

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-83-88

УДК 616.98:579.841.93

С.А. Курчева, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, Ю.В. Сирица, М.В. Костюченко, А.Г. Кошкидько, И.В. Жарникова, Е.Л. Ракитина, О.В. Логвиненко, А.М. Жиров

**КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ БРУЦЕЛЛЕЗНЫХ АНТИГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕСТОВ *IN VITRO***

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Для разработки наиболее диагностически информативных методик постановки антиген-стимулированных клеточных тестов *in vitro* необходим тщательный подбор стимулирующего агента (антигена), обладающего достаточным активирующим потенциалом и обеспечивающим специфичность реакции. **Цель работы** – определение качественных показателей экспериментальных серий бруцеллезных антигенных препаратов, предназначенных для клеточных тестов *in vitro*. **Материалы и методы.** Для проведения исследований получали антигенные комплексы бруцеллезного микроба – на основе вакцинных штаммов трех эпидемически значимых видов *Brucella* spp. (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*). Количественное определение белков экспериментальных серий полученных препаратов *WsAg* и *PPBC* проводили методом специфической флуориметрии. Исследование белкового состава препаратов проводили методом капиллярного электрофореза. Качественный состав определяли методом ионообменной жидкостной хроматографии с рефрактометрической детекцией. **Результаты и обсуждение.** В результате исследований определены физико-химические характеристики, изучены хроматографические профили и состав белковых фракций, а также проведена апробация изготовленных экспериментальных серий бруцеллезных антигенных препаратов. Анализируя охарактеризованный белковый и полисахаридный состав полученных образцов *WsAg*, можно сделать заключение о невозможности использования препарата *WsAg* для клеточных тестов, так как экспериментально доказана вероятность проявления неспецифических реакций лимфоцитов *in vitro*. В свою очередь, комплексный бруцеллезный антигенный препарат *PPBC* обладает выраженной специфической активностью и специфичностью в условиях *in vitro* и имеет перспективы использования при разработке методических подходов для лабораторной диагностики бруцеллеза и оценке фактической привитости контингентов риска после вакцинации. Полученные характеристики позволяют обеспечить надлежащее качество при производстве разработанного экспериментального препарата *PPBC*, предназначенного для клеточных тестов *in vitro*, с учетом современных правил валидации и стандартизации.

**Ключевые слова:** бруцеллез, *Brucella* spp., антигенспецифические клеточные тесты *in vitro*, антигенный комплекс.

Корреспондирующий автор: Курчева Светлана Александровна, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Для цитирования: Курчева С.А., Ковалев Д.А., Пономаренко Д.Г., Сирица Ю.В., Костюченко М.В., Кошкидько А.Г., Жарникова И.В., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Жиров А.М. Качественные показатели экспериментальных бруцеллезных антигенных препаратов, предназначенных для клеточных тестов *in vitro*. Проблемы особо опасных инфекций. 2020; 3:83–88. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-83-88

Поступила 11.11.19. Отправлена на доработку 15.01.20. Принята к публ. 04.09.20.

S.A. Kurcheva, D.A. Kovalev, D.G. Ponomarenko, Yu.V. Siritsa, M.V. Kostyuchenko, A.G. Koshkid'ko, I.V. Zharnikova, E.L. Rakitina, O.V. Logvinenko, A.M. Zhirov

**Qualitative Indicators of Experimental Brucellosis Antigen Preparations Designed for Cellular Tests *in vitro***

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

**Abstract.** In order to develop the most diagnostically informative methods for carrying out antigen-stimulated cellular tests *in vitro* a careful selection of stimulating agent (antigen) is required, possessing an adequate activating potential and providing specificity of the reaction. **Objective** of the study was to identify the qualitative indicators of experimental batches of brucellosis antigen preparations designed for cellular tests *in vitro*. **Materials and methods.** Initially we produced antigen complexes of brucellosis microbe on the basis of the vaccine strains of three epidemically significant *Brucella* species (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*). Quantitative determination of *WsAg* and *PPBC* proteins of experimental preparation series was performed applying capillary electrophoresis. Qualitative composition was assessed through ion exchange liquid chromatography with refractometric detection. **Results and discussion.** We have specified physical-chemical features, investigated chromatographic profiles and composition of protein fractions, as well as tried the produced experimental batches of brucellosis antigen preparations. After analyzing the defined protein and polysaccharide composition of the obtained *WsAg* samples, one can conclude that *WsAg* preparation cannot be used for cellular tests as the probability of non-specific lymphocyte reaction manifestation *in vitro* was experimentally proven. By contrast, complex brucellosis antigen preparation *PPBC* has an expressed specific activity and specificity under *in vitro* conditions and the prospects to be used when developing methodological approaches for laboratory diagnosis of brucellosis and assessment of *de facto* immunity rate in risk contingents after vaccination. The obtained parameters will allow for proper quality provision when manufacturing the developed experimental *PPBC* preparation designed for cellular tests *in vitro*, taking into account modern validation and standardization regulations.

**Key words:** brucellosis, *Brucella* spp., antigen-specific cellular tests *in vitro*, antigen complex.

*Conflict of interest:* The authors declare no conflict of interest.

*Corresponding author:* Svetlana A. Kurcheva, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

*Citation:* Kurcheva S.A., Kovalev D.A., Ponomarenko D.G., Siritsa Yu.V., Kostyuchenko M.V., Koshkid'ko A.G., Zharnikova I.V., Rakitina E.L., Logvinenko O.V., Zhiron A.M. Qualitative Indicators of Experimental Brucellosis Antigen Preparations Designed for Cellular Tests *in vitro*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 3:83–88. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-83-88

*Received* 11.11.19. *Revised* 15.01.20. *Accepted* 04.09.20.

Kurcheva S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3564-0791>  
Kovalev D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>  
Ponomarenko D.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0422-6755>  
Siritsa Yu.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9442-6966>  
Kostyuchenko M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6068-6655>  
Koshkid'ko A.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6617-9504>  
Zharnikova I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8443-4089>  
Rakitina E.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6073-6544>  
Logvinenko O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1054-8937>  
Zhiron A.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7698-7361>

Этиопатогенетическая особенность бруцеллеза обуславливается способностью возбудителя инфекции «уклоняться» от иммунного ответа хозяина (выживать и размножаться как в фагоцитарных, так и в нефагоцитарных клетках), что приводит к хроническому течению заболевания с длительной персистенцией патогена [1–3]. Вакцинация населения против бруцеллеза входит в Национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Для иммунизации людей применяется живая вакцина, приготовленная из вакцинного штамма *B. abortus* 19 BA, при ее введении у людей возникает бессимптомная или латентная инфекция в сочетании с формированием нестерильного иммунитета, переходящего в постинфекционный, стерильный [4–6].

Для оценки специфического клеточно-опосредованного иммунитета против возбудителя бруцеллеза предложена кожная алергологическая реакция с бруцеллином (проба Бюрне), но в настоящее время она применяется крайне редко в связи с высоким риском развития общих и местных побочных реакций.

В последние годы в лабораторную практику активно внедряются диагностические тесты, основанные на антигенспецифических клеточных реакциях *in vitro*, позволяющие выявить интенсивность экспрессии иммунокомпетентными клетками различных рецепторов активации при оценке формирования и напряженности клеточного иммунитета [7–13].

Для разработки диагностически информативных методик постановки антиген-стимулированных клеточных тестов *in vitro* необходим тщательный подбор стимулирующего агента (антигена), обладающего достаточным активирующим потенциалом и обеспечивающего специфичность реакции в условиях *in vitro* [14, 15]. В настоящее время на фармацевтическом рынке отсутствует коммерчески доступный препарат, отвечающий необходимым для постановки реакции требованиям. На базе Ставропольского противочумного института получены несколько экспериментальных серий препаратов, содержащих различные по составу антигенные комплексы.

Цель настоящей работы – определить качественные показатели экспериментальных серий бруцеллезных антигенных препаратов *WsAg* и *PPBC* и оценить возможную перспективу их использования в антигенспецифических клеточных тестах *in vitro*.

## Материалы и методы

Антигенные комплексы бруцеллезного микроба получали на основе вакцинных штаммов трех эпидемически значимых видов *Brucella spp.* (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) из коллекции патогенных микроорганизмов Ставропольского противочумного института. Работы с культурами штаммов проводили с соблюдением СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Метод получения бруцеллезного антигенного комплекса *WsAg* предложен Е.Н. Афанасьевым и соавт. в 1986 г., технология включает в себя водно-солевую и ультразвуковую дезинтеграцию с осаждением белковых фракций сульфатом аммония, что позволяет получить активный специфический препарат, который имеет длительную историю успешного применения как специфический агент для сенсibilизации биологических объектов и/или твердой фазы в иммуноферментных тест-системах. Бруцеллезный антигенный комплекс *PPBC* получен по модифицированной нами методике получения вышеуказанного антигенного комплекса.

