

Е.М.Кузнецова, И.А.Шепелёв, О.А.Волох

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ АНТИГЕНОВ *FRANCISELLA TULARENSIS*

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В обзоре представлены данные литературы об антигенных компонентах туляремийного микроба, описываются их биохимическая структура и иммуногенные свойства. Научные данные указывают на то, что, несмотря на активные исследования, проводимые в области изучения отдельных антигенных компонентов *Francisella tularensis* и определения их роли в иммунопрофилактике и диагностике инфекции, причина высокой патогенности возбудителя туляремии не установлена, а также проблема разработки безопасной субъединичной вакцины и высокоспецифичных методов экспресс-индикации возбудителя остается нерешенной.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, антигены, белки внешней мембраны, липополисахарид, капсула.

Возбудитель туляремии – *Francisella tularensis*, циркулируя в природных очагах, может вызывать вспышки заболевания среди широкого круга хозяев, включая человека, что представляет серьезную проблему для практического здравоохранения. Несмотря на успешные исследования особенностей строения и биологии туляремийного микроба в последнее время, факторы патогенности этого возбудителя и его протективные антигены не установлены [3, 31, 47]. Это, в свою очередь, затрудняет работу по созданию химических вакцин против туляремии [29, 42], а также разработке и усовершенствованию методов иммунодиагностики возбудителя [21].

К настоящему времени установлено, что возбудитель туляремии относится к внутриклеточным паразитам, обитает в фагоцитах, подавляя их способность убивать чужеродные клетки. Обладает ферментом нейраминидазой, который способствует прикреплению бактерии к клеткам-мишеням, и эндотоксином, вызывающим при разрушении микробной клетки общие симптомы интоксикации в организме человека. Кроме того, у возбудителя туляремии обнаружены рецепторы, связывающиеся с Fc-фрагментом антител класса IgG, что нарушает активность системы комплемента и макрофагов [47]. Выявлено, что *F. tularensis* также обладают факторами персистенции, направленными на инактивацию механизмов естественной противоинойфекционной резистентности, такими как антилизоцимная, антилактоферриновая и антикомплемментарная активности, частота встречаемости и выраженности которых зависит от источника выделения микроорганизмов [24]. По иммунологической значимости протективные антигены туляремийного микроба можно условно разделить на два вида [5]. Первая группа – антигены, синтезируемые во вторую фазу биосинтетического цикла развития популяции, как вторичные метаболиты. Возможная область их применения – экстренная профилактика заболевания. Вторая группа это конститутивные антигены возбудителя, антитела на ко-

торые индуцируют переход микробной популяции в латентную или некультивируемую фазу развития.

В данной работе мы попытались объединить имеющиеся на сегодняшний день сведения об основных антигенных компонентах туляремийного микроба.

Белкам внешней мембраны *F. tularensis* в настоящее время уделяется большое внимание при изучении клеточно-опосредованного иммунитета и совершенствования диагностики туляремии. Установлено, что содержание белка во внешней мембране составляет от 12 до 20 %, углеводов от 15 до 30 %, липидов до 40 % [22]. Белковый спектр этой структуры, по данным SDS-ПААГ электрофореза, разнообразен: обнаружено до 25 белковых фракций с молекулярными массами от 10 до 80 кДа. Основными интегральными белками являются белки с молекулярными массами 47, 41–43, 17 и 12 кДа [17, 22]. Существенной разницы в спектре мембранных белков у вирулентных и авирулентных штаммов не обнаружено [44]. Однако из штамма Schu S4 *F. tularensis* subsp. *nearctica* (LD₅₀ <10 КОЕ) был получен спонтанный мутант со сниженной вирулентностью (LD₅₀ ≥10⁸ КОЕ), который, по данным сравнительного протеомного анализа, был лишен способности экспрессировать белок 58 кДа [42]. Установлено, что препараты внешней мембраны обладают протективной активностью для белых мышей и морских свинок [22] и оказывают выраженный иммуномодулирующий эффект на разные формы функциональной активности макрофагов [19]. При росте внутри макрофагов *F. tularensis* выделяет стрессовые белки. В частности, был получен белок с молекулярной массой 23 кДа с изоэлектрической точкой рН 5,8. Аминокислотная последовательность этого протеина отличалась от других известных белков, его функции в настоящее время неизвестны, хотя, по-видимому, он играет роль в ответе на стресс [31]. Показано, что некоторые белки внешней мембраны распознаются специфическими Т-лимфоцитами [46, 50]. Кроме того, Н.М.Surcel и соавт. [50] идентифицировали два термолabileльных

