

2. Lista F., Reubsaet FA, De Santis R et al. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. BMC Microbiology. – 2011. – Vol. 11. – P. 267.

3. Veen S., Claas E., Kuijper E. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories // J. Clin. Microbiol. – 2010. – Vol. 48. – P. 900-907.

Ответственный автор

Ульшина Диана Васильевна – младший научный сотрудник подготовки специалистов ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Тел.: (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru

УДК: 577:579.852.11B.anth

ПРОДУКЦИЯ БЕЛКОВ S-СЛОЯ И ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНА РАЗЛИЧНЫМИ ШТАММАМИ *BACILLUS ANTHRACIS*

А.М. Барков, А.В. Новоженина, И.А. Баркова, С.В. Порожня, Г.А. Ткаченко, А.В. Липницкий

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград

*Изучена продукция белков изогенными вариантами штаммов *Bacillus anthracis* с различным набором плазмид вирулентности. Показано, что однотипные варианты штаммов различаются по продукции белков S-слоя и протективного антигена, что следует учитывать при отборе штаммов-продуцентов.*

Ключевые слова: *изогенные варианты штаммов *Bacillus anthracis*, реакция иммунодиффузии с растущими культурами (РИДПК), электрофорез, гель-хроматография.*

PRODUCTION OF S-LAYER PROTEINS AND PROTECTIVE ANTIGEN BY DIFFERENT *BACILLUS ANTHRACIS* STRAINS

A.M. Barkov, A.V. Novozhenina, I.A. Barkova, S.V. Porohnya, G.A. Tkachenko, A.V. Lipnitsky
Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd

*In this paper we studied protein production by *Bacillus anthracis* isogenic variants with different set of virulence plasmids. It was shown that homotypic strains differed by S-layer protein and protective antigen production that should be taken into account in the selection of producer strains.*

Key words: *isogenic *Bacillus anthracis* variants, immunodiffusion with growing cultures (IDGC), electrophoresis, gel-chromatography.*

Предметом протеомных исследований является сравнительный анализ секреции белков *Bacillus anthracis*, поиск иммунодоминантных антигенов, что может иметь значение при определении патогенности, терапевтических и диагностических маркеров, разработке вакцин. Для этого исследователями были использованы изогенные варианты штаммов возбудителя сибирской язвы, с различным содержанием плазмид вирулентности, выращенные в определенных условиях [2, 3, 8]. В предыдущих исследованиях нами получены сыворотки, содержащие антитела преимущественно к одному из белков S-слоя или протективному антигену (ПА), что позволило проводить внутривидовую дифференциацию штаммов [1, 2].

Цель работы – изучение продукции белков S-слоя и протективного антигена изогенными штаммами *B. anthracis* с различным профилем плазмид вирулентности.

Материалы и методы

В работе использованы вирулентные штаммы *B. anthracis* 81/1 и 575/122, вакцинные штаммы *B. anthracis* СТИ-1, Stern34F₂ и 55 ВНИИВВиМ. Удаление плазмид осуществляли путем температурной элиминации, а также при выращивании на среде с канамицином [7, 9]. Отбор вариантов проводили по продукции ПА и белков S-слоя с использованием реакции иммунодиффузии с растущими культурами (РИДРК). Для этого R-варианты, отобранные со среды для продукции капсулы, засеивали на токсин- и капсуло- продуцирующую среду. После выращивания в атмосфере CO₂, в течение 18 ч, в лунки, пробитые против газонов выросших культур, вносили соответствующие сыворотки. По сформировавшимся иммунопреципитатам судили о продукции белков Sap, EA1 и ПА [1, 2]. Для выявления плазмид вирулентности *B. anthracis* использовали набор реагентов мультиплексной амплификационной тест-системы для идентификации и дифференциации *B. anthracis* [5]. Культуральные фильтраты (КФ) авирулентных вариантов получали с использованием среды Ристроф. Гельхроматографию культуральных фильтратов полученных вариантов проводили на сефакриле S-300HR. Электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН проводили по методике, изложенной в руководстве «Hoefler Scientific Instruments 1988 – 1989» [2].