Для проведения исследований изготовили пять экспериментальных серий каждого препарата. Полученные серии разливали в ампулы по 0,5 мл, замораживали и подвергали сублимационному высушиванию на лиофильной установке *Martin Christ* (Германия) с последующей герметизацией и маркировкой ампул с полученным продуктом. Для осуществления межлабораторных испытаний комиссионно отбирали по три образца каждой серии. За один образец принимали содержимое одной ампулы.

Для проведения исследований применяли реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США): дансилгидразин, трифторуксусную кислоту > 99 %, ацетонитрил > 99,93 %, ацетат аммония > 98 %, фосфатно-солевой буфер (рН 7,4), D-глюкозу, N-ацетил-D-галактозамин, рибозу, сахарозу, лактозу, ксилозу, галактозу, рамнозу, арабинозу, фруктозу.

Спектры поглощения исследуемых образцов в диапазоне 180–800 нм получены на спектрофотометре NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США).

Количественное определение белков проводили методом специфической флуориметрии на приборе

Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, США) с использованием набора реактивов Qubit Protein Assay Kit (Invitrogen, США).

Исследование белкового состава препаратов проводили методом капиллярного электрофореза на чипе для анализа белков (набор Experion Pro260 Analysis Kit для 10 чипов, Bio-Rad) с помощью автоматической системы Experion System (Bio-Rad, США). Обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Experion Software, Version 3.2.

Качественный состав определяли методом ионообменной жидкостной хроматографии с рефрактометрической детекцией. Оборудование ВЭЖХ: система жидкостной хроматографии Konik Q12 C (Konik, Испания), колонка хроматографическая ZORBAX NH2 4,6×250 mm (Agilent Technologies, США) с предколонкой 1×0,4 cm; детекция – рефрактометрический детектор (Konik RID 560). Условия ВЭЖХ: подвижная фаза – ацетонитрил/Н<sub>2</sub>O (70/30); скорость подвижной фазы 1,8 мл/мин; в изократическом режиме в течение 15 мин, температура термостата колонки 30 °С; объем вводимой пробы 20 мкл. Для вычисления времени удерживания, площадей хроматографических пиков при детектировании, а также для графического представления хроматограмм использовали программу Konikrom Plus (Konik, Испания).

Исследовали интактные водные растворы *WsAg* и *PPBC* (концентрация 1 мг/мл) и кислотные гидролизаты образцов. Гидролиз проводили 2М трифторуксусной кислотой при температуре 99 °С с последующим испарением кислоты при пониженном давлении и температуре 30 °С.

Хроматографический анализ гидролизированных образцов бруцеллезных антигенных комплексов осуществляли путем сравнения со стандартами моно- и дисахаридов, проводя не менее пяти измерений для каждой пробы. Идентификацию компонентов на хроматограммах исследуемых гидролизатов осуществляли путем сравнения со временем удерживания стандартных образцов моно- и дисахаридов (D-глюкоза, галактозамин, сахароза, лактоза, ксилоза, галактоза, рамноза, арабиноза, фруктоза). Воспроизводимость хроматограмм разных серий составила (98,0±0,5) %, что свидетельствует о стандартности технологического процесса и получаемых продуктов.

Для определения специфической активности изготовленных экспериментальных серий препаратов использовали метод двойной иммунодиффузии (РИД) в 1 % агаровом геле (Difko, США) по О. Ouchterlony в чашках Петри с применением гипериммунной сыворотки против возбудителя бруцеллеза производства Ставропольского противочумного института с предварительно проверенной активностью в РИД не менее 1:16. При контроле специфичности использовали сыворотки производства Иркутского научно-исследовательского противочумного института (сыворотка диагностическая туляремиальная сухая для реакции агглютинации, сыворотка диагностическая

холерная О1 адсорбированная сухая для реакции агглютинации) и сыворотку диагностическую сальмонеллезную О-поливалентную редких групп производства ООО НПО «ЭКОлаб-Диагностика».

Все эксперименты с животными выполнялись в соответствии с законодательством Российской Федерации и Директивой европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях.

Специфическую активность и специфичность полученных бруцеллезных антигенных комплексов оценивали в клеточных тестах *in vitro*. В качестве объекта исследования использовали аутобредных белых лабораторных мышей SHK (Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, МО) в возрасте 6–8 недель с массой тела 18–20 г (n=50), иммунизированных вакциной против бруцеллеза (НПО «Микроген» Минздрава России) в дозе  $3,4 \cdot 10^8$  –  $4,6 \cdot 10^8$  живых м.к. в 0,5 мл 0,9 % раствора NaCl. Контрольную группу (n=50) составили лабораторные мыши, которым вводили стерильный 0,9 % раствор NaCl в объеме 0,5 мл. Взятие крови у иммунизированных и контрольных биомоделей осуществляли до вакцинации и на 14 сут после иммунизации. Исследования проводили на проточном цитометре FACS Calibur (Becton Dickinson, США) с программным обеспечением BD Cell Quest, используя моноклональные антитела (МКАТ) (Invitrogen, США) к поверхностным антигенам лимфоцитов мыши, меченные FITC (флуоресцеинизотиоцианат) и PE (фикоэритрин). Определяли активационные молекулы CD25, CD69, экспрессированные лимфоцитами. Популяцию лимфоцитов идентифицировали при помощи гейтирования в координатах FSC-SSC на графике Dot Plot. События, попавшие в регион лимфоцитов, анализировали на предмет экспрессии CD69<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> рецепторов – маркеров ранней активации. Для определения фоновых значений маркеров активации стимуляцию лимфоцитов осуществляли стерильным физиологическим раствором. Реакцию активации учитывали через 24 ч после инкубации с образцами препаратов в условиях *in vitro*.

Для подтверждения воспроизводимости и достоверности полученных при исследовании результатов проводили математическую обработку значений исследуемых показателей в программе Microsoft Excel, производя расчет значения средней квадратичной ошибки отдельного измерения, выборочной дисперсии, вероятного квадратичного отклонения при двух степенях свободы с доверительной вероятностью 0,95.

## Результаты и обсуждение

Получение и экспериментальное исследование антигенных препаратов, предназначенных для клеточных тестов *in vitro*, является одной из приоритетных задач при разработке методов оценки формирования и напряженности клеточного иммунитета.



Ввиду отсутствия аналоговых препаратов и стандартизированного набора характеристик, подтверждающих их диагностическую ценность, полученные в ходе разработок препараты проанализированы с помощью комплекса методов, позволяющих охарактеризовать белковую и полисахаридную часть антигена, а также сделать вывод о возможности использования данных комплексов в антиген-специфических клеточных тестах *in vitro*.

На первом этапе исследования экспериментальных серий для каждой группы образцов получены характерные спектры поглощения. Так, спектры поглощения раствора *WsAg* содержали два максимума поглощения при 218 и 260 нм и локальный минимум при 235–238 нм, а для образцов *PPBC* – максимум поглощения регистрировался при 213 и 259 нм с идентичным для *WsAg* локальным минимумом. Результаты спектрального анализа показали идентичность состава образцов и позволили подтвердить стандартность технологии их получения.

При учете особенностей спектров поглощения отдельных классов органических соединений и оценке соотношения поглощений при 260/280 нм и 260/230 нм возможно определение наличия примесей нуклеиновых кислот и белков. Значения этих соотношений для образцов *WsAg* составили  $A_{(260/280)} 1,85 \pm 0,05$ ,  $A_{(260/230)} 0,83 \pm 0,05$ , а для *PPBC* –  $A_{(260/280)} 1,87 \pm 0,05$ ,  $A_{(260/230)} 1,02 \pm 0,05$ , что свидетельствует об относительно низком содержании нуклеиновых кислот в образцах по сравнению с белками и подтверждается данными специфичной флуориметрии: концентрация белка –  $(930,57 \pm 5,09)$  мкг/мл и  $(745,06 \pm 5,01)$  мкг/мл, ДНК –  $(100,06 \pm 2,16)$  мкг/мл и  $(11,05 \pm 0,02)$  мкг/мл соответственно.

Для более детального изучения белковой составляющей препарата методом капиллярного электрофореза охарактеризован состав полученных белковых фракций. Так, в анализируемых образцах *WsAg* определено шесть пептидов с молекулярной массой в диапазоне от 9,23 до 45,61 кДа без преобладания каких-либо фракций по концентрации, что согласуется с результатами проверки препарата на специфичность. В свою очередь, при исследовании образцов *PPBC* на фореграммах зарегистрировано 14 пиков, но, несмотря на то, что по результатам проведенного анализа данный препарат является более гетерогенным по составу и содержит белки с массой от 10,91 до 112,47 кДа, преобладающим и основным компонентом антигенного комплекса является полипептид с молекулярной массой 33 кДа.

