

О.А.Волох, Е.М.Кузнецова, Е.А.Смолькова, Т.Н.Щуковская, С.А.Бугоркова, Н.Г.Авдеева,
Д.Г.Филимонова, Т.П.Шмелькова, С.Н.Клюева, А.К.Никифоров

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ТУЛЯРЕМИИ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов,
Российская Федерация

Сконструирован экспериментальный препарат прототипной химической туляремийной вакцины (ПХТВ). В состав ПХТВ входит протективный антигенный комплекс (ПАК) туляремийного микроба и белок S-слоя (Slp) чумного микроба. Определено оптимальное соотношение компонентов и схема введения препарата. Представлены результаты испытаний его физико-химических свойств, реактогенности, специфической активности и влияния на иммунную систему лабораторных животных. Установлено, что препарат прототипа химической туляремийной вакцины не токсичен для белых мышей и морских свинок и не оказывает повреждающего действия на их иммунную систему. Однократная подкожная иммунизация лабораторных животных препаратом ПХТВ вызывает формирование напряженного адаптивного иммунитета к 14–21-м суткам: выработку специфических антител и стимуляцию клеточного звена иммунитета. Индекс защиты препарата ПХТВ для белых мышей при экспериментальной туляремии, вызванной *Francisella tularensis subsp. holarctica*, составил в среднем 87,5 %, при инфицировании *F. tularensis subsp. nearctica* – 50 %, с высокой напряженностью иммунитета в обоих случаях. На модели морских свинок была подтверждена высокая эффективность экспериментального препарата против туляремии голарктического подвида (индекс защиты 75 %) и длительность напряженного иммунитета.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, антиген, химические вакцины.

O.A.Volokh, E.M.Kuznetsova, E.A.Smol'kova, T.N.Shchukovskaya, S.A.Bugorkova, N.G.Avdeeva,
D.G.Filimonova, T.P.Shmel'kova, S.N.Klyueva, A.K.Nikiforov

Experimental Preventive Anti-Tularemia Preparation

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Designed is an experimental preparation of a prototype chemical tularemia vaccine (PCTV). It is composed of protective antigenic complex (PAC) of tularemia microbe and S-layer protein (Slp) of plague microbe. Determined is optimum ratio of these components in the preparation and schedule of its administration. Displayed are the results of its testing as regards physical-chemical properties, reactogenicity, specific activity and impact on the immune system of laboratory animals. It is found out that preparation of the prototype is non-toxic for white mice and Guinea pigs and has no damaging effect on their immune systems. Single-stage subcutaneous immunization with PCTV induces elaboration of high-level adaptive immunity in laboratory animals within 14–21 days: specific antibody generation and stimulation of immune system cell component. PCTV protective index for white mice in case of experimental tularemia, caused by *Francisella tularensis subsp. holarctica*, is 87,5 % on average; in case of infecting with *F. tularensis subsp. nearctica* – 50 %; and high-level immunity in both cases. High potency of the experimental preparation against tularemia caused by *subsp. holarctica* (protective index is 75 %) and high-grade immunity persistence is verified on the model of Guinea pigs too.

Key words: *Francisella tularensis*, antigen, chemical vaccines.

Усовершенствование имеющихся и разработка новых профилактических средств против туляремии остается актуальной задачей. Используемые в настоящее время живые туляремийные вакцины создают стойкий и длительный иммунитет, защищают против легочной туляремии, но обладают реактогенностью. Использование убитых бактериальных препаратов, даже совместно с адьювантами, недостаточно для формирования полноценного иммунитета [13]. В связи с этим ведутся работы по созданию более совершенной живой и разработке химической и субклеточной вакцин [6, 7, 9, 10, 11]. Для создания эффективного препарата может потребоваться большой набор бактериальных полипептидов, вызывающих активацию как клеточного, так и гуморального иммунитета макроорганизма. В качестве такого «природного коктейля» биологически активных компонентов туляремийного микроба могут рассматриваться препараты антигенных комплексов внешней мембраны,

которые характеризуются поверхностным расположением, сложной химической природой, наличием в своем составе основных иммунодоминантных белков и выраженными иммуногенными свойствами [1, 3, 5, 8, 15].

