

СТРАТЕГИИ ВЫЖИВАНИЯ, РАСПРОСТРАНЕНИЯ И ВИРУЛЕНТНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ



Т.Ю. Кудрявцева, А.Н. Мокриевич

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия

Резюме. Бактерия *Francisella tularensis* — этиологический агент туляремии, природно-очаговой, особо опасной инфекции, которая, «благодаря» низкой инфекционной дозе и способности передаваться человеку всеми возможными путями, является потенциальным агентом биотерроризма. Человечеству уже более ста лет известен этот возбудитель, однако до сих пор предотвратить массовые вспышки заболевания людей не удастся, а для подтверждения диагноза «туляремия» требуется от нескольких дней до нескольких недель. Диагностика туляремии и лечение, особенно при спорадической заболеваемости, из-за полиморфизма клинических симптомов, разнообразной локализации инфекционного процесса и множественной природной устойчивости возбудителя ко многим антимикробным препаратам вызывает очень большие затруднения. Основа вирулентности возбудителя туляремии — способность нарушать функцию фагоцитов. В организме животного и человека различные бактериальные системы туляремийного микроба работают вместе, чтобы обойти иммунную систему, прикрепиться к эукариотическим клеткам и проникнуть в них, блокировать слияние фагосомы с лизосомой, размножиться в различных клетках хозяина, не будучи обнаруженными, ингибируя свое уничтожение и вызывая гибель клеток-хозяев для высвобождения бактерий и инфицирования соседних клеток тканей, развивая таким образом инфекционное заболевание в разных органах. Для этого служат и уникальный, зависимый от комплемента, процесс проникновения в клетку хозяина, названный петлевым фагоцитозом, и необычный инертный эндотоксин, и варьирование разнообразных модификаций форм «свободного» липида А и липида А в составе ЛПС, и динамическое регулирование длины его ацильных цепей, и специфичная комбинация регуляторных факторов для индукции синтеза белков «острова патогенности». Накопленные точечные мутации, внутригеномные перестройки, делеции, вставки, дубликации, транспозиции, дегградация генов, варьирование числа копий в повторяющихся последовательностях ДНК, а также гомологичная и негомологичная рекомбинации являются основой значительного расширения возможностей существования возбудителя туляремии: способствуют выживанию штаммов голарктического подвида в различных условиях, в том числе в условиях осмотического шока, формируют множественную устойчивость к различным токсическим веществам, меняют вирулентность подвидов *F. tularensis*. Анализ значительного количества публикаций по каждому из перечисленных аспектов жизнедеятельности возбудителя туляремии —

Адрес для переписки:

Мокриевич Александр Николаевич
142279, Россия, Московская область, Серпуховский р-н,
п. Оболенск, ФБУН Государственный научный центр
прикладной микробиологии и биотехнологии.
Тел.: 8 (4967) 36-01-17 (служебн.); 8 (905) 780-61-61 (моб.).
E-mail: mokrievich@obolensk.org

Contacts:

Alexander N. Mokrievich
142279, Russian Federation, Moscow Region, Serpukhov District,
Obolensk, State Research Center for Applied Microbiology
and Biotechnology.
Phone: +7 (4967) 36-01-17 (office); +7 (905) 780-61-61 (mobile).
E-mail: mokrievich@obolensk.org

Для цитирования:

Кудрявцева Т.Ю., Мокриевич А.Н. Стратегии выживания,
распространения и вирулентности возбудителя туляремии //
Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 9–23. doi: 10.15789/2220-
7619-SFT-17576

Citation:

Kudryavtseva T.Yu., Mokrievich A.N. Strategies for tularemia pathogen
survival, spread and virulence // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 9–23. doi: 10.15789/2220-
7619-SFT-17576

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на период 2021–2025 гг. «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней» (Пер. № ЕГИСУ НИОКТР 121021500051-2).

The study was carried out within the framework of the industry research program of Rosпотребнадзор for the period 2021–2025 “Scientific support of epidemiological surveillance and sanitary protection of the territory of the Russian Federation. Creation of new technologies, means and methods of control and prevention of infectious and parasitic diseases” (No. 121021500051-2).

попытка объединения отличий, особенностей строения и «уловок» клеток вида *F. tularensis*, позволяющих данным бактериям являться мощным патогеном, обладать высокой способностью к адаптации при низкой изменчивости возбудителя и ограниченном геноме по сравнению с другими особо опасными бактериями.

Ключевые слова: *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, вирулентность, эндотоксин, внутриклеточная локализация и репликация, множественная лекарственная устойчивость.

STRATEGIES FOR TULAREMIA PATHOGEN SURVIVAL, SPREAD AND VIRULENCE

Kudryavtseva T.Yu., Mokrievich A.N.

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

Abstract. The bacterium *Francisella tularensis* is the etiological agent of tularemia, a natural focal, especially dangerous infection, which, “thanks to” its low infectious dose and ability to be transmitted to humans via all possible routes, is a potential bioterrorism agent. This pathogen has been known to mankind for over a hundred years, but it is still impossible to prevent massive human disease outbreaks and sporadic incidence cases, whereas tularemia diagnosis may be verified within several days-to-weeks. The basis for tularemia causative agent virulence is based on its ability to disrupt phagocyte function. In animals and humans, the various *Francisella tularensis* systems work together to bypass host immune system, attach to and enter eukaryotic cells, block phagosome-lysosome fusion, multiply in various host cells without being detected, inhibit their destruction and cause host cell death to release bacteria and infect neighboring tissue cells, thus developing an infectious disease in different organs. This is achieved through a unique complement-dependent penetration process into host cell, called loop phagocytosis, and an unusual inert endotoxin as well as variation in diverse forms of “free” lipid A modifications and lipid A in the LPS composition, its dynamic acyl chain length regulation, and specifically combined regulatory factors to induce the “pathogenicity island” protein synthesis. Accumulated point mutations, intragenomic rearrangements, deletions, insertions, duplications, transpositions, gene degradation, variation in the number of copies in repeated DNA sequences, as well as homologous and non-homologous recombinations underlie a markedly expanded potential for existence of the tularemia causative agent: they contribute to the holarctic subspecies strain survival in varying conditions, including osmotic shock, to form multiple resistance to various toxic substances and alter *F. tularensis* subspecies virulence. Analyzing a whole body of publications on the abovementioned aspects for tularemia causative agent life activity attempts to combine the differences, structural features and “tricks” of the *F. tularensis* species cells allowing them to be a powerful pathogen, with a high potential to adapt upon low pathogen variability and a limited genome length compared with other specially dangerous bacteria.

Key words: *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, virulence, endotoxin, intracellular localization and replication, multidrug resistance.

Экологическая стабильность

Francisella tularensis — мелкий, грамотрицательный, неподвижный, факультативный внутриклеточный бактериальный патоген — имеет впечатляющий диапазон хозяев, который включает сотни видов: позвоночных (в основном, это грызуны и зайцы), беспозвоночных (в основном это членистоногие) и даже свободноживущих простейших [3, 5, 54, 87, 132]. Наличие нескольких хозяев (полигостальность) и переносчиков (поливекторность) у микроорганизма обеспечивает устойчивость паразитарной системы за счет интенсивной циркуляции возбудителя, особенно в условиях высокой численности носителей. Например, в 2022 г. в процессе эпизоотолого-эпидемиологического мониторинга на территории Российской Федерации было выявлено 42 вида мелких млекопитающих и 13 видов клещей, инфицированных возбудителем туляремии [1].

Наиболее распространены в мире и на территории России штаммы вирулентного для человека и животных подвида *F. tularensis* subsp.

holarctica, которые выделяются на территориях различных природных очагов Европы, Азии, Северной Америки, Австралии, от водных до пустынных, со своими хозяевами и переносчиками [32, 55, 93, 111, 113].

В природе имеется огромное разнообразие микроорганизмов, из которого культивируемые в искусственных условиях бактерии составляют около 1% [4]. Клетки возбудителя туляремии, по-видимому, занимают промежуточное положение. Бактерию, находящуюся в объектах внешней среды, можно видеть в микроскоп, обнаруживать иммунологическими методами и выявлять ДНК возбудителя с помощью ПЦР, но вырастить культуру возбудителя туляремии из воды, членистоногих, инфицированных предметов на искусственной питательной среде практически не удается. Однако введение суспензии этих образцов чувствительному животному, например, мыши, приводит к развитию типичного заболевания, и при высеве из органов погибшего или эвтаназированного грызуна медленно, в течение 2–3 дней, вырастают колонии возбудителя туляремии. Показано,

что во внешней среде бактерия переходит в инфекционное, жизнеспособное, но «некультивируемое» состояние, сохраняя при этом способность реверсии в вегетативные вирулентные формы при изменении условий существования [21, 43]. При этом более древние авирулентные бактерии — подвид *F. tularensis* subsp. *novicida* и вид *F. philomiragia* — культивируются на искусственных питательных средах из воды естественных водоемов и других объектов окружающей среды [2, 19, 121]. Эпизоотический процесс в природном очаге туляремии складывается из двух составляющих: сохранения возбудителя в межэпидемический период и циркуляции возбудителя в эпидемический период. Между вспышками возбудитель сохраняется в окружающей среде в неактивном состоянии практически без репликации. Этим объясняют идентичность генотипа при возникновении вспышки через десятилетия [10, 118].

F. tularensis имеет низкую метаболическую активность, что говорит о том, что это зависящий от хозяина патоген. Показана возможность существования популяции бактерий в водно-болотной среде, насыщенной простейшими, с высокой питательной доступностью [87, 105].

Способность выдерживать осмотический шок при переходе от внутриклеточного образа жизни к существованию в соленой и пресной воде значительно расширила возможности распространения и выживания голарктического подвида по сравнению с другими вирулентными подвидами. Канал, который действует как «клапан сброса давления», кодируется консервативным геном (FTL_1753), с единственной из 165 аминокислот заменой между штаммами подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *F. tularensis* subsp. *tularensis* [131]. Способность клеток возбудителя туляремии *F. tularensis* subsp. *holarctica* существовать в природных водоемах является ключевым моментом не только для выживания бактерии, но и для ее более широкого распространения, сохранения и взаимодействия с развивающимися в воде простейшими и личинками насекомых [20, 21].

Показано, что возбудитель туляремии не размножается в клещах, насекомых, не передается трансвариально, но при питании кровью больных туляремией животных членистоногие способны сохранять микроорганизм длительное время и передавать его при укусах другому животному и человеку. Комары получают туляремийный микроб через личинку, которая развивается в инфицированной воде, или питаясь кровью инфицированного животного [6, 11, 73, 120].

Бактерии *F. tularensis* subsp. *holarctica* являются мощным патогеном, обладают высокой способностью к адаптации при низкой изменчивости возбудителя и чрезвычайно ограни-

ченном геноме по сравнению с другими особо опасными бактериями. Так, геном возбудителя туляремии состоит из одной хромосомной ДНК размером около 1,9 Mbp (megabases), в то время как геном *Yersinia pestis* состоит из хромосомы размером 4,65 Mbp и трех плазмид вирулентности 96,2 kb (в среднем 1,8 копий на клетку), 70,3 kb (4,3 копии на клетку) и 9,6 kb (186 копий на клетку) [88]. Геном возбудителя сибирской язвы состоит из хромосомы размером 5,23 Mbp и двух плазмид вирулентности pXO1 = 181 677 kbp, в среднем 3 копии плазмиды на клетку, и 2 копии pXO2 = 94 830 kbp [102]. Бактерии *Brucella melitensis* имеют две хромосомы размером 3 294 931 Mbp (2 117 144 Mbp и 1 177 787 Mbp) [40].

