

# ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ПЕСТИНА ПП И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *IN VITRO*

С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, Ю.В. Сирица, Е.Л. Ракина, Е.Н. Афанасьев, М.В. Костюченко

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

**Резюме.** Формирование иммунитета против инфекционных заболеваний сопровождается иммуноаллергической перестройкой организма, при этом интенсивность аллергической реакции ассоциирована с наличием специфического иммунитета. Для определения интенсивности сенсибилизации организма часто применяют кожное аллертестирование. При определении иммунитета у вакцинированных против чумы ранее в качестве аллергена предлагался пестин ПП — полипептидно-полисахаридный комплекс чумного микроба. Авторами оптимизирована методика получения препарата пестина с сохранением его химического состава, высокой специфичности и аллергенной активности. Известно, что недостатком аллергопроб *in vivo* является высокий риск формирования побочных реакций. Предложен метод оценки адаптивного противочумного иммунитета с аллергеном пестином в антигенспецифических клеточных тестах *in vitro*. Получение аллергена по модифицированной методике осуществляли путем гидролиза биомассы вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ с последующим фильтрованием и лиофилизацией осадка. В полученном препарате определяли рН и концентрацию белка. Для проверки специфичности образцы подвергали спектрофотометрическому и хроматографическому анализу. Для оценки специфической активности использовали образцы крови 17 человек, иммунизированных вакциной чумной живой из штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ по эпидемическим показаниям. В качестве сравнительного контроля использовали стерильный изотонический раствор натрия хлорида. Контингент обследовали до вакцинации, на 7, 21 сутки и через 3 месяца после иммунизации путем оценки интенсивности экспрессии базофилами CD63. Биохимический анализ полученного по модифицированной методике пестина и производных позволил судить о качественном составе, показать отсутствие примесей белковой природы, а так же определить углеводный профиль. Использование препарата в качестве аллергена для оценки формирования противочумного иммунитета у вакцинированного контингента подтвердило его специфичность. Полученные данные показали возможность и перспективу использования пестина ПП в качестве тест-аллергена для постановки реакции активации базофилов *in vitro*.

**Ключевые слова:** аллерген пестин ПП, противочумный иммунитет, вакцинация, спектрофотометрия, проточная цитофлуориметрия, хроматографический анализ.

---

**Адрес для переписки:**

Гостищева Светлана Евгеньевна  
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15,  
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт  
Роспотребнадзора.  
Тел./факс: +7 (8652) 26-20-50 (служебн.).  
E-mail: chumnpl@yandex.ru; snipchi@mail.stv.ru

**Contacts:**

Svetlana E. Gostischeva  
355035, Russian Federation, Stavropol, Sovetskaya str., 13–15,  
Stavropol Plague Control Research Institute.  
Phone/fax: +7 (8652) 26-20-50 (office).  
E-mail: chumnpl@yandex.ru; snipchi@mail.stv.ru

**Библиографическое описание:**

Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Ковалев Д.А., Пономаренко Д.Г., Сирица Ю.В., Ракина Е.Л., Афанасьев Е.Н., Костюченко М.В. Оптимизация метода получения пестина ПП и изучение его специфической активности *in vitro* // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 85–90. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-85-90

**Citation:**

Gostischeva S.E., Abzaeva N.V., Kovalev D.A., Ponomarenko D.G., Siritsa Yu.V., Rakitina E.L., Afanasyev E.N., Kostuchenko M.V. Optimization of the method of obtaining pestine PP and studying its specific activity *in vitro* // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 85–90. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-85-90

## OPTIMIZATION OF THE METHOD OF OBTAINING PESTINE PP AND STUDYING ITS SPECIFIC ACTIVITY *IN VITRO*

Gostischeva S.E., Abzaeva N.V., Kovalev D.A., Ponomarenko D.G., Siritsa Yu.V., Rakitina E.L., Afanasyev E.N., Kostuchenko M.V.

*Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation*

**Abstract.** The formation of immunity against infectious diseases is accompanied by an immunoallergic alteration of the organism, while the intensity of the allergic reaction is associated with the presence of specific immunity. Skin allergotesting is often used to determine the intensity of sensitization of the body. When determining the immunity of vaccines against the plague, previously an allergen was suggested as a pestin PP — a polypeptide polysaccharide complex of a plague microbe. The authors optimized the technique for obtaining the preparation of pestin with preservation of its chemical composition, high specificity and allergenic activity. It is known that a lack of allergic test *in vivo* is a high risk of formation of adverse reactions. A method for estimating adaptive antiplague immunity with the allergen pestin in antigen-specific cellular tests *in vitro* is proposed. The preparation of the allergen by a modified procedure was carried out by hydrolysis of the biomass of the vaccine strain of the plague microbe *Yersinia pestis* EV of the NIEG line, followed by filtration and lyophilization of the precipitate. In the preparation obtained, the pH and the protein concentration were determined. To check the specificity, the samples were subjected to spectrophotometric and chromatographic analysis. To assess specific activity, blood samples of 17 people immunized with the plague live vaccine from the *Yersinia pestis* EV strain of the NIEG line were used for epidemic indications. As a comparative control, a sterile isotonic sodium chloride solution was used. The contingent was examined before vaccination on days 7, 21 and 3 months after immunization by evaluating the expression intensity of basophils CD63. Biochemical analysis of the obtained by the modified procedure of the pestin and derivatives allowed to judge the qualitative composition, to show the absence of impurities of the protein nature, as well as to determine the carbohydrate profile. The use of the drug as an allergen to assess the formation of antiplague immunity in the vaccinated contingent confirmed its specificity. The obtained data showed the possibility and prospect of using the Pestin PP as a test allergen for the establishment of the reaction of activation of basophils *in vitro*.

**Key words:** *allergen pestine PP, antiplague immunity, vaccination, spectrophotometry, flow cytometry, chromatographic analysis.*

Формирование постинфекционного и поствакцинального иммунитета против бактериальных инфекций сопровождается иммуноаллергической перестройкой организма. При этом интенсивность аллергической реакции на антиген ассоциирована с наличием и напряженностью специфического иммунитета [2].

Для определения интенсивности сенсибилизации организма при инфицировании и после иммунизации часто применяют накожное аллерготестирование с использованием бактериальных аллергенов (проба Манту, Бюрне, с тулярином, антраксин-кожный тест и др.).

Совершенствование аллергодиагностических препаратов для чумного микроба шло от корпускулярных бактериальных аллергенов к очищенным его фракциям. Для постановки внутрикожной пробы при определении иммуноаллергической перестройки организма в ответ на введение вакцины против чумы ранее использовали корпускулярный аллерген и экстракт убитой культуры — пестин безмикробный [2]. В 70-е гг. XX в. был предложен к использованию пестин ПП — одна из фракций чумного микроба, высокоактивный и специфичный аллерген для определения иммунитета у вакцинированных против чумы [3].

Анализ имеющихся данных по применению пестина в кожно-аллергических тестах для оценки иммунитета к чуме после вакцинации указывает на его эффективность с позиции до-

статочно высокой специфичности реакции. При этом авторы отмечают, что основным недостатком применения аллергена пестина *in vivo* — высокий риск формирования побочных реакций на инокуляцию антигена (ухудшение общего состояния, развитие некроза на месте введения аллергена и т. д.).

Таким образом, исследователями доказано, что применение пестина для постановки кожно-аллергической реакции позволяет выявлять специфическую сенсибилизацию к возбудителю чумы, а так же может служить объективным показателем развития клеточного иммунитета и устойчивости организма к инфекции [2, 4, 5].

Известно, что кожная реакция на аллерген *in vivo* реализуется преимущественно за счет антигенспецифических Th1-клеток (CD4 Т-клеток воспаления), факторов и медиаторов воспаления (цитокины), отражая активность клеточного иммунитета к инфекции. Авторами был предложен метод оценки адаптивного противочумного иммунитета в антигенспецифических клеточных тестах *in vitro* с аллергеном пестином.

Разработанная и предложенная Тараненко Т.М. (1967) методика получения пестина ПП, предполагающая кислотный гидролиз клеток вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV с последующим двукратным осаждением спиртом и высушиванием полученного осадка в вакуум-эксикаторе над хлористым кальцием, достаточно сложна и, по-нашему мнению, требует со-

вершенствования с позиции сокращения времени и оптимизации (упрощения) процедуры получения аллергена.

Цель исследований — оптимизировать метод получения бактериального аллергена пестина ПП и подтвердить его специфичность биохимическими методами и тестами *in vitro*.

## Материалы и методы

Для получения бактериального аллергена пестина ПП использовали вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ.

Спектрофотометрию водного раствора пестина и его гидролизата осуществляли на спектрофотометре NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США). В качестве раствора сравнения использовали воду I типа (сопротивление 18,2 МОм/см). Анализ образцов проводили в диапазоне от 180 до 800 нм.

Хроматографический анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (Dionex Corp., США) с флуоресцентным детектором FLD-3100. Во всех экспериментах применялась колонка Reprosil-PurC18-Aq длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, размер частиц 5 мкм, и предколонка Acclaim® 120 C18 длиной 10 мм и внутренним диаметром 2 мм, размер частиц 5 мкм. Элюирование осуществляли в градиентном режиме с применением двух подвижных фаз. Фаза А — 0,1 М ацетат аммония в воде pH 6,8, фаза В — ацетонитрил. Градиент: 0–1 мин — 85% А; 1–8 мин — 85–60% А; 8–11 мин — 60% А; 11–12 мин — 60–85% А; 12–15 мин — 85% А. Скорость потока 1,0 мл/мин, объем вводимого образца 5 мкл, температура колонки 30°C. Детекцию вели при длине волны возбуждения и эмиссии 336 и 530 нм соответственно. Формирование и анализ хроматограмм осуществляли в программе Chromeleon v. 6.80 (Dionex Corp.). Концентрацию белков и нуклеиновых кислот в образце пестина определяли с помощью специфической флуоресценции на предварительно откалиброванном флуориметре Qubit 2.0 (Life Technologies, США). В работе использовали наборы для определения концентрации белка Quant-iT™ Protein assay kit 100 реакций (Invitrogen, США), наборы для определения концентрации ДНК Quant-iT dsDNA BR assay kit 100 реакций (Invitrogen, США), анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя.

Для оценки специфичности и специфической активности полученного пестина ПП, проводили аллергологическое обследование 17 человек, иммунизированных вакциной чумной живой из штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ по эпидемическим показаниям. В качестве сравнительного контроля антигена использовали

стерильный изотонический раствор натрия хлорида. Контингент обследовали до вакцинации, на 7, 21 сут и через 3 месяца после иммунизации. Специфическую активность аллергена учитывали в реакции активации базофилов *in vitro* с применением наборов «FlowCAST®» (Buhlmann Laboratories, Швейцария) согласно описанной авторами методике [6]. Цитометрические исследования проводили с использованием проточного цитофлуориметра FACS Calibur (BD, США).

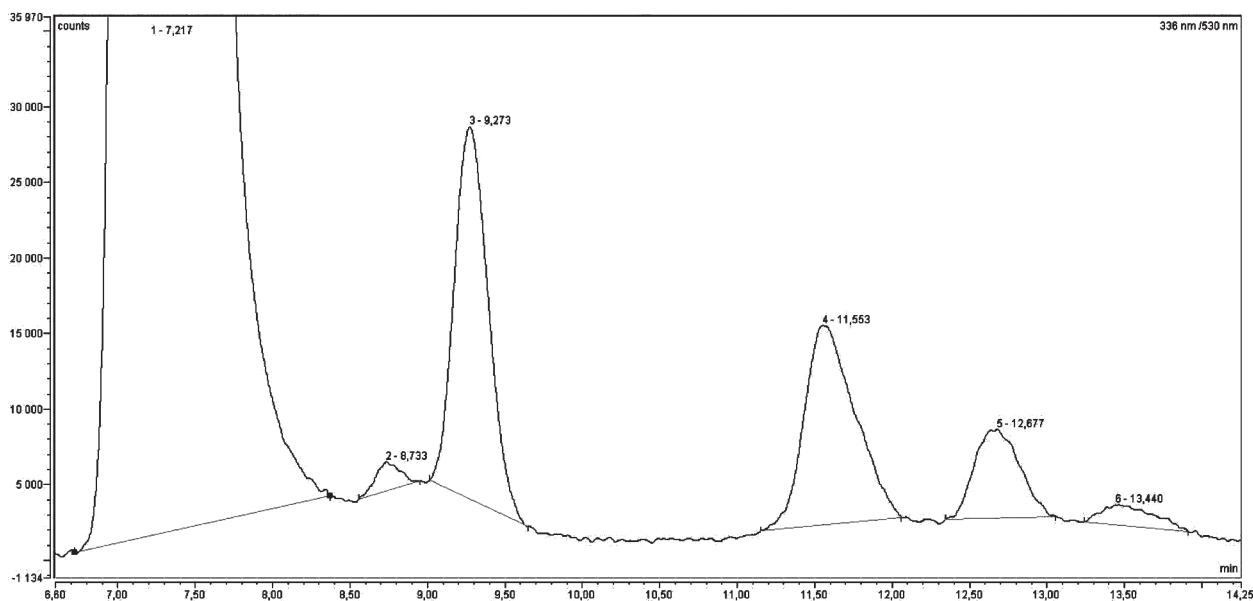
Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica 6.0. Для выявления статистической значимости различий результатов использовали t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Для получения аллергена пестина ПП по модифицированной методике, выращенную в течение 48 ч бактериальную массу *Yersinia pestis* EV подвергали гидролизу 0,1 N уксусной кислотой в течение 3 ч на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Затем охлаждали до комнатной температуры и помещали на 18–20°C в холодильник (4±2)°C на электромагнитную мешалку. Суспензию фильтровали, осадок клеток суспендировали в 1% раствора  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и центрифугировали при 5000–6000 об./мин в течение 10–15 мин. Супернатант соединяли с фильтратом, осадок отбрасывали. Определяли pH полученного гидролизата (в пределах 7,4–7,6), концентрацию белка (4,5 мг/мл). Суспензию разливали в ампулы по 1 мл и лиофилизировали. Полученный препарат подвергали биохимическому анализу и проверке специфической активности в клеточных тестах *in vitro*.

Гидролиз препарата проводили 2М трифторуксусной кислотой при температуре 99°C с последующим испарением кислоты при пониженном давлении и температуре 30°C [10]. Для дериватизации пестина ПП 9 мкл 1% раствора дансилгидразина в этаноле смешивали с 1 мкл 10 мМ фосфатно-солевого буфера pH 7,4 и 10 мкл 10 мМ раствора моно-/олигосахариды или гидролизата и выдерживали при 65°C в течение 20 мин [8, 9].

При исследовании спектрофотометрическим методом для интактного и гидролизованного раствора пестина были получены характеристичные спектры поглощения, которые для растворов пестина содержали два пика поглощения при 230 и 242 нм и локальный минимум при 232–238 нм. В свою очередь у гидролизатов присутствовали пики 230 нм и широкая полоса поглощения 260–310 нм с максимумами 273 и 296 нм, что по нашему мнению связано с наличием R-полосы карбонильной группы.



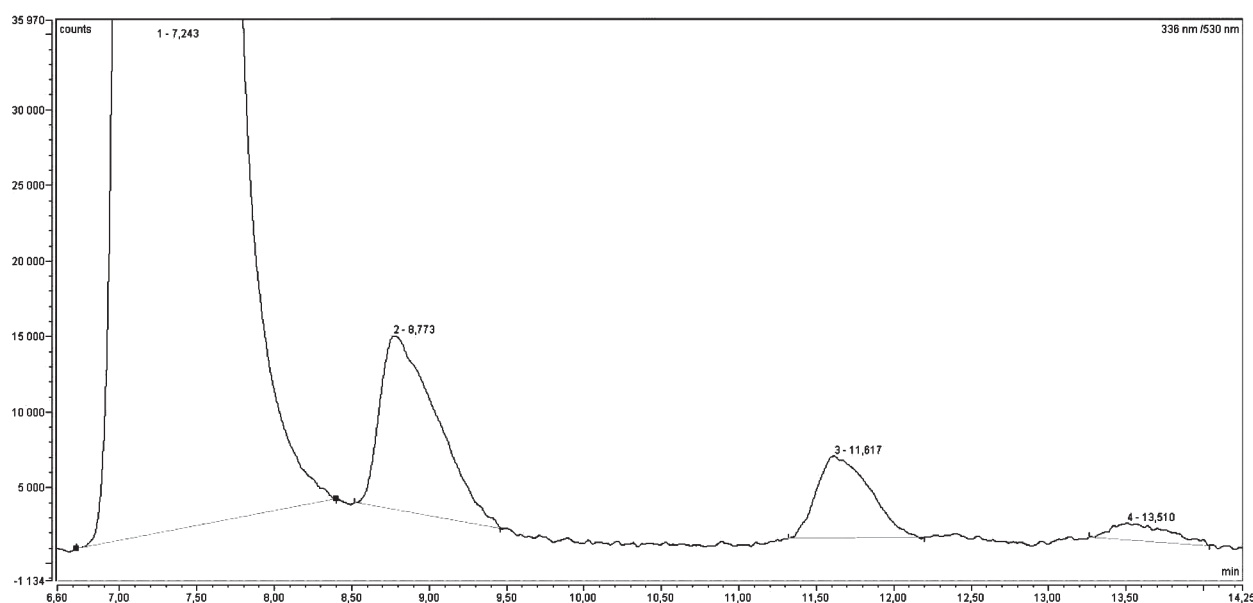
**Рисунок 1. Фрагмент хроматограммы гидролизованного пестина ПП**

Figure 1. The typical chromatogram of hydrolyzed pestin PP

Принимая во внимание особенности спектров поглощения отдельных классов органических соединений и оценивая соотношения поглощений, при 260/280 нм и 260/230 нм можно судить о присутствии в препарате примесей нуклеиновых кислот и белков. Значения этих соотношений для интактного пестина ПП составили  $1,02 \pm 0,002$  и  $1,13 \pm 0,005$ , для гидролизованного раствора —  $0,83 \pm 0,003$  и  $1,01 \pm 0,003$ , что свидетельствует о высокой степени очистки препарата от примесных нуклеиновых кислот и белков. Дополнительно для подтверждения чистоты получаемого пестина ПП была про-

ведена флуориметрия образца, которая показала низкое содержание белков  $0,112 \pm 0,02$  нг/мкл и нуклеиновых кислот  $1,67 \pm 0,02$  нг/мкл.

Качественный состав исходного препарата оценивали с помощью ВЭЖХ с флуоресцентной меткой. В соответствии с данными о мономерном составе пестина ПП были получены хроматограммы интактного пестина, содержащие основной пик с временем удерживания  $8,77 \pm 0,13$  мин и гидролизата пестина с пиком глюкозы (время удерживания  $9,29 \pm 0,15$  мин), а также пиками с большим удерживанием ( $12,66 \pm 0,1$  и  $13,45 \pm 0,12$  мин), принадлежащими



**Рисунок 2. Фрагмент хроматограммы интактного пестина ПП**

Figure 2. The typical chromatogram of intact pestin PP

**Таблица. Оценка специфичности пестина ПП в аллергологических клеточных тестах *in vitro*, %**Table. Evaluation of the pestin specificity in PP allergy cellular tests *in vitro*, %

| Сроки обследования<br>Terms of inspection                | Стимулирующий антиген (пестин ПП)<br>Stimulating antigen (Pestin PP) | Контроль (0,9% раствор NaCl)<br>Control (0,9% solution of NaCl) |
|--|--|---|
| До вакцинации<br>Before vaccination                      | 2,12±0,51  | 1,74±0,58   |
| Ч/з 7 сут после вакцинации<br>7 days after vaccination   | 15,05±1,78   | 1,34±0,28   |
| Ч/з 21 сут после вакцинации<br>21 days after vaccination | 7,45±1,84  | 1,52±0,36   |
| Ч/з 3 мес после вакцинации<br>3 months after vaccination | 5,89±0,89  | 1,52±0,53   |

рибозе, глюкозамину (рис. 1). Отсутствие на хроматограммах гидролизата пестина пика со временем удерживания  $8,77 \pm 0,13$  мин связано с полным гидролизом полисахаридов, входящих в состав данного пика, на соответствующие мономеры. Свободный дансилгидразин элюируется в виде двух пиков с временами удерживания  $7,22 \pm 0,02$  и  $11,56 \pm 0,05$  мин (рис. 2).

Анализ результатов оценки специфичности пестина ПП в аллергологических клеточных тестах *in vitro* показал, что до вакцинации уровень антигенспецифической активации базофилов обследуемых составлял в среднем  $2,12 \pm 0,51\%$ , при инкубации с физраствором  $1,74 \pm 0,58\%$  (контроль). На 7 сут после иммунизации наблюдали более чем двукратное увеличение количества дегранулированных базофилов — количество CD63<sup>+</sup> клеток под действием аллергена повысилось в среднем до  $15,05 \pm 1,78\%$ , (контроль  $1,34 \pm 0,28\%$ ). Через 21 сут после вакцинации против чумы установлено снижение значений исследуемого показателя при активации пестином до  $7,45 \pm 1,84\%$ , в контрольных пробах  $1,52 \pm 0,36\%$ . Через 3 месяца после иммунизации уровень антигениндуцированной экспрессии базофилами CD63 находился на уровне  $5,89 \pm 0,89\%$ , контрольные значения составили  $1,52 \pm 0,53\%$  (табл.). Полученные данные подтверждают специфичность пестина как препарата для аллергодиагностики и, как следствие, оценки формирования противочумного иммунитета у вакцинированного контингента.

В результате проведенных исследований оптимизирован метод получения бактериального аллергена пестина ПП путем гидролиза с последующим фильтрованием и лиофилизацией осадка, что позволяет получить препарат, не уступающий по составу и свойствам ранее упомянутому.

Биохимический анализ полученного по модифицированной методике пестина ПП и его производных позволил сделать вывод о его качественном составе, отсутствии примесей белковой природы, а так же о согласовании углеводного профиля с ранее полученными данными [1, 7]. Используемые в работе методы могут найти применение при разработке критериев качества получаемого препарата, отклонение от которых может говорить о нарушении технологии получения.

Бактериальный аллерген пестин, полученный по модифицированной методике, обладает выраженной специфической активностью в условиях *in vitro*, не вызывает неспецифических реакций клеток *in vitro* у людей, неиммунных к возбудителю чумы. Полученный препарат можно рекомендовать в качестве тест-аллергена для постановки реакции активации базофилов *in vitro* при определении степени интенсивности специфической сенсибилизации у людей перед ревакцинацией против чумы, уровня фактической привитости и развития поствакцинального иммунитета у иммунизированного контингента.

## Список литературы/References

- Бахрах Е.Э., Тараненко Т.М. Изучение химического состава аллергена пестина ПП. Очистка пестина фильтрацией через гель сефадекса // Проблемы особо опасных инфекций. 1968. № 2 С. 146–153. [Bakhrakh E.E., Taranenko T.M. Study of the chemical composition of the allergen Pestin PP. Purification of the pestin by filtration through the sephadex gel. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 1968, no. 2, pp. 146–153. (In Russ.)]
- Белобородов Р.А., Тараненко Т.М., Бахрах Е.Э., Муравьева Н.К., Дудкова В.К. Эффективность компонентов пестина ПП при определении корреляции аллергической реактивности и приобретенной резистентности к чуме // Проблемы особо опасных инфекций. 1974. № 6 (40). С. 51–54. [Beloborodov R.A., Taranenko T.M., Bachrach E.E., Muravieva N.K., Dudkova V.K. Efficiency pestin PP components in determining the correlation of allergic reactivity and acquired resistance to the plague. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 1974, no. 6 (40), pp. 51–54. (In Russ.)]
- Коробкова Е.И. Живая противочумная вакцина. М.: Медгиз, 1956. 205 с. [Korobkova E.I. Zhivaya protivochumnaya vaksina [Live plague vaccine]. Moscow: Medgiz, 1956. 205 p.]

4. Кравцов А.Л., Шмелькова Т.П., Шуковская Т.Н. Влияние противочумной вакцинации на функциональную активность клеток врожденного иммунитета человека // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. № 107. С. 77–80. [Kravtsov A.L., Shmelkova T.P., Schukovskaya T.N. Effect of anti-plague vaccination in the functional activity of the human innate immune cells. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2011, no. 107, pp. 77–80. (In Russ.)]
5. Медуницын Н.В. Вакцинология. М.: Триада-Х, 2010. 507 с. [Medunitsin N.V. Vaksinologiya [Vaccination]. Moscow: Triada-X, 2010. 507 p.]
6. Патент 2574207 Российская Федерация, МПК G01N33/48. Способ дифференциации поствакцинного и инфекционного бруцеллезного процессов по степени повышенной чувствительности организма к бруцеллам в условиях in vitro / Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Саркисян Н.С., Костюченко М.В., Куличенко А.Н., Лямкин Г.И., Голубь О.Г., Бердникова Т.В. Заявитель и патентообладатель: ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; опубл. 10.02.2016 [Patent No. 2574207 of the Russian Federation, IPC G01N33/48. The way of differentiation of postvaccine and infectious brucellosis processes according to the degree of hypersensitivity to brucella in vitro / Ponomarenko D.G., Rakitina E.L., Logvinenko O.V., Sarkisyan N.S., Kostyuchenko M.V., Kulichenko A.N., Lyamkin G.I., Golub O.G., Berdnikova T.V. Applicant and patent holder: Federal Public Health Institution Stavropol Scientific Research Anti-Plague Institute of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare; publ. 10.02.2016]
7. Тараненко Т.М. Изучение химического состава аллергена пестина ПП. Исследование пестина методом электрофореза // Проблемы особо опасных инфекций. 1968. № 2. С. 154–157. [Taranenko T.M. Study of the chemical composition of the allergen pestin PP. Pestin study by electrophoresis. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 1968, no. 2, pp. 154–157. (In Russ.)]
8. Alpenfels W.F. A rapid and sensitive method for the determination of monosaccharides as their dansyl hydrazones by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 1981, vol. 114, no. 1, pp. 153–157. doi: 10.1016/0003-2697(81)90466-8
9. Avigad G. Dansyl hydrazine as a fluorimetric reagent for thin-layer chromatographic analysis of reducing sugars. *J. Chromatogr. A*, 1977, vol. 139, no. 2, pp. 343–347. doi: 10.1016/S0021-9673(00)89330-9
10. Yuan X., Zeng Y., Nie K., Luo D., Wang Z. Extraction optimization, characterization and bioactivities of a major polysaccharide from *Sargassum thunbergii*. *PLoS ONE*, 2015, vol. 10, no. 12:e0144773. doi: 10.1371/journal.pone.0144773

**Авторы:**

**Гостищева С.Е.**, научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

**Абзаева Н.В.**, к.б.н., зав. научно-производственной лабораторией чумных вакцин ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

**Ковалев Д.А.**, к.х.н., зав. лабораторией биохимии ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

**Пономаренко Д.Г.**, к.б.н., зав. лабораторией бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

**Сирица Ю.В.**, младший научный сотрудник лаборатории биохимии ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

**Ракитина Е.Л.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

**Афанасьев Е.Н.**, д.м.н., главный научный сотрудник научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

**Костюченко М.В.**, научный сотрудник сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия.

**Authors:**

**Gostischeva S.E.**, Researcher, Scientific and Industrial Laboratory of Plague Vaccine, Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

**Abzaeva N.V.**, PhD (Biology), Head of the Scientific and Industrial Laboratory of Plague Vaccine Research and Production, Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

**Kovalev D.A.**, PhD (Chemistry), Head of the Laboratory of Biochemistry, Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

**Ponomarenko D.G.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory of Brucellosis, Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

**Siritsa Yu.V.**, Junior Researcher, Laboratory of Biochemistry, Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

**Rakitina E.L.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Department of Clinical Immunology and Pathomorphology of Especially Dangerous Infectious Diseases, Laboratory of Brucellosis, Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

**Afanasyev E.N.**, PhD, MD (Medicine), Chief Researcher, Scientific and Industrial Laboratory of Drugs for Diagnosis of Especially Dangerous Infectious Diseases, Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

**Kostyuchenko M.V.**, Researcher, Department of Clinical Immunology and Pathomorphology of Especially Dangerous Infectious Diseases, Laboratory of Brucellosis, Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russian Federation.