Материалы и методы

Моделирование туляремийной инфекции проводили с использованием вирулентных штаммов *F. tularensis* 503 *subsp. holarctica* и *F. tularensis* A'Cole *subsp. nearctica* на белых мышах и морских свинках. Выбор заражающих штаммов и дозы были обусловлены требованиями к типовым штаммам для контроля вакцинирующей активности живой туляремийной вакцины. В качестве положительного контроля использовали животных, однократно подкожно (п/к) вакцинированных живой туляремийной вакциной (ЖТВ). Отрицательный контроль – животные, кото-

рым вводили равный объем 0,86 % раствора NaCl. Белых мышей заражали на 21-е сутки после иммунизации, морских свинок – на 30-е. Срок наблюдения в первом случае составил 21 сут, во втором – 25. Специфичность экспериментальной туляремийной инфекции подтверждали данными контрольного вскрытия, микроскопией мазков-отпечатков и высевами на питательные среды.

Острую токсичность испытуемого препарата прототипа химической туляремийной вакцины (ПХТВ) по морфологическим показателям определяли в экспериментах на морских свинках при однократном подкожном способе введения. Проводили вскрытие животных на 1, 3, 7, 14, 21, 28, 31 и 46-е сутки и подробное протоколирование всех видимых патолого-анатомических изменений, а также забор гистологического материала на исследование. Вскрытие животных выполняли общепринятым методом. Гистологический материал (кусочки органов, лимфатические узлы – целиком) фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина. Дальнейшую обработку выполняли по стандартной схеме [4], готовые срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Г.Э.). Гистологические изменения изучали при световой микроскопии, используя увеличение $\times 40$ и $\times 200$. Подсчет клеточных элементов и отдельных структур органа (клеток ретикулоэндотелиальной системы печени, почечных телец, клеток инфильтратов и др.) проводили в десяти полях зрения правильно ориентированных срезов.

Уровень антител в сыворотке крови биомоделей оценивали с помощью иммуноферментного анализа с использованием экспериментальной тест-системы на основе антигенов – компонентов ПХТВ и коммерческой ИФА-Став-тул (производство СтавНИПЧИ). Влияние препарата ПХТВ на иммунную систему морских свинок оценивали по степени функциональной активности макрофагов в НСТ-тесте, реакции лейкоцитолитической активности В-лимфоцитов по числу антителообразующих клеток (АОК), по развитию иммунного ответа на гетерологичный антиген.

Результаты и обсуждение

Был проведен выбор оптимальной прописи сконструированного препарата, разработаны схемы его введения. В состав экспериментального препарата химической туляремийной вакцины входит протективный антигенный комплекс (ПАК) туляремийного микроба, полученный из *F. tularensis* 15 НИИЭГ [3] и белок S-слоя (Slp) чумного микроба, полученный из *Y. pestis* КМ 218, который, как было показано ранее, обладает иммуногенными свойствами и взаимодействует с клетками и белками макроорганизма [2]. Данные литературы указывают на перспективность применения S-слоев в комбинированных вакцинах в качестве адъювантов и носителей эпитопов [12, 14]. Совместное однократное введение S-белка и ПАК

белым мышам значительно усиливает иммуногенные свойства последнего. ED₅₀ препарата ПАК для белых мышей против *F. tularensis* 503/840 составляет в среднем (3±0,50) мкг. В тех же условиях эксперимента ED₅₀ ПАК+S-белок составляет (0,5±0,2) мкг.

Препарат ПХТВ в лиофильно высушенном состоянии представляет собой однородную серовато-белую пористую массу. Обладает хорошей растворимостью в дистиллированной воде и 0,9 % растворе натрия хлорида. В растворенном виде препарат ПХТВ представляет собой бесцветную жидкость с опалесценцией без посторонних примесей и хлопьев, рН растворенного препарата прототипа химической вакцины составляет (7,2±0,1) ед, концентрация белка на 1 условную дозу (у/д) – (1,5±0,1) мг.