белка с молекулярной массой 17 и 40 кДа. Белок 17 кДа оказывает значительное влияние на пролиферативную активность Т-клеток у людей, вакцинированных живой туляремийной вакциной, тогда как белок 40 кДа не вызывает пролиферацию Т-лимфоцитов, но влияет на выработку антител. Установлено сходство между белком 40 кДа и OmpA-подобными белками наружной мембраны других бактерий [50]. Была проведена оценка диагностической значимости ряда белков внешней мембраны возбудителя туляремии, обладающих различными антигенными детерминантами [36, 49]. При этом особое внимание привлекали белки с молекулярными массами в пределах 17–20 и 63 кДа, которые эффективно выявляются в иммуноблоттинге сыворотками иммунизированных людей и животных [23, 27, 41, 49]. Кроме того, получены моноклональные антитела к белку внешней мембраны *F. tularensis* 43 кДа, специфичность которых в ИФА составила 96 % [28]. А.Нотта и соавт. [38] были сконструированы семь моноклональных антител, специфичных, по крайней мере, к пяти различным антигенным детерминантам *F. tularensis* LVS, из них четыре реагировали также с *F. tularensis subsp. novicida* и *F. philomiragia*. С помощью иммуноблоттинга в составе данных препаратов были обнаружены антитела к белкам *F. tularensis subsp. holarctica* и *subsp. nearctica* с молекулярными массами 10, 17, 40, 41 и 43 кДа. Вышеописанные моноклональные антитела обладали различной агглютинативной активностью, а сконструированные на их основе флюоресцентные конъюгаты – различной специфичностью [38]. Разработана ПЦР тест-система, основанная на определении генов, кодирующих такие белки наружной мембраны, как ForA (43 кДа) [34] или липопротеин TUL4 (17 кДа) [35]. Известно, что ForA белок представлен на поверхности в количестве 10^4 молекул на клетку и тесно связан с липополисахаридами *F. tularensis* [7]. В.Г.Луниным и соавт. [9] был сконструирован рекомбинантный штамм *F. tularensis* 15, обладающий способностью к суперэкспрессии белка TUL4, реализован новый методический подход для клонирования гена белка TUL4, позволивший получить высокий уровень экспрессии этого гена в клетках *E. coli*. Позже на основе *E. coli* был создан высокоэффективный штамм-продуцент химерного белка TUL4-CBD, состоящего из последовательности белка TUL4, (Gly-Ser)-спейсера и целлюлозосвязывающего домена из *Anaerocellum thermophilum*, способного индуцировать выработку специфических антител к белку TUL4 у лабораторных животных [9, 10]. На основе последовательностей генов, кодирующих белки TUL4, ForA и 23 кДа протеин, были созданы праймеры для детекции *F. tularensis* в различных вариантах ПЦР-анализа [26, 48].

Мокриевичу А.Н. и соавт. [12] при изучении геномов вирулентного штамма *F. tularensis subsp. tularensis* Schu и вакцинного штамма *F. tularensis subsp. holarctica* LVS удалось идентифицировать ген *qseC*, относящийся к системе «чувства кворума»

и кодирующий белок с молекулярной массой около 56 кДа. По мнению авторов, некоторые отличия в нуклеотидной последовательности гена *qseC* штаммов различного географического происхождения могут дать основу для разработки метода быстрой диагностики туляремии, позволяющего не только обнаружить возбудитель, но и определить его подвиды [12].

В последнее время интенсивно развивается направление по изучению антигенов, выделяемых в среду культивирования в процессе роста микроорганизма. В частности, В. Lee и соавт. получили белки из культуральных фильтратов вирулентного и вакцинного штаммов голарктического подвида. Установлено, что в составе белков, выделяемых вирулентным штаммом, содержатся белок теплового шока 65 кДа, GroEL и ферменты: супероксиддисмутаза, щелочная гидропероксидредуктаза [40, 42]. Был выделен полипептид, синтезируемый при стрессовом ответе на повышение температуры. По ряду признаков (индукция в условиях стрессового ответа, масса субъединиц, полиморфное строение, морфология при электронной микроскопии) данный полипептид можно идентифицировать как стрессовый белок-шаперон GroEL (Cpn 60) [18].

