).

Мутанты LVS и Schu S4 Δ*clpB* показали высокую чувствительность к тепловому шоку и низкому pH, проявляли дефектную внутриклеточную репликацию, сопровождающуюся нарушением секретионной системы VI типа (Alam et al., 2018). Отмечено, что делеция только одного гена *clpB* приводила к значительной аттенуации штаммов *F. tularensis ssp. holarctica* FSC200 и *F. tularensis ssp. tularensis* Schu S4 при ВК введении мышам, сопоставимой с LVS (Golovliov et al., 2013). При этом мутант FSC200 Δ*clpB* имел большую остаточную вирулентность для иммунодефицитных мышей при ИН или ВК пути введения, чем LVS и Schu S4 Δ*clpB*. При сравнении протективности двух мутантов более иммуногенным оказался Schu S4 Δ*clpB*, в отличие от FSC200 Δ*clpB* и LVS (табл. 1) (Golovliov et al., 2013).

Гены FPI ответственны за внутриклеточную репликацию, способность бактерий к выходу из фагосомы и вирулентность, а мутанты этих генов рассматриваются как потенциально вакцинные штаммы (Jones et al., 2014). *F. tularensis* Schu S4 и LVS показывают значительные различия в уровне экспрессии генов FPI, вовлеченных в репликацию: у Schu S4 он был примерно в 3 раза выше, чем у LVS (Jones et al., 2014). Гены FPI, которые кодируют способность лизировать фагосомальную мембрану, играют центральную роль в спо-

способности патогенов достигать цитозоля. Мутация любого из генов FPI приводит к тому, что бактерии подвида *tularensis* становятся безвредными для мышей, например, делеция в гене FPI — *iglH* или *iglC* (локусы *igl* кодируют внутриклеточный рост) (Twine et al., 2005; Conlan et al., 2010; Straskova et al., 2015). Однако эти мутанты не защищали от АЭ заражения вирулентным штаммом Schu S4 (табл. 1). Другой ген FPI — *pdpC* также востребован в патогенности *F. tularensis* (Tian et al., 2018). ПК иммунизированные аттенуированным мутантом Schu P9 $\Delta pdpC$ мыши имели незначительный иммунитет (38%) против ИН заражения высоковирулентным штаммом Schu P9 в дозе 100 LD₅₀ (табл. 1). Вакцинированные этим же мутантом (ПК 10⁶ КОЕ) две макаки *Macaca fascicularis* после интрахеального (ИТ) заражения массивной летальной дозой 10⁶ КОЕ штамма Schu P9 выжили. Мутант был стабилен после 10 серийных пассажей через организм мышей (Tian et al., 2018, 2019).

При анализе литературных источников обращают на себя внимание мутанты с более высоким стандартом: со способностью защищать экспериментальных животных против заражения высоковирулентным штаммом Schu S4, с протективной эффективностью, эквивалентной или выше, чем у LVS. Этими мутантами были (табл. 1): *F. tularensis* ssp. *holarctica* 15/23-1/*sodB* $\Delta recA$, LVS $\Delta purMCD$, LVS *sodB*, LVS $\Delta capB$, FSC200 $\Delta clpB$, *F. tularensis* ssp. *tularensis* Schu S4 $\Delta FTT0918$, SCHU S4 $\Delta purMCD$, Schu S4 $\Delta clpB$, Schu S4 $\Delta 0918\Delta capB$, Schu S4 $\Delta guaBA$, Schu S4 $\Delta aroD$ (Карцева и др., 2020; Twine et al., 2005; Bakshi et al., 2008; Pechous et al., 2008; Conlan et al., 2010; Jia et al., 2010; Shen et al., 2010; Golovliov et al., 2013; Reed et al., 2014).

Так как получение аттенуированных штаммов *F. tularensis* с одной мутацией не всегда приводило к ожидаемым результатам, особенно при ИН введении высоковирулентного штамма *F. tularensis* ssp. *tularensis*, были предприняты попытки создания высокоиммуногенных мутантов с делециями в двух генах. Так, если при ПК вакцинации мышей Schu S4 с одной делецией ΔfsI и последующего ПК заражения штаммом Schu S4 протективные свойства не были обнаружены, а при вакцинации $\Delta fupA$ в живых оставалось минимальное количество животных, то двойной мутант $\Delta fsI\Delta fupA$ создавал 100%-ную защиту (табл. 1) (Ramakrishnan et al., 2012). Двойной мутант Schu S4 $\Delta 0918\Delta capB$ на модели мышей BALB/c обладал протективной активностью против АЭ заражения Schu S4 более высокой, чем LVS (табл. 1) (Conlan et al., 2010). Комбинация двух делетированных генов *FTT_0369c* и *FTT_1676* не улучшила эффективность протективных свойств мутанта Schu S4 $\Delta FTT0369c\Delta FTT1676$ (Rockx-Brouwer et al., 2012). ВК иммунизация Schu S4 $\Delta clpB\Delta capB$ (10⁷ КОЕ)

также не обеспечила полной защиты мышей от АЭ заражения Schu S4 (10² КОЕ) — только 20% выживших, тогда как иммунизация Schu S4 $\Delta clpB$ создала защиту ~60% животных от высоковирулентного штамма (табл. 1) (Golovliov et al., 2013).

Наиболее полными из всех разработок вакцинных штаммов стали исследования (Мокриевич, 2016), которые были посвящены улучшению свойств существующей вакцины 15 НИИЭГ. Вакцинный штамм *F. tularensis* подвида *holarctica* 15/23-1/ $\Delta recA$ с делециями в двух генах: одной копии гена *iglC* и *recA* (*iglC* кодирует белок внутриклеточного роста рекомбиназу A, *recA* — систему рекомбинации *F. tularensis*) обладал сниженной реактогенностью, большей стабильностью при сохранении протективного потенциала родительского штамма. ПК иммунизация штаммом 15/23-1/ $\Delta recA$ мышей BALB/c и морских свинок создавала защиту от ПК заражения штаммом 503 и Schu (мыши) на уровне штамма 15 НИИЭГ. В процессе исследования этого штамма со свойствами вакцинного был разработан алгоритм, предусматривающий комплексное использование оптимизированных критериев оценки перспективных вакцинных штаммов *F. tularensis*, основанных на информативных, хорошо изученных и широко применяемых тестах. Этот штамм может рассматриваться в качестве перспективной кандидатной вакцины против туляремии. Продолжением исследований 15/23-1/ $\Delta recA$ стало изучение (Карцева и др., 2020) иммуногенных свойств штамма 15/23-1/*sodB* $\Delta recA$ (с модификацией гена *sodB*), у которого был обнаружен более выраженный уровень защиты мышей (70%) от высокой дозы ИН заражения Schu S4, по сравнению с таковым у мышей, иммунизированных 15 НИИЭГ и 15/23-1/ $\Delta recA$: 50 и 30% соответственно (табл. 1).

Заслуживают внимания усилия по разработке потенциальных вакцинных кандидатов против туляремии на основе малопатогенного штамма *F. tularensis* ssp. *novicida*. Мутант штамма U112 с отсутствующим геном — липопотеином наружной мембраны — *FTN0109* снизил свою вирулентность (>10⁵ КОЕ) для мышей двух линий — BALB/c и C57BL/6, по сравнению с родительским штаммом U112 (<10 КОЕ) (Cunningham et al., 2015). Однако ИТ вакцинация (10⁶ КОЕ) этим мутантом крыс Fischer 344 (второй модели легочной туляремии, близкой по чувствительности к человеку) создавала частичную (50%) защиту против ИН введения высоковирулентного штамма *F. tularensis* Schu S4 (1.25 × 10⁴ КОЕ) (Cunningham et al., 2015). После ИТ или ПО вакцинации крыс Fischer 344 мутантом U112 $\Delta iglB$ и последующего АЭ заражения штаммом *F. tularensis* Schu S4 (1.25 × 10⁴ КОЕ) живыми остались также только половина животных (Signarovitz et al., 2012). Лучшие результаты были получены при ПО вакцинации

(10^7 КОЕ) U112 *DigI*B:*fljB* мышей BALB/c и крыс Fischer 344: мутант обеспечивал им 83%-ную защиту против ИТ введения (10^4 КОЕ) штамма *F. tularensis* Schu S4 (Cunningham et al., 2014). Промонстрировано различное воздействие одной и той же мутации у разных подвидов *F. tularensis*. Так, если аттенуированный мутант *F. tularensis* ssp. *novicida* *Fn iglD*, введенный ИТ (10^5 и 10^7 КОЕ), защищал крыс Fischer 344 против последующего ИТ (10^4 КОЕ) заражения высоковирулентным штаммом *F. tularensis* ssp. *tularensis* (100 и 83% соответственно), то мутант другого подвида *F. tularensis* ssp. *tularensis* *Ftt iglD*, инокулированный ПО (10^7 КОЕ), создавал 50%-ную защиту крыс. Из 6 макаков *Macaca fascicularis*, иммунизированных *Fn iglD* бронхоскопией (10^8 КОЕ), выжило 5 (83%) после АЭ заражения ($>10^3$ КОЕ) штаммом Schu S4 (Chu et al., 2014). Испытанные мутанты *F. novicida* с отмеченными протективными свойствами могут быть платформой для создания живой противотуляремийной вакцины.

Модели туляремийной инфекции на животных

Оптимальные модели, воспроизводящие особенности заболевания у человека, — мыши, кролики и крысы. Морские свинки могут быть использованы при исследовании остаточной вирулентности, безвредности, прививаемости, иммунности и стабильности испытываемых штаммов как 15 НИИЭГ, так и новых аттенуированных *F. tularensis* ssp. *holarctica*, что указывается в требованиях к штаммам туляремийного микроба — кандидатам в вакцинные (Основные требования..., 2007). Данные по изучению кандидатов в вакцинные штаммы *F. tularensis* ssp. *tularensis* на модели морских свинок противоречивы из-за возможно более высокой чувствительности их легочной системы к штаммам этого подвида.

В большинстве экспериментов доклинические испытания новых вакцинных штаммов проходят на мышах. При выборе экспериментальной модели следует учитывать, что LVS гораздо более вирулентен для мышей, чем людей, когда он вводится ингаляционно (Conlan, 2011). Мыши одинаково восприимчивы к штаммам как *F. tularensis* ssp. *tularensis*, так и *F. tularensis* ssp. *holarctica*, но отмечены различия в зависимости от дозы, вирулентности патогенного штамма и пути введения, а также от линий мышей (Chen et al., 2003; Elkins et al., 2016). На мышинной модели разработаны стандарты определения уровня аттенуации туляремийных микробов, при этом в качестве критериев использованы следующие характеристики: LD₅₀ при ИТ, внутрибрюшинном и ВК пути введения должна быть ≤ 1000 КОЕ, ≤ 100 КОЕ и $\geq 10^7$ КОЕ соответственно (Marohn, Barry, 2013).