Общий механизм приобретения генетической изменчивости у бактерий чаще всего происходит путем горизонтального переноса генов. Это показано для многих видов бактерий. Штаммы вирулентных для человека и животных подвида *F. tularensis* отличаются от многих грамотрицательных микроорганизмов тем, что не содержат плазмид. У вирулентных подвида *F. tularensis* генетическая вариабельность, в том числе устойчивость к токсическим атакам внешней среды и продуктам жизнедеятельности других организмов, возникла в результате мутаций, а не приобретения новых генов с помощью плазмид [23].

Проведенный *in silico* анализ показал, что штаммы *F. tularensis* subsp. *novicida* обладают системой CRISPR/Cas для защиты от вторжения генетических элементов, но у трех вирулентных для человека подвида *F. tularensis* (*tularensis*, *holarctica* и *mediasiatica*) гены, ответственные за систему CRISPR/Cas, не функциональны [52].

Все близкородственные представители рода *Francisella* обнаруживают значительную перестройку своих геномов по отношению друг к другу [91]. Чумной микроб и возбудитель туляремии являются двумя яркими примерами резкого увеличения количества IS-элементов и хромосомных перестроек, опосредованных этими повторяющимися последовательностями, в популяциях, которые в противном случае имеют очень мало полиморфизмов. Интерпретация повышенной частоты таких изменений заключается в том, что большая часть генома освобождается от селективного давления из-за «сдвига ниши», в которой оказался микроорганизм. В относительно узкой новой нише большая часть генома больше не нужна и открыта для случайных мутаций [14, 24, 69].

Показано, что в результате эволюции свободноживущие авирулентные более древние виды *F. philomiragia* и *F. novicida* превратились в патогенные, зависимые от хозяина штаммы подвида *F. tularensis*, и этот процесс сопровож-

дался значительной, независимой потерей функций генов и приобретением элементов вставок, обеспечивающих механизмы транслокации при геномных перестройках, которые в большинстве случаев относятся к гомологичной рекомбинации [103, 128]. Показано, что патогенные штаммы отличаются на 148 генов, которые были детектированы только в свободноживущих штаммах, у вирулентных подвидов *F. tularensis* отсутствуют пути биосинтеза ряда аминокислот, а также снижена экспрессия 352 генов по сравнению со свободноживущими штаммами подвида *F. novicida* [85, 110].

Особенностью рода *Francisella* является необычный состав жирных кислот и высокое содержание липидов в клеточной стенке [33, 112].

Бактерия подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica* способна менять свой стиль жизни на внутриклеточный, персистирующий, «некультивируемый», симбиотический или свободноживущий, в зависимости от среды, в которую она попадает [20, 53, 73].

Высокая инвазивность

F. tularensis является высокоинфекционным организмом. Вдыхание всего 10 колониеобразующих единиц достаточно, чтобы вызвать заболевание у людей со смертельным исходом в 30–60% случаев при неправильном лечении [66].

Возбудитель туляремии способен проникать в организм человека и животного всеми возможными путями: трансмиссивным, контактным, алиментарным и аэрогенным, но инфекция не контагиозна — не передается от человека человеку. В организме человека микроб размножается в месте входных ворот, вызывая некротическую воспалительную реакцию с развитием на коже — язвы, на миндалинах — некротической ангины, в легких — очаговой некротической пневмонии, все состояния сопровождаются воспалением регионарных лимфатических узлов [113].

Бактерия проникает в различные типы клеток. Помимо макрофагов, *F. tularensis* может инфицировать полиморфно-ядерные нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки, эндотелиальные и альвеолярные эпителиальные клетки типа II, гепатоциты и даже эритроциты [18, 46, 49, 58, 72, 78, 81, 94, 107, 108].

Используя линию макрофагоподобных клеток человека (ГНР-1), показали, что бактерии *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 и subsp. *holarctica* LVS проникают в макрофаги человека посредством уникального, зависящего от комплемента процесса, названного петлевым фагоцитозом [28].

Прилипание и поглощение *F. tularensis* макрофагами сильно зависит от рецепторов комплемента и от сыворотки с интактным фактором комплемента С3. Комплемент и рецепто-

ры комплемента играют доминирующую роль в опосредовании эффективного поглощения вирулентных подвидов *F. tularensis* [64, 65]. При не опсоническом поглощении штаммов *F. tularensis* значительную роль играет фагоцитарный рецептор маннозы, который обеспечивает бактерию средствами для ограничения поглощения бактерицидными фагоцитами [28].

Внутриклеточная локализация и репликация

Возбудитель туляремии не только проникает, но и реплицируется в цитозоле клеток эукариотического хозяина. После захвата макрофагами посредством уникального петлевого фагоцитоза бактерии первоначально находятся внутри фагосомы, связанной с мембраной. Поглощение требует актиновых микрофиламентов, образующих фибриллярное покрытие фагосомы, которое защищает от слияния с лизосомой и способствует ограниченному приобретению лизосомных маркеров [28, 30].

После поглощения туляремийного микроба макрофагами млекопитающих фагоцитарная вакуоль не перерастает в фаголизосому, а превращается сначала в раннюю эндосому, затем в позднюю эндосому, которые характеризуются специфическими маркерами. С помощью привлечения протонного насоса происходит снижение рН среды, разрушение фагосомальной мембраны и выход микробов в цитозоль, где и происходит репликация [27, 29]. Короткое время, проведенное в фагоцитарной вакуоли (30–60 мин), является противомикробным средством защиты, от активных форм кислорода и антимикробных пептидов [59]. Поздние этапы внутриклеточной пролиферации сопровождаются гибелью инфицированных макрофагов или здоровых клеток, что опосредуется универсальным путем апоптоза или пироптоза [18, 87]. За ним следует выход бактерий из клетки.

Чтобы избежать слияния фагосомы с лизосомой, бактерии *F. tularensis* активируют свою систему секреции, подобную типу VI (type 6 secretion system, T6SS), которая кодируется островом патогенности (FPI). Регуляторные гены и локус, называемый «островом патогенности», включает в себя в штаммах патогенных подвидов возбудителя туляремии два повтора от 16 до 19 генов, ответственных за синтез соответственного числа секретируемых белков «острова патогенности», которые играют важную роль в способности микроорганизма избегать фагоцитоза и размножаться в иммунных клетках организма хозяина [67, 83, 84].

Необходимым этапом вирулентности *F. tularensis* является выход клеток из фагосо-

мы в цитозоль, где бактерия способна быстро делиться и распространяться в окружающие ткани. Для этого *F. tularensis* использует регуляторную схему для активации патогенеза посредством индукции синтеза белков «острова патогенности», которая включает уникальную РНК полимеразу, состоящую из двух крупных субъединиц, и уникальную комбинацию регуляторных факторов. Ключевую роль играет гетеродимер MglA (macrophage growth locus protein A) и SspA (stringent starvation protein A), который выполняет две роли в активации генов вирулентности. Включает функцию активации посредством комплекса RNAP σ 70-(MglA-SspA) с фактором специфичности, необходимым для распознавания промотора (σ 70) и основной β '-субъединицей РНК-полимеразы (RNAP). Дополнительным активатором транскрипции генов острова патогенности является комплекс (MglA-SspA) — ppGpp (стрессовый алармон, гуанозин тетрафосфат) — PigR (pathogenicity island gene regulator) [122].

Способность поражать и размножаться в различных клетках-хозяевах представляется одной из главных особенностей экологии и эпидемиологии *F. tularensis*. После инфицирования эукариотических клеток бактерии *F. tularensis* быстро диссеминируют в нормальные здоровые клетки селезенки, печени, легких, лимфатических узлов и костного мозга и размножаются в этих органах [34, 36, 44, 70].

Поскольку эритроциты не способны к фагоцитозу или эндоцитозу, остается неизвестным, как *F. tularensis* проникает в эти клетки. Более того, последствия заселения во внутриклеточном пространстве эритроцитов не определены. Известно только, что пребывание в эритроците увеличивает способность *F. tularensis* колонизировать клещей. Эритроцит защищает бактерии от среды с низким рН, аналогичной среде кишечных клеток питающегося клеща. Исследования показали, что система секреции *F. tularensis* типа VI (type 6 secretion system, T6SS) необходима для инвазии эритроцитов, поскольку мутация *mglA* (регулятора транскрипции генов T6SS), *dotU* или *iglC* (два гена, кодирующих механизм T6SS) резко снижает проникновение бактерий в эритроциты [107].

У туляремийного микроба отсутствуют экзотоксины (система секреции типа III). Вместо этого *F. tularensis* повреждает ткани путем инвазии и разрушения. Неконтролируемый рост в системных органах приводит к повреждениям клеток, гиперсекреции цитокинов и смерти от цитокинового шторма [37, 38].

Защитный иммунитет, вызванный естественной инфекцией *F. tularensis* или вакцинацией штаммом LVS у людей, зависит в первую

очередь от клеточно-опосредованных иммунных ответов Th1-типа, включая интерферон-гамма, фактор некроза опухоли-альфа и интерлейкин-12 [57]. По сей день остается большой пробел в понимании роли В-клеток и их продуктов — антител и цитокинов — в опосредовании защитного ответа на инфекцию, вызванную *F. tularensis* [64, 65].

Несмотря на хорошо известную роль пилей в адгезии, агрегации, подвижности и поглощении ДНК другими грамотрицательными бактериями (система секреции типа IV), подобные функции не приписываются роговидным выступам на поверхности бактерий *F. tularensis* [24, 41, 42].

Необычный, инертный эндотоксин

Молекулы липополисахарида (ЛПС, эндотоксин) грамотрицательных бактерий играют решающую роль в поддержании целостности внешней мембраны, регуляции проницаемости клеток, регуляции иммунных ответов хозяина, устойчивости к антимикробным пептидам, устойчивости к антителам хозяина и предотвращении активации комплемента. Мутанты, лишенные ЛПС, часто проявляют фенотипы, которые включают снижение жизнеспособности, медленный рост и потерю вирулентности. Установлена тесная связь между строением ЛПС клеток *F. tularensis* subsp. *holarctica* и уклоном от иммунной системы хозяина. Все изменения эндотоксина возбудителя туляремии приводят к очень низкому уровню токсичности ЛПС и отсутствию иммунного распознавания липида А клеток *F. tularensis*. Иммунный ответ организма млекопитающего, чувствительного к возбудителю туляремии, или опаздывает, или значительно слабее, чем нужно [58].

Липополисахарид *F. tularensis* состоит из 1) липида А, который прикрепляет ЛПС к внешней мембране; 2) ядра, или корового олигосахарида (Kdo), и 3) O-полисахарида (также известного как O-антиген), который содержит различное количество повторяющихся единиц тетрасахарида. ЛПС клеток возбудителя туляремии необычен по сравнению с ЛПС других грамотрицательных бактерий, поскольку он не может активировать Toll-подобный рецептор 4 (TLR4) при всех температурах роста, который в значительной степени ответствен за воспаление в ответ на бактериальный эндотоксин [51, 71].

Распознавание липида А как чужеродного является важным признаком защиты организма млекопитающих. Многие клетки, такие как макрофаги эпителиальные клетки, распознают липид А с помощью механизмов врожденного иммунитета. В отличие от других, липид А

F. tularensis subsp. *holarctica* является очень слабым стимулятором врожденного иммунитета хозяина. Отсутствие иммунного распознавания липида А клеток *F. tularensis* объясняется несколькими структурными различиями по сравнению с мощным иммунным активатором — липидом А *E. coli*. Во-первых, липид А клеток возбудителя туляремии является тетраацилированным по сравнению с гексаацилированным липидом А, обычно встречающимся у большинства грамотрицательных микроорганизмов. Во-вторых, ацильные цепи липида А бактерий *F. tularensis* subsp. *holarctica* имеют длину от 16 до 18 атомов углерода по сравнению с цепями длиной от 12 до 14 атомов углерода обычного ЛПС. В-третьих, липид А клеток возбудителя туляремии является либо нефосфорилированным, либо монофосфорилированным (в положении 1'), по сравнению с прототипом липида А, который фосфорилирован в положениях 1' и 4' диглюкозаминового остова. В-четвертых, патоген маскирует свой 1'-фосфат, если он присутствует, путем добавления галактозамина (рис. 1). Снижение или отсутствие отрицательно заряженных фосфатов, вероятно, влияет на общий заряд ЛПС бактерий *F. tularensis*, частой мишени катионных антимикробных пептидов, и придает устойчивость к противомикробным пептидам [71, 86, 92, 98, 99, 123, 127].

Менее распространенные варианты липида А *F. tularensis* могут иметь различные модификации состава сахара, как показано пунк-

тирными кружками (В). Изменение длины ацильных цепей (14/16/18) при различных температурах указана в скобках (GlcN — глюкозамин, GalN — галактозамин).

Ген N-ацил-трансферазы LpxD1 приводит к включению более длинных ацильных цепей (длиной 18 атомов углерода) во 2 и 2' положениях липида А, тогда как экспрессия ферментов LpxD2 добавляет жирные кислоты с более короткой цепью (16 атомов углерода в длину) в тех же местах. Динамическое регулирование длины ацильной цепи липида А с помощью ферментов LpxD1/LpxD2 при различных температурах, по-видимому, важно для поддержания проницаемости мембран и восприимчивости к катионным антимикробным пептидам [71].

Кроме того, необычным оказалось то, что от 60 до 95% общего липида А существует в «свободной» форме, в которой отсутствуют коровый олигосахарид и полисахариды О-антигена [13, 68, 129].

В отличие от липида А, который присоединен к ядру и О-антигену, «свободный» липид А находится в двух формах, обе из которых содержат 1'-фосфат, модифицированный галактозамином, при этом А1 (без глюкозы), а А2 с глюкозой или маннозой в 6'-положении [129]. Способность клеток возбудителя туляремии реплицироваться внутриклеточно, сопротивляться противомикробным препаратам в фагосоме и вызывать заболевание требует разнообразных модификаций свободного липида А и липида А в составе ЛПС [59, 62].

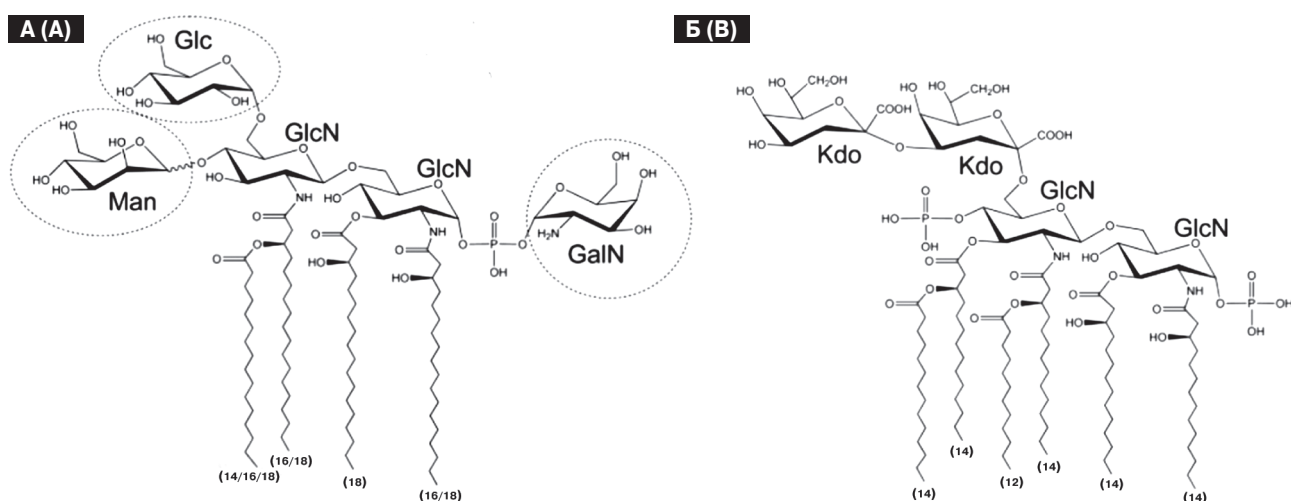


Рисунок 1. Сравнение строения липида А *F. tularensis* (А) и *E. coli* (Б) [86]

Figure 1. Comparison of the *F. tularensis* (A) and *E. coli* (B) lipid A structure [86]

Примечание. Менее распространенные варианты липида А *F. tularensis* могут иметь различные модификации состава сахара, как показано пунктирными кружками (А). Изменение длины ацильных цепей (14/16/18) при различных температурах указана в скобках (GlcN — глюкозамин, GalN — галактозамин).

Note. Less common *F. tularensis* lipid A variants may have different sugar composition modifications denoted by the dotted circles (A). The change in acyl chain length (14/16/18) at varying temperatures is indicated in parentheses (GlcN — glucosamine, GalN — galactosamine).

В модификации ЛПС наружной мембраны центральная роль принадлежит семейству флиппаз, которое включает белки, переносящие липид-связанные компоненты оболочки через мембрану. FlmX представляет собой флиппазу для модификации свободного липида А у *Francisella*. FlmX влияет на ядро и структуру О-антигена ЛПС. FlmX необходим для патогенеза высоко-вирулентных штаммов. Дефицит гена *flmX*, кодирующего флиппазу FlmX, вызывает дефекты модификации липида А, ремоделирования ядра и добавления О-антигена. Было обнаружено, что мутант *F. tularensis*, лишенный *flmX*, аттенуирован более чем в 1 000 000 раз, и не может противостоять врожденному антимикробному действию пептида LL-37 и антибиотика полимиксина [26].

Коровый олигосахарид (KDO) обеспечивает присутствие О-антигена на поверхности клетки. У большинства грамотрицательных бактерий липид А связан с ядром через две молекулы KDO. Необычной особенностью корового региона ЛПС клеток возбудителя туляремии является наличие единственной единицы KDO (восьмиуглеродного сахара, 3-дезоксид-маннооктулозоновой кислоты (3-deoxy-D-manno-octulosonic acid), присоединенной к липиду А [86, 125, 126, 127].

О-полисахарид. Бактериальные О-антигены, как известно, вызывают сильный ответ антител из-за их повторяющейся структуры и конститутивной экспрессии. О-антиген штаммов подвида *F. tularensis* subsp. *holartctica* идентичен штаммам подвида *F. tularensis* subsp. *tularensis* и состоит из четырех повторяющихся сахаров, но отличается от такового у *F. tularensis* subsp. *novicida* [130]. Как и у многих других бактериальных патогенов, О-антиген клеток *F. tularensis* subsp. *holartctica* играет роль в сопротивлении действию сыворотки крови. Мутанты *F. tularensis*, в которых отсутствует О-полисахарид, очень чувствительны к уничтожению комплементом сыворотки. Антитела к О-антигену обеспечивают защиту мышей, зараженных штаммом LVS [31], но не защищают от заражения штаммами *F. tularensis* subsp. *tularensis* [35].

Капсула. Электронно-плотный поверхностный материал, напоминающий капсулу, был продемонстрирован вокруг клеток вирулентных подвигов *F. tularensis* с помощью электронной микроскопии, что привело к выводу, что эти подвиды могут быть инкапсулированы. Однако эти электронно-плотные поверхностные структуры не всегда видны, что позволяет предположить, что этот капсулоподобный комплекс активируется в определенных условиях роста или окружающей среды. Детальный анализ капсулы *F. tularensis* выявил полисахарид, идентичный О-антигенной субъединице LPS [9]. Капсула обычно защищает бактерии

от комплемент-опосредованного лизиса, фагоцитоза и иммунного распознавания. Капсула блокирует связывание IgM и компонента С3 комплемента. Для внутриклеточного патогена, такого как *F. tularensis*, антифагоцитарные свойства капсулы могут показаться контрпродуктивными, и возможно именно поэтому синтез капсулы подавляется. Однако возможно, что изменяя синтез поверхностных структур капсулы, патоген манипулирует механизмами проникновения в клетку-хозяина и внутриклеточного транспорта, чтобы ограничить воспаление и способствовать внутриклеточному выживанию [39, 45]. Есть данные, что различные капсулоподобные вещества могут продуцироваться разными штаммами *F. tularensis* и что состав капсул может варьироваться в зависимости от условий культивирования или факторов окружающей среды. Если действительно существуют различные композиции капсул, эти варианты могут быть важной частью общей стратегии вирулентности возбудителя туляремии [12].

В геноме клеток *F. tularensis* найден локус из трех генов, *capBCA*, гомологичный локусу капсулы поли- γ -D-глутаминовой кислоты возбудителя сибирской язвы *B. anthracis*. Однако локус не участвует в синтезе капсулы, а показано, что ген *capA* может кодировать интегральный белок внутренней мембраны, который взаимодействует с CapB и CapC для экстрацеллюлярного экспорта углеводов [76]. Локус *capBCA* консервативен для штаммов типа А и В, а исследования мутагенеза в штаммах Schu S4 и LVS подтвердили, что мутанты *capBCA* или *capB* были аттенуированы как *in vitro*, так и *in vivo* [56, 80, 115].