Таким образом, на сегодняшний день идентифицировано большое количество иммуногенных белков туляремийного микроба, но ни один из них не способен индуцировать протективный иммунный ответ. Возможно, это связано с тем, что активная выработка антител в ответ на введение антигена в макроорганизм не обеспечивает защиту организма против туляремии без активации клеточного звена иммунной системы (прежде всего Т-клеток памяти) [42].

Липополисахарид (ЛПС) как компонент внешней мембраны представляет существенный интерес, так как традиционно с ним связаны многие жизненно важные для грамотрицательных бактерий функции [2, 14]. У вирулентных штаммов *F. tularensis* ЛПС в S-форме, для авирулентных характерен R-ЛПС. Известно, что в процессе диссоциации клеток *F. tularensis* из S- в R-форму нарушается синтез углеводсодержащих компонентов, при этом синтезируемый ЛПС представлен только в R-форме, лишенной специфических O-боковых цепей. Фазовые вариации липида А действуют на способность микроорганизма к внутриклеточному росту. В одной фазе уменьшение выделения оксида азота (II) приводило к бактериальному росту, тогда как в другой фазе повышение продукции NO останавливало рост. При этом установлено, что из 4 подвигов *F. tularensis* наибольшей стимуляцией монооксида азота, а, следовательно, наименьшей антифагоцитарной активностью обладает подвид *F. tularensis subsp. novicida*, что, возможно, связано с отсутствием гена, ответственного за биосинтез гомоцистеина, являющегося антагонистом окиси азота. Эти изменения бактериального роста первоначально были отмечены в макрофагах крыс [30], а в последствии также в макрофагах и полиморфно-ядерных лейкоцитах мор-

ских свинок [4].

Первые работы по выделению и изучению ЛПС показали, что препараты ЛПС туляремийного микроба, выделенные из клеток по методу O. Westphal, не обладают свойствами типичного эндотоксина [31]. В отличие от мембранных белков, углеводсодержащие компоненты внешней мембраны, очищенные от белковых примесей, не способны стимулировать Т-лимфоциты. Несмотря на это, ЛПС – один из основных углеводных полимеров, который эффективно взаимодействует с антителами, присутствующими в сыворотках инфицированных или вакцинированных живой вакциной людей [45]. Установлено, что ЛПС является одним из основных стимуляторов гуморального иммунного ответа [34]. Для представителей вида *F. tularensis*, включая *F. tularensis subsp. novicida* (-like), ЛПС является иммунодоминантным антигеном, на О-полисахариде которого локализованы высокоспецифичные эпитопы [2]. Была показана также возможность применения ДОТ-иммуноанализа с использованием в качестве антигенсодержащего препарата ЛПС *F. tularensis* для определения противотуляремийных антител в сыворотках больных и вакцинированных людей и животных. Данный метод обладал достаточно высокой чувствительностью и специфичностью [1]. За рубежом диагностика туляремии у человека иммуноферментными и иммуносуспензионными методами базируется на выявлении видоспецифических антител против ЛПС в сыворотках больных [32]. В ИФА с применением моноклональных антител к ЛПС определяются все штаммы *F. tularensis*, кроме *novicida*, нет перекрестных реакций с другими видами бактерий. Чувствительность метода составляет 10^3 КОЕ/мл в фосфатном буфере и 10^4 КОЕ/мл в сыворотке человека. Иммунохроматографический анализ также основан на поли- и моноклональных антителах к ЛПС *F. tularensis* LVS. Его чувствительность – 10^6 КОЕ/мл в фосфатном буфере и 10^7 КОЕ/мл в сыворотке человека [35]. На сегодняшний день на основе моноклональных антител к ЛПС *F. tularensis* разрабатываются различные методы детекции возбудителя туляремии [21, 33, 39]. Кроме того, для диагностики *F. tularensis* предлагается использовать конъюгаты иммуноглобулинов, направленных к эпитопам молекулы ЛПС туляремийного микроба, меченные пенициллиназой [6]. С.Н. Скопинской и соавт. [20] разработан метод флуоресцентного липосомального иммуноанализа (ФЛИА) для обнаружения антител к возбудителям некоторых инфекционных заболеваний, в том числе и туляремии, на основе липосом, сенсibilизированных поверхностными антигенами липополисахаридной природы с инкапсулированными флуоресцентными маркерами. Абсолютная чувствительность метода ФЛИА составила 25–100 нг/мл иммуноглобулинов класса G, что в 4–165 раз превосходит применяемую в практике РПГА для выявления антител к возбудителю туляремии [20].

Препараты ЛПС представителей рода *Francisella* характеризуются отсутствием токсичных свойств

для организма хозяина [2, 14, 45], но не защищают лабораторных животных от гибели при заражении вирулентными штаммами *F. tularensis*. По результатам других исследований [11] установлено, что обработка чувствительных животных очищенными не содержащими примесей белка препаратами ЛПС обеспечивала повышение их неспецифической резистентности к возбудителю. В частности, иммунизация очищенным препаратом ЛПС *F. tularensis subsp. nearctica* защищала белых мышей от заражения штаммами голарктического подвида, но не защищала от *subsp. novicida*, тогда как препарат ЛПС *subsp. novicida* защищал против собственного подвида, но не обеспечивал защиту против голарктического [42]. Кроме того, S-ЛПС вирулентных штаммов характеризовался большей иммуномодулирующей активностью по сравнению с R-ЛПС авирулентных штаммов как по показателю количества выживших животных, так и по продолжительности жизни павших [43]. Также было показано, что S-ЛПС вирулентных бактерий менее активно взаимодействует с липополисахаридсвязывающим белком сыворотки крови человека, чем R-ЛПС авирулентных вариантов, что позволяет *F. tularensis* 15НИИЭГ длительно персистировать в организме и обеспечивать формирование специфического иммунитета против туляремийной инфекции [14]. Проведенные исследования [22, 23] показали, что ЛПС в комплексе с мембранными белками (ЛПБК), полученный из внешней мембраны при обработке детергентами, ультрацентрифугированием и последующей гель-фильтрацией, обладал выраженной иммуномодулирующей активностью. Данный антигенный комплекс защищал белых мышей и морских свинок от гибели при заражении вирулентными штаммами *F. tularensis* 503 (*subsp. holarctica*) и *F. tularensis* Schu (*subsp. nearctica*), соответственно. Биохимический анализ ЛПБК туляремийного микроба показал, что в его состав входит ЛПС и мембранные белки с молекулярной массой 17–20 кДа, с соотношением ЛПС:белок 1:1 по массе [8]. В дальнейшем из ЛПБК туляремийного микроба дифференциальным ультрацентрифугированием был выделен «С»-комплекс, содержащий белок (60–70 %) и ЛПС [5, 25].

Только живые бактерии природных штаммов *F. tularensis* обладают *in vivo* высокотоксичной формой ЛПС. Нарушения в синтезе ЛПС или гибель микроба приводят к утрате биологической активности этой молекулы. Внутривенное введение мышам препарата ЛПС вирулентного штамма в дозе 25 мг не приводило к гибели и повышало чувствительность к туляремии [14]. При этом даже незначительные изменения в структуре ЛПС мутантных штаммов приводят к снижению патогенности возбудителя, что позволяет рассматривать ЛПС как важный фактор вирулентности туляремийного микроба.

В пользу модификации (антигенных фазовых вариаций) ЛПС туляремийного микроба *in vitro* свидетельствуют данные об обнаружении в сыворотках

людей с туляремийной инфекцией антител, направленных к специфическим эпитопам ЛПС другого подвида возбудителя – *subsp. novicida* [2]. Возможно такой механизм направлен на изменение токсического потенциала ЛПС: у чувствительных хозяев такие вариации приводят биологически инертный ЛПС в токсическую форму, а у нечувствительных (туляремия у человека) в нетоксическую форму, включая изменения антигенной специфичности. Последнее, обуславливая уход бактерий от системы специфической защиты организма, может способствовать длительной персистенции возбудителя в макроорганизме с формированием носительства [14, 16]. В формировании такого носительства может иметь значение чередование таких фаз развития популяции микроорганизмов, как накопление численности и переход в некультивируемое состояние [5].

Капсула (капсулоподобное вещество) туляремийного микроба на 50–70 % состоит из липидов, другие компоненты мало изучены [37, 47]. В мазках-отпечатках из органов животных, павших от туляремии, это образование имеет вид небольшой светлой зоны вокруг бактериальной клетки [13]. По данным электронной микроскопии, у *F. tularensis* в вирулентной форме имеется капсулообразный покров, который частично теряется при гипертонической обработке [37, 44]. По результатам исследований G. Sandstrom и соавт. [44], в спектрах мембранных белков капсульного вакцинного штамма LVS и его бескапсульного авирулентного мутанта различий не обнаружено. Однако при изучении поверхностных структур туляремийного микроба было установлено, что во внешней мембране у капсульных вариантов присутствует белок с молекулярной массой 65 кДа и S-ЛПС, тогда как у бескапсульных – белок с молекулярной массой 33 кДа и R-ЛПС [16]. Капсула обеспечивает устойчивость к сывороткам, но не требуется для выживания при фагоцитозе в полиморфно-ядерных лейкоцитах. У вакцинированных LVS людей лимфоциты, реагирующие с белковыми антигенами и антителами, продуцировались против углеводных антигенов, представленных в капсуле [44]. Белковые антигены, которые вызывали реактивность Т-клеток у вакцинированных людей, исследовались с помощью капсул-дефицитных мутантов вакцинного штамма. Некоторые антигены были идентифицированы, а четыре основных были очищены и определены их молекулярные массы: 61, 37, 32 и 17,5 кДа. Последние два белка представлены на бактериальной поверхности. Все указанные полипептиды вызывали пролиферацию лимфоцитов у вакцинированных людей. Бескапсульные мутанты обладали более высокой нейраминидазной активностью, чем исходный штамм. Позднее этим же автором было показано, что для бескапсульных вариантов *F. tularensis* разной подвидовой принадлежности характерны также чувствительность к нормальной сыворотке человека, отсутствие антигенов капсульного вещества и неспособность вступать в сероло-

Характеристика основных антигенных компонентов *F. tularensis*

Признаки	Источник
Антигенные компоненты	
ЛПС	[2; 8; 13; 14; 22; 23; 25; 27; 31; 43; 45; 46; 47]
белки внешней мембраны	[5; 7; 8; 12; 13; 17; 18; 22; 23; 25; 27; 31; 36; 40; 41; 46; 47; 49; 50]
капсула	[13; 16; 31; 37; 44; 47]
Функции	
адаптация к факторам внешней среды	[3; 4; 13; 18; 31; 42]
адгезия	[13; 15; 24; 31; 37; 47]
роль в вирулентности	[3; 8; 11; 13; 14; 15; 19; 22; 24; 30; 34; 37; 42; 45; 46; 47]
Возможность применения	
вакцины	[5; 9; 10; 13; 22; 29]
диагностика	[1; 2; 6; 13; 20; 21; 26; 27; 28; 32; 33; 35; 38; 39; 48; 49]

гические реакции (РНГА, РНАт) [16]. Были описаны устойчивые мутанты с неполной капсулой, один из которых оказался авирулентным для мышей и восприимчивым к комплемент-зависимому лизису. Последний, поглощенный полиморфно-ядерными лейкоцитами, не вызывал антимикробный ответ и сохранялся в клетке макроорганизма. Исходный штамм *F. tularensis* наоборот вызывал кислородный взрыв и уничтожался внутри клеток хозяина [47]. По-видимому, капсула является необходимым компонентом для проявления туляремийным микробом вирулентности в полной мере.

Хотя возбудитель туляремии известен более века, сведения о его биологических особенностях, жизни вне макроорганизма и факторах патогенности все еще очень ограничены. Из числа возможных факторов патогенности *F. tularensis* подробно изучен лишь ЛПС, играющий существенную роль в патогенезе инфекции и проявлении специфичности. В течение последнего десятилетия ведутся активные исследования в области изучения отдельных антигенных компонентов белковой природы, а также секретируемых иммуногенов, и определения их роли в иммунопрофилактике и диагностике инфекции (таблица). Но, несмотря на это, до сих пор не установлены антигены *F. tularensis*, обладающие достаточной протективной и иммунологической активностями, необходимыми для разработки безопасной субъединичной вакцины и высокоспецифичных методов экспресс-индикации возбудителя и ранней диагностики инфекции. Научные данные указывают на необходимость дальнейших исследований в этом направлении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аронова Н.В., Павлович Н.В. Использование препаратов ЛПС *F. tularensis* в точечном ИФА для обнаружения противотуляремийных антител. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2000; 5:75–8.
2. Аронова Н.В., Павлович Н.В. Фазовые вариации липополисахарида *Francisella tularensis* при инфекции человека. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 4:8–12.
3. Домарадский И.В. Проблемы патогенности франциселл.

- Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 1:106–10.
4. Дубровина В.И., Коновалова Ж.А., Татарников С.А., Мазепа А.В., Бельков А.И. Неспецифическая резистентность морских свинок в отношении *F. tularensis* с разными фенотипическими свойствами. В кн.: Матер. VIII Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ; 25–26 сентября 2007; Саратов. Саратов; 2007. С. 198–200.
 5. Жемчугов В.Е. Как мы делали химические вакцины. Записки о современных охотниках за микробами. М.: «Наука»; 2004. 349 с.
 6. Куанбаев Д.Н., Чимиров О.Б., Темиралиева Г.А., Лухнова Л.Ю., Турсунов А.Н. Иммуноглобулиновый пенициллиназный конъюгат для выявления антигена возбудителя туляремии. Лаб. дело. 1990; 1:44–6.
 7. Кудрявцева Т.Ю., Комбарова Т.И., Павлов В.М. FOPa белок внешней мембраны вакцинного штамма *Francisella tularensis*: выделение и моделирование структуры. В кн.: Матер. VII Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ; 3–5 октября 2006; Оболенск, Московской обл., Россия. Оболенск; 2006. С. 110.
 8. Кулевацкий Д.П. Липополисахаридобелковые комплексы внешней мембраны возбудителя туляремии [автореф. дис. канд. биол. наук]. Любучаны; 1994. 20 с.
 9. Лукин В.Г., Мецереякова И.С., Народноцкий Б.С., Шмаров М.М., Ляцук А.В., Родионова И.В. и др. Суперэкспрессия гена белка TUL4 – основного белка наружной мембраны *Francisella tularensis* – в рекомбинантных штаммах *F. tularensis* и *Escherichia coli*: новые подходы к созданию генно-инженерных живых и субъединичных вакцин для профилактики туляремии. В кн.: Медицинская микробиология – XXI век: Матер. Всерос. науч.-практ. конф.; 28–30 сент. 2004; Саратов; 2004. С. 136–7.
 10. Ляцук А.М., Лукин В.Г., Карягина А.С., Сергиенко О.В., Лаврова Н.В., Рязанова Е.М. и др. Получение и характеристика рекомбинантного белка TUL4 из *F. tularensis*, потенциального компонента генно-инженерной субъединичной противотуляремийной вакцины. Биотехнология. 2006; 5:32–8.
 11. Маслова Н.Н., Павлович Н.В. Иммуномодулирующие и антитоксические свойства препаратов липополисахарида представителей рода *Francisella*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1999; 4:50–3.
 12. Мокриевич А.Н., Платонов М.Е., Вахрамеева Г.М., Миронова Р.И., Бахтеева И.В., Титарова Г.М. и др. Влияние нокдаунной мутации в гене QSEC на биологические свойства туляремийного микроба. В кн.: Матер. VIII Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ; 25–26 сентября 2007; Саратов. Саратов; 2007. С. 252–4.
 13. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина; 1975. 190 с.
 14. Оноприенко Н.Н., Павлович Н.В. Роль липополисахарида в токсичности бактерий рода *Francisella*. Молекулярная генетика. 2003; 3:23–8.
