

# Анализ иммунологической активности рекомбинантного белка RibH1 *Brucella abortus*

Д.Г.Пономаренко<sup>1,2</sup>, А.М.Жиров<sup>1</sup>, Е.Л.Ракитина<sup>1</sup>, О.В.Логвиненко<sup>1</sup>, М.В.Костюченко<sup>1</sup>, Д.А.Ковалёв<sup>1</sup>, А.С.Волынкина<sup>1</sup>, Е.И.Василенко<sup>1</sup>, А.А.Хачатурова<sup>1</sup>, Ю.В.Кондратьева<sup>1</sup>, Т.В.Тембай<sup>1</sup>, Т.В.Деригуз<sup>1</sup>, Е.П.Брянцева<sup>1</sup>, А.С.Толмачева<sup>1</sup>, И.В.Кузнецова<sup>1</sup>, Е.И.Харина<sup>2</sup>, А.Н.Куличенко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», Ставрополь, Российская Федерация

Представлены результаты изучения иммунологической активности *in vivo* субъединичного белка RibH1 *Brucella abortus*. Исследования показали, что однократное внутримышечное введение биомоделям 100 мкг субъединичного антигена RibH1 вызывает выраженную иммунологическую реакцию, которая проявляется активизацией лимфоцитопозеза с поляризацией в сторону пролиферации Т-клеток, активацией выработки цитокина интерлейкин-2, усилением метаболической активности (бактерицидного потенциала) фагоцитов. На ранних сроках после иммунизации RibH1 у экспериментальных животных отмечается формирование пула Т-лимфоцитов, реактивных в отношении исследуемого антигена бруцелл, что указывает на развитие адаптивных иммунологических реакций и может способствовать формированию активного Т-клеточного иммунитета против бруцеллезной инфекции. Таким образом, показана перспектива использования антигена RibH1 *B. abortus* в качестве компонента субъединичной вакцины против бруцеллеза.

**Ключевые слова:** бруцеллез, субъединичные антигены бруцелл, иммунологическая активность, Т-клеточный иммунный ответ

**Для цитирования:** Пономаренко Д.Г., Жиров А.М., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Костюченко М.В., Ковалёв Д.А., Волынкина А.С., Василенко Е.И., Хачатурова А.А., Кондратьева Ю.В., Тембай Т.В., Деригуз Т.В., Брянцева Е.П., Толмачева А.С., Кузнецова И.В., Харина Е.И., Куличенко А.Н. Анализ иммунологической активности рекомбинантного белка RibH1 *Brucella abortus*. Бактериология. 2025; 10(4): 102–109. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-102-109

## Analysis immunological activity recombinant protein RibH1 *Brucella abortus*

D.G.Ponomarenko<sup>1,2</sup>, A.M.Zhirov<sup>1</sup>, E.L.Rakitina<sup>1</sup>, O.V.Logvinenko<sup>1</sup>, M.V.Kostyuchenko<sup>1</sup>, D.A.Kovalev<sup>1</sup>, A.S.Volynkina<sup>1</sup>, E.I.Vasilenko<sup>1</sup>, A.A.Khachaturova<sup>1</sup>, Yu.V.Kondratieva<sup>1</sup>, T.V.Tembay<sup>1</sup>, T.V.Deriguz<sup>1</sup>, E.P.Bryanceva<sup>1</sup>, A.S.Tolmacheva<sup>1</sup>, I.V.Kuznetsova<sup>1</sup>, E.I.Kharina<sup>2</sup>, A.N.Kulichenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation;

<sup>2</sup>North Caucasian Federal University, Stavropol, Russian Federation

The article presents results study of immunological activity *in vivo* subunit protein RibH1 *Brucella abortus*. Studies have shown that a single intramuscular injection of 100 µg subunit antigen RibH1 to biomodels causes a pronounced immunological reaction, which is manifested by activation of lymphocytopoiesis with polarization towards T-cell proliferation, activation production of cytokine IL-2, and an increase in metabolic activity (bactericidal potential) phagocytes. In early stages after immunization with RibH1, experimental animals are noted to form a pool T-lymphocytes reactive with respect to studied antigen of *Brucella*, which indicates development adaptive immunological reactions and can contribute to formation active T-cell immunity against brucellosis infection. Prospects for using RibH1 *B. abortus* antigen as a component subunit vaccine against brucellosis are shown.