Результаты и обсуждение

Для получения капсулопродуцирующих вариантов вирулентные штаммы *B. anthracis* 81/1 и 575/122 пассировали в L – бульоне при температуре 42,5 °С в течение 10-15 суток с регулярными контрольными высевами на сывороточный агар. После пассажа на среду для капсулообразования в атмосфере CO₂ штаммы вырастали в RS-форме, разделить которые на R- и S- формы при последующих пассажах не удалось. При окраске мазков по Ребигеру у отдельных клеток капсула определялась в виде узкой зоны.

В РИДРК штаммы образовывали иммунопреципитаты только с сыворотками к антигенам S-слоя, что свидетельствовало об элиминации плазмиды рХО1 и содержании плазмиды рХО2 (*B. anthracis* 81/1 R02 и 575/122 R02). Штаммы были вирулентны для белых мышей при подкожном введении 100 и более спор. Животные погибали в течение 4-5 суток. В мазках-отпечатках органов павших животных обнаруживали капсульные формы, которые на сывороточной среде в атмосфере CO₂ вырастали в RS-форме.

По-видимому, недостаточное образование *in vitro* капсулы обусловлено отсутствием плазмиды рХО1, несущей ген AtxA, который координирует экспрессию ряда белков и капсулы [6]. Вирулентность этих штаммов для белых мышей, возможно, обусловлена чувствительностью животных к капсулосодержащим штаммам *B. anthracis*. Незавершенный фагоцитоз, при котором поглощенные микроорганизмы не подвергаются внутриклеточному перевариванию, сохраняются или размножаются в фагоцитах, приводит к нарушению обменных процессов, быстрой деградации и гибели клеток [4].

Для получения моноплазмидных токсинпродуцирующих вариантов штаммы *B. anthracis* 81/1 и 575/122 инкубировали на среде с канамицином в течение 20 суток. При пересевах со среды с канамицином на содовый агар в атмосфере CO₂ получали рост штаммов в R-форме, у которых при окраске мазков по Ребигеру капсула не определялась. В РИДРК эти штаммы продуцировали ПА и белки S-слоя, что свидетельствовало об элиминации плазмиды рХО2 и сохранении плазмиды рХО1 (*B. anthracis* 81/1 R01 и 575/122 R01). При подкожном заражении белых мышей этими штаммами в дозе 1×10⁶ спор пали три из пяти мышей в течение пяти суток. В мазках-отпечатках органов отдельных павших животных определялись бескапсульные формы *B. anthracis*. Контрольные животные, зараженные *B. anthracis* 81/1 и 575/122, пали от пяти спор в течение трех суток. В мазках-отпечатках органов павших животных контрольной группы выявляли капсульные формы *B. anthracis*.

Гибель отдельных белых мышей, зараженных высокими дозами токсинпродуцирующих штаммов, обусловлена действием сибиреязвенного токсина, что характерно для вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 и известно как остаточная вирулентность [4].

С целью получения бесплазмидных штаммов проведены последующие пассажи *B. anthracis* 81/1 R01 и 575/122 R01, вакцинных штаммов *B. anthracis* СТИ-1, 55 ВНИИВВиМ, Stern34F₂ в сердечно-мозговом бульоне при 42,5 °С в течение 10 суток. Получены варианты этих штаммов, выроставшие в оптимальных для формирования капсулы в R-форме условиях, у которых, при окраске мазков по Ребигеру, капсулу не визуализировали. В РИДРК эти штаммы продуцировали белки S-слоя и не продуцировали ПА и капсулу, что свидетельствовало об элиминации обеих плазмид (*B. anthracis* 81/1 R00 и 575/122 R00, СТИ-1 R00, 55 ВНИИВВиМ R00, Sterne34F₂ R00). При подкожном введении белым мышам 1×10⁶ спор культур бесплазмидных вариантов животные не погибали.

Наличие генов плазмид рХО1, рХО2 и хромосомного маркера sap гена у вирулентных, вакцинных штаммов и их вариантов подтверждено методом ПЦР [5].