Для анализа токсичности беспородным белым мышам препарат ПХТВ вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл, морским свинкам – подкожно в объеме 1,0 мл, в обоих случаях в максимальной концентрации (1 у/д). Контрольным группам вводили равный объем 0,86 % раствора NaCl (рН 7,2). Наблюдали белых мышей – 7 сут, морских свинок – 28. Было установлено, что препарат прототипа химической туляремийной вакцины не токсичен в тесте на белых мышках и морских свинках. Все животные в течение срока наблюдения остались живы. Уменьшение веса у экспериментальных групп животных в течение всего периода не наблюдалось.

При оценке острой токсичности препарата по морфологическим показателям было установлено, что препарат ПХТВ при подкожном введении морским свинкам не вызывал видимых изменений со стороны внутренних органов и грубых экссудативных и инфильтративных процессов в месте его введения. Полученные данные морфометрических показателей (вес и линейные размеры органов) для иммунизированной группы морских свинок практически не отличались от аналогичных параметров для контрольной группы животных.

При гистологическом исследовании отмечали умеренную экссудативную реакцию в коже места введения ПХТВ, сохраняющуюся до 3 сут и проходящую бесследно.

Со стороны паренхиматозных органов регистрировали признаки умеренного функционального напряжения клеток паренхимы и незначительные гемодинамические нарушения. В почках подопытных животных наблюдали умеренное функциональное напряжение эпителия извитых канальцев, отмечали реакцию со стороны гломерулярного аппарата в виде умеренного полнокровия капиллярных петель почечных телец (рис. 1). На всем протяжении периода наблюдения процент полнокровных почечных телец не превышал 35, и четко прослеживалась тенденция к уменьшению их количества по мере отдаления срока наблюдения. Все описанные изменения происходили без уменьшения количества функционально активных почечных телец на единицу площади среза органа. В печени подопытных животных нарушения в системе

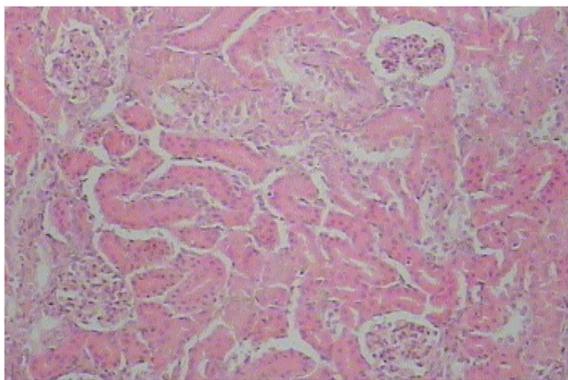


Рис. 1. Гистологическое исследование почки морской свинки на 13-е сутки после иммунизации препаратом ПХТВ. Умеренное функциональное напряжение эпителия извитых канальцев. Окраска Г.Э. Увеличение $\times 100$

гемоциркуляции до 13-х суток проявлялись умеренным полнокровием внутридольковых синусоидальных гемокапилляров и отчасти касались системы оттока крови из органа (центральных вен печеночных долек). Реакция со стороны звездчатых ретикулоэндотелиоцитов (клеток Купфера) заключалась в относительной активации элементов РЭС печени в период с 3-х по 46-е сутки и сводилась к увеличению количества клеток Купфера в 2,5 раза к 13-м суткам и до 1,5 раз после 21-х суток наблюдения. Изменения в надпочечниках у подопытных животных укладывались в картину стресс-реакции организма биомодели.

Со стороны лимфоидных органов отмечали признаки иммунологической перестройки в период с 13-х по 46-е сутки. В тимусе в период с 21-х по 31-е сутки выявляли по результатам макрометрии умеренное уменьшение его массы, сопровождающееся при гистологическом исследовании некоторым истончением коркового вещества органа и стиранием границ между корковым и мозговым веществом. Повидимому, эти изменения сопряжены с массовым выбросом Т-лимфоцитов в кровотока в период активации процессов иммуногенеза. В последующие сроки восстанавливалась обычная структура органа и имела место умеренная пролиферативная активность клеток мозгового вещества.

