

- quantification of in vitro NET formation. *Front. Immunol.* 2013; 3: 413.
36. Radic M., Kaplan M.J. Extracellular chromatin traps interconnect cell biology, microbiology, and immunology. *Front. Immunol.* 2013; 4: 160.
37. Brinkmann V., Laube B., Abu Abed U., Goosmann C., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J. Vis. Exp.* 2010; (36). pii: 1724.
38. Lande R., Ganguly D., Facchinetti V., Frasca L., Conrad C., Gregorio J. et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* 2011; 3 (73): 73–19.
39. Remijsen Q., Van den Berghe T., Wirawan E., Asselbergh B., Parthoens E., De Rycke R. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res.* 2011; 21: 290–304.
40. Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.* 2012; 198: 773–83.
41. Li P., Li M., Lindberg M.R., Kennett M.J., Xiong N., Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* 2010; 207: 1853–62.
42. Lood C., Blanco L.P., Purmalek M.M., Carmona-Rivera C., De Ravin S.S., Smith C.K. et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat. Med.* 2016; 22 (2): 146–53.
43. Liaw P.C., Ito T., Iba T., Thachil J., Zeerleder S. DAMP and DIC: The role of extracellular DNA and DNA-binding proteins in the pathogenesis of DIC. *Blood Rev.* 2015; pii: S0268-960X (15)00097-1.
44. Kain R., Firmin D.A., Rees A.J. Pathogenesis of small vessel vasculitis associated with autoantibodies to neutrophil cytoplasmic antigens: new insights from animal models. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2010; 22: 15–20.
45. Levy O. A neutrophil-derived anti-infective molecule: bactericidal/permeability-increasing protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44 (11): 2925–31.
46. Mankovich A.R., Lee C.Y., Heinrich V. Differential effects of serum heat treatment on chemotaxis and phagocytosis by human neutrophils. *PLoS One.* 2013; 8 (1): e54 735.
47. Andryukov B.G., Somova L.M., Timchenko N.F. Strategy of programmed cell death in prokaryotes. *Infektsiya i immunitet.* 2015; 5 (1): 15–26. (in Russian)
48. Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11: 519–31.
49. Metzler K.D., Fuchs T.A., Nauseef W.M., Reumaux D., Roesler J., Schulze I. et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: Implications for innate immunity. *Blood.* 2010; 3 (17): 36–43.
50. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* 2013; 210 (7): 1283–99.
51. Radford-Smith G., Jewell D. P. Cytokines and inflammatory bowel disease. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 1996; 10 (1): 151–64.
52. Korotina O.L., Generalov I.I. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and function. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya.* 2012; (4): 23–32. (in Russian)
53. Sun L., Wang H., Wang Z., He S., Chen S., Liao D. et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell.* 2012; 148 (1–2): 213–27.
54. Vandenabeele P., Galluzzi L., Vanden Berghe T., Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010; 11 (10): 700–14.
55. Yousefi S., Mihalache C., Kozlowski E., Schmid I., Simon H.U. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009; 16 (11): 1438–44.
56. Neeli I., Dwivedi N., Khan S., Radic M. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J. Innate Immun.* 2009; 1 (3): 194–201.
57. Farrera C., Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J. Immunol.* 2013; 191: 2647–56.
58. Sangaletti S., Tripodo C., Chiodoni C., Guarnotta C., Cappetti B., Casalini P. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood.* 2012; 120: 3007–18.
59. Wang Y., Li P., Wang S., Hu J., Chen X.A., Wu J. et al. Anticancer peptidylarginine deiminase (PAD) inhibitors regulate the autophagy flux and the mammalian target of rapamycin complex 1 activity. *J. Biol. Chem.* 2012; 287 (31): 25 941–53.
60. Leshner M., Wang S., Lewis C., Zheng H., Chen X.A., Santy L. PAD4 mediated histone hypercitullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front. Immunol.* 2012; 3: 307.

Поступила 30.05.16
Принята к печати 15.06.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.373:579.852.11

Баркова И.А., Червакова М.П., Барков А.М., Новоженина А.В., Викторов Д.В.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ИММУНОДОМИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ИЗОГЕННЫХ ВАРИАНТОВ *BACILLUS ANTHRACIS*

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 400131, г. Волгоград

Получены поликлональные моноспецифические сыворотки к белкам токсина и антигенам S-слоя *Bacillus anthracis*, выделенным в препаративном электрофорезе. При применении метода флуоресцирующих антител (МФА) иммуноглобулины сывороток к белку S-слоя *B. anthracis* м.м. 94 кДа обладали специфичностью и специфической активностью на представленном количестве штаммов, а в пробах почвы обнаруживали споры в концентрации $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл, что позволяет рекомендовать данные иммуноглобулины для индикации *B. anthracis*. Белки м.м. 90 кДа, относящиеся к антигенам токсина *B. anthracis*, в иммуноблоттинге реагировали с сыворотками больных кожной формой сибирской язвы и морских свинок, иммунизированных и выживших после заражения. Сыворотки к ним видоспецифичны, могут быть использованы для диагностики заболевания (обнаружение протективного антигена) и определения продукции белков в реакции иммунодиффузии с растущими культурами (РИДРК).

Ключевые слова: культуральные фильтраты; препаративный электрофорез; белки м.м. 94, 87, 90 кДа *Bacillus anthracis*; иммуноблоттинг; метод флуоресцирующих антител (МФА).

Для цитирования: Баркова И.А., Червакова М.П., Барков А.М., Новоженина А.В., Викторов Д.В. Диагностическое значение некоторых иммунодоминантных белков изогенных вариантов *Bacillus anthracis*. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (12): 833-837. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-833-837>

Для корреспонденции: Баркова Ирина Анатольевна – канд. мед. наук, доц., зав. лаб. оперативной диагностики бактериальных и вирусных инфекций, e-mail: barina_10@mail.ru

Barkova I.A., Chervakova M.P., Barkov A.M., Novojenina A.V., Viktorov D.V.

THE DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF PARTICULAR IMMUNE-DOMINATING PROTEINS OF ISOGENIC VARIANTS OF BACILLUS ANTHRACIS

The Volgogradskii anti-plague research institute of Rospotrebnadzor, 400131 Volgograd, Russia

The polyclonal mono-specific sera to proteins of toxin and antigens of S-layer of Bacillus Anthracis separated in preparative electrophoresis. While fluorescent antibody technique was applied, immunoglobulins of sera to protein of S-layer of Bacillus Anthracis m.m. 94 kDa had specificity and specific activity in presented number of strains. In the soil samples spores in concentration of 1x10⁴ КОЕ/ml were detected that permits to recommend the given immunoglobulins for indexation of Bacillus Anthracis. The proteins m.m. 90 kDa relevant to antigens of toxin of Bacillus Anthracis reacted in immuno-blotting with sera from patients with skin form of anthrax and guinea pigs immunized and survived after infection. Thew sera to them are species specified and can be applied for diagnostic of disease (detection of protective antigen) and detection of production of proteins in reaction of immuno-diffusion with growing cultures.

Key words: *cultural filtrates; preparative electrophoresis; proteins m.m. 94, 87,90 kDa of Bacillus Anthracis; fluorescent antibody technique.*

For citation: *Barkova I.A., Chervakova M.P., Barkov A.M., Novojenina A.V., Viktorov D.V. The diagnostic significance of particular immune-dominating proteins of isogenic variants of Bacillus Anthracis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2016; 61 (12): 833-837. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-833-837>*

For correspondence: *Barkova I.A., candidate of medical sciences, associate professor, head of the laboratory of operative diagnostic of bacterial and viral infections. e-mail: barina_10@mail.ru*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Financing. *The study had no sponsor support*

Received 17.03.2016
Accepted 21.03.2016

Введение. Возбудитель сибирской язвы при культивировании в жидких питательных средах продуцирует большое количество белков, спектр которых зависит от особенностей штамма, питательной среды и условий культивирования. Унифицированная оценка высоко- и низкосекретируемых белков позволила идентифицировать группы белков, кодируемых генами, расположенными на хромосоме или плазмиде рХО1. Белки S-слоя, такие как Sap и EA1 молекулярной массой (м.м.) 86,7 кДа и 91,4 кДа соответственно, а также протективный антиген (ПА) выявлялись наиболее часто, при культивировании в течение 16 ч их количество было максимальным по сравнению с другими внеклеточными белками [1–4]. Высокая иммуногенность и распространенность предполагают, что белки S-слоя, особенно EA1, могут служить в качестве подходящей мишени для тест-систем, предназначенных для обнаружения вегетативных клеток и спор *Bacillus anthracis* в пробах продуктов и клиническом материале [5–10].

Ранее нами была изучена видовая специфичность сывороток против белков м.м. 94 кДа культурального фильтрата (КФ) бесплазмидного штамма *B. anthracis* 81/1, полученных при гель-хроматографическом разделении на сефакриле S-300 SF. Однако препаративное накопление гель-хроматографией было трудоемким, а выделение электрофорезом невозможно, так как антиген не окрашивался Кумасси. Полученные нами изогенные варианты *B. anthracis* 575/122 характеризовались стабильной продукцией и окрашиванием белков м.м. 94, 87 и 90 кДа, которые соответствовали м.м. белков S-слоя и токсина [11, 12].

Цель работы – предварительная оценка диагностического значения белков S-слоя и сибирезявенного токсина *B. anthracis*, выделенных препаративным электрофорезом.

Материал и методы. Штаммы. Изогенные варианты вирулентных штаммов *B. anthracis* 81/1, 575/122 (рХО1⁺, рХО2⁺): моноплазмидные токсинпродуцирующие (рХО1⁺, рХО2⁻) *B. anthracis* 81/1 R01, 575/122 R01 и бесплазмидные (рХО1⁻, рХО2⁻) *B. anthracis* 81/1 R00, 575/122R 00 [12].

При оценке тестов идентификации возбудителя сибирской язвы использованы десять вирулентных штаммов *B. anthracis* (81/1, 575/122, 614/1, 298/2, 591/2, 12/16, 619/42, 44/1CO, 248/22, 3-БК-2), вакцинные штаммы *B. anthracis* (СТИ, Sterne) и штаммы близкородственных ба-

цилл: *B. cereus* (UHA, 1, 8035, VRRL569, ATCC 6464), *B. thuringiensis* v. v. Pasteur, *B. megaterium* (5, 216, 1), *B. subtilis* (6051, 6633), *B. stearotermophilus* ВКМВ718, *B. mycoides* 2, *B. mesentericus* 6 (коллекция живых культур ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт») Роспотребнадзора).

Питательные среды. В качестве питательных сред использовали сердечно-мозговой агар и бульон («Difco», США), бесклеточные культуральные фильтраты получали с использованием R-среды рН 8,0–8,3, для реакции иммунодиффузии с растущими культурами (РИДПК) использовали среду, описанную ранее [11, 13].

Электрофоретический анализ и препаративный электрофорез белков. Для электрофоретического анализа белки КФ, сконцентрированных в 180 раз на ультрафильтре с отсечением (cut-off) белков до 10 кДа, осаждали ацетоном [13]. Электрофорез в полиакриамидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ с ДСН), окраску и иммуноблоттинг проводили по методике, изложенной в инструкции к «Ettan Dalt electrophoresis systems» (General Electric). Для препаративного выделения белков формировали блок 10% геля с площадью 1,5×140 мм без гребенки в концентрирующем геле, на который наносили 150–350 мкл препарата. Проводили электрофорез при 5 мА, 24 В. Электрофорез заканчивали при миграции свидетеля на 10 см. Локализацию белков определяли после окрашивания Кумасси R-250 и обесцвечивания в течение 15–20 мин, или блок геля помещали в охлажденный раствор 0,1 М КСl при температуре 0–1°C на 1 ч. Полосы вырезали, гомогенизировали, помещали в пробирку с сетчатым мешком, содержащую 0,5 мл 0,05М (NH₄)₂НСО₃ (углекислый аммоний) [14]. Экстракцию проводили при 37°C и при комнатной температуре в течение 18 ч, затем гель переносили в пробирку с сетчатой перегородкой, центрифугировали при 2000 об/мин 5 мин. Жидкость отсасывали, гель экстрагировали повторно. Эффективность элюирования контролировали в реакции иммунодиффузии (РИД).

Для определения молекулярной массы белков применяли маркеры фирмы «Amresco» (фосфоорилаза – 97,4 кДа; бычий сывороточный альбумин – 66,2 кДа; альдолаза – 39,2 кДа; триоз-фосфат изомераза – 26,6 кДа; ингибитор трипсина – 21,5 кДа; лизоцим – 14,4 кДа) и программу «LabImage».

Получение моноспецифических поликлональных сывороток. Для получения кроличьих сывороток к белкам м.м. 94, 90 и 87 кДа, выделенных препаративным электрофорезом, внутривенно паравертебрально и в оба паха вводили возрастающие объемы белков, активных в РИД. Первое введение включало 0,25 мл препарата, последующие – на 0,25 мл больше, которые доводили до 1 мл раствором 0,9% NaCl и смешивали с 1 мл неполного адьюванта Фрейнда (НАФ). При титре антител 1:8–1:16 у животных брали кровь из вены уха в объеме 30 мл, что позволяло получить 15–20 мл сыворотки. Сыворотки консервировали мертиолятом 1:10 000 и хранили при температуре +4°C.

При более низких титрах антител после месячного перерыва проводили второй цикл иммунизации, который заключался в двукратном введении антигенов с НАФ по описанной методике.

Специфическую активность и специфичность сывороток оценивали в РИД, РИДРК, МФА. Иммуноглобулины сывороток выделяли полиэтиленгликолем, метили флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), использовали в методе флуоресцирующих антител (МФА), иммуноблоттинге [11–13].

МФА проводили с вегетативными клетками и спорами *B. anthracis* и близкородственных бактерий [11]. Пробы почвы готовили в соответствии с МУ 4.2.1103-02 «Приготовление проб с имитаторами патологических биологических агентов».

Результаты и обсуждение. С целью выделения белков S-слоя были изучены КФ изогенных авирулентных токсинпродуцирующих и бесплазмидных вариантов *B. anthracis* 81/1 и 575/122, с концентрацией белка 3,07–3,68 мг/мл и 4,54–5,62 мг/мл соответственно. Более высокое содержание белка в КФ бесплазмидных вариантов, возможно, связано с экспрессией белков, вовлеченных в процесс споруляции, так как существуют различия в споруляции плазмидсодержащих и бесплазмидных штаммов [1].

В результате электрофоретического разделения белков КФ в ПААГ с ДСН установлено, что КФ токсинпродуцирующих штаммов содержали белок м.м. 90 кДа, что соответствует м.м. компонентов сибиреязвенного токсина (протективный антиген (ПА) 83 кДа, отечный фактор (ОФ) 88,8 кДа, летальный фактор (ЛФ) 90,33 кДа) [15]. Культуральные фильтраты бесплазмидных штаммов были представлены белками м.м. 94 и 87 кДа, которые соответствуют м.м. белков S-слоя, EA1 и Sap [1, 4, 5]. Для визуализации белков м.м. 94 и 87 кДа было использовано окрашивание Кумасси, а для белков м.м. 90 кДа был определен метод инкубации блока геля в растворе 0,1M KCl при 1–2°C в течение 1 ч [20]. При этом белки м.м. 87 кДа бесплазмидного варианта *B. anthracis* 81/1 R00, содержащего ген *sap*, не выявлялись Кумасси, однако определялись в иммуноблоттинге. При электрофоретическом разделении белки м.м. 94 и 87 кДа, штамма *B. anthracis* 575/122 R00, окрашенные Кумасси, определялись в виде двух полос шириной до 1 мм с расстоянием между ними до 5 мм [12]. В связи с этим КФ штамма *B. anthracis* 575/122 R00 был использован для препаративного выделения белков S-слоя, а для выделения белков м.м. 90 кДа – штамм *B. anthracis* 575/122 R01.

Препаративный электрофорез по сравнению с гелехроматографией оказался более рациональным, так как позволял выделять белки м.м. 94, 87 и 90 кДа в концентрациях, активных в РИД, что позволяло контролировать наличие белков, экстрагируемых из геля. Исключались дополнительные поте-

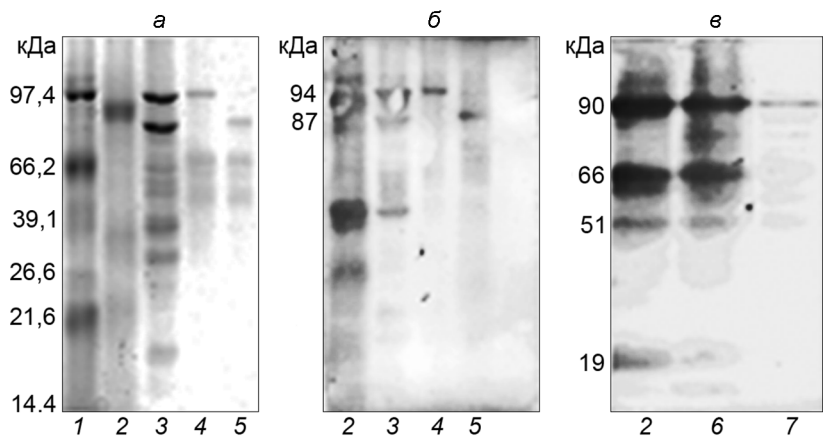


Рис. 1. Электрофорез и иммуноблоттинг белков, выделенных электрофорезом. а – электрофорез; б, в – иммуноблоттинг с поликлональной кроличьей сывороткой к КФ *B. anthracis* СТИ. 1 – маркеры м.м.; 2 – КФ *B. anthracis* 575/122 R01 (рХО1⁺, рХО2⁻); 3 – КФ *B. anthracis* 575/122 R00 (рХО1⁻, рХО2⁻); 4 – белок м.м. 94 кДа; 5 – белок м.м. 87 кДа; 6 – КФ *B. anthracis* 55 (рХО1⁺, рХО2⁻); 7 – белок м.м. 90 кДа.

ри, связанные с концентрированием фракции на ультрафильтрах. В иммуноблоттинге с поликлональной сибиреязвенной сывороткой белки электрофоретических фракций бесплазмидного варианта штамма *B. anthracis* 575/122 идентифицированы как белки м.м. 94 и 87 кДа, а токсинпродуцирующего – как м.м. 90 кДа, что подтверждает высокую степень гомогенности и чистоту выделенных антигенов (рис. 1). К электрофоретическим фракциям были получены моноспецифические сыворотки. Сыворотки к белкам, элюированным в свободном объеме при гелехроматографии [11], и сыворотки к белкам м.м. 94, 87 кДа бесплазмидного варианта *B. anthracis* 575/122, выделенным электрофорезом, в РИД содержали антитела к идентичным антигенам, что подтверждало принадлежность белков к антигенам S-слоя. Изучение в РИДРК сывороток к белкам м.м. 94, 87 кДа показало, что они реагируют с антиге-

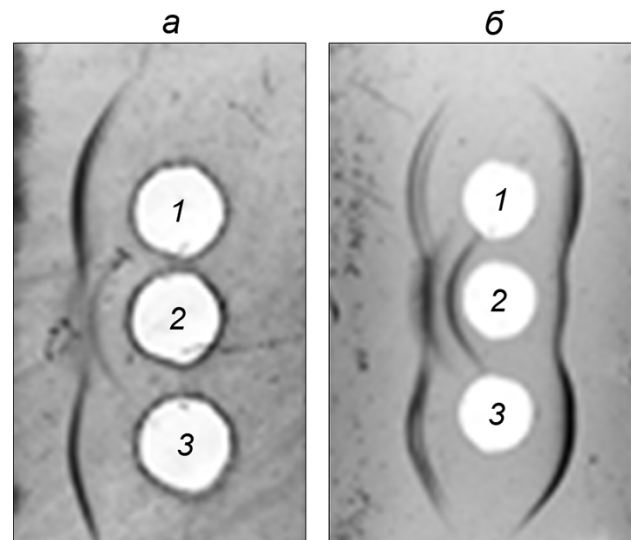


Рис. 2. Идентификация и дифференциация штаммов *B. anthracis* в РИДРК.

а – слева *B. anthracis* 55; справа – *B. cereus* VRRL569; б – слева *B. anthracis* 575/122 R01; справа – *B. anthracis* 575/122 R00. Сыворотки к антигенам *B. anthracis*: 1 – м.м. 94 кДа; 2 – м.м. 90 кДа; 3 – м.м. 87 кДа.

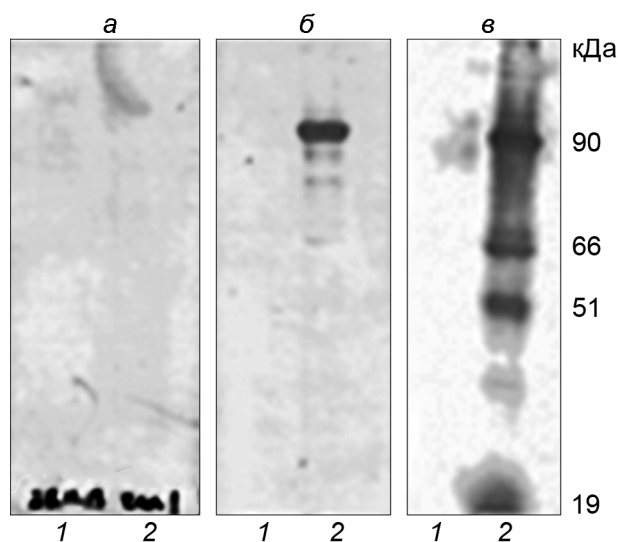


Рис. 3. Антигены *B. anthracis*, выявляемые в иммуноблоттинге с сыворотками больных людей и зараженных животных. *а* – с сывороткой больного кожной формой сибирской язвы на 5-й день заболевания; *б* – на 21-й день заболевания; *в* – с сывороткой иммунизированной морской свинки, выжившей после заражения. 1 – КФ *B. anthracis* 575/122 R00 (рХО1, рХО2); 2 – КФ *B. anthracis* 575/122 R01 (рХО1⁺, рХО2).

нами, продукция которых не зависит от плазмид вирулентности, а сыворотки к белкам м.м. 90 кДа реагируют с антигенами токсинпродуцирующих штаммов *B. anthracis* [12]. Сыворотки к белкам S-слоя и токсина не образовывали иммунопреципитатов с антигенами близкородственных бацилл, что свидетельствовало об их видоспецифичности (рис. 2).

Специфическая активность и специфичность иммуноглобулинов к белкам м.м. 94 и 87 кДа *B. anthracis* 575/122 R00 изучены в МФА с вегетативными клетками и спорами 10 штаммов *B. anthracis*. Наиболее активными оказались иммуноглобулины сыворотки к белкам м.м. 94 кДа *B. anthracis* 575/122 R00, которые в рабочих разведениях дифференцировали штаммы *B. anthracis* от близкородственных спорообразующих бацилл, в пробах почвы обнаруживали споры в концентрации 1×10^4 КОЕ/мл, что позволяет рекомендовать данные иммуноглобулины для индикации *B. anthracis*.

Белки КФ бесплазмидного и токсинпродуцирующего штаммов изучены в иммуноблоттинге для определения их диагностического значения. С этой целью использованы сыворотка больной Л. с диагнозом «сибирская язва, кожная форма», контакт с источником – 08.09.2008 г., дата заболевания – 16.09.2008 г., сыворотка получена 02.10.2008 г., титр антител в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) 1:2560; парные сыворотки больного К. с диагнозом «сибирская язва, кожная форма», контакт с источником – 01.09.2011 г., дата заболевания – 05.09.2011 г., сыворотки получены 09.09.2011 г. и 26.09.2011 г., титр антител в РНГА 1:40 и 1:640 соответственно, а также сыворотки двух морских свинок, иммунизированных ПА и выживших после подкожного заражения 2×10^4 спор *B. anthracis* которые получены на 21-е и 35-е сутки после заражения, титр антител в РНГА 1:20 480 и 1:81 920.

В иммуноблоттинге сыворотки больных преимущественно выявляли белки м.м. 90 кДа КФ токсинпродуцирующего варианта *B. anthracis* 575/122R01, сыворотки животных реагировали с антигенами м.м. 90, 65, 39,2 кДа, что соответствовало м.м. компонентов протективного антигена. Определить

антитела к белкам S-слоя м.м. 94 и 87 кДа бесплазмидного штамма *B. anthracis* 575/122R00 в сыворотках больных людей не удалось; в сыворотках морских свинок антитела определялись в следовых количествах (рис. 3). Постановка точного диагноза сибирской язвы осложняется редкостью заболевания и неспецифичностью симптомов, быстрой элиминацией *B. anthracis* при ранней антибиотикотерапии. Лабораторная диагностика основывается на обнаружении в клинических образцах возбудителя, детекции генов плазмид вирулентности, антител в сыворотках больных и реконвалесцентов; рутинные методы иммунофлуоресценции и иммуногистохимии недостаточно разработаны. Использование ПА в качестве биомаркера сибиреязвенной инфекции связано с его наличием в значительном количестве в крови инфицированных животных. ОФ и ЛФ могут быть обнаружены только на более поздних стадиях инфекции. В связи с этим сероконверсия в ответ на различные компоненты токсина может служить только ретроспективным подтверждением заболевания. Кроме ПА, ОФ и ЛФ, в крови инфицированных животных были обнаружены уникальные высокоспецифичные белки: протеаза HtrA (BA3660), эндопептидаза NlpC/P60 (BA1952) и белок с неизвестной функцией (BA0796) [16, 17]. Доказано присутствие антигенов S-слоя в вегетативных клетках и спорах *B. anthracis*, а антител к ним – в сыворотках иммунизированных и зараженных животных, вакцинированных и больных людей [3, 4, 6–10].

В предыдущих работах белки ПА, выделенные гелехроматографией, были успешно использованы нами в РНГА и твердофазном иммуноферментном анализе (ТИФМ) [18]. В данной работе белки м.м. 90 кДа, выделенные препаративным электрофорезом, выявлялись в иммуноблоттинге сыворотками зараженных животных и больных людей, что подтверждает первостепенное значение ПА для диагностики сибирской язвы [19, 20].

Заключение. Таким образом, в препаративном электрофорезе накоплены белки токсина и S-слоя *B. anthracis*. Иммуноглобулины моноспецифических сывороток к белкам S-слоя м.м. 94 кДа бесплазмидного варианта *B. anthracis* 575/122R00, меченные ФИТЦ, пригодны для идентификации и индикации вегетативных клеток и спор *B. anthracis*. Белки м.м. 90 кДа токсинпродуцирующего штамма *B. anthracis* 575/122R01, выделенные электрофорезом, являются антигенами с первостепенным значением для диагностики заболевания, а сыворотки к ним видоспецифичны и могут быть использованы для определения продукции белков токсина в РИДРК.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–4, 7–10, 15–16, 19–20 см. REFERENCES)

1. Гончарова А.Ю., Микшис Н.И., Кудрявцева О.М., Болотникова М.Ф., Новикова Л.В., Красичков Г.Г. и др. Получение поликлональных антител к белкам S-слоя *Bacillus anthracis* и изучение их специфичности в иммуноферментном анализе. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010; (3): 46–9.
2. Свешников П.Г., Киселев В.И., Северин Е.С., Пальцев М.А. Биобезопасность: применение моноклональных антител для индикации опасных патогенов и диагностики инфекционных болезней. *Молекулярная медицина*. 2004; (4): 67–72.
3. Барков А.М., Баркова И.А., Алексеев В.В., Липницкий А.В. Видоспецифические сыворотки против антигенов поверхностных структур штаммов *Bacillus anthracis*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2010; (11): 51–3.
4. Барков А.М., Новоженкина А.В., Порохня С.В., Ткаченко Г.А., Лип-

- ницкий А.В. Характеристика изогенных вариантов *Bacillus anthracis* с различным содержанием плазмид вирулентности. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; (1): 17–22.
13. Баркова И.А., Барков А.М., Алексеев В.В., Липницкий А.В., Буханцова Л.В. Продукция белков S – слоя разными штаммами *Bacillus anthracis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2008; 98 (4): 29–32.
14. Остерман Л.А. *Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие)*. М.: Наука; 1981.
17. Онищенко Г.Г., Кожухов В.В., Васильев Н.Т., Бондарев В.П., Борисевич И.В., Дармов И.В. и др. *Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты: руководство для врачей*. М.: Медицина; 2010.
18. Барков А.М., Баркова И.А., Алексеев В.В., Липницкий А.В., Кулаков М.Я. Обнаружение антител к протективному антигену *Bacillus anthracis* с использованием реакции непрямой геммагглютинации и твердофазного иммуноферментного метода. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010; (3): 42 – 5.
9. Makam S., Kingston J., Ramakrishna U., Radhika M., Tuteja U., Murali R. et al. Application of extractable antigen 1 (EA1) for specific detection of *Bacillus anthracis* cells. *IJPRBS*. 2013; 4 (2): 274–83.
10. Walper S.A., Anderson G.P., Brozozog P.A., Glaven R.H., Liu J.L., Bernstein R.D. et al. Rugged single domain antibody detection elements for *Bacillus anthracis* spores and vegetative cells. *PLoS One*. 2012; 7 (3): e32 801.
11. Barkov A.M., Barkova I.A., Alekseev V.V., Lipnitskiy A.V. Species-specific serum against antigens of surface structures strains of *Bacillus anthracis*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2010; (11): 51–3. (in Russian)
12. Barkov A.M., Novozhenina A.V., Porokhnyia S.V., Tkachenko G.A., Lipnitskiy A.V. Characteristics of isogenic variants *Bacillus anthracis* with different content of virulence plasmids. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; (1): 17–22. (in Russian)
13. Barkova I.A., Barkov A.M., Alekseev V.V., Lipnitskiy A.V., Bukhantsova L.V. Production of protein of S – layer different strains of *Bacillus anthracis*. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2008; 98 (4): 29–32. (in Russian)
14. Osterman L.A. *Methods of Studying Proteins and Nucleic Acids: Electrophoresis and Ultracentrifugation (Practical Guide) [Metody issledovaniya belkov i nukleinovykh kislot: elektroforez i ul'tratsentrifugirovaniye (prakticheskoe posobie)]*. Moscow: Nauka; 1981. (in Russian)
15. Boyer A.E., Gallegos-Candela M., Lins R.C., Kuklenyik Z., Woolfitt A., Moura H. et al. Quantitative mass spectrometry for bacterial protein toxins – a sensitive, specific, high-throughput tool for detection and diagnosis. *Molecules*. 2011; 16 (3): 2391–413.
16. Sela-Abranovich S., Chitlaru T., Gat O., Grosfeld H., Cohen O., Shafferman A. Novel and Unique Diagnostic Biomarkers for *Bacillus anthracis* Infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75 (19): 6157–67.
17. Onishchenko G.G., Kozhukhov V.V., Vasil'ev N.T., Bondarev V.P., Borisevich I.V., Darmov I.V. et al. *Anthrax: Actual Problems of Development and Implementation of Health Protection: A Guide for Physicians [Sibirskaya yazva: aktual'nye problemy razrabotki i vnedreniya meditsinskikh sredstv zashchity: rukovodstvo dlya vrachey]*. Moscow: Meditsina; 2010. (in Russian)
18. Barkov A.M., Barkova I.A., Alekseev V.V., Lipnitskiy A.V., Kulakov M.Ya. Detection of antibodies to protective antigen *Bacillus anthracis* using indirect hemagglutination reaction and enzyme linked immunoassay assay. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2010; (3): 42–5. (in Russian)
19. Kobiler D., Weiss S., Levy H., Fisher M., Michaly A., Pass A. et al. Protective antigen as a correlative marker for anthrax in animal models. *Infect. Immun.* 2006; 74: 5871–6.
20. Rossi C.A., Urich M., Noris S., Reed D.S., Pitt I.M., Leffell E.K. Identification of a surrogate marker for infection in the African green monkey model of inhalation anthrax. *Infect. Immune*. 2008; 76: 5790–801.

Поступила 17.03.16

Принята к печати 21.03.16