При изучении полисахаридного состава изготовленных экспериментальных препаратов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии подобрана методика кислотного гидролиза образцов. Анализ хроматограмм полученных гидролизатов осуществляли путем сравнения со временем удерживания образцов моно- и дисахаридов (D-глюкоза, галактозамин, сахароза, лактоза, ксилоза, галактоза, рамноза, арабиноза, фруктоза): время удерживания

углеводных компонентов *PPBC* –  $(4,90 \pm 0,10)$  мин и  $(6,64 \pm 0,10)$  мин, что соответствует хроматограммам стандартных образцов рамнозы –  $(4,92 \pm 0,10)$  мин и D-глюкозы –  $(6,64 \pm 0,10)$  мин, в свою очередь время удерживания углеводных компонентов *WsAg* –  $(4,90 \pm 0,10)$  мин,  $(6,06 \pm 0,10)$  и  $(6,61 \pm 0,10)$  мин, что соотносится с сигналами рамнозы, арабинозы и D-глюкозы. Отсутствие других пиков на хроматограммах свидетельствует о полном кислотном гидролизе углеводной части антигенных препаратов. Воспроизводимость хроматограмм разных серий составила  $(98,0 \pm 0,5) \%$ , что свидетельствует о стандартности технологического процесса полученных продуктов. Отсутствие дополнительного пика арабинозы в гидролизате *PPBC* связано с особенностями его получения и не влияет на его антигенные свойства, которые в большей степени связаны с белковой составляющей.

Проверка преципитирующей активности полученных антигенных комплексов в РИД позволила определить специфический титр образцов, который составил 1:128 для *PPBC* и 1:64 для *WsAg*.

Изготовленные экспериментальные серии антигенных комплексов (*WsAg* и *PPBC*) прошли апробацию при постановке антигенспецифических клеточных тестов *in vitro*, по результатам которой определены специфичность и специфическая активность препаратов.

Анализ результатов изучения интенсивности активирующего влияния антигена *WsAg* на лимфоциты свидетельствовал о неконтролируемой индуцированной активации популяции лимфоцитов *in vitro*, что указывает на неспецифические реакции клеток в присутствии данного антигена. Антиген *PPBC* не вызывал неспецифических реакций – не способствовал *in vitro* активации лимфоцитов у биомоделей, неиммунных к возбудителю бруцеллеза (рис. 1).

Проведенные исследования показали, что интенсивность экспрессии маркеров активации лимфоцитов в контрольной группе при стимуляции изотоническим 0,9 % раствором NaCl и *PPBC* не

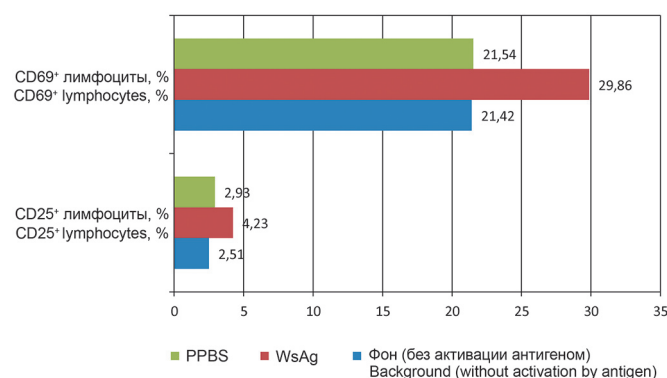


Рис. 1. Интенсивность фоновой и антигениндуцированной активации *in vitro* лимфоцитов у биомоделей, неиммунных к возбудителю бруцеллеза

Fig. 1. Intensity of the background and antigen-induced activation of lymphocytes in biomodels that have no immunity to brucellosis agent *in vitro*

имела статистически значимой разницы во все сроки исследования. Это указывает на то, что *PPBC* не вызывает неспецифической реакции лимфоцитов *in vitro*. Вероятно, как определено нами ранее, наличие в антигенном комплексе *PPBC* полипептида с молекулярной массой 33 кДа (как основного компонента) и более низкое содержание ДНК (на один порядок ниже, чем в *WsAg*) обуславливают специфичность препарата, применение которого не вызывает спонтанной экспрессии лимфоцитов.

На следующем этапе исследовали интенсивность экспрессии лимфоцитами иммунизированных *B. abortus* 19 BA биологических моделей «ранних» активационных молекул – CD69 и CD25 под влиянием антигенного комплекса *PPBC*. Показано, что при инкубации смешанной культуры лейкоцитов, иммунных к возбудителю бруцеллеза биологических моделей, в среде антигенным комплексом *PPBC* возникает активация лимфоцитов, что выражается увеличением в 2,8 раза интенсивности экспрессии лимфоцитами рецептора к IL-2 (CD25), составив в среднем  $(8,65 \pm 1,85) \%$  (фоновые значения –  $(3,73 \pm 0,40) \%$ ). По результатам анализа специфической активности *PPBC* по маркеру ранней пролиферации лимфоцитов (CD69) определено, что на 14 сут после иммунизации антигенный комплекс способствовал увеличению, в сравнении с фоновыми значениями  $(23,07 \pm 1,87 \%)$ , интенсивности экспонирования CD69 более чем в 2 раза –  $(46,81 \pm 4,53) \%$  (рис. 2).

Экспериментально доказано, что в течение всего срока испытания *PPBC* (в масштабе реального времени) лиофилизированный препарат сохранял стабильность без изменения внешнего вида, растворимости, pH, содержания белка, специфичности и специфической активности *in vitro*. В течение 12 месяцев наблюдения качественные показатели препарата оставались в пределах установленных интервалов при температуре хранения от 2 до 8 °C. В процессе применения восстановленный в физиологическом растворе препарат характеризуется стабильностью своих биологических и физико-

химических свойств в течение 3 месяцев при температуре хранения -18 °C.

Таким образом, в результате исследований определены физико-химические характеристики, изучены хроматографические профили и состав белковых фракций, а также специфичность и специфическая активность *in vitro* экспериментальных серий изготовленных антигенных препаратов. Анализ полученных результатов позволяет заключить, что белковый и полисахаридный состав полученных образцов *WsAg* исключает возможность использования данного препарата для клеточных тестов, так как его применение способствует проявлению неспецифических реакций лимфоцитов *in vitro*. В свою очередь, комплексный антиген *PPBC* не вызывает неспецифических реакций (неспецифической активации) лимфоцитов *in vitro*, обладает выраженной специфической активностью в условиях *in vitro* и имеет перспективы использования при разработке эффективных методических подходов для лабораторной диагностики бруцеллеза, а также при оценке фактической привитости контингентов риска после вакцинации. В настоящее время, как уже отмечено ранее, на российском рынке диагностических тест-систем отсутствуют антигенные препараты для постановки клеточных тестов. Полученные данные позволяют обеспечить надлежащее качество разработанного экспериментального препарата с учетом современных правил валидации и стандартизации при производстве комплексного бруцеллезного антигена *PPBC*, предназначенного для клеточных тестов *in vitro*.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

### Список литературы

- Byndloss M.X., Tsolis R.M. *Brucella* spp. virulence factors and immunity. *Annual Review of Animal Biosciences*. 2016; 4:111–27. DOI: 10.1146/annurev-animal-021815-111326.
- Głowacka P., Zakowska D., Naylor K., Niemcewicz M., Bielawska-Drózd A. *Brucella* – virulence factors, pathogenesis and treatment. *Polish Journal of Microbiology*. 2018; 67(2):151–61. DOI: 10.21307/pjm-2018-029.
- Amjadi O., Rafiei A., Mardani M., Zafari P., Zarifian A. A review of the immunopathogenesis of Brucellosis. *Infect. Dis. (Lond)*. 2019; 51(5):321–33. DOI: 10.1080/23744235.2019.1568545.
- Smith J.A. *Brucella* Lipopolysaccharide and pathogenicity: The core of the matter. *Virulence*. 2018; 9(1):379–82. DOI: 10.1080/21505594.2017.1395544.
- Avila-Calderón E.D., Flores-Romo L., Sharon W., Donis-Maturano L., Becerril-García M.A., Arreola M.G.A., Reynoso B.A., Güemes F.S., Contreras-Rodríguez A. Dendritic cells and *Brucella* spp. interaction: the sentinel host and the stealthy pathogen. *Folia Microbiol (Praha)*. 2020; 65(1):1–16. DOI: 10.1007/s12223-019-00691-6.
- Брико Н.И., Онищенко Г.Г., Покровский В.И. Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство»; 2019. Т. 1. 880 с.
- Костюченко М.В., Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Санникова И.В., Дейнека Д.А., Голубь О.Г. Перспектива оценки антигенреактивности лимфоцитов *in vitro* для диагностики острого бруцеллеза. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(1):91–6. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-1-91-96.
- Костюченко М.В., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Курчева С.А., Бердникова Т.В., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. Изучение формирования клеточного поствакцинального иммунитета против бруцеллеза в лимфоцитарных те-

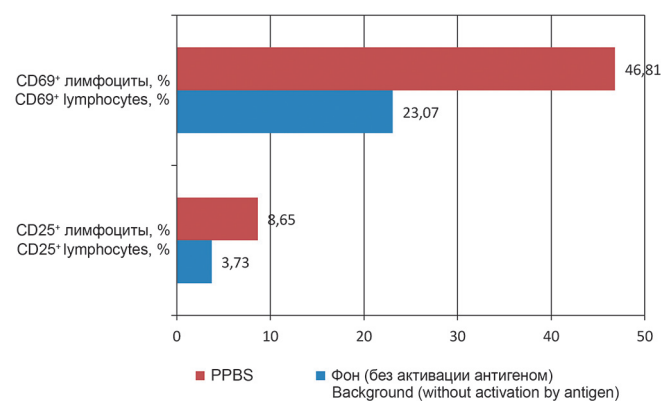


Рис. 2. Интенсивность фоновой и индуцированной *PPBC* активации *in vitro* лимфоцитов у биомodelей, иммунных к возбудителю бруцеллеза

Fig. 2. Intensity of the background and *PPBC*-induced activation of lymphocytes in biomodels that have immunity to brucellosis agent *in vitro*

стах *in vitro* с использованием экспериментального антигенного комплекса. *Медицинская иммунология*. 2019; 21(3):547–54. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-547-554.

9. Пономаренко Д.Г. Новый подход к комплексной оценке иммунобиологической реактивности контингента, подлежащего вакцинации (ревакцинации) против бруцеллеза. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2015; 3:28–31.

10. Budak F., Bal S.H., Tezcan G., Akalin E.H., Yilmaz A., Hiz P., Oral H.B. The microRNA expression signature of CD4<sup>+</sup> T cells in the transition of brucellosis into chronicity. *PLoS One*. 2018; 13(6):e0198659. DOI: 10.1371/journal.pone.0198659.

11. Starska K., Glowacka E., Kulig A., Lewy-Trenda I., Bryś M., Lewkowicz P. Prognostic value of the immunological phenomena and relationship with clinicopathological characteristics of the tumor – the expression of the early CD69<sup>+</sup>, CD71<sup>+</sup> and the late CD25<sup>+</sup>, CD26<sup>+</sup>, HLA/DR<sup>+</sup> activation markers on T CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes in squamous cell laryngeal carcinoma. Part II. *J. Folia Histochem. Cytobiol.* 2011; 49(4):593–603. DOI: 10.5603/FHC.2011.0082.

12. Shipkova M., Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica Chimica Acta*. 2012; 413(17–18):1338–49. DOI: 10.1016/j.cca.2011.11.006.

13. Shevach E.M., McHugh R.S., Piccirillo C.A., Thornton A.M. Control of T-cell activation by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells. *Immunol. Rev.* 2001; 182:58–67. DOI: 10.1034/j.1600-065-x.2001.1820104.x.

14. Moreno-Lafont M.C., López-Santiago R., Zumarán-Cuellar E., Paredes-Cervantes V., López-Merino A., Estrada-Aguilera A., Santos-Argumedo L. Antigen-specific activation and proliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from brucellosis patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002; 96(3):340–7. DOI: 10.1016/s0035-9203(02)90119-7.

15. Coria L.M., Ibañez A.E., Pasquevich K.A., González Cobiello P.L., Frank F.M., Giambartolomei G.H., Cassataro J. *Brucella abortus* Omp19 recombinant protein subcutaneously co-delivered with an antigen enhances antigen-specific T helper 1 memory responses and induces protection against parasite challenge. *Vaccine*. 2016; 34(4):430–7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.12.012.

## References

1. Byndloss M.X., Tsolis R.M. *Brucella* spp. virulence factors and immunity. *Annual Review of Animal Biosciences*. 2016; 4:111–27. DOI: 10.1146/annurev-animal-021815-111326.

2. Glowacka P., Zakowska D., Naylor K., Niemcewicz M., Bielawska-Drózd A. *Brucella* – virulence factors, pathogenesis and treatment. *Polish Journal of Microbiology*. 2018; 67(2):151–61. DOI: 10.21307/pjm-2018-029.

3. Amjadi O., Rafiei A., Mardani M., Zafari P., Zarifian A. A review of the immunopathogenesis of Brucellosis. *Infect. Dis. (Lond)*. 2019; 51(5):321–33. DOI: 10.1080/23744235.2019.1568545.

4. Smith J.A. *Brucella* Lipopolysaccharide and pathogenicity: The core of the matter. *Virulence*. 2018; 9(1):379–82. DOI: 10.1080/21505594.2017.1395544.

5. Avila-Calderón E.D., Flores-Romo L., Sharon W., Donis-Maturano L., Becerril-García M.A., Arreola M.G.A., Reynoso B.A., Güemes F.S., Contreras-Rodríguez A. Dendritic cells and *Brucella* spp. interaction: the sentinel host and the stealthy pathogen. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2020; 65(1):1–16. DOI: 10.1007/s12223-019-00691-6.

6. Briko N.I., Onishchenko G.G., Pokrovsky V.I. Guidelines on epidemiology of infectious diseases [in 2 vols.]. Moscow: “Medical information Agency” Publishing house; 2019. Vol. 1. 880 p.

7. Kostyuchenko M.V., Ponomarenko D.G., Rakitina E.L., Logvinenko O.V., Sannikova I.V., Deyneka D.A., Golub' O.G. Prospect of assessment of lymphocyte antigen-reactivity *in vitro* for diagnostics of acute brucellosis. *Infektsiya i Immunitet [Infection and Immunity]*. 2019; 21(3):547–54. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-1-91-96.

8. Kostyuchenko M.V., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Logvinenko O.V., Kurcheva S.A., Berdnikova T.V., Rusanova D.V., Kulichenko A.N. Studying development of post-vaccinal cellular immunity against brucellosis by means of lymphocyte *in vitro* tests using an experimental antigenic complex. *Meditsinskaya Immunologiya [Medical Immunology]*. 2019; 21(3):547–54. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-547-554.

9. Ponomarenko D.G. A new approach to comprehensively assessing immunobiological responsiveness in a cohort to be vaccinated (revaccinated) against brucellosis. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. Aktual'nye Voprosy [Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items]*. 2015; 3:28–31.

10. Budak F., Bal S.H., Tezcan G., Akalin E.H., Yilmaz A., Hiz P., Oral H.B. The microRNA expression signature of CD4<sup>+</sup> T cells in the transition of brucellosis into chronicity. *PLoS One*. 2018; 13(6):e0198659. DOI: 10.1371/journal.pone.0198659.

11. Starska K., Glowacka E., Kulig A., Lewy-Trenda I., Bryś M., Lewkowicz P. Prognostic value of the immunological phenomena and relationship with clinicopathological characteristics of the tumor – the expression of the early CD69<sup>+</sup>, CD71<sup>+</sup> and the late CD25<sup>+</sup>, CD26<sup>+</sup>, HLA/DR<sup>+</sup> activation markers on T CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes in squamous cell laryngeal carcinoma. Part II. *J. Folia Histochem. Cytobiol.* 2011; 49(4):593–603. DOI: 10.5603/FHC.2011.0082.

12. Shipkova M., Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica Chimica Acta*. 2012; 413(17–18):1338–49. DOI: 10.1016/j.cca.2011.11.006.

13. Shevach E.M., McHugh R.S., Piccirillo C.A., Thornton A.M. Control of T-cell activation by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells. *Immunol. Rev.* 2001; 182:58–67. DOI: 10.1034/j.1600-065-x.2001.1820104.x.

14. Moreno-Lafont M.C., López-Santiago R., Zumarán-Cuellar E., Paredes-Cervantes V., López-Merino A., Estrada-Aguilera A., Santos-Argumedo L. Antigen-specific activation and proliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from brucellosis patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002; 96(3):340–7. DOI: 10.1016/s0035-9203(02)90119-7.

15. Coria L.M., Ibañez A.E., Pasquevich K.A., González Cobiello P.L., Frank F.M., Giambartolomei G.H., Cassataro J. *Brucella abortus* Omp19 recombinant protein subcutaneously co-delivered with an antigen enhances antigen-specific T helper 1 memory responses and induces protection against parasite challenge. *Vaccine*. 2016; 34(4):430–7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.12.012.

## Authors:

Kurcheva S.A., Kovalev D.A., Ponomarenko D.G., Siritsa Yu.V., Kostyuchenko M.V., Koshkid'ko A.G., Zharnikova I.V., Rakitina E.L., Logvinenko O.V., Zhirov A.M. Stavropol Research Anti-Plague Institute, 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

## Об авторах:

Курчева С.А., Ковалев Д.А., Пономаренко Д.Г., Сирица Ю.В., Костюченко М.В., Кошкидько А.Г., Жарникова И.В., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Жиров А.М. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.