Поскольку оболочка является самым наружным слоем *F. tularensis*, многие исследования были направлены на идентификацию и характеристику компонентов оболочки, учитывая их потенциальное воздействие на поверхность, вероятное прямое взаимодействие с молекулами клетки-хозяина и способность эффективно проникать через мембраны эукариот (рис. 2, II обложка). Было обнаружено, что клетки возбудителя туляремии содержат свыше 20 белков наружной мембраны (ОМР), из которых не менее десяти требуются для вирулентности. Белки наружной мембраны TolC (FTL_1865), FtlC (FTL_1107) и SilC (FTL_0686) функционируют как система секреции типа I для высвобождения эффекторных молекул и их доставки в клетку-хозяина. Гибридный белок FurA/B (FTL_0439), необходимый для внутриклеточного выживания, является транспортером железа [101, 109]. Интересно, что *furA/B* в штамме LVS является результатом делеции 1,5 т.п.н. между двумя генами, обнаруженными у вирулентных штаммов *Francisella*, которые участвуют в транспорте железа [100]. Белок наружной мембраны, липопротеин Flpp3 (FTL_0645), необходим для

выживания патогена в легких мыши [115], стимулирует TLR2, взаимодействует с антисывороткой [89]. Белок OmpA (FTL_0325) подавляет провоспалительные цитокиновые ответы в клетках-хозяевах [75]. Экспонируемый на поверхности белок FsaP (FTL_1658) важен для прилипания к эпителиальным клеткам [79]. Белок наружной мембраны DsbA (FipB) (FTL_1096) является бифункциональным белком, обладающим как оксидоредуктазной, так и изомеразной активностью для правильного образования сложных дисульфидных связей с более чем 50 субстратами, включая и другие белки наружной мембраны, такие как DipA (FTL_1306), ForA (FTL_1328), OmpA, белки острова патогенности и 25 гипотетических белков [94, 95, 96, 97, 104, 106, 119]. Дальнейшие исследования по идентификации и характеристике белков наружной мембраны помогут лучше понять высокую вирулентность возбудителя туляремии.

Капсула *F. tularensis*, идентичная O-антигену ЛПС, блокирует связывание антител и компонента С3 комплемента. ЛПС *F. tularensis* отличается тем, что он тетраацелирован, имеет длинноцепочечные ацильные цепи (длиной 16–20 атомов углерода), либо не фосфорилирован, либо монофосфорилирован, а также является слабым агонистом TLR4. Пили типа IV образуют роговидные выступы на поверхности бактерий, и хотя они коррелируют с вирулентностью точная функция пилей типа IV *F. tularensis* неизвестна. Система секреции типа VI, кодируемая Francisella Pathogenicity Island (FPI), включает два повтора от 16 до 19 генов, ответственных за синтез соответствующего числа секретлируемых белков «острова патогенности». *F. tularensis* секретирует также различные белки, включая AspA, KatG и SodB, но механизмы их секреции неизвестны. Наружная мембрана (OM) *F. tularensis* содержит много наружных мембранных белков (OMP) и липопротеинов наружной мембраны (OMLps), которые необходимы для вирулентности. Периплазматические белки и белки внутренней мембраны (IMPs) также играют роль в вирулентности *F. tularensis*, но о них известно гораздо меньше.

Врожденная множественная лекарственная устойчивость

Для того, чтобы выжить, микроорганизмы должны быть в состоянии пережить токсические атаки и продукты жизнедеятельности других организмов и быть способными справиться с различными ядовитыми веществами (дезинфекционными и моющими средствами, антибиотиками, красителями, тяжелыми металлами, растворителями). Множественная природная устойчивость к различным токсическим

веществам в клетках *F. tularensis* обусловлена не приобретением плазмид, а является результатом мутаций, которые произошли в генах, кодирующих регуляторы, мишени, переносчики и ферменты, модифицирующие противомикробные препараты [48, 61, 77].

Возбудитель туляремии, *Francisella tularensis*, проявляет значительную чувствительность только к трем основным группам антибиотиков — тетрациклам, аминогликозидам и фторхинолонам. Однако почти в 25% случаев лечение заболевших туляремией относящимися к этим группам антибиотиками оказывалось также неэффективным [17, 22, 90]. Напомним, подвид *holartctica* имеет врожденную устойчивость к пенициллинам, полимиксинам, цефалоспорином, линкозамидам (клиндамицину), ко-тримоксазолу (сульфометоксазола триметоприму). К макролидам, карбопенемам, монобактамам (азтреонему) наблюдается штамм-зависимая устойчивость изолятов голарктического подвида.

Частичная устойчивость к антибиотикам, которые используются для лечения туляремии обусловлена разными причинами. В случае фторхинолонов — это индуцированные антибиотиком мутации в бактериальных гиразах типа II GyrA и GyrB, а также мутации в топоизомеразах типа IV ParE или ParC (мишенях лекарственного средства), которые придают повышенную устойчивость патогена к фторхинолонам [116, 117].

Гентамицин не способен проникать через мембрану, поэтому внутриклеточная локализация возбудителя в организме человека или животного — это защита от данного лекарственного средства, но любые внеклеточные, нефагоцитированные бактерии будут уничтожены гентамицином. Хотя известны белки, модифицирующие аминогликозиды, у представителей других родов, но у *Francisella* они отсутствуют. Известные механизмы устойчивости *Francisella* к аминогликозидам основаны на эффлюксной помпе.

Наиболее распространенными бактериальными механизмами, вовлеченными в резистентность, являются снижение проницаемости наружной мембраны и естественная и индуцированная активность эффлюксных насосов [114]. Виды *Francisella* содержат гены очень небольшого числа насосов. В целом существует три тесно связанных, перекрывающихся насоса, классифицируемых как системы секреции I типа (T1SS), которые представляют собой ассоциацию белка оттока наружной мембраны, периплазматического белка, называемого белком слияния мембран (MFP, membrane fusion protein) и белком-транспортером. Геном *F. tularensis* содержит опероны, кодирующие 3 ортолога белков оттока наружной мембраны — TolC, FtlC и SilC [8, 74]. Делеция *tolC* (FTL_1865) или его го-

мологов в штамме LVS приводит к повышенной чувствительности ко многим антибиотикам [47]. Насос оттока, содержащий белок внешней мембраны TolC/AcrA/AcrB, играет важную роль в обеспечении устойчивости к эритромицину, SDS и устойчивости к аминогликозидам и гликотрипептидам [63]. Другой TolC-подобный белок, FtlC (FTL_1107), частично отвечает за антибиотико-резистентность к канамицину и стрептомицину. Насос оттока с участием ортолога SilC/EmrA1/EmrB (FTL_0686, FTL_0687, FTL_0688) играет важную роль в устойчивости к стрептомицину и неомицину [8].

Мишенью действия бета-лактамовых антибиотиков является синтез клеточной стенки бактерии. Устойчивость возбудителя туляремии к бета-лактамовым антибиотикам связывают с действием трех механизмов. Это нарушение проницаемости внешней мембраны с помощью ЛПС, действием четырех пенициллин-связывающих белков (PBP) и их активатора (LpoB), а также ферментативное разложение лекарственного средства сериновыми бета-лактамазами класса A [16].

Устойчивость к полимиксинам связывают с модификацией анионных фосфатных групп липида А возбудителя туляремии положительно заряженными фрагментами, такими как галактозамин, что приводит к уменьшению отрицательного поверхностного заряда и отталкиванию катионных противомикробных препаратов [71].

Механизмом устойчивости к эритромицину является модификация гена *rrl* 23S рибосомальной РНК. Введение точечной нуклеотидной замены цитозина на аденин в положении 2059 трех копий этого гена сделало чувствительные к эритромицину штаммы *F. tularensis* устойчивыми. Эта мутация оказалась генетической основой биоварной, фенотипической и таксономической дифференциации большой филогенетической группы В.12 штаммов голарктического подвида [60].

Поскольку *F. tularensis* является факультативной внутриклеточной бактерией, любой предлагаемый антибиотик должен обладать внутриклеточной фармакокинетической и фармакодинамической активностью. Антибиотик группы макролидов — азитромицин — обладает фармакокинетической способностью концентрироваться внутри макрофагов примерно в 1000 раз выше концентрации в сыворотке, вследствие чего бактерии возбудителя туляремии могут быть убиты во внутриклеточном состоянии этим антибиотиком [7].

Рифампицин также имеет фармакокинетический профиль, который включает накопление внутри эукариотических клеток и, таким образом, может оказывать антибакте-

риальное действие против внутриклеточных бактерий. Подавление рифампицином роста бактерий *F. tularensis* является бактериостатическим, но его можно использовать в сочетании с другими антибиотиками, например, с ципрофлоксацином [25].

Фенотипическая устойчивость

Различают генотипическую устойчивость, которая является наследуемой, и фенотипическую, которая не передается по наследству и заключается в изменении экспрессии генов. Фенотипическая устойчивость обеспечивается дополнительными механизмами бактериальной устойчивости, проявляемой или образованием биопленки, или включением медленной скорости роста и индукцией персистенции клеток, или индукцией экспрессии эффлюксной помпы [114].

Считается, что повышение антимикробной устойчивости может происходить из-за плохой диффузии антибиотиков через внеклеточный полисахаридный матрикс, составляющий биопленку. Неясно, какую роль биопленки играют в жизненном цикле возбудителя туляремии и болезни человека. Клетки вирулентных подвидов возбудителя туляремии значительно слабее образуют биопленки, чем свободноживущие экологические виды. Двухкомпонентная система, регулирующая производство биопленок (*qseBC*), важна для вирулентности, но считается, что биопленка больше способствует выживанию в различных экологических нишах и ее формирование, по-видимому, вызвано стрессом [15, 50, 124].

Заключение

Способность штаммов подвида *F. tularensis* subsp. *holarctica* занимать различные экологические ниши и резервуары и, соответственно, менять стиль жизни (внутриклеточный, симбиотический, «некультивируемый», персистирующий, свободноживущий) объясняет его высокую экологическую стабильность и более широкое и длительное распространение в окружающей среде в сравнении с другими подвидами возбудителя туляремии.

Центральный аспект вирулентности возбудителя туляремии — это способность разрушать функцию макрофагов и нейтрофилов, предотвращать нормальный эндосомально-лизосомальный путь фагоцитоза, который является необходимым компонентом природной защиты организма человека и животного от бактериальных патогенов.

Существование особенностей строения и варьирование разнообразных модификаций форм «свободного» липида А или липида А в составе ЛПС,

а также регулирование длины ацильных цепей эндотоксина обуславливает отсутствие иммунного распознавания липида А клеток *F. tularensis*, поддержание проницаемости мембран, способности клеток возбудителя туляремии реплицироваться внутриклеточно, вызывать заболевание и сопротивляться противомикробным препаратам. Также к мультирезистентности и отбору наиболее эффективных и универсальных механизмов привело широкое распространение возбудителя туляремии *F. tularensis* subsp. *holarctica* в различных биосистемах.

Таким образом, различные бактериальные системы *F. tularensis* работают вместе, создают уникальные метаболические программы, чтобы обойти иммунную систему человека и животного, прикрепиться к эукариотическим клеткам и проникнуть в них, блокировать слияние фагосомы с лизосомой, размножиться в различных клетках хозяина, не будучи обнаруженными, ингибируя свое уничтожение, и вызвать гибель клеток-хозяев для высвобождения бактерий и инфицирования соседних клеток, приводя к развитию заболевания.

Список литературы/References

1. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Куликалова Е.С., Холин А.В., Мазепа А.В., Борзенко М.А., Пичурина Н.Л., Павлович Н.В., Носков А.К., Гранквилевский Д.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. Множественная лекарственная устойчивость клеток *F. tularensis* subsp. *holarctica*, анализ эпизоотологической и эпидемиологической ситуации по туляремии на территории Российской Федерации в 2022 г. и прогноз на 2023 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2023. № 1. С. 37–47. [Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Kulikalova E.S., Kholin A.V., Mazepa A.V., Borzenko M.A., Pichurina N.L., Pavlovich N.V., Noskov A.K., Trankvilevsky D.V., Khramov M.V., Dyatlov I.A. Multidrug resistance of *F. tularensis* subsp. *holarctica*, epizootiological and epidemiological analysis of the situation on tularemia in the Russian Federation in 2022 and forecast for 2023. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2023, no. 1, pp. 37–47. (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2023-1-37-47
2. Мирончук Ю.В., Мазепа А.В. Жизнеспособность и вирулентность *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* в водных экосистемах (экспериментальное изучение) // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2002. № 2. С. 9–13. [Mironchuk Yu.V., Mazepa A.V. Viability and virulence of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in water ecosystems (experimental study). *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2002, vol. 2, pp. 9–13. (In Russ.)]
3. Олсуфьев Н.Г., Руднев Г.П. Туляремия. М.: Медицина, 1960. 459 с. [Olsuf'ev N.G., Rudnev G.P. Tularemia. *Moscow: Meditsina*, 1960. 459 p. (In Russ.)]
4. Титов Л.П. Классификация, номенклатура и эволюция значимых для медицины бактерий // Медицинский журнал. 2006. № 1. С. 13–18. [Titov L.P. Classification, nomenclature and evolution of medically significant bacteria. *Meditsinskiy zhurnal = Medical Journal*, 2006, pp. 13–18. (In Russ.)]
5. Abd H., Johansson T., Golovliov I., Sandstrom G., Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, vol. 69, no. 1, pp. 600–606. doi: 10.1128/AEM.69.1.600-606.2003
6. Abdellahoum Z., Maurin M., Bitam I. Tularemia as a mosquito-borne disease. *Microorganisms*, 2020, vol. 9: 26. doi: 10.3390/microorganisms9010026
7. Ahmad S., Hunter L., Qin A., Mann B.J., van Hoek M.L. Azithromycin effectiveness against intracellular infections of *Francisella*. *BMC Microbiol.*, 2010, vol. 10: 123. doi: 10.1186/1471-2180-10-123
8. Alqahtani M., Ma Z., Ketkar H., Suresh R.V., Malik M., Bakshi C.S. Characterization of a unique outer membrane protein required for oxidative stress resistance and virulence of *Francisella tularensis*. *J. Bacteriol.* 2018, vol. 200, no. 8: e00693-17. doi: 10.1128/JB.00693-17
9. Apicella M.A., Post D.M., Fowler A.C., Jones B.D., Rasmussen J.A., Hunt J.R., Imagawa S., Choudhury B., Inzana T.J., Maier T.M., Frank D.W., Zahrt T.C., Chaloner K., Jennings M.P., McLendon M.K., Gibson B.W. Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of *Francisella tularensis*. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 7: e11060. doi: 10.1371/journal.pone.0011060
10. Ariza-Miguel J., Johansson A., Fernández-Natal M.I., Martínez-Nistal C., Orduña A., Rodríguez-Ferri E.F., Hernández M., Rodríguez-Lázaro D. Molecular Investigation of tularemia outbreaks, Spain, 1997–2008. *Emerg. Infect. Dis.*, 2014, vol. 20, no. 5, pp. 754–761. doi: 10.3201/eid2005.130654
11. Bäckman S., Näslund J., Forsman M., Thelaus J. Transmission of tularemia from a water source by transstadial maintenance in a mosquito vector. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5: 7793. doi: 10.1038/srep07793
12. Bandara A.B., Champion A.E., Wang X., Berg G., Apicella M.A., McLendon M., Azadi P., Snyder D.S., Inzana T.J. Mutagenesis of a capsule-like complex (CLC) from *Francisella tularensis*, and contribution of the CLC to *F. tularensis* virulence in mice. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 4: e19003. doi: 10.1371/journal.pone.0019003
13. Barker J.H., Kaufman J.W., Zhang D.S., Weiss J.P. Metabolic labeling to characterize the overall composition of *Francisella* lipid A and LPS grown in broth and in human phagocytes. *Innate Immun.*, 2014, no. 20, pp. 88–103. doi: 10.1177/1753425913485308
14. Beckstrom-Sternberg S.M., Auerbach R.K., Godbole S., Pearson J.V., Beckstrom-Sternberg J.S., Deng Z., Munk C., Kubota K., Zhou Y., Bruce D., Noronha J., Scheuermann R.H., Wang A., Wei X., Wang J., J. Hao, Wagner D.M., Brettin T.S., Brown N., Gilna P., Keim P.S. Complete genomic characterization of a pathogenic A.II strain of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *PLoS One*, 2007, vol. 2, no. 9: e947. doi: 10.1371/journal.pone.0000947
15. Biot F.V., Bachert B.A., Mlynek K.D., Toothman R.G., Koroleva G.I., Lovett S.P., Klimko C.P., Palacios G.F., Cote C.K., Ladner J.T., Bozue J.A. Evolution of antibiotic resistance in surrogates of *Francisella tularensis* (LVS and *Francisella novicida*): effects on biofilm formation and fitness. *Front. Microbiol.*, 2020, vol. 11: 593542. doi: 10.3389/fmicb.2020.593542

16. Biswas S., Raoult D., Rolain J.M. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2008, no. 32, pp. 207–220. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.03.017
17. Boisset S., Caspar Y., Sutura V., Maurin M. New therapeutic approaches for treatment of tularemia: a review. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014, vol. 4: 40. doi: 10.3389/fcimb.2014.00040
18. Bradford M.K., Elkins K.L. Immune lymphocytes halt replication of *Francisella tularensis* LVS within the cytoplasm of infected macrophages. *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10: 12023. doi: 10.1038/s41598-020-68798-2
19. Broman T., Thelaus J., Andersson A.C., Bäckman S., Wikström P., Larsson E., Granberg M., Karlsson L., Bäck E., Eliasson H., Mattsson R., Sjöstedt A., Forsman M. Molecular detection of persistent *Francisella tularensis* subspecies holarctica in natural waters. *Int. J. Microbiol.*, 2011: 851946. doi: 10.1155/2011/851946
20. Brunet C.D., Hennebique A., Peyroux J., Pelloux I., Caspar Y., Maurin M. Presence of *Francisella tularensis* subsp. holarctica DNA in the aquatic environment in France. *Microorganisms*, 2021, vol. 9: 1398. doi: 10.3390/microorganisms9071398
21. Brunet C.D., Peyroux J., Ponderand L., Bouillot S., Girard T., Faudry É., Maurin M., Caspar Y. Aquatic long-term persistence of *Francisella tularensis* ssp. holarctica is driven by water temperature and transition to a viable but non-culturable state. *bioRxiv*, 2022: 480867. doi: 10.1101/2022.02.18.480867
22. Caspar Y., Maurin M. *Francisella tularensis* susceptibility to antibiotics: a comprehensive review of the data obtained in vitro and in animal models. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, vol. 7: 122. doi: 10.3389/fcimb.2017.00122
23. Challacombe J.F., Pillai S., Kuske C.R. Shared features of cryptic plasmids from environmental and pathogenic *Francisella* species. *PLoS One*, 2017, vol. 12: e0183554. doi: 10.1371/journal.pone.0183554
24. Champion M.D., Zeng Q.D., Nix E.B., Nano F.E., Keim P., Kodira C.D., Borowsky M., Young S., Koehrsen M., Engels R., Pearson M., Howarth C., Larson L., White J., Alvarado L., Forsman M., Bearden S.W., Sjöstedt A., Titball R., Mitchell S.L., Birren B., Galagan J. Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies. *PLoS Pathog.*, 2009, vol. 5, no. 5: e1000459. doi: 10.1371/journal.ppat.1000459
25. Chen L.F., Kaye D. Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifamycins, and aminoglycosides. *Med. Clin. North Am.*, 2011, no. 95, pp. 819–842. doi: 10.1016/j.mena.2011.03.007
26. Chin C.Y., Zhao J., Llewellyn A.C., Golovliov I., Sjöstedt A., Zhou P., Weiss D.S. *Francisella* FlmX broadly affects lipopolysaccharide modification and virulence. *Cell Rep.*, 2021, vol. 35, no. 11: 109247. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109247. PMID: 34133919
27. Clemens D.L., Lee B.Y., Horwitz M.A. Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect. Immun.*, 2004, no. 72, pp. 3204–3217. doi: 10.1128/IAI.72.6.3204-3217.2004
28. Clemens D.L., Lee B.Y., Horwitz M.A. *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, pp. 5892–5902. doi: 10.1128/IAI.73.9.5892-5902.2005
29. Clemens D.L., Lee B.Y., Horwitz M.A. *Francisella tularensis* phagosomal escape does not require acidification of the phagosome. *Infect. Immun.*, 2009, vol. 77, pp. 1757–1773. doi: 10.1128/IAI.01485-08
30. Clemens D.L., Lee B.Y., Horwitz M.A. O-antigen-deficient *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain mutants are ingested via an aberrant form of looping phagocytosis and show altered kinetics of intracellular trafficking in human macrophages. *Infect. Immun.*, 2012, vol. 80, pp. 952–967. doi: 10.1128/IAI.05221-11
31. Cole L.E., Yang Y., Elkins K.L., Fernandez E.T., Qureshi N., Shlomchik M.J., Herzenberg L.A., Vogel S.N. Antigen-specific B-1a antibodies induced by *Francisella tularensis* LPS provide long-term protection against *F. tularensis* LVS challenge. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2009, vol. 106, no. 11, pp. 4343–4348. doi: 10.1073/pnas.0813411106
32. Colquhoun D.J., Duodu S. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. *Vet. Res.*, 2011, vol. 42, no. 1: 47. doi: 10.1186/1297-9716-42-47
33. Colquhoun D.J., Larsson P., Duodu S., Forsman M. The family Francisellaceae. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds). *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014. doi: 10.1007/978-3-642-38922-1_236
34. Conlan J.W., North R.J. Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infect. Immun.*, 1992, vol. 60, pp. 5164–5171. doi: 10.1128/IAI.60.12.5164-5171
35. Conlan J.W., Shen H., Webb A., Perry M.B. Mice vaccinated with the O antigen of *Francisella tularensis* LVS lipopolysaccharide conjugated to bovine serum albumin develop varying degrees of protective immunity against systemic or aerosol challenge with virulent type A and type B strains of the pathogen. *Vaccine*, 2002, vol. 20, pp. 3465–3471. doi: 10.1016/s0264-410x(02)00345-6
36. Conlan J.W., Chen W., Shen H., Webb A., KuoLee R. Experimental tularemia in mice challenged by aerosol or intradermally with virulent strains of *Francisella tularensis*: bacteriologic and histopathologic studies. *Microb. Pathog.*, 2003, vol. 34, no. 5, pp. 239–248. doi: 10.1016/s0882-4010(03)00046-9
37. Cowley S.C. Editorial: Proinflammatory cytokines in pneumonic tularemia: too much too late? *J. Leukoc. Biol.*, 2009, vol. 86, no. 3, pp. 469–470. doi: 10.1189/jlb.0309119
38. Cowley S.C., Elkins K.L. Immunity to *Francisella*. *Front. Microbiol.*, 2011, vol. 2: 26. doi: 10.3389/fmicb.2011.00026
39. Dai S., Rajaram M.V., Curry H.M., Leander R., Schlesinger L.S. Fine tuning inflammation at the front door: macrophage complement receptor 3 mediates phagocytosis and immune suppression for *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog.*, 2013, vol. 9: e1003114. doi: 10.1371/journal.ppat.1003114
40. DelVecchio V.G., Kapatral V., Elzer P., Patra G., Mujer C.V. The genome of *Brucella melitensis*. *Vet. Microbiol.*, 2002, vol. 90, no. 1–4, pp. 587–592. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00238-9
41. Forslund A.L., Kuoppa K., Svensson K., Salomonsson E., Johansson A., Byström M., Oyston P.C.F., Mitchell S.L., Titball R.W., Noppa L., Frithz-Lindsten E., Forsman M., Forsberg A. Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Mol. Microbiol.*, 2006, vol. 59, no. 6, pp. 1818–1830. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05061.x
42. Forslund A.L., Salomonsson E.N., Golovliov I., Kuoppa K., Mitchell S., Titball R., Oyston P., Noppa L., Sjöstedt A., Forsberg A. The type IV pilin, PilA, is required for full virulence of *Francisella tularensis* subspecies tularensis. *BMC Microbiol.*, 2010, vol. 10: 227. doi: 10.1186/1471-2180-10-227