Функциональное состояние органов периферической иммунной системы укладывалось в картину иммуногенеза, что проявлялось последовательным усилением процессов активации Т- и В-зон лимфоидных органов.

В селезенке признаки умеренной пролиферативной активности отмечали с 21-х суток. Нарастание пролиферативной активности в Т- и В- зонах органа, регистрируемое с 31-х суток, сохранялось на высоком уровне до 46-х суток. Определенный прирост плазмобластов наблюдали в период с 21-х по 46-е сутки.

При макрометрии отмечали планомерное увеличение массы регионарных (РЛУ) и отдаленных (ОЛУ) лимфатических узлов в период с 21-х по 46-е сутки. При гистологическом исследовании регистрировали признаки пролиферативной активности паракорти-

кальных зон (ПКЗ) – Т-зон, в РЛУ – практически с 3-х суток, а в ОЛУ – с 13-х. Далее активность ПКЗ постепенно нарастала и достигала максимальной выраженности к 31-м суткам, в последующем в РЛУ к 46-м суткам имело место некоторое снижение активности, а в ОЛУ – активность еще сохранялась. Появление активных фолликулов со светлыми центрами, с нарастанием бластической реакции (В-зоны), усилением митотической активности отмечали в РЛУ и ОЛУ с 21-х суток, максимальные проявления активности в РЛУ приходились на 31-е сутки, а в ОЛУ регистрировались вплоть до 46-х суток наблюдения.

Таким образом, выявленные изменения у подопытных животных укладывались в картину умеренного функционального напряжения органов и систем макроорганизма, обусловленных до 13-х суток стресс-реакцией на препарат и манипуляции, связанные с его введением, а с 21-х по 46-е сутки – процессом иммуногенеза и адаптации.

Установлено, что однократная подкожная иммунизация лабораторных животных препаратом ПХТВ вызывает формирование напряженного адаптивного иммунитета к 14–21-м суткам: выработку специфических антител и стимуляцию клеточного звена иммунитета. Было показано, что однократная п/к иммунизация белых мышей вызывает образование специфических антител к компонентам прототипной вакцины на 3-и сутки с максимумом к 14-м. При иммунизации морских свинок (таблица) максимум уровня антител регистрировался на 21-е сутки. Динамика уровня реакции лейкоцитолита у иммунизированных белых мышей линии BALB/c была аналогична показателям вакцинированной ЖТВ группы, достигая резко положительных значений также к 21-м суткам (53–56 %). Максимум значений коэффициента лейкоцитолита (81,1 %) у морских свинок регистрировался на 14–21-е сутки после иммунизации с тенденцией снижения к 30-м суткам. Резко положительный ответ на введение испытуемого препарата морским свинкам свидетельствует о высокой иммуногенности прототипа химической туляремийной вакцины.

Испытуемый препарат ПХТВ стимулировал функциональную активность фагоцитирующих мононуклеаров перитонеального экссудата. Наиболее выраженное стимулирующее влияние прототипа ХТВ на функциональную активность перитонеальных макрофагов (в 3–5 раз по сравнению с контрольными значениями) отмечалось при иммунизации

Динамика образования специфических антител (обратные титры) у морских свинок, иммунизированных препаратом ПХТВ

Срок после иммунизации, сут	Ат к ПАК	Ат к S-белку	Ат к клеткам туляремийного микроба
7-е	200	80	800
14-е	320	100	1600
21-е	640	200	3200
30-е	480	400	1600
42-е	400	400	1600

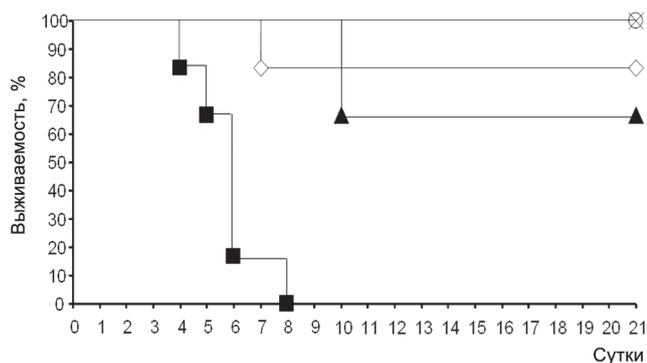


Рис. 2. Иммуногенность прототипа химической туляремийной вакцины для белых мышей

Разведение препарата: ○ – 1; × – 1/5; ▲ – 1/25; ◇ – 1/125; ■ – контрольная группа