В ряде экспериментов показано, что защита от ИТ заражения малыми дозами вирулентного штамма *F. tularensis* ssp. *tularensis* была обеспечена у мышей линии BALB/c, вакцинированных LVS, но не мышей C57BL/6 (Chen et al., 2003; Bakshi et al., 2008; Roberts et al., 2018). Такая же закономерность отмечена и для мышей двух линий (BALB/c и C57BL/6), иммунизированных мутантами (табл. 1): LVS *FTL_0552*, Schu S4 *ΔclpB* (Sammons-Jackson et al., 2008; Twine et al., 2012a). Однако ИТ иммунизация мутантом LVS *sodB_{fl}* обеспечивает высоковоспроизводимую 40%-ную защиту у мышей C57BL/6 при ИТ заражении высоковирулентным штаммом Schu S4 (табл. 1), по сравнению с мышами, вакцинированными родительским LVS (Bakshi et al., 2008). При ИТ иммунизации мутантом Schu S4 *ΔFTT1103* выживало 50–100% мышей линии C57BL/6 и 75% — BALB/c (табл. 1) после последующего ИТ заражения Schu S4 (Qin et al., 2009). Предположительно (Suresh et al., 2015), показателем защитной эффективности какого-либо кандидата в вакцину в организме человека является уровень протекции мышей линии C57BL/6 — высокочувствительных к заражению штаммом *F. tularensis* ssp. *tularensis* Schu S4. Отмечено преимущество беспородных мышей SW в качестве альтернативной модели вакцинации для тестирования вакцин против респираторного заражения *F. tularensis* Schu S4 (Sunagar et al., 2018). Авторы показали, что с точки зрения иммунологического разнообразия эта модель более соответствует человеческой, по сравнению с инбредными мышами C57BL/6. Мутант *Ft* LVS *sodB*, введенный ИТ, обеспечивал (табл. 1) 100%-ную защиту от ИТ заражения мышей SW штаммом Schu S4, в отличие от мышей C57BL/6, у которых отмечена 50%-ная защита (Sunagar et al., 2018). На модели инбредных мышей C57BL/6, иммунизированных LVS *sodB*, показано, что самцы инбредных мышей оказались более чувствительны к последующему заражению *F. tularensis* Schu S4, чем самки, однако беспородные мыши SW не проявили гендерных различий при заражении этим вирулентным штаммом. Большая часть работ отражают результаты исследования протективных свойств мутантов на модели мышей BALB/c (табл. 1). Вероятнее всего, в эффективной иммунизации против штамма *F. tularensis* Schu S4 решающим является используемый аттенуированный штамм для развития защитного иммунитета, а не линия мышей (Griffin et al., 2015). Предположительно (Timofeev et al., 2020), конструирование аттенуированного штамма ssp. *mediaasiatica* со свойствами вакцинного позволяет формировать иммунный ответ в течение достаточно длительного времени и более эффективную защиту при заражении высоковирулентными штаммами подвидов *tularensis* и *mediaasiatica*.

Защиту против высоких доз респираторного заражения *F. tularensis* намного сложнее достичь, чем против ВК или ПК инфицирования (табл. 1). Выявлено, что кролики являются хорошей моделью легочной формы туляремии у человека при воздействии аэрозолей, содержащих вирулентные *F. tularensis* ssp. *tularensis* (например, Schu S4). Кролики занимают промежуточное положение между мышами и крысами (Reed et al., 2014). СК-вакцинация кроликов мутантами штамма Schu S4 с делециями в генах *guaBA* и *aroD* обеспечила слабую защиту от АЭ заражения штаммом Schu S4 (27 и 36% соответственно), в отличие от LVS-вакцинированных кроликов (табл. 1), павших от таких же доз заражения (Reed et al., 2014). Следует отметить большую эффективность АЭ способа вакцинации кроликов LVS, по сравнению с СК, против АЭ заражения Schu S4 (Stinson et al., 2016).

Использование в качестве моделей мышей, крыс и кроликов наиболее целесообразно для оценки эффективности разрабатываемой живой вакцины, особенно с учетом небольшого размера этих лабораторных животных (в отличие от обезьян) и их способности воспроизводить различные аспекты туляремии у человека (Roberts et al., 2018).

Следует указать, что вышеперечисленные мутанты *F. tularensis* — кандидаты в потенциально вакцинные штаммы, были исследованы по схемам, отличающимся друг от друга: различные дозы вакцинации новых аттенуированных штаммов, интервал между вакцинацией и заражением, проведение экспериментов на одной или нескольких моделях животных различных линий и т.д. В связи с этим исследования новых мутантов как потенциальных кандидатов в вакцину желательнее проводить по единой схеме.

Различия между штаммами *F. tularensis* трех подвидов указывают на то, что разработка вакцины против туляремии, вероятнее всего, будет сосредоточена на штаммах ssp. *tularensis*, которые смогут создать иммунитет против заражения высоковирулентными штаммами возбудителя туляремии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время только живые вакцины на основе вакцинных штаммов *F. tularensis* — 15 НИИЭГ и LVS, несмотря на указанные их недостатки, обеспечивают эффективную иммуноспецифическую защиту против туляремии. Рассматриваются возможности использования новых кандидатов в потенциально вакцинные штаммы. Многие исследования сосредоточены на разработке вакцины, способной защитить от наиболее вирулентных штаммов *F. tularensis*, в частности, от штаммов

подвида *tularensis*, получаемых респираторным путем. Наиболее вероятный путь продолжения поиска новых вакцинных штаммов — конструирование аттенуированных мутантов, дефектных в более чем одном из генов, ответственных за ослабление вирулентности туляремийного микроба. Опасения по поводу безопасности вызваны тем, что туляремийные штаммы с одной ослабляющей мутацией имеют риск возврата к вирулентности во время репликации *in vivo*. Продолжает оставаться актуальным создание живых вакцин нового поколения, обладающих высокой иммуногенностью против заражения высоковирулентными штаммами *F. tularensis*.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Айкимбаев А.М., Чимиров О.Б., Лухнова Л.Ю. и др. Штамм бактерии *Francisella tularensis mediaasiatica* 240, аттенуированный, используемый для приготовления вакцины. Патент РК KZ (A) № 12742, 17.02.2003; опублик. 15.09.2006 г., бюл. № 9.
- Емельянова О.С. Изучение изменчивости микроба туляремии в искусственных и естественных условиях: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: НИИЭМ им. почет. акад. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР, 1963. 26 с.
- Емельянова О.С., Олсуфьев Н.Г. Попыты получения и испытания аттенуированной культуры, иммунизирующей против американского штамма Schu // Вопр. противоэпидем. защ. насел. 1962. Вып. 2—3. С. 269—274.
- Карцева А.С., Калмантаева О.В., Силкина М.В. и др. Характеристика иммуногенных и протективных свойств модифицированных вариантов штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ // Пробл. особ. опас. инф. 2020. № 3. С. 62—69.
- Кормилицына М.И., Маракуша Б.И., Петровская В.Г., Мещерякова И.С. Штамм бактерий *Francisella tularensis* для приготовления живой вакцины против туляремийной инфекции. Автор. свидет. на изобретение № 294124 19.01.1987, по заявке № 316545, SU 1 839 960 A1; опублик. 20.06.2006, бюл. № 17.
- Кормилицына М.И., Михайлова Т.В., Мещерякова И.С. Выявление генов *pilA* и *FTT0918* в ДНК штаммов *Francisella tularensis* различной вирулентности // Сб. тр. VII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участ. "Молекулярная диагностика — 2010" (Москва, 24—26 ноября 2010) / Ред. В.И. Покровский. М.: Киселёва Н.В., 2010. Т. 1. С. 392—395.

- Кормилицына М.И., Мещерякова И.С., Михайлова Т.В. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Francisella tularensis*, различающихся по таксономической принадлежности и вирулентности // Мол. генет. микробиол. вирусол. 2013. № 3. С. 22–25.
- Куница Т.Н. Штамм бактерий *Francisella tularensis mediaasiatica* 240, tif-R, аттенуированный, рифампициностойчивый, высокоиммуногенный, используемый для приготовления вакцины. Патент РК KZ A4 № 25947, 08.11.2011; опубл. 15.08.12 г., бюл. № 8.
- Мещерякова И.С., Кормилицына М.И., Родионова И.В., Константинова Н.Д. Характеристика новых видов патогенных микроорганизмов рода *Francisella* // Журн. микробиол. 1995. № 5. С. 3–8.
- Мокриевич А.Н. Молекулярно-генетические подходы к исследованию возбудителя туляремии для целей совершенствования диагностики и специфической профилактики: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М.: ГНЦ ПМБ, 2016. 46 с.
- Нарышкина Е.А., Краснов Я.М., Альхова Ж.В. и др. Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ // Пробл. особ. опас. инф. 2020. № 2. С. 91–97.
- Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина, 1975. 192 с.
- Олсуфьев Н.Г., Емельянова О.С. Об иммунологических отношениях разновидностей туляремиального микроба Старого и Нового света // Журн. гиг. эпидемиол. микробиол. иммунол. Прага. 1963. Т. 7 (1). С. 41–49.
- Олсуфьев Н.Г., Мещерякова И.С. Внутривидовая таксономия возбудителя туляремии *Francisella tularensis* McCoy et Chapin // Журн. гиг. эпидемиол. микробиол. иммунол. Прага. 1982. № 3. С. 281–291.
- Основные требования к вакцинным штаммам туляремиального микроба. Методические указания МУ 3.3.1.2161-07. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. 51 с.
- О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018. 268 с.
- Савельева Р.А., Ананова Е.В., Пронин А.В. и др. Определение продолжительности поствакцинального иммунитета против туляремии // Журн. микробиол. 1992. № 6. С. 51–52.
- Санин А.В., Сосновская О.Ю., Голованова Т.А. и др. Иммунологический анализ бактериальной персистенции в костном мозге // Журн. микробиол. 1994 (Приложение). С. 36–40.
- Alam A., Golovliov I., Javed E., Sjöstedt A. ClpB mutants of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* and *tularensis* are defective for type VI secretion and intracellular replication // Sci. Rep. 2018. V. 8 (1). P. 11324.
- Apicella M.A., Post D.M., Fowler A.C. et al. Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of *Francisella tularensis* // PLoS One. 2010. V. 5 (7). P. e11060.
- Ark N.M., Mann B.J. Impact of *Francisella tularensis* pilin homologs on pilus formation and virulence // Microb. Pathog. 2011. V. 51 (3). P. 110–120.
- Bakshi C.S., Malik M., Mahawar M. et al. An improved vaccine for prevention of respiratory tularemia caused by *Francisella tularensis* SchuS4 strain // Vaccine. 2008. V. 26 (41). P. 5276–5288.
- Balzano P.M., Cunningham A.L., Grassel C., Barry E.M. Deletion of the major facilitator superfamily transporter *fptB* alters host cell interactions and attenuates virulence of type A *Francisella tularensis* // Infect. Immun. 2018. V. 86 (3). P. e00832-17.
- Bandara A.B., Champion A.E., Wang X. et al. Isolation and mutagenesis of a capsule-like complex (CLC) from *Francisella tularensis*, and contribution of the CLC to *F. tularensis* virulence in mice // PLoS One. 2011. V. 6 (4). P. e19003.
- Barker J.H., Kaufman J.W., Apicella M.A., Weiss J.P. Evidence suggesting that *Francisella tularensis* O-antigen capsule contains a lipid A-like molecule that is structurally distinct from the more abundant free lipid A // PLoS One. 2016. V. 11 (6). P. e0157842.
- Broekhuijsen M., Larsson P., Johansson A. et al. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* ssp. *tularensis* // J. Clin. Microbiol. 2003. V. 41 (7). P. 2924–2931.
- Catanzaro K.C.F., Inzana T.J. The *Francisella tularensis* polysaccharides: what is the real capsule? // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2020. V. 84 (1). P. e00065-19.
- Celli J., Zahrt T.C. Mechanisms of *Francisella tularensis* intracellular pathogenesis // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2013. V. 3 (4). P. a010314.
- Chen W., Shen H., Webb A. et al. Tularemia in BALB/c and C57BL/6 mice vaccinated with *Francisella tularensis* LVS and challenged intradermally, or by aerosol with virulent isolates of the pathogen: protection varies depending on pathogen virulence, route of exposure, and host genetic background // Vaccine. 2003. V. 21 (25–26). P. 3690–3700.
- Chu P., Cunningham A.L., Yu J.J. et al. Live attenuated *Francisella novicida* vaccine protects against *Francisella tularensis* pulmonary challenge in rats and non-human primates // PLoS Pathog. 2014. V. 10 (10). P. e1004439.
- Conlan J.W. Tularemia vaccines: recent developments and remaining hurdles // Future Microbiol. 2011. V. 6 (4). P. 391–405.
- Conlan J.W., Shen H., Golovliov I. et al. Differential ability of novel attenuated targeted deletion mutants of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* strain SCHU S4 to protect mice against aerosol challenge with virulent bacteria: effects of host background and route of immunization // Vaccine. 2010. V. 28 (7). P. 1824–1831.
- Cunningham A.L., Guentzel M.N., Yu J.J. et al. Enhancement of vaccine efficacy by expression of a TLR5 ligand in the defined live attenuated *Francisella tularensis* subsp. *novicida* strain U112Δ*iglB*::*fljB* // Vaccine. 2014. V. 32 (40). P. 5234–5240.
- Cunningham A.L., Dang K.M., Yu J.J. et al. Vaccination with the live attenuated *Francisella novicida* mutant

- FTN0109 protects against pulmonary tularemia // W. J. Vacc. 2015. V. 5. P. 25–36.
- Cunningham A.L., Mann B.J., Qin A. et al. Characterization of Schu S4 aro mutants as live attenuated tularemia vaccine candidates // Virulence. 2020. V. 11 (1). P. 283–294.
- Darling R.G., Catlett C.L., Huebner K.D., Jarrett D.G. Threats in bioterrorism. I: CDC category A agents // Emerg. Med. Clin. North Am. 2002. V. 20 (2). P. 273–309.
- Dennis D.T., Inglesby T.V., Henderson D.A. et al. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management // JAMA. 2001. V. 285 (21). P. 2763–2773.
- Downs C.M., Woodward J.M. Studies on pathogenesis and immunity in tularemia; immunogenic properties for the white mouse of various strains of *Bacterium tularensis* // J. Immunol. 1949. V. 63 (2). P. 147–162.
- El Sahly H.M., Atmar R.L., Patel S.M. et al. Safety, reactogenicity and immunogenicity of *Francisella tularensis* live vaccine strain in humans // Vaccine. 2009. V. 27 (36). P. 4905–4911.
- Eigelsbach H.T., Downs C.M. Prophylactic effectiveness of live and killed tularemia vaccines. I. Production of vaccine and evaluation in the white mouse and guinea pig // J. Immunol. 1961. V. 87 (4). P. 415–425.
- Eigelsbach H.T., Braun W., Herring R.D. Studies on the variation of *Bacterium tularensis* // J. Bacteriol. 1951. V. 61 (5). P. 557–569.
- Elkins K.L., Kurtz S.L., De Pascalis R. Progress, challenges, and opportunities in *Francisella* vaccine development // Exp. Rev. Vacc. 2016. V. 15. № 9. P. 1183–1196.
- Ellis J., Oyston P.C., Green M., Titball R.W. Tularemia // Clin. Microbiol. Rev. 2002. V. 15 (4). P. 631–646.
- Forslund A.L., Salomonsson E.N., Golovliov I. et al. The type IV pilin, PilA, is required for full virulence of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* // BMC Microbiol. 2010. V. 10. P. 227.
- Gillette D.D., Curry H.M., Cremer T. et al. Virulent type A *Francisella tularensis* actively suppresses cytokine responses in human monocytes // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2014. V. 4. P. 45.
- Golovliov I., Twine S.M., Shen H. et al. A $\Delta clpB$ mutant of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* strain, FSC200, is a more effective live vaccine than *F. tularensis* LVS in a mouse respiratory challenge model of tularemia // PLoS One. 2013. V. 8 (11). P. e78671.
- Griffin A.J., Crane D.D., Wehrly T.D., Bosio C.M. Successful protection against tularemia in C57BL/6 mice is correlated with expansion of *Francisella tularensis*-specific effector T cells // Clin. Vacc. Immunol. 2015. V. 22 (1). P. 1119–1128.
- Gunn J.S., Ernst R.K. The structure and function of *Francisella* lipopolysaccharide // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007. V. 1105. P. 202–218.
- Hollis D.G., Weaver R.E., Steigerwalt A.G. et al. *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup *novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease // J. Clin. Microbiol. 1989. V. 27 (7). P. 1601–1608.
- Hong K.J., Park P.G., Seo S.H. et al. Current status of vaccine development for tularemia preparedness // Clin. Exp. Vaccine Res. 2013. V. 2 (1). P. 34–39.
- Hornick R.B., Eigelsbach H.T. Aerogenic immunization of man with live tularemia vaccine // Bacteriol. Rev. 1966. V. 30 (3). P. 532–538.
- Ireland P.M., LeButt H., Thomas R.M., Oyston P.C.F. A *Francisella tularensis* SCHU S4 mutant deficient in c-glutamyltransferase activity induces protective immunity: characterization of an attenuated vaccine candidate // Microbiology. 2011. V. 157 (11). P. 3172–3179.
- Jia Q., Horwitz M.A. Live attenuated tularemia vaccines for protection against respiratory challenge with virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis* // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2018. V. 8. P. 154.
- Jia Q., Lee B.Y., Bowen R. et al. A *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) mutant with a deletion in *capB*, encoding a putative capsular biosynthesis protein, is significantly more attenuated than LVS yet induces potent protective immunity in mice against *F. tularensis* challenge // Infect. Immun. 2010. V. 78 (10). P. 4341–4355.
- Jones B.D., Faron M., Rasmussen J.A., Fletcher J.R. Uncovering the components of the *Francisella tularensis* virulence stealth strategy // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2014. V. 4. P. 32.
- Kijek T.M., Mou Sh., Bachert B.A. et al. The D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase enzyme is essential for virulence in the Schu S4 strain of *Francisella tularensis* and a *dacD* mutant is able to provide protection against a pneumonic challenge // Microb. Pathog. 2019. V. 137. P. 103742.
- Kim T.H., Pinkham J.T., Heninger S.J. et al. Genetic modification of the O-polysaccharide of *Francisella tularensis* results in an avirulent live attenuated vaccine // J. Infect. Dis. 2012. V. 205 (7). P. 1056–1065.
- Kingry L.C., Petersen J.M. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida* // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2014. V. 4. P. 35.
- Kormilitsyna M.I., Meshcheryakova I.S. The new vaccine strains (or variants) of *Francisella tularensis* // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1996. V. 13 (3). P. 215–219.
- Kugeler K.J., Mead P.S., Janusz A.M. et al. Molecular epidemiology of *Francisella tularensis* in the United States // Clin. Infect. Dis. 2009. V. 48 (7). P. 863–870.
- Larson C.L., Wicht W., Jellison W.L. A new organism resembling *P. tularensis* isolated from water // Public Health Rep. 1955. V. 70 (3). P. 253–258.
- Lindemann S.R., Peng K., Long M.E. et al. *Francisella tularensis* Schu S4 O-antigen and capsule biosynthesis gene mutants induce early cell death in human macrophages // Infect. Immun. 2011. V. 79 (2). P. 581–594.
- Lindgren M., Tancred L., Golovliov I. et al. Identification of mechanisms for attenuation of the FSC043 mutant of *Francisella tularensis* SCHU S4 // Infect. Immun. 2014. V. 82 (9). P. 3622–3635.
- Mahawar M., Rabadi S.M., Banik S. et al. Identification of a live attenuated vaccine candidate for tularemia prophylaxis // PLoS One. 2013. V. 8 (4). P. e61539.
- Marohn M.E., Barry E.M. Live attenuated tularemia vaccines: recent developments and future goals // Vaccine. 2013. V. 31. № 35. P. 3485–3491.