 15. Оноприенко Н.Н., Павлович Н.В. Взаимодействие S- и R-липополисахаридов *Francisella tularensis* с липополисахарид-связывающим белком сыворотки крови человека. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 4:16–21.
 16. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н., Данилевская Г.И., Ходова В.А., Рыжкова В.В., Цимбалистова М.И. и др. Получение бескапсульных вариантов *Francisella tularensis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1993; 2: 7–11.
 17. Родионова И.В., Захаренко В.И. Антигенный состав белков наружной мембраны туляремийного микроба. Мол. ген. микробиол. и вирусол. 1990; 11:16–8.
 18. Романова Л.В., Водопьянов С.О., Саямов С.Р., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н. Тепловой стресс и белок теплового стресса GroEL у возбудителя туляремии. Биотехнология. 2004; 5:33–8.
 19. Скатов Д.В., Хлебников В.С., Василенко Н.Р. Влияние антигенных фракций внешней мембраны *Francisella tularensis* на функциональную активность макрофагов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1993; 4:87–91.
 20. Скопинская С.Н., Ярков С.П., Храмов Е.Н. Применение флуоресцентного липосомального иммуноанализа для выявления антител к возбудителям туляремии, холеры, брюшного тифа, сапа и мелиоидоза. Пробл. особо опасных инф. 2007; 2(94): 67–71.
 21. Сырова Н.А., Терешкина Н.Е., Девдариани З.Л. Современное состояние иммунодиагностики туляремии. Пробл. особо опасных инф. 2008; 3(97):12–5.
 22. Хлебников В.С., Головлев И.Р., Кулевацкий Д.П., Аверин С.Ф., Пиширков С.Ю., Тохтамышева Н.В. и др. Изучение биохимических, антигенных и протективных свойств внешней мембраны возбудителя туляремии. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 1991; 7:15–20.
 23. Хлебников В.С., Кулевацкий Д.П., Головлев И.Р., Аверин С.Ф., Жемчугов В.Е., Чузунов А.М. и др. Исследование ЛПС-белкового комплекса из внешней мембраны *Francisella tularensis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1992; 3:13–7.
 24. Шеенков Н.В., Опочинский Э.Ф., Вальшев А.В., Вальшева И.В., Карташова О.Л., Паршина А.В. и др. Факторы персистенции *Francisella tularensis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 1:63–6.
 25. Шенелёв И.А., Волох О.А., Еремин С.А., Дятлов И.А. Оптимизация способа получения «С»-комплекса туляремийного микроба. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):61–64.
 26. Яшечкин Ю. И., Куличенко А. Н., Иващенко Л. Н., Самойлова Л.В., Кутырев В.В. ПИР-тест-система для детекции возбудителя туляремии. Пробл. особо опасных инф. 2003; 1(81):159–63.
 27. Bevander L., Maeland J.A., Naess A.I. Agglutinin and antibodies to *F. tularensis* outer membrane antigens in the early diagnosis of disease during an outbreak of tularemia. J. Clin. Microbiol. 1988; 26:433–7.
 28. Bevanger L., Maeland J. A., Naess A.I. Competitive enzyme immunoassay for antibodies to a 43 000-molecular-weight *Francisella tularensis* outer membrane protein for the diagnosis of tularemia. J. Clin. Microbiol. 1989; 27:922–6.
 29. Conlan J.W. Vaccines against *Francisella tularensis* – past, present and future. Expert Rev. Vaccines. 2004; 3(3):307–14.
 30. Cowley S.C., Myltseva S.V., Nano F.E. Phasa variation in *Francisella tularensis* growth, lipopolysaccharide antigenicity and nitric oxide production. Mol. Microbiol. 1996; 20(4):867–74.
 31. Ellis J., Petra C.F. Oyston, Green M., Titball R. Tularemia. J. Clin. Microbiol. 2002; 15:631–46.
 32. Fomsgaard A. Antibodies to LPS: some diagnostic and protective aspects. AMPIS Suppl. 1990; 18:1–38.
 33. Fulop M., Webber T., Manchee R.J., Kelly D.C. Production and characterization of monoclonal antibodies directed against the lipopolysaccharide of *F. tularensis*. J. Clin. Microbiol. 1991; 29(7):1407–12.
 34. Fulop M., Manchee R., Titball R. Role of two membrane antigens in induction of different virulence. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1996; 13:245–7.