морских свинок на 14–21-е сутки после иммунизации, что соответствует моменту формирования напряженного адаптивного иммунитета при туляремии и свидетельствует о выраженной протективной активности препарата. Экспериментальный препарат ПХТВ не приводил к увеличению количества АОК в селезенке, т.е. не вызывал поликлональную активацию В-лимфоцитов, а также не вызывал у нелинейных белых мышей угнетения иммунного ответа на гетерологичный антиген. Представленные результаты свидетельствуют об отсутствии повреждающего действия препарата ПХТВ на иммунную систему морских свинок.

В «остром» опыте показано, что однократное п/к введение конструированного препарата защищает в среднем 87,5 % белых мышей при экспериментальной туляремии, вызванной штаммом голарктического подвида, при 100 % гибели животных в группе отрицательного контроля (рис. 2). Средняя иммунизирующая доза (ED_{50}) против экспериментальной туляремии, вызванной штаммами голарктического подвида, составила 0,008 условной человеческой дозы (у/д). При заражении штаммом неарктического подвида средняя иммунизирующая доза составила 0,2 у/д, а индекс защиты – 50 %. Напряженность иммунитета в обоих случаях была высокой (показатель индекса иммунитета более 15).

После заражения 1000 DcI вирулентного штамма голарктического подвида выживали 75 % морских свинок, иммунизированных препаратом прототипа химической вакцины (рис. 3). Средняя продолжительность жизни составила 24,5 сут при 100 % гибели контрольной группы на 8–9-е сутки. Вакцинация ЖТВ защищала 67 % морских свинок, средняя продолжительность жизни которых составила 21,6 сут. Индекс иммунитета при иммунизации препаратом ПХТВ составил 18,7, а при вакцинации ЖТВ – 11,1, что соответствует требованиям, предъявляемым живым туляремийным вакцинам (согласно МУ 3.3.1.2161-07 – не менее 10). При оценке продолжительности иммунитета через 3,5 мес. после иммунизации препаратом экспериментальной химической вакцины выживало 50 % со средней продолжитель-

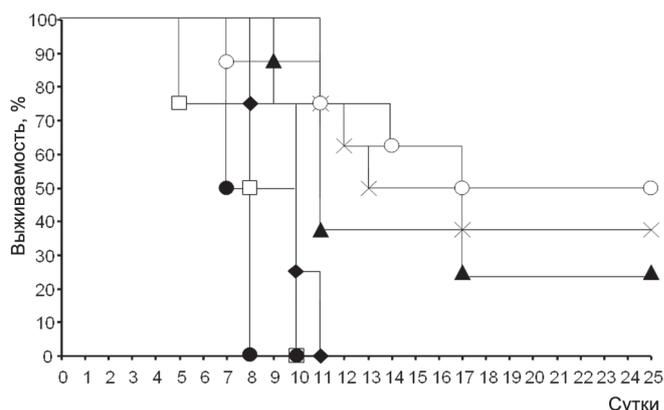


Рис. 3. Длительность иммунитета у морских свинок, иммунизированных препаратом ПХТВ при экспериментальной туляремийной инфекции через 1, 2 и 3,5 мес. после иммунизации:

1 мес.: × – иммунизированная группа, □ – контрольная; 2 мес.: ▲ – иммунизированная, ● – контрольная; 3,5 мес.: ○ – иммунизированная, ● – контрольная

ностью жизни после заражения 21,2 сут.

Для успешного внедрения экспериментального препарата в качестве возможной химической вакцины требуется изучение его эффективности при различных способах инфицирования иммунизированных животных вирулентными штаммами туляремии, проведение анализа особенностей формирования клеточных факторов защиты, состояния специфического иммунитета в отдаленные сроки после применения данного препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волох О.А., Шепелёв И.А., Фирстова В.В., Храмова (Кузнецова) Е.М., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И., Еремин С.А., Дятлов И.А. Оценка иммунобиологической активности препаратов С-комплекса туляремийного микроба, как перспективного компонента химических вакцин. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 3:16–21.
2. Дятлов И.А., Волох О.А. Получение S-слоя чумного микроба и возможности его применения. Биотехнология. 2004; 1:20–5.
3. Кузнецова Е.М., Волох О.А., Смолькова Е.А., Шуковская Т.Н., Шепелёв И.А., Авдеева Н.Г., Крайцов А.Л., Никифоров А.К. Иммунобиологические свойства антигенных комплексов туляремийного микроба. Пробл. особо опасных инф. 2011; 3(109):46–9.
4. Саркисова Д.С., Перова Ю.Л., редакторы. Микроскопическая техника. М: Медицина; 1996. 543 с.
5. Хлебников В.С., Головлев И.Р., Кулевацкий Д.П., Аверин С.Ф., Пишурков С.Ю., Тохтамышева Н.В., Жемчужов В.Е., Сафонова Л.А., Герасимов В.Н., Чугунов А.М., Ветчинин С.С., Галактионов В.Г., Афанасьев С.С. Изучение биохимических, антигенных и протективных свойств внешней мембраны возбудителя туляремии. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 1991; 7:15–20.
6. Barry E.M., Cole L.E., Santiago A.E. Vaccines against tularemia. Hum. Vaccine. 2009; 5(12):832–8.
7. Conlan J. W. Tularemia vaccines: recent developments and remaining hurdles. Future Microbiol. 2011; 6(4):391–405
8. Gregory S.H., Chen W.H., Mott S., Palardy J.E., Parejo N.A., Heninger S., Anderson C.A., Artenstein A.W., Opal S.M., Cross A.S. Detoxified endotoxin vaccine (J5dLPS/OMP) protects mice against lethal respiratory challenge with *Francisella tularensis* SchuS4. Vaccine. 2010; 28(16):2908–15.
9. Jahn-Schmid B., Messner P., Under F.M., Sleytr U.B., Scheiner O., Kraft D. Toward selective elicitation of T1-controlled vaccination responses: vaccine application of bacteria surface layer proteins. J. Biotechnol. 1996; 44:225–31.
10. Jia Q., Lee B.Y., Bowen R., Dillon B.J., Som S.M., Horwitz M.A. 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; 78(10):4341–55.