- McCrum F.R. Aerosol infection of man with *Pasterella tularensis* // *Bacteriol. Rev.* 1961. V. 25 (3). P. 262–267.
- Michell S.L., Dean R.E., Eyles J.E. et al. Deletion of the *Bacillus anthracis* capB homologue in *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* generates an attenuated strain that protects mice against virulent tularemia // *J. Med. Microbiol.* 2010. V. 59 (11). P. 1275–1284.
- Molins C.R., Delorey M.J., Yockey B.M. et al. Virulence differences among *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* clades in mice // *PLoS One*. 2010. V. 5 (4). P. e10205.
- Molins C.R., Delorey M.J., Yockey B.M. et al. Virulence difference between the prototypic Schu S4 strain (A1a) and *Francisella tularensis* A1a, A1b, A2 and type B strains in a murine model of infection // *BMC Infect. Dis.* 2014. V. 14. P. 67.
- Mulligan M.J., Stapleton J.T., Keitel W.A. et al. Tularemia vaccine: safety, reactogenicity, “take” skin reactions, and antibody responses following vaccination with a new lot of the *Francisella tularensis* live vaccine strain – A phase 2 randomized clinical trial // *Vaccine*. 2017. V. 35 (36). P. 4730–4737.
- Okan N.A., Chalabaev S., Kim T.H. et al. Kdo hydrolase is required for *Francisella tularensis* virulence and evasion of TLR2-mediated innate immunity // *mBio*. 2013. V. 4 (1). P. e00638-12.
- Olsufiev N.G., Meshcheryakova I.S. Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912 // *Int. J. Syst. Bacter.* 1983. V. 33. P. 872–874.
- Pavkova I., Kopeckova M., Klimentova J. et al. The multiple localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase contributes to the attenuation of the *Francisella tularensis* dsbA deletion mutant // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017. V. 7. P. 503.
- Pechous R.D., McCarthy T.R., Mohapatra N.P. et al. A *Francisella tularensis* Schu S4 purine auxotroph is highly attenuated in mice but offers limited protection against homologous intranasal challenge // *PLoS One*. 2008. V. 3 (6). P. e2487.
- Petersen J.M., Schriefer M.E. Tularemia: emergence/re-emergence // *Vet. Res.* 2005. V. 36 (3). P. 455–467.
- Petersen J.M., Molins C.R. Subpopulations of *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* and *holarctica*: identification and associated epidemiology // *Fut. Microbiol.* 2010. V. 5 (4). P. 649–661.
- Qin A., Scott D.W., Thompson J.A., Mann B.J. Identification of an essential *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* virulence factor // *Infect. Immun.* 2009. V. 77 (1). P. 152–161.
- Ramakrishnan G., Sen B., Johnson R. Paralogous outer membrane proteins mediate uptake of different forms of iron and synergistically govern virulence in *Francisella tularensis* // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287 (30). P. 25191–25202.
- Rasmussen J.A., Post D.M.B., Gibson B.W. et al. *Francisella tularensis* Schu S4 lipopolysaccharide core sugar and O-antigen mutants are attenuated in a mouse model of tularemia // *Infect. Immun.* 2014. V. 82 (4). P. 1523–1539.
- Rasmussen J.A., Fletcher J.R., Long M.E. et al. Characterization of *Francisella tularensis* Schu S4 mutants identified from a transposon library screened for O-antigen and capsule deficiencies // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 338.
- Ray H.J., Cong Y., Murthy A.K. et al. Oral live vaccine strain-induced protective immunity against pulmonary *Francisella tularensis* challenge is mediated by CD4⁺ T cells and antibodies, including immunoglobulin A // *Clin. Vaccine Immunol.* 2009. V. 6 (4). P. 444–452.
- Reed D.S., Smith L.P., Cole K.S. et al. Live attenuated mutants of *Francisella tularensis* protect rabbits against aerosol challenge with a virulent type A strain // *Infect. Immun.* 2014. V. 82 (5). P. 2098–2105.
- Roberts L.M., Powell D.A., Frelinger J.A. Adaptive immunity to *Francisella tularensis* and considerations for vaccine development // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018. V. 8. P. 115.
- Rockx-Brouwer D., Chong A., Wehrly T.D. et al. Low dose vaccination with attenuated *Francisella tularensis* strain SchuS4 mutants protects against tularemia independent of the route of vaccination // *PLoS One*. 2012. V. 7 (5). P. e37752.
- Rohmer L., Brittnacher M., Svensson K. et al. Potential source of *Francisella tularensis* live vaccine strain attenuation determined by genome comparison // *Infect. Immun.* 2006. V. 74 (12). P. 6895–6906.
- Rowe H.M., Huntley J.F. From the outside-in: the *Francisella tularensis* envelope and virulence // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2015. V. 23 (5). P. 94.
- Ryden P., Twine S., Shen H. et al. Correlates of protection following vaccination of mice with gene deletion mutants of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* strain, Schu S4 that elicit varying degrees of immunity to systemic and respiratory challenge with wild-type bacteria // *Mol. Immunol.* 2013. V. 54 (1). P. 58–67.
- Salomonsson E., Kuoppa K., Forslund A.L. et al. Reintroduction of two deleted virulence loci restores full virulence to the live vaccine strain of *Francisella tularensis* // *Infect. Immun.* 2009. V. 77 (8). P. 3424–3431.
- Sammons-Jackson W.L., McClelland K., Manch-Citron J.N. et al. Generation and characterization of an attenuated mutant in a response regulator gene of *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) // *DNA Cell. Biol.* 2008. V. 27 (7). P. 387–403.
- Sandström G., Sjöstedt A., Forsman M. et al. Characterization and classification of strains of *Francisella tularensis* isolated in the central Asian focus of the Soviet Union and in Japan // *J. Clin. Microbiol.* 1992. V. 30 (1). P. 172–175.
- Saslaw S., Eigelsbach H.T., Prior J.A. et al. Tularemia vaccine study. II. Respiratory challenge // *Arch. Intern. Med.* 1961. V. 107. № 5. P. 702–714.
- Sebastian S., Dillon S.T., Lynch J.G. et al. A defined O-antigen polysaccharide mutant of *Francisella tularensis* live vaccine strain has attenuated virulence while retaining its protective capacity // *Infect. Immun.* 2007. V. 75 (5). P. 2591–2602.
- Shen H., Harris G., Chen W. et al. Molecular immune responses to aerosol challenge with *Francisella tularensis* in mice inoculated with live vaccine candidates of varying efficacy // *PLoS One*. 2010. V. 5 (10). P. e13349.
- Signarovitz A.L., Ray H.J., Yu J.J. et al. Mucosal immunization with live attenuated *Francisella novicida* U112Δ*iglB* protects against pulmonary *F. tularensis* SCHU S4 in the Fischer 344 rat model // *PLoS One*. 2012. V. 7 (10). P. e47639.