43. Forsman M., Henningson E.W., Larsson E., Johansson T., Sandström G. Francisella tularensis does not manifest virulence in viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2000, vol. 31, no. 3, pp. 217–224. doi: 10.1111/j.1574-6941.2000.tb00686.x
44. Fritz D.L., England M.J., Miller L., Waag D.M. Mouse models of aerosol-acquired tularemia caused by Francisella tularensis types A and B. *Comp. Med.*, 2014, vol. 64, no. 5, pp. 341–350.
45. Geier H., Celli J. Phagocytic receptors dictate phagosomal escape and intracellular proliferation of Francisella tularensis. *Infect. Immun.*, 2011, vol. 79, pp. 2204–2214. doi: 10.1128/IAI.01382-10
46. Gentry M., Taormina J., Pyles R.B., Yeager L., Kirtley M., Popov V.L., Klimpel G., Eaves-Pyles T. Role of primary human alveolar epithelial cells in host defense against Francisella tularensis infection. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, no. 8, pp. 3969–3978. doi: 10.1128/IAI.00157-07
47. Gil H., Platz G.J., Forestal C.A., Monfett M., Bakshi C.S., Sellati T.J., Furie M.B., Benach J.L., Thanassi D.G. Deletion of TolC orthologs in Francisella tularensis identifies roles in multidrug resistance and virulence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, no. 34, pp. 12897–12902. doi: 10.1073/pnas.0602582103
48. Girgis H.S., Hottes A.K., Tavaoie S. Genetic architecture of intrinsic antibiotic susceptibility. *PLoS One*, 2009, vol. 4, no. 5: e5629. doi: 10.1371/journal.pone.0005629
49. Golovliov I., Baranov V., Krocova Z., Kovarova H., Sjøstedt A. An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium Francisella tularensis can escape the phagosome of monocytic cells. *Infect. Immun.*, 2003, vol. 71, pp. 5940–5950. doi: 10.1128/IAI.71.10.5940-5950.2003
50. Golovliov I., Bäckman S., Granberg M., Salomonsson E., Lundmark E., Näslund J., Busch J.D., Birdsell D., Sahl J.W., Wagner D.M., Johansson A., Forsman M., Thelaus J. Long-term survival of virulent tularemia pathogens outside a host in conditions that mimic natural aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2021, vol. 87: e02713-20. doi: 10.1128/AEM.02713-20
51. Gunn J.S., Ernst R.K. The structure and function of Francisella lipopolysaccharide. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2007, no. 1105, pp. 202–218. doi: 10.1196/annals.1409.006
52. Gunnell M.K., Adams B.J., Robison R.A. The genetic diversity and evolution of Francisella tularensis with comments on detection by PCR. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2016, vol. 18, no. 1, pp. 79–91. doi: 10.21775/cimb.018.079
53. Hennebique A., Boisset S., Maurin M. Tularemia as a waterborne disease: a review. *Emerg. Microbes Infect.*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 1027–1042, doi: 10.1080/22221751.2019.1638734
54. Hopla C.E. The ecology of tularemia. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 1974, vol. 18, pp. 25–53.
55. Jackson J., McGregor A., Cooley L., Ng J., Brown M., Ong C.W., Darcy C., Sintchenko V. Francisella tularensis subspecies holarctica, Tasmania, Australia, 2011. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, vol. 18, no. 9, pp. 1484–1486. doi: 10.3201/eid1809.111856
56. 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, vol. 78, pp. 4341–4355. doi: 10.1128/IAI.00192-10
57. 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, vol. 8: 154. doi: 10.3389/fcimb.2018.00154
58. 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, vol. 4: 32. doi: 10.3389/fcimb.2014.00032
59. Jones C.L., Napier B.A., Sampson T.R., Llewellyn A.C., Schroeder M.R., Weiss D.S. Subversion of host recognition and defense systems by Francisella spp. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2012, vol. 76, no. 2, pp. 383–404. doi: 10.1128/MMBR.05027-11
60. Karlsson E., Golovliov I., Lärkeryd A., Granberg M., Larsson E., Öhrman C., Niemcewicz M., Birdsell D., Wagner D.M., Forsman M., Johansson A. Clonality of erythromycin resistance in Francisella tularensis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2016, vol. 71, pp. 2815–2823. doi: 10.1093/jac/dkw235
61. Kassinger S.J., van Hoek M.L. Genetic determinants of antibiotic resistance in Francisella. *Front. Microbiol.*, 2021, vol. 12: 644855. doi: 10.3389/fmicb.2021.644855
62. Kingry L.C., Petersen J.M. Comparative review of Francisella tularensis and Francisella novicida. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014, vol. 4: 35. doi: 10.3389/fcimb.2014.00035
63. Kopping E.J., Doyle C.R., Sampath V., Thanassi D.G. Contributions of TolC orthologs to Francisella tularensis Schu S4 multidrug resistance, modulation of host cell responses, and virulence. *Infect. Immun.*, 2019, vol. 87: e00823-18. doi: 10.1128/IAI.00823-18
64. Kubelkova K., Macela A. Francisella and antibodies. *Microorganisms*, 2021, vol. 9, no. 10: 2136. doi: 10.3390/microorganisms9102136
65. Kubelkova K., Hudcovic T., Kozakova H., Pejchal J., Macela A. Early infection-induced natural antibody response. *Sci. Rep.*, 2021, vol. 11, no. 1: 1541. doi: 10.1038/s41598-021-81083-0
66. Kugeler K.J., Mead P.S., Janusz A.M., Staples J.E., Kubota K.A., Chalcraft L.G., Petersen J.M. Molecular epidemiology of Francisella tularensis in the United States. *Clin. Infect. Dis.*, 2009, vol. 48, no. 7, pp. 863–870. doi: 10.1086/597261
67. Kumar R., Bröms J.E., Sjøstedt A. Exploring the diversity within the genus Francisella — an integrated pan-genome and genome-mining approach. *Front. Microbiol.*, 2020, vol. 11: 1928. doi: 10.3389/fmicb.2020.01928
68. Lai X.H., Shirley R.L., Crosa L., Kanistanon D., Tempel R., Ernst R.K., Gallagher L.A., Manoil C., Heffron F. Mutations of Francisella novicida that alter the mechanism of its phagocytosis by murine macrophages. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 7: e11857. doi: 10.1371/journal.pone.0011857
69. Larsson P., Elfsmark D., Svensson K., Wikström P., Forsman M., Brettin T., Keim P., Johansson A. Molecular evolutionary consequences of niche restriction in Francisella tularensis, a facultative intracellular pathogen. *PLoS Pathog.*, 2009, vol. 5, no. 6: e1000472. doi: 10.1371/journal.ppat.1000472
70. Lewisch E., Menanteau-Ledouble S., Tichy A., El-Matbouli M. Susceptibility of common carp and sunfish to a strain of Francisella noatunensis subsp. orientalis in a challenge experiment. *Dis. Aquat. Organ.*, 2016, vol. 121, no. 2, pp. 161–166. doi: 10.3354/dao03044
71. Li Y., Powell D.A., Shaffer S.A., Rasko D.A., Pelletier M.R., Leszyk J.D., Scott A.J., Masoudi A., Goodlett D.R., Wang X., Raetz C.R.H., Ernst R.K. LPS remodeling is an evolved survival strategy for bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2012, vol. 109, no. 22, pp. 8716–8721. doi: 10.1073/pnas.1202908109

72. Lindemann S.R., McLendon M.K., Apicella M.A., Jones B.D. An in vitro model system used to study adherence and invasion of *Francisella tularensis* live vaccines training nonphagocytic cells. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, pp. 3178–3182. doi: 10.1128/IAI.01811-06
73. Lundstrom J.O., Andersson A.C., Backman S., Schafer M.L., Forsman M., Thelaus J. Transstadial transmission of *Francisella tularensis* holarctica in mosquitoes, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, vol. 17, no. 5, pp. 794–799. doi: 10.3201/eid1705.100426
74. Ma Z., Banik S., Rane H., Mora V.T., Rabadi S.M., Doyle C.R., Thanassi D.G., Bakshi C.S., Malik M. EmrA1 membrane fusion protein of *Francisella tularensis* LVS is required for resistance to oxidative stress, intramacrophage survival and virulence in mice. *Mol. Microbiol.*, 2014, vol. 91, no. 5, pp. 976–995. doi: 10.1111/mmi.12509
75. Mahawar M., Atianand M.K., Dotson R.J., Mora V., Rabadi S.M., Metzger D.W., Huntley J.F., Harton J.A., Malik M., Bakshi C.S. Identification of a novel *Francisella tularensis* factor required for intramacrophage survival and subversion of innate immune response. *J. Biol. Chem.*, 2012, vol. 287, no. 30, pp. 25216–25229. doi: 10.1074/jbc.M112.367672
76. Martin-Garcia J.M., Hansen D.T., Zook J., Loskutov A.V., Robida M.D., Craciunescu F.M., Sykes K.F., Wachter R.M., Fromme P., Allen J.P. Purification and biophysical characterization of the CapA membrane protein FTT0807 from *Francisella tularensis*. *Biochemistry*, 2014, vol. 53, no. 12, pp. 1958–1970. doi: 10.1021/bi401644s
77. Martinez J.L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov. Today Technol.*, 2014, vol. 11, pp. 33–39. doi: 10.1016/j.ddtec.2014.02.001
78. McCaffrey R.L., Allen L.A. *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, vol. 80, pp. 1224–1230. doi: 10.1189/jlb.0406287
79. Melillo A., Sledjeski D.D., Lipski S., Wooten R.M., Basur V., Lafontaine E.R. Identification of a *Francisella tularensis* LVS outer membrane protein that confers adherence to A549 human lung cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2006, vol. 263, pp. 102–108. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00413.x
80. Michell S.L., Dean R.E., Eyles J.E., Hartley M.G., Waters E., Prior J.L., Titball R.W., Oyston P.C.F. Deletion of the *Bacillus anthracis* capB homologue in *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* generates an attenuated strain that protects mice against virulent tularaemia. *J. Med. Microbiol.*, 2010, vol. 59, pp. 1275–1284. doi: 10.1099/jmm.0.018911-0
81. Moreland J.G., Hook J.S., Bailey G., Ulland T., Nauseef W.M. *Francisella tularensis* directly interacts with the endothelium and recruits neutrophils with a blunted inflammatory phenotype. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2009, vol. 296, no. 6, pp. L1076–L1084. doi: 10.1152/ajplung.90332.2008
82. Mörner T. The ecology of tularaemia. *Rev. Sci. Tech.*, 1992, vol. 11, no. 4, pp. 1123–1130.
83. Nano F.E., Zhang N., Cowley S.C., Klose K.E., Cheung K.K., Roberts M.J., Ludu J.S., Letendre G.W., Meierovics A.I., Stephens G., Elkins K.L. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J. Bacteriol.*, 2004, vol. 186, no. 19, pp. 6430–6436. doi: 10.1128/JB.186.19.6430-6436.2004
84. Nano F.E., Schmerk C. The *Francisella* pathogenicity island. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2007, vol. 1105, pp. 122–137. doi: 10.1196/annals.1409.000
85. Öhrman C., Sahl J.W., Sjödin A., Uneklikt I., Ballard R., Karlsson L., McDonough R.F., Sundell D., Soria K., Bäckman S., Chase K., Brindefalk B., Sozhamannan S., Vallesi A., Häggglund E., Ramirez-Paredes J.G., Thelaus J., Colquhoun D., Myrtenäs K., Birdsell D., Johansson A., Wagner D.M., Forsman M. Reorganized genomic taxonomy of *Francisellaceae* enables design of robust environmental PCR assays for detection of *Francisella tularensis*. *Microorganisms*, 2021, vol. 9, no. 1: 146. doi: 10.3390/microorganisms9010146
86. Okan N.A., Kasper D.L. The atypical lipopolysaccharide of *Francisella*. *Carbohydr. Res.*, 2013, vol. 378, pp. 79–83. doi: 10.1016/j.carres.2013.06.015
87. Ozanic M., Marecic V., Kwaik Y.A., Santic M. The divergent intracellular lifestyle of *Francisella tularensis* in evolutionarily distinct host cells. *PLoS Pathog.*, 2015, vol. 11, no. 12: e1005208. doi: 10.1371/journal.ppat.1005208
88. Parkhill J., Wren B.W., Thomson N.R., Titball R.W., Holden M.T., Prentice M.B., Sebahia M., James K.D., Churcher C., Mungall K.L., Baker S., Basham D., Bentley S.D., Brooks K., Cerdeño-Tarraga A.M., Chillingworth T., Cronin A., Davies R.M., Davis P., Dougan G., Feltwell T., Hamlin N., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Leather S., Moule S., Oyston P.C., Quail M., Rutherford K., Simmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S., Barrell B.G. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*, 2001, vol. 413, no. 6855, pp. 523–527. doi: 10.1038/35097083
89. Parra M.C., Shaffer S.A., Hajjar A.M., Gallis B.M., Hager A., Goodlett D.R., Guina T., Miller S., Collins C.M. Identification, cloning, expression, and purification of *Francisella lpp3*: an immunogenic lipoprotein. *Microbiol. Res.*, 2010, vol. 165, no. 7, pp. 531–545. doi: 10.1016/j.micres.2009.11.004
90. Perez-Castrillon J.L., Bachiller-Luque P., Martin-Luquero M., Mena-Martin F.J., Herreros V. Tularaemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. *Clin. Infect. Dis.*, 2001, vol. 33, pp. 573–576. doi: 10.1086/322601
91. Petrosino J.F., Xiang Q., Karpathy S.E., Jiang H.Y., Yerrapragada S., Liu Y.M., Gioia J., Hemphill L., Gonzalez A., Raghavan T.M., Uzman A., Fox G.E., Highlander S., Reichard M., Morton R.J., Clinkenbeard K.D., Weinstock G.M. Chromosome rearrangement and diversification of *Francisella tularensis* revealed by the type B (OSU18) genome sequence. *J. Bacteriol.*, 2006, vol. 188, no. 19, pp. 6977–6985. doi: 10.1128/JB.00506-06
92. Phillips N.J., Schilling B., McLendon M.K., Apicella M.A., Gibson B.W. Novel modification of lipid A of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, pp. 5340–5348. doi: 10.1128/IAI.72.9.5340-5348.2004
93. Pilo P. Phylogenetic lineages of *Francisella tularensis* in animals. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2018, vol. 8: 258. doi: 10.3389/fcimb.2018.00258
94. Qin A., Mann B.J. Identification of transposon insertion mutants of *Francisella tularensis* strain SchuS4 deficient in intracellular replication in the hepatic cell line HepG2. *BMC Microbiol.*, 2006, vol. 6: 69. doi: 10.1186/1471-2180-6-69
95. Qin A., Scott D.W., Rabideau M.M., Moore E.A., Mann B.J. Requirement of the CXXC motif of novel *Francisella* infectivity potentiator protein B FipB, and FipA in virulence of *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *PLoS One*, 2011, vol. 6: e24611. doi: 10.1371/journal.pone.0024611
96. Qin A., Scott D.W., Thompson J.A., Mann B.J. Identification of an essential *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* virulence factor. *Infect. Immun.*, 2009, vol. 77, pp. 152–161. doi: 10.1128/IAI.01113-08

97. Qin A., Zhang Y., Clark M.E., Rabideau M.M., MillanBarea L.R., Mann B.J. FipB, an essential virulence factor of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*, has dual roles in disulfide bond formation. *J. Bacteriol.*, 2014, vol. 196, no. 20, pp. 3571–3581. doi: 10.1128/JB.01359-13
98. Raetz C.R., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 2002, vol. 71, pp. 635–700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414
99. Raetz C.R., Guan Z., Ingram B.O., Six D.A., Song F., Wang X., Zhao J. Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. *J. Lipid Res.*, 2009, vol. 50 (suppl.), pp. S103–S108. doi: 10.1194/jlr.R800060-JLR200
100. Ramakrishnan G., Sen B., Johnson R. Paralogous outer membrane proteins mediate uptake of different forms of iron and synergistically govern virulence in *Francisella tularensis tularensis*. *J. Biol. Chem.*, 2012, vol. 287, no. 30, pp. 25191–25202. doi: 10.1074/jbc.M112.371856
101. Ramakrishnan G., Sen B. The FupA/B protein uniquely facilitates transport of ferrous iron and siderophore-associated ferric iron across the outer membrane of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbiology*, 2014, vol. 160, pp. 446–457. doi: 10.1099/mic.0.072835-0
102. Ravel J., Jiang L., Stanley S.T., Wilson M.R., Decker R.S., Read T.D., Worsham P., Keim P.S., Salzberg S.L., Fraser-Liggett C.M., Rasko D.A. The complete genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames “Ancestor”. *J. Bacteriol.*, 2009, vol. 191, no. 1, pp. 445–446. doi: 10.1128/JB.01347-08
103. Rohmer L., Fong C., Abmayr S., Wasnick M., Freeman T.J.L., Radey M., Guina T., Svensson K., Hayden H.S., Jacobs M., Gallagher L.A., Manoil C., Ernst R.K., Drees B., Buckley D., Haugen E., Bovee D., Zhou Y., Chang J., Levy R., Lim R., Gillett W., Guentherer D., Kang A., Shaffer S.A., Taylor G., Chen J., Gallis B., D’Argenio D.A., Forsman M., Olson M.V., Goodlett D.R., Kaul R., Miller S.I., Brittner M.J. Comparison of *Francisella tularensis* genomes reveals evolutionary events associated with the emergence of human pathogenic strains. *Genome Biol.*, 2007, vol. 8, no. 6: R102. doi: 10.1186/gb-2007-8-6-r102
104. Rowe H.M., Huntley J.F. From the outside-in: the *Francisella tularensis* envelope and virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2015, vol. 5: 94. doi: 10.3389/fcimb.2015.00094
105. Santic M., Ozanic M., Semic V., Pavokovic G., Mrvcic V., Kwaik Y.A. Intra-vacuolar proliferation of *F. novicida* within *H. vermiciformis*. *Front. Microbiol.*, 2011, vol. 2: 78. doi: 10.3389/fmicb.2011.00078
106. Schmidt M., Klimentova J., Rehulka P., Straskova A., Spidlova P., Szotakova B., Stulik J., Pavkova I. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* DsbA homologue: a thioredoxin-like protein with chaperone function. *Microbiology*, 2013, vol. 159, pp. 2364–2374. doi: 10.1099/mic.0.070516-0
107. Schmitt D.M., Barnes R., Rogerson T., Haught A., Mazzella L.K., Ford M., Gilson T., Birch J.W.-M., Sjöstedt A., Reed D.S., Franks J.M., Stolz D.B., Denvir J., Fan J., Rekulapally S., Primerano D.A., Horzempa J. The role and mechanism of erythrocyte invasion by *Francisella tularensis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, vol. 7: 173. doi: 10.3389/fcimb.2017.00173
108. Schulert G.S., Allen L.A. Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, vol. 80, pp. 563–571. doi: 10.1189/jlb.0306219
109. Sen B., Meeker A., Ramakrishnan G. The *ftsI* homolog, FTL_0439 (*fupA/B*), mediates siderophore-dependent iron uptake in *Francisella tularensis* LVS. *Infect. Immun.*, 2010, vol. 78, no. 10, pp. 4276–4285. doi: 10.1128/IAI.00503-10
110. Shibata K., Shimizu T., Nakahara M., Ito E., Legoux F., Fujii S., Yamada Y., Furutani-Seiki M., Lantz O., Yamasaki S., Watarai M., Shirai M. The intracellular pathogen *Francisella tularensis* escapes from adaptive immunity by metabolic adaptation. *Life Sci. Alliance*, 2022, vol. 5, no. 10: e202201441. doi: 10.26508/lsa.202201441
111. Sjödin A., Svensson K., Öhrman C., Ahlinder J., Lindgren P., Duodu S., Johansson A., Colquhoun D.J., Larsson P., Forsman M. Genome characterisation of the genus *Francisella* reveals insight into similar evolutionary paths in pathogens of mammals and fish. *BMC Genomics*, 2012, vol. 13: 268. doi: 10.1186/1471-2164-13-268
112. Sjöstedt A.B. *Francisella*. In: *The Proteobacteria, Part B., Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, 2005, Vol. 2, 2nd ed. Eds.: D.J. Brenner, J.T. Staley, G.M. Garrity. *New York: Springer*, pp. 200–210.
113. Sjöstedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2007, vol. 1105, pp. 1–29. doi: 10.1196/annals.1409.009
114. Soto S.M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 2013, vol. 4, no. 3, pp. 223–229. doi: 10.4161/viru.23724
115. Su J., Yang J., Zhao D., Kawula T.H., Banas J.A., Zhang J.R. Genome-wide identification of *Francisella tularensis* virulence determinants. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, no. 6, pp. 3089–3101. doi: 10.1128/IAI.01865-06
116. Sutera V., Hoarau G., Renesto P., Caspar Y., Maurin M. In vitro and in vivo evaluation of fluoroquinolone resistance associated with DNA gyrase mutations in *Francisella tularensis*, including in tularaemia patients with treatment failure. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2017, vol. 50, no. 3, pp. 377–383. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.03.022
117. Sutera V., Levert M., Burmeister W.P., Schneider D., Maurin M. Evolution toward high-level fluoroquinolone resistance in *Francisella* species. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2014, vol. 69, no. 1, pp. 101–110. doi: 10.1093/jac/dkt321
118. Svensson K., Bäck E., Eliasson H., Berglund L., Granberg M., Karlsson L., Larsson P., Forsman M., Johansson A. Landscape epidemiology of tularemia outbreaks in Sweden. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, vol. 15, no. 12, pp. 1937–1947. doi: 10.3201/eid1512.090487
119. Thakran S., Li H., Lavine C.L., Miller M.A., Bina J.E., Bina X.R., Re F. Identification of *Francisella tularensis* lipoproteins that stimulate the toll-like receptor (TLR)2/TLR1 heterodimer. *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, no. 7, pp. 3751–3760. doi: 10.1074/jbc.M706854200
120. Thelaus J., Andersson A., Broman T., Bäckman S., Granberg M., Karlsson L., Kuoppa K., Larsson E., Lundmark E., Lundström J.O., Mathisen P., Näslund J., Schäfer M., Wahab T., Forsman M. *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* occurs in Swedish mosquitoes, persists through the developmental stages of laboratory-infected mosquitoes and is transmissible during blood feeding. *Microb. Ecol.*, 2014, vol. 67, pp. 96–107. doi: 10.1007/s00248-013-0285-1
121. Thelaus J., Andersson A., Mathisen P., Forslund A., Noppa L., Forsman M. Influence of nutrient status and grazing pressure on the fate of *Francisella tularensis* in lake water. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2009, vol. 67, no. 1, pp. 69–80. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00612.x