**Key words:** brucellosis, brucellosis subunit antigens, immunological activity, T-cell immune response

**For citation:** Ponomarenko D.G., Zhirov A.M., Rakitina E.L., Logvinenko O.V., Kostyuchenko M.V., Kovalev D.A., Volynkina A.S., Vasilenko E.I., Khachaturova A.A., Kondratieva Yu.V., Tembay T.V., Deriguz T.V., Bryanceva E.P., Tolmacheva A.S., Kuznetsova I.V., Kharina E.I., Kulichenko A.N. Analysis immunological activity recombinant protein RibH1 *Brucella abortus*. Bacteriology. 2025; 10(4): 102–109. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-102-109

### Для корреспонденции:

Пономаренко Дмитрий Григорьевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15  
Телефон: (865-2) 74-77-41 (373)  
ORCID: 0000-0003-0422-6755

Статья поступила 24.07.2025, принята к печати 25.12.2025

### For correspondence:

Dmitry G. Ponomarenko, PhD in Biological Sciences, head of brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation  
Phone: (865-2) 74-77-41 (373)  
ORCID: 0000-0003-0422-6755

The article was received 24.07.2025, accepted for publication 25.12.2025

**В** последние десятилетия эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в мире остается достаточно напряженной. По данным ряда исследователей, с начала XXI века отмечено почти двукратное увеличение числа стран, где регистрируется это заболевание [1, 2].

К эффективной мере индивидуальной защиты контингентов риска от заболевания бруцеллезом относится специфическая профилактика. Для иммунизации людей против бруцеллеза в России используется препарат вакцины на основе живого штамма *Brucella abortus* 19 BA, который требует совершенствования с позиций повышения протективных свойств и безопасности. Вместе с тем в Российской Федерации для иммунизации животных используются живые вакцины на основе штаммов *B. abortus* 19, *B. abortus* 82, *B. abortus* 75/79, *B. abortus* RB51, *B. melitensis* Rev.1, которые являются высокоиммуногенными и обеспечивают иммунологическую защиту животных от бруцеллеза. Однако эти препараты требуют проведения дополнительных испытаний безопасности (остаточной вирулентности), в т.ч. для оценки возможности применения для иммунизации людей против бруцеллеза [3, 4].

По мнению многих исследователей, разработка субъединичных вакцин против бруцеллеза относится к наиболее перспективному направлению исследований в области совершенствования специфической профилактики инфекции у людей. Субъединичные препараты в сравнении с живыми вакцинами более безопасны и позволяют использовать схемы экстренной постконтактной профилактики [5, 6].

Результаты многочисленных исследований указывают, что очищенные белки в качестве субъединичных вакцин могут избирательно стимулировать клеточный иммунитет у людей и животных. Также показано, что белки внешней мембраны и другие патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs), в т.ч. находящиеся в периплазме бруцеллы, способны стимулировать активацию клеток мононуклеарно-макрофагальной системы (системы мононуклеарных фагоцитов) и выработку иммунорегуляторных медиаторов, что играет важнейшую роль в формировании комплекса врожденных и адаптивных иммунных реакций для защиты от инфекции [7–9].

Известно, что изоферменты люмазинсинтазы RibH1 участвуют в биосинтезе и метаболизме эндогенного рибофлавина у бактерий, в т.ч. и у бруцелл. Блокировка RibH способствует гибели бактерий [10].

Иммунный ответ макроорганизма на метаболиты эндогенного рибофлавина бактерий во многом опосредован взаимодействием с главным комплексом гистосовместимости I типа. Комплементарный МНС (Major histocompatibility complex) белок-1 (MR1) захватывает эти пиримидиновые промежуточные продукты и образует комплекс. Рецепторы антигенов Т-клеток принимают комплексы MR1-антиген, а затем запускают иммунные реакции, сопровождающиеся выработкой цитокинов (интерферона- $\gamma$ , гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерлейкина-17 (IL-17) и др.), продуцируемых активированными макрофагами и Т-клетками, усиливающими иммунную защиту хозяина. Гранзим/перфорин-опосредованная цитотоксическая реакция лимфоцитов обеспечивает более эффективную иммунологическую защиту от внутриклеточных патогенов [11–15].

Анализ современной литературы показал, что белок, кодируемый генами эндогенного рибофлавина, у бактерий (RibH) может считаться потенциально высокоиммуногенным, способным стимулировать Th1-реакцию иммунной системы с формированием адаптивного иммунитета против инфекции. В последние годы уделяется большое внимание изучению особенностей иммунного ответа на эндогенные метаболиты рибофлавина при инфекционных заболеваниях, которые распознаются через систему главного комплекса гистосовместимости, а затем представляются Т-клеткам, в т.ч. инвариантным лимфоцитам, ассоциированным со слизистыми оболочками, и TNK-лимфоцитам [10, 16–18].

Вместе с тем требует комплексного изучения способность субъединиц RibH1 индуцировать активацию макрофагов и специфический Th1-иммунный ответ.

**Цель исследований:** изучить в экспериментах *in vivo* иммунологическую активность рекомбинантного белка бруцелл RibH1.

## Материалы и методы

Конструирование векторов для экспрессии антигена RibH1 проводили на основе плазмидного вектора pET23b(+) (3665 п.н.) (экспрессия белка в клетках *Escherichia coli* проходит под контролем промотора T7, содержит маркер устойчивости к ампициллину и канамицину). Дизайн генетической конструкции для экспрессии бруцеллезного антигена RibH1 в клетках *E. coli* и подбор праймеров для амплификации целевой вставки проводили в программе SnapGene. Клонирование целевой вставки проводили методом рестрикции-лигирования с использованием рестриктаз XbaI и XhoI. Кодирующие последовательности RibH1 (558 п.н.) нарабатывали методом полимеразной цепной реакции на основе ДНК штамма *B. abortus* 19BA. Рекомбинантными плазмидами pET23b(+)-RibH1-HIS трансформировали клетки *E. coli* BL-21 Tuner.

Для получения лизатов клеток штамм-продуцент выращивали в бульоне LB при 37°C в объеме 50 мл, клетки осаждали центрифугированием при 6000 g в течение 10 мин. Осадок промывали и обрабатывали на ультразвуковом гомогенизаторе циклом озвучивания 5 с ON, 5 с OFF, 10 мин при частоте 60 кГц на ледяной бане. Нерастворимый остаток осаждали при 10 000 g в течение 15 мин. Концентрирование и первичную очистку белка в супернатанте проводили методом металл-аффинной хроматографии на Ni-NTA-колонке, а элюирование целевого белка – в градиенте концентрации имидазола. Ионообменную хроматографию проводили на монолитной колонке Q12, целевой белок элюировали в градиенте концентрации хлорида натрия. Наличие целевого белка в элюирующем буфере после хроматографической очистки подтверждали методами ДСН-ПААГ-электрофореза и вестерн-блоттинга. В элюатах выявлен белок RibH1 с массой 17,6 кДа, содержащий гексагистидиновую метку, что соответствует расчетному размеру экспрессируемого антигена. После двух этапов очистки чистота белка RibH1 составила не менее 98% по данным ДСН-ПААГ-электрофореза.

Оценку иммунологической активности полученных белков проводили с использованием аутбредных белых лабора-

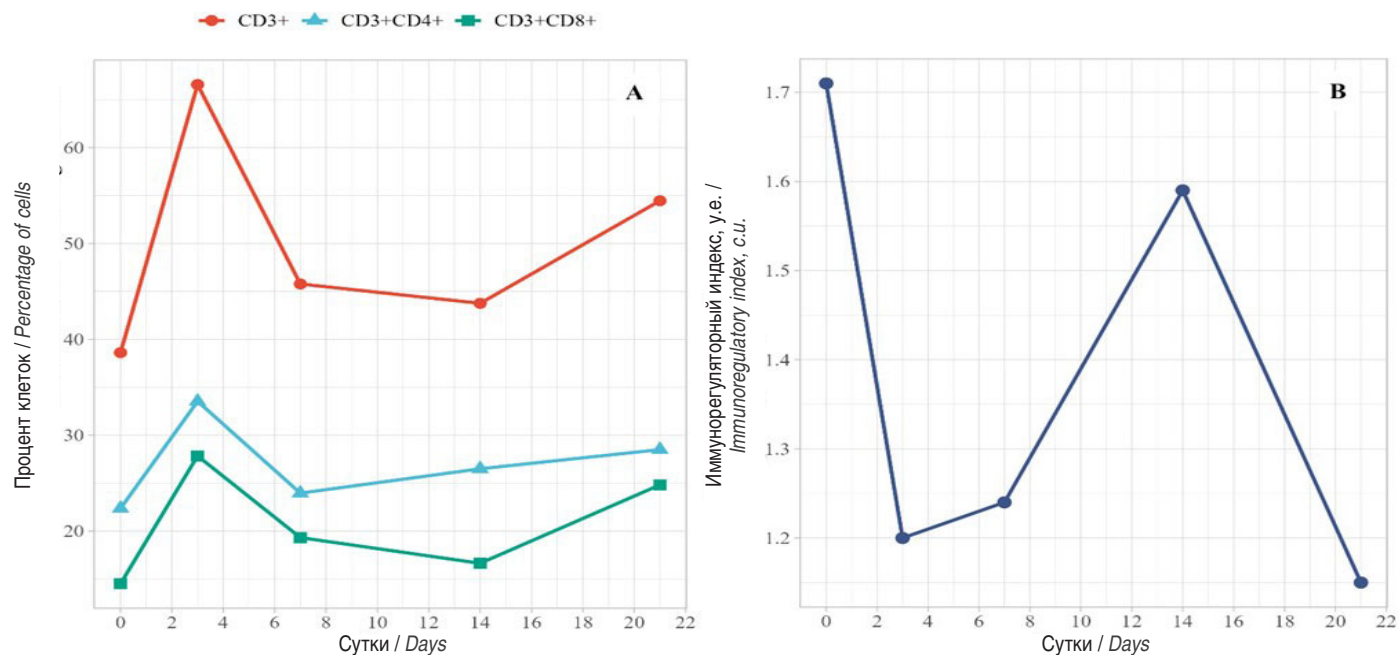


Рис. 1. Динамика общего количества субпопуляций Т-лимфоцитов (А) и иммунорегуляторного индекса (В) у биомоделей после иммунизации RibH1.

Fig. 1. Dynamics of the total number of T-lymphocyte subpopulations (A) and the immunoregulatory index (B) in biomodels after immunization with RibH1.

торных мышей самцов в возрасте 8–10 нед. ( $n = 80$ ). Содержание животных соответствовало «Положению о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментальных клиник (вивариев)». Все животные перед постановкой эксперимента выдерживались в карантине (РД-АПК 3.10.07.02-09). Проведение экспериментов с использованием лабораторных животных и условия их содержания соответствовали требованиям нормативных документов [19, 20].

Животных разделили на 2 группы. Особей 1-й группы иммунизировали RibH1. Суспензию белка животным вводили внутримышечно по 0,2 мл (концентрация антигена составила 50 мкг в 0,1 мл). Мыши 2-й группы были контрольными, им вводили стерильный физиологический раствор в эквивалентном объеме (0,2 мл). Взятие крови у животных (по 10 особей из каждой группы) осуществляли из сердца после их усыпления путем хлороформирования на 3, 8, 14 и 21-е сутки после введения антигенов. В цельной стабилизированной гепарином крови определяли общее количество лейкоцитов и лейкограмму, фагоцитарную активность нейтрофилов, а также функциональную активность фагоцитов в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) [21].

Кроме того, анализировали относительное (%) и абсолютное ( $\times 10^9/\text{л}$ ) количество популяций лимфоцитов CD3, CD4, CD8 и CD19, рассчитывали иммунорегуляторный индекс (ИРИ)  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+/\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ , оценивали экспрессию на моноцитах (CD14) рецептора CD86, который экспонируется антигенпрезентирующими-клетками (АПК-клетками) как ко-стимулирующий сигнал для активации и выживания Т-клеток. Также оценивали уровень экспрессии Т-лимфоцитами маркеров активации CD25 и CD69 после *in vitro* специфической активации субъединичным антигеном RibH1, которым и проводили иммунизацию [22].

Для цитометрической детекции субпопуляций клеток и маркеров активации использовали лазерный проточный цитометр FACS Canto II (Becton Dickinson, США) и конъюгаты моноклональных антител производства Wuhan Elabscience (Китай). В сыворотке крови экспериментальных животных с помощью иммуноферментного анализа определяли концентрацию цитокинов IL-2, IL-4, IL-10 с использованием тест-систем Cloud Clone Corp. (Китай).

Для статистической обработки полученных результатов применяли аналитический пакет Microsoft Excel 2019. Рассчитывали среднюю арифметическую и ошибку средней ( $M \pm m$ ), интервал (min–max), медиану ( $Me$ ). При статистическом анализе различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ . Также проводили множественный регрессионный анализ и определение коэффициента корреляции динамики значений показателей  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD8}^+$  и RibH1-реактивных субпопуляций Т-клеток (на основе данных коэффициента стимуляции (КС) по маркерам активации CD25, CD69).

## Результаты исследования

Анализ иммунологической активности RibH1 показал, что у биомоделей 1-й группы на 3-и сутки после введения субъединичного антигена наблюдалось более чем двукратное увеличение количества лейкоцитов – медианные значения составили  $15,6 \cdot 10^9/\text{л}$  ( $Me$  в контрольной группе ( $Me$ ) –  $6,84 \cdot 10^9/\text{л}$ ). При этом отмечено почти трехкратное увеличение общего числа лимфоцитов –  $9,56 \cdot 10^9/\text{л}$  ( $Me$  –  $3,55 \cdot 10^9/\text{л}$ ). Динамика популяционного состава лимфоцитов у лабораторных животных указывала на выраженную активизацию пролиферации Т-клеток –  $Me$  количества CD3-лимфоцитов составило  $6,36 \cdot 10^9/\text{л}$  ( $Me$  –  $1,32 \cdot 10^9/\text{л}$ ),  $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$  –  $6,36 \cdot 10^9/\text{л}$  ( $Me$  –  $0,30 \cdot 10^9/\text{л}$ ),  $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$  –  $1,77 \cdot 10^9/\text{л}$  ( $Me$  –  $0,18 \cdot 10^9/\text{л}$ ).

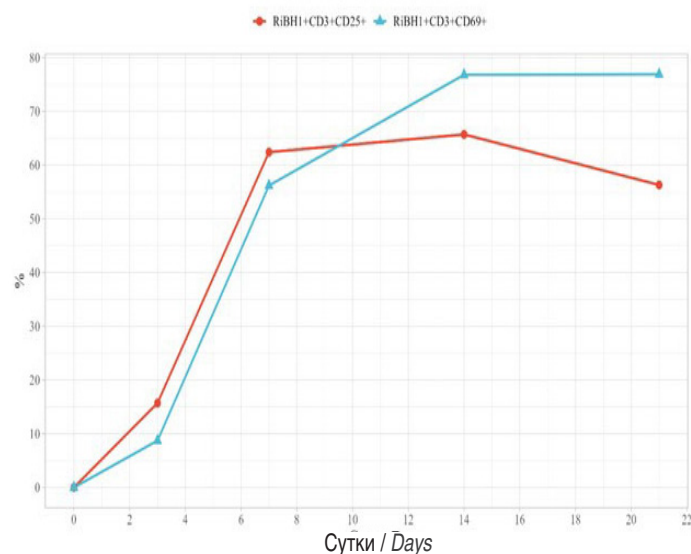


Рис. 2. Динамика пула антигенреактивных Т-клеток у биомоделей после иммунизации RibH1.  
Fig. 2. Dynamics of the pool of antigen-reactive T cells in biomodels after immunization with RibH1.

(рис. 1а). ИРИ находился в пределах референсных значений, составив в среднем 1,20 у.е., при этом у контрольных животных медианное значение ИРИ составило 1,71 у.е. (рис. 1в). В сравнении с контрольными животными на фоне повышения количества Т-клеток у биомоделей, иммунизированных RibH1, отмечено снижение относительного числа В-лимфоцитов – 17,9% ( $Me = 30,4\%$ ), однако абсолютное количество CD19 было на 41,7% выше ( $1,71 \cdot 10^9/\text{л}$ ), чем у интактных животных ( $1,08 \cdot 10^9/\text{л}$ ).

Медианное значение КС Т-лимфоцитов антигеном RibH1 *in vitro* по маркеру CD25 составило 15,7% ( $Me = 5,34\%$ ), CD69 – 8,71% ( $Me = 6,74\%$ ) (рис. 2), что не является значимым. Пул CD86-позитивных моноцитов составил 5,14%, что в 2 раза ниже контрольных значений (11,68%).

Важно отметить, что на фоне выраженного лейкоцитоза у животных 1-й группы уровни фагоцитарной и функциональной активности (по НСТ-тесту) нейтрофилов практически не отличались от контрольных значений, составив в среднем 31,6 и 13,4% соответственно.

Анализ результатов оценки активности рекомбинантного RibH1 на 7-е сутки после введения показал снижение у иммунизированных мышей реактивности иммунной системы. Общее количество лейкоцитов у биомоделей снизилось в 2 раза ( $7,18 \cdot 10^9/\text{л}$ ), достигнув в среднем контрольных значений ( $7,02 \cdot 10^9/\text{л}$ ). Вместе с тем отмечено снижение общего количества лимфоцитов –  $2,53 \cdot 10^9/\text{л}$ , что можно связать с активной миграцией клеток в периферические органы иммунной системы для прайминга. Также отмечены изменения в популяционном составе Т-лимфоцитов: медианное значение общего количества Т-клеток снизилось до  $1,16 \cdot 10^9/\text{л}$ , Т-хелперов –  $0,28 \cdot 10^9/\text{л}$ , СТЛ-лимфоцитов –  $0,22 \cdot 10^9/\text{л}$ . ИРИ составил 1,24 у.е. При увеличении доли В-лимфоцитов в среднем до 28,72% их абсолютное количество ( $0,73 \cdot 10^9/\text{л}$ ) практически не отличалось от данных контрольных животных. Необходимо отметить, что на фоне снижения общего количества Т-лимфоцитов отмечается существенное повышение их антигенреактивности (RibH1-

позитивных). Так, медианные значения КС CD3CD25 составили 62,4%, CD3CD69 – 56,2%, количество моноцитов, экспрессирующих маркер CD86, практически не изменилось (6,1%). Вместе с тем на 7-е сутки после введения субъединичного антигена RibH1 у лабораторных животных было отмечено более чем двукратное усиление метаболической активности фагоцитов – НСТ-тест составил 28,6% (контрольное значение).

При обследовании лабораторных животных на 14-й день после введения субъединичного антигена RibH1 было установлено повторное двукратное повышение количества лейкоцитов –  $Me 14,1 \cdot 10^9/\text{л}$  ( $Me = 7,2 \cdot 10^9/\text{л}$ ) и общего числа лимфоцитов –  $6,41 \cdot 10^9/\text{л}$  ( $Me = 3,13 \cdot 10^9/\text{л}$ ). Анализ динамики популяционного состава лимфоцитов у лабораторных животных указывал на повторное повышение активности образования CD3-клеток –  $Me$  количества Т-лимфоцитов составила  $2,81 \cdot 10^9/\text{л}$  ( $Me = 1,29 \cdot 10^9/\text{л}$ ), Th –  $0,74 \cdot 10^9/\text{л}$  ( $Me = 0,27 \cdot 10^9/\text{л}$ ), Т-цитотоксические лимфоциты –  $0,47 \cdot 10^9/\text{л}$  ( $Me = 0,16 \cdot 10^9/\text{л}$ ).

Можно отметить некоторое повышение ИРИ до 1,59 у.е., что указывает на приоритетную пролиферацию CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. Кроме того, на фоне лейкоцитоза отмечено повышение, относительно предыдущего срока наблюдения, абсолютного числа В-лимфоцитов – в среднем до  $1,74 \cdot 10^9/\text{л}$ , при этом их относительное количество (доля в лимфоцитарном пуле) осталось неизменной и практически не отличалось от контрольных значений – 27,1% ( $Me = 28,8\%$ ). Вместе с тем сохранялась выраженная RibH1-реактивность Т-клеток – медианные значения КС CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> составили 65,7%, что отражает активационное состояние популяции Т-клеток. При этом по показателю индуцированной экспрессии ранней активации/пролиферации CD69 наблюдалось увеличение доли Т-клеток, активирующихся при воздействии антигена *in vitro*, медианные значения КС CD3<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> составили 76,8%. Количество моноцитов, экспрессирующих рецептор антиген-представляющих клеток CD86, медианные значения которого составили 7,82%, оставалось ниже контрольных значений – 11,25%. Кроме того, можно отметить сохранение относительно высокой бактерицидной активности фагоцитов, значение которой (28,2%) более чем в 2 раза превышало контрольные (12,8%).

По результатам изучения реакции иммунной системы у лабораторных животных в более отдаленные сроки – на 21-е сутки после иммунизации субъединичным антигеном RibH1 – было установлено сохранение относительно высокого уровня общего количества лейкоцитов ( $15,9 \cdot 10^9/\text{л}$ ) и повышение числа лимфоцитов в среднем до  $8,01 \cdot 10^9/\text{л}$  (при сохранении их относительного количества 50,3%, в среднем на уровне контрольных значений – 51,9%), преимущественно за счет Т-клеток ( $4,36 \cdot 10^9/\text{л}$ ).

При анализе популяционного состава CD3-клеток было установлено увеличение относительного и абсолютного числа Т-хелперов (28,5%,  $1,24 \cdot 10^9/\text{л}$ ) и Т-цитотоксических лимфоцитов (24,8%,  $1,08 \cdot 10^9/\text{л}$ ), при этом наблюдалось незначительное снижение ИРИ ( $Me = 1,15$  у.е.) за счет повышения доли СТЛ-клеток, что можно связать с формированием адаптивных Th1-опосредованных иммунных реакций. На фоне увеличения содержания Т-клеточного пула отмечается снижение доли В-лимфоцитов ( $Me = 23,8\%$ ), однако абсолютное количество клеток ( $1,9 \cdot 10^9/\text{л}$ ) было почти в 2 раза

выше контрольных значений ( $1,03 \cdot 10^9/\text{л}$ ). Анализ состояния антигенреактивности Т-клеток указал на сохранение пула RibH1-позитивных лимфоцитов: медианные значения коэффициента стимуляции  $CD3^+CD25^+$  – 49,4%,  $CD3^+CD69^+$  – 62,9%. Вместе с тем можно отметить повторное двукратное повышение бактерицидной активности фагоцитов ( $Me - 45,1\