11. *Khlebnikov V.S., Golovliov I.R., Kulevatsky D.P., Tokhtamysheva N.V., Averin S.F., Zhemchugov V.E., Pchelintsev S.Y., Afanasiev S.S., Shcherbakov G.Y.* Outer membranes of a lipopolysaccharide-protein complex (LPS-17 kDa protein) as chemical tularemia vaccines. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996; 13:227–33.
12. *Pechous R.D., McCarthy T.R., Zahrt T.C.* Working toward the future: insights into *Francisella tularensis* pathogenesis and vaccine development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2009; 73(4):684–711.
13. *Tarnvik A., Bergland L.* Tularaemia. *Eur. Respir. J.* 2003; 21:361–73.
14. *Under F.M., Messneer P., Smid B.J., Sleytr U.B.* Vaccine application of crystalline bacterial surface layer proteins (S-layers). *FEMS Microbiol. Rev.* 1997; 20:157–8.
15. *Zhemchugov V.E., Volokh O.A., Dyatlov I.A. et al.* Outer membrane “C”-complex from *F. tularensis* vaccine strain 15 protect from challenge with *F. tularensis* type-A strain. In: The 4th International conference on tularemia. City of Bath (U.K.), 2003. Abstr. S-29.
1. *Volokh O.A., Shepelev I.A., Firstova V.V., Khrankova (Kuznetsova) E.M., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I., Eremin S.A., Dyatlov I.A.* [Evaluation of immunobiological activity of tularemia microbe C-complex preparations as a prospective component of chemical vaccines]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2007; 3:16–21.
2. *Dyatlov I.A., Volokh O.A.* [Construction of plague microbe S-layer and possible ways of its application]. *Biotechnologia.* 2004; 1:20–5.
3. *Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Smol'kova E.A., Shchukovskaya T.N., Shepelev I.A., Avdeeva N.G., Kravtsov A.L., Nikiforov A.K.* [Immunobiological properties of *Francisella tularensis* antigen complexes]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; (109):46–9.
4. *Sarkisova D.S., Perova Yu.L.,* editors [Microscopy accessories]. M.: Meditsina; 1996. 543 p.
5. *Khlebnikov V.S., Golovlev I.R., Kulevatsky D.P., Averin S.F., Pshirkov S.Yu., Tokhtamysheva N.V., Zhemchugov V.E., Safonova L.A., Gerasimov V.N., Chugunov A.M., Vetchinin S.S., Galaktionov V.G., Afanas'ev S.S.* [Investigation of biochemical, antigenic and protective properties of tularemia agent outer membrane]. *Mol. Gen. Microbiol. Virusol.* 1991; 7:15–20.
6. *Barry E.M., Cole L.E., Santiago A.E.* Vaccines against tularemia. *Hum. Vaccine.* 2009; 5(12):832–8.
7. *Conlan J.W.* Tularemia vaccines: recent developments and remaining hurdles. *Future Microbiol.* 2011; 6(4):391–405.
8. *Gregory S.H., Chen W.H., Mott S., Palardy J.E., Parejo N.A., Heninger S., Anderson C.A., Artenstein A.W., Opal S.M., Cross A.S.* Detoxified endotoxin vaccine (J5dLPS/OMP) protects mice against lethal respiratory challenge with *Francisella tularensis* SchuS4. *Vaccine.* 2010; 28(16):2908–15.
9. *Jahn-Schmid B., Messneer P., Under F.M., Sleytr U.B., Scheiner O., Kraft D.* Toward selective elicitation of T1-controlled vaccination responses: vaccine application of bacteria surface layer proteins. *J. Biotechnol.* 1996; 44:225–31.
10. *Jia Q., Lee B.Y., Bowen R., Dillon B.J., Som S.M., Horwitz M.A.* 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; 78(10):4341–55.
11. *Khlebnikov V.S., Golovliov I.R., Kulevatsky D.P., Tokhtamysheva N.V., Averin S.F., Zhemchugov V.E., Pchelintsev S.Y., Afanasiev S.S., Shcherbakov G.Y.* Outer membranes of a lipopolysaccharide-protein complex (LPS-17 kDa protein) as chemical tularemia vaccines. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996; 13:227–33.
12. *Pechous R.D., McCarthy T.R., Zahrt T.C.* Working toward the future: insights into *Francisella tularensis* pathogenesis and vaccine development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2009; 73(4):684–711.
13. *Tarnvik A., Bergland L.* Tularaemia. *Eur. Respir. J.* 2003; 21:361–73.
14. *Under F.M., Messneer P., Smid B.J., Sleytr U.B.* Vaccine application of crystalline bacterial surface layer proteins (S-layers). *FEMS Microbiol. Rev.* 1997; 20:157–8.
15. *Zhemchugov V.E., Volokh O.A., Dyatlov I.A. et al.* Outer membrane “C”-complex from *F. tularensis* vaccine strain 15 protect from challenge with *F. tularensis* type-A strain. In: The 4th International conference on tularemia. City of Bath (U.K.), 2003. Abstr. S-29.

References

Authors:

Volokh O.A., Kuznetsova E.M., Smol'kova E.A., Shchukovskaya T.N., Bugorkova S.A., Avdeeva N.G., Filimonova D.G., Shmel'kova T.P., Klyueva S.N., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru

Об авторах:

Волох О.А., Кузнецова Е.М., Смолькова Е.А., Щуковская Т.Н., Бугоркова С.А., Авдеева Н.Г., Филимонова Д.Г., Шмелькова Т.П., Ключева С.Н., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 07.09.12.