 35. Grunow R.W., Spletstoesser S., McDonald C., Otterbein C., O'Brien T., Morgan C. et al. Detection of *Francisella tularensis* in biological specimens using a capture enzyme-linked immunosorbent assay, an immunochromatographic handheld assay, and a PCR. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2000; 7:86–90.
 36. Havlasova J., Herynchova L., Halada P., Pellantova W., Krejsek J., Stulik J. et al. Mapping of immunoreactive antigens of *Francisella tularensis* live vaccine strain. Proteomics. 2002; 2: 857–67.
 37. Hood A.M. Virulence factors of *Francisella tularensis*. J. Hyg. (Lond.). 1977; 79:47–60.
 38. Hotta A., Akihiko U., Fujita O., Tanabayashi K., Yamada A. Preparation of monoclonal antibodies for detection and identification of *Francisella tularensis*. Clin. Vaccine Immunol. 2007; 14(1):81–4.
 39. Hulseweh B., Ehrlich R., Marschall H.-J. A simple and rapid protein array based method for the simultaneous detection of bio warfare agents. Proteomics. 2006; 6:2972–81.
 40. Lee B., Clemens D., Horwitz M. Identification of early culture filtrate proteins of *Francisella tularensis*. Fourth International Conf. On Tularemia; City of Bath, United Kingdom; 2003. 202 p.
 41. Nano F.E. Identification of a heat-modifiable protein of *Francisella tularensis* and molecular cloning of the encoding gene. Microb. Pathogen. 1988; 5:109–19.
 42. Oyston Petra C.F. *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. J. Med. Microbiol. 2008; 57:921–30.
 43. Prior J.L., Prior R.G., Hitchen P.G. Characterisation of the lipopolysaccharide of *F. tularensis* subspecies *tularensis*. Fourth International Conf. On Tularemia; City of Bath, United Kingdom; 2003. 27 p.
 44. Sandstrom G., Lofgren S., Tarnvik A. A capsule deficient mutant of *Francisella tularensis* LVS exhibits enhanced sensitivity to killing by serum but diminished sensitivity to killing by polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. 1988; 56(5):1194–202.
 45. Sandstrom G., Sjostedt A., Johansson T. Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* LVS. FEMS Microbiol. Immunol. 1992; 5:201–10.
 46. Sjostedt A., Sandstrom G., Tarnvik A. Several membrane polypeptides of the live vaccine strain *Francisella tularensis* LVS stimulate T cells from naturally infected individuals. J. Clin. Microbiol. 1990; 28(1):43–8.
 47. Sjostedt A. Virulence determinants and protective antigens of *Francisella tularensis*. Curr. Opin. Microbiol. 2003; 6:66–71.
 48. Spletstoesser W.D., Tomaso H., Dahouk S.A., Neubauer H., Schuff-Werner P. Diagnostic procedures in tularemia with special focus on molecular and immunological techniques. J. Vet. Med. 2005; 52:249–61.
 49. Stulik J., Cerna J., Kovarova H., Macela A. Protein heterogeneity of *Francisella tularensis*: detection of proteins with antigenic determinants. Folia microbiol. (Praha). 1989; 34(4):316–23.
 50. Surcel H.M., Sarvas M., Helander J.M., Herva E. Membrane proteins of *Francisella tularensis* LVS differ in ability to induce proliferation of lymphocytes from tularemia-vaccinated individuals. Microbiol. Patogen. 1989; 7:411–9.

Об авторах:

Кузнецова Е.М., Шепелёв И.А., Волох О.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. Тел.: (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

E.M.Kuznetchova, I.A.Shepelev, O.A.Volokh

Structural and Functional Characterization of Main *Francisella tularensis* Antigens

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

The review presents literature data on tularemia agent antigenic components, their biochemical structure and immune properties. Though active studies are carried out to analyze separate *Francisella tularensis* antigenic

components and to elucidate their role in immunoprophylaxis and diagnostics of this infection, the cause of tularemia agent high pathogenicity is not yet determined. Nor is decided the problem of the development of safe subunit vaccine and high-specific methods of agent express-indication, according to scientific evidence.

Key words: *Francisella tularensis*, antigens, outer membrane proteins, lipopolysaccharide, capsule.

Authors:

Kuznetchova E.M., Shepelev I.A., Volokh O.A. Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 27.11.08.