122. Travis B.A., Ramsey K.M., Prezioso S.M., Tallo T., Wandzilak J.M., Hsu A., Borgnia M., Bartesaghi A., Dove S.L., Brennan R.G., Schumacher M.A. Structural basis for virulence activation of *Francisella tularensis*. *Mol. Cell*, 2021, vol. 81, no. 1, pp. 139–152. e10. doi: 10.1016/j.molcel.2020.10.035
123. Trent M.S. Biosynthesis, transport, and modification of lipid A. *Biochem. Cell. Biol.*, 2004, vol. 82, no. 1, pp. 71–86. doi: 10.1139/o03-070
124. Van Hoek M.L. Biofilms: an advancement in our understanding of *Francisella* species. *Virulence*, 2013, vol. 4, pp. 833–846. doi: 10.4161/viru.27023
125. Vinogradov E., Conlan W.J., Gunn J.S., Perry M.B. Characterization of the lipopolysaccharide O-antigen of *Francisella novicida* (U112). *Carbohydr. Res.*, 2004, vol. 339, no. 3, pp. 649–654. doi: 10.1016/j.carres.2003.12.013
126. Vinogradov E., Perry M.B. Characterization of the core part of the lipopolysaccharide O-antigen of *Francisella novicida* (U112). *Carbohydr. Res.*, 2004, vol. 339, no. 9, pp. 1643–1648. doi: 10.1016/j.carres.2004.04.013
127. Vinogradov E., Perry M.B., Conlan J.W. Structural analysis of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.*, 2002, vol. 269, pp. 6112–6118. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03321.x
128. Vogler A.J., Birdsell D., Price L.B., Bowers J.R., Beckstrom-Sternberg S.M., Auerbach R.K., Beckstrom-Sternberg J., S., Johansson A., Clare A., Buchhagen J.L., Petersen J.M., Pearson T., Vaissaire J., Dempsey M.P., Foxall P., Engelthaler D.M., Wagner D.M., Keim P. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.*, 2009, vol. 191, no. 8, pp. 2474–2484. doi: 10.1128/JB.01786-08
129. Wang X., Ribeiro A.A., Guan Z., McGrath S.C., Cotter R.J., Raetz C.R. Structure and biosynthesis of free lipid A molecules that replace lipopolysaccharide in *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, no. 48, pp. 14427–14440. doi: 10.1021/bi061767s
130. Wang Q., Shi X., Leymarie N., Madico G., Sharon J., Costello C.E., Zaia J. A typical preparation of *Francisella tularensis* O-antigen yields a mixture of three types of saccharides. *Biochemistry*, 2011, vol. 50, no. 50, pp. 10941–10950. doi: 10.1021/bi201450v
131. Williamson D.R., Dewan K.K., Patel T., Wastella C.M., Ning G., Kirimanjeswara G.S. A single mechanosensitive channel protects *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* from hypoosmotic shock and promotes survival in the aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2018, vol. 84, no. 5: e02203-17. doi: 10.1128/AEM.02203-17
132. Zellner B., Huntley J.F. Ticks and Tularemia: do we know what we don't know? *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2019, vol. 9: 146. doi: 10.3389/fcimb.2019.00146

Авторы:

Кудрявцева Т.Ю., к.б.н., старший научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия;

Мокриевич А.Н., д.м.н., зав. отделом особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Россия.

Authors:

Kudryavtseva T.Yu., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;

Mokrievich A.N., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Especially Dangerous Infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.01.2024
Принята к печати 08.03.2024

Received 26.01.2024
Accepted 08.03.2024

Иллюстрация к статье «Стратегии выживания, распространения и вирулентности возбудителя туляремии» (авторы: Т.Ю. Кудрявцева, А.Н. Мокриевич) (с. 9–23)

Illustration for the article “Strategies for tularemia pathogen survival, spread and virulence”
(authors: Kudryavtseva T.Yu., Mokrievich A.N.) (pp. 9–23)

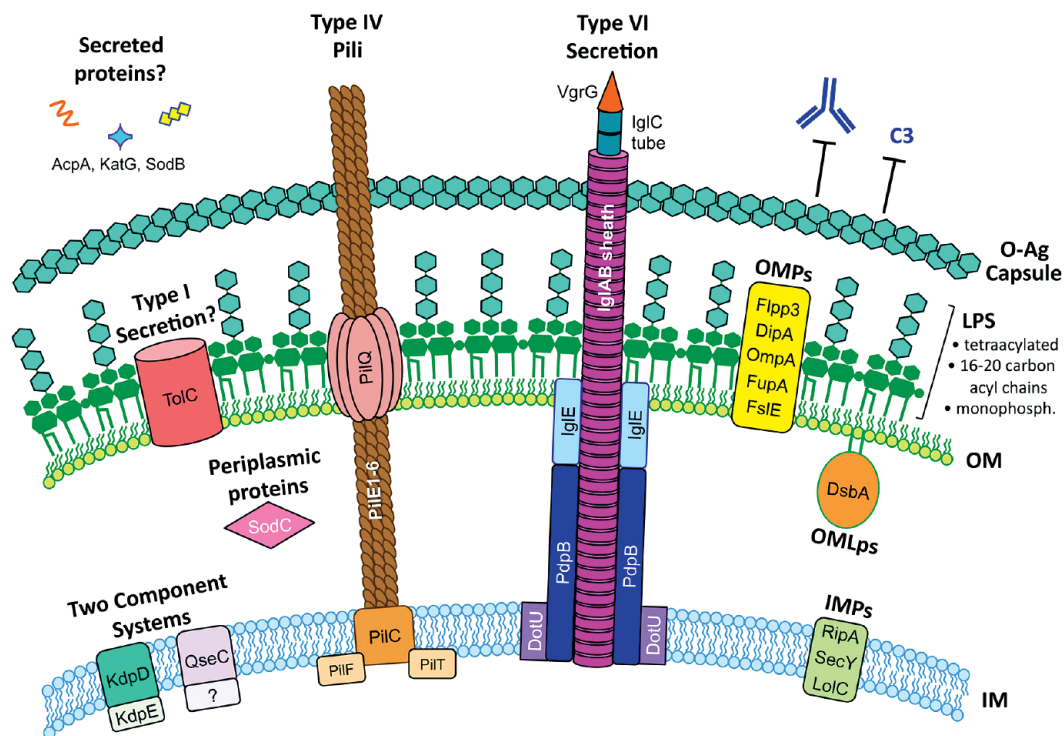


Рисунок 2. Особенности строения оболочки патогенных для человека подвидов *F. tularensis* и ее роль в вирулентности [104]

Figure 2. Features of shell structure in *F. tularensis* subspecies pathogenic to humans and its role in virulence [104]

Примечание. Капсула *F. tularensis*, идентичная О-антигену ЛПС, блокирует связывание антител и компонента С3 комплемента. ЛПС *F. tularensis* отличается тем, что он тетраацелирован, имеет длинноцепочечные ацильные цепи (длиной 16–20 атомов углерода), либо не фосфорилирован, либо монофосфорилирован, а также является слабым агонистом TLR4. Пили типа IV образуют роговидные выступы на поверхности бактерий, и хотя они коррелируют с вирулентностью, точная функция пилей типа IV *F. tularensis* неизвестна. Система секреции типа VI, кодируемая Francisella Pathogenicity Island (FPI), включает два повтора от 16 до 19 генов, ответственных за синтез соответствующего числа секретируемых белков «острова патогенности». *F. tularensis* секретирует также различные белки, включая AcpA, KatG и SodB, но механизмы их секреции неизвестны. Наружная мембрана (OM) *F. tularensis* содержит много наружных мембранных белков (OMP) и липопротеинов наружной мембраны (OMLps), которые необходимы для вирулентности. Периплазматические белки и белки внутренней мембраны (IMPs) также играют роль в вирулентности *F. tularensis*, но о них известно гораздо меньше.

Note. The *F. tularensis* capsule, identical to the LPS O-antigen, blocks the binding of antibodies and complement component C3. *F. tularensis* LPS is distinctive in that it is tetraacylated, has long-chain acyl chains (16–20 carbons in length), being either unphosphorylated or monophosphorylated, and is a weak TLR4 agonist. Type IV pili form horn-like projections on the surface of bacteria and, although they correlate with virulence, the precise function for type IV pili in *F. tularensis* is unknown. The type VI secretion system, encoded by the Francisella Pathogenicity Island (FPI), includes two repeats of 16 to 19 genes responsible for production of relevant number of secreted pathogenicity island proteins. *F. tularensis* also secretes various proteins, including AcpA, KatG, and SodB, but the underlying mechanisms are unknown. The outer membrane (OM) of *F. tularensis* contains many outer membrane proteins (OMP) and outer membrane lipoproteins (OMLps) that are essential for virulence. Periplasmic proteins and inner membrane proteins (IMPs) also play a role in the virulence of *F. tularensis*, but much less is known about them.