- Sjöstedt A.B. Genus I. *Francisella* Dorofe'ev 1947, 176^{AL} // Bergey's manual of systematic bacteriology. V. 2 (The Proteobacteria). Pt B (The Gammaproteobacteria) / Eds D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity. N.Y.: Springer, 2005. P. 200–210.
- Straskova A., Spidlova P., Mou S. et al. *Francisella tularensis* type B $\Delta dsbA$ mutant protects against type A strain and induces strong inflammatory cytokine and Th1-like antibody response *in vivo* // Pathog. Dis. 2015. V. 73 (8). P. ftv058.
- Soni S., Ernst R.K., Muszyński A. et al. *Francisella tularensis* blue–gray phase variation involves structural modifications of lipopolysaccharide O-antigen, core and lipid A and affects intramacrophage survival and vaccine efficacy // Front. Microbiol. 2010. V. 1. P. 129.
- Stinson E., Smith L.P., Cole K.S. et al. Respiratory and oral vaccination improves protection conferred by the live vaccine strain against pneumonic tularemia in the rabbit model // Pathog. Dis. 2016. V. 74 (7). P. ftw079.
- Sunagar R., Kumar S., Franz B.J., Gosselin E.J. Tularemia vaccine development: paralysis or progress? // Vaccine. 2016. V. 6. P. 9–23.
- Sunagar R., Kumar S., Namjoshi P. et al. Evaluation of an outbred mouse model for *Francisella tularensis* vaccine development and testing // PLoS One. 2018. V. 13 (12). P. e0207587.
- Suresh R.V., Ma Z., Sunagar R. et al. Preclinical testing of a vaccine candidate against tularemia // PLoS One. 2015. V. 10 (4). P. e0124326.
- Tian D., Uda A., Park E.-S. et al. Evaluation of *Francisella tularensis* $\Delta pdpC$ as a candidate live attenuated vaccine against respiratory challenge by a virulent SCHU P9 strain of *Francisella tularensis* in a C57BL/6J mouse model // Microbiol. Immunol. 2018. V. 62 (1). P. 24–33.
- Tian D., Uda A., Ami Y. et al. Protective effects of the *Francisella tularensis* $\Delta pdpC$ mutant against its virulent parental strain SCHU P9 in *Cynomolgus macaques* // Sci. Rep. 2019. V. 9 (1). P. 9193.
- Timofeev V., Titareva G., Bakhteeva I. et al. The comparative virulence of *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* for vaccinated laboratory animals // Microorganisms. 2020. V. 8 (9). P. 1403.
- Twine S., Byström M., Chen W. et al. A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58-kilodalton protein is attenuated for virulence and is an effective live vaccine // Infect. Immun. 2005. V. 73 (12). P. 8345–8352.
- Twine S., Shen H., Harris G. et al. BALB/c mice, but not C57BL/6 mice immunized with a $\Delta clpB$ mutant of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* are protected against respiratory challenge with wild-type bacteria: association of protection with post-vaccination and post-challenge immune responses // Vaccine. 2012a. V. 30 (24). P. 3634–3645.
- Twine S., Vinogradov E., Lindgren H. et al. Roles for *wbtC*, *wbtI*, and *kdtA* genes in lipopolysaccharide biosynthesis, protein glycosylation, virulence, and immunogenicity in *Francisella tularensis* strain SCHU S4 // Pathogens. 2012b. V. 1. P. 12–29.

Development of New Live Tularemia Vaccines – Problems and Prospects

M. I. Kormilitsyna*

Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

*e-mail: mkormilits@mail.ru

Francisella tularensis is an etiological agent of tularemia, a natural focal infection of humans and animals. This pathogenic microorganism is highly infectious, can cause fatal infection, especially when inhaled. The attenuated tularemia strain 15 of Gaysky, developed by Soviet scientists more than 60 years ago, remains the only one for the production of a live vaccine, with the help of which the problem of specific prevention of tularemia in humans is solved. The subject of the review is the history of the creation of currently used two live vaccines based on the attenuated vaccine strain 15 Gaysky, their advantages and disadvantages. The ways of constructing new attenuated mutants defective in the genes responsible for virulence as candidates for new vaccine strains of tularemia microbe are presented.

Keywords: tularemia, *Francisella*, vaccine, attenuated strain, immunogenicity, virulence