При гелехроматографическом разделении культуральных фильтратов полученных вариантов установлено, что токсинпродуцирующие варианты *B. anthracis* 81/1 R01 и 575/122 R01, СТИ-1 и 55ВНИИВВиМ преимущественно содержали ПА (5 пик) и белки, которые элюировались в свободном объеме (1 пик). При этом культуральный фильтрат *B. anthracis* Stern34F₂, в отличие от токсинпродуцирующих вариантов других штаммов, содержал преимущественно белки, элюировавшиеся в свободном объеме, что обусловлено протеазной активностью штамма. В связи с вирулентностью для белых мышей капсулосодержащих штаммов их культуральные фильтраты не получали.

Бесплазмидные варианты *B. anthracis* 81/1 R00 и 575/122 R00, СТИ-1 R00, Stern34F₂ R00 и 55 ВНИИВВиМ R00 содержали белки, которые элюировались в свободном объеме. При этом культуральные фильтраты бесплазмидных вариантов вакцинных штаммов *B. anthracis* СТИ-1 и 55ВНИИВВиМ, в отличие от *B. anthracis* 81/1 R00 и 575/122 R00, содержали значительное количество белков, которые элюировались в объеме выхода ферритина (3 пик).

При электрофоретическом разделении в 10 % ПААГ с СДС установлено, что культуральные фильтраты авирулентных токсинпродуцирующих штаммов содержали главным образом белки молекулярной массой 90 кДа, что характерно для белков сибиреязвенного токсина. Культуральные фильтраты бесплазмидных штаммов содержали белки молекулярной массой 94 и 87 кДа, которые соответствуют молекулярным массам белков S-слоя – EA1 и Sap.

Заключение

Изучение продукции белков изогенными вариантами штаммов *B. anthracis* с различным набором плазмид вирулентности показало, что однотипные варианты штаммов различаются по продукции белков S-слоя и ПА, что следует учитывать при отборе штаммов-продуцентов.

Литература

1. Барков А.М., Алексеев В.В., Липницкий А.В. Способ идентификации *Bacillus anthracis* с дифференциацией штаммов по продукции капсулы, протективного антигена и антигенов S-слоя // Патент на изобретение № 2376385. – 2009. – 12 с.
2. Баркова И.А., Алексеев В.В., Липницкий А.В. и др. Продукция белков S-слоя разными штаммами *Bacillus anthracis* // Пробл. особо опасн. инф. – 2008. – Вып. 4 (98). – С. 29-32.
3. Микшис Н.И., Корсакова А.Ю., Болотникова М.Ф. и др. Продукция белков S-слоя штаммами *Bacillus anthracis* // Биотехнология – 2004. – № 5. – С. 22-23.
4. Попов С.Ф., Липницкий А.В., Барков А.М. Особенности взаимодействия *Bacillus anthracis* с фагоцитами хозяина в зависимости от плазмидного спектра возбудителя // Журн. микробиол. – 1996. – № 2. – С. 13-16.
5. Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Цыганкова Е.А. Мультиплексная амплификационная тест-система для идентификации и дифференциации *Bacillus anthracis* // Журн. микробиол. – 2005. – № 3. – С. 69-74.
6. Drysdale M., Bourgogne A., Bourgogne T. Transcriptional Analysis of the *Bacillus anthracis* Capsule Regulators // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187, № 15. – P. 5108-5114.
7. Green B.D., Laurie Battisti, Kochler T.M. et al. Demonstration of capsule in *B. anthracis* // Infect. Immun. – 1985. – Vol. 49, № 2. – P. 291-297
8. Lamonica J.M., Wagner M.A., Echenbrenner M. Comparative secretome analyses of the *Bacillus anthracis* strains with variant plasmid contents // Infect. Immun. – 2005. – Vol. 73, № 6. – P. 3646-3658.
9. Mikesell P., Ivins B.E., Ristroph J.D., Dreiter T.M. Evidence for Plasmid – mediated Toxin Production in *Bacillus anthracis* // Infect. Immun. – 1983. – Vol. 39. – P.371-376.

Ответственный автор

Барков Анатолий Макарович – старший научный сотрудник ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский потивочумный институт Роспотребнадзора канд. мед. наук.
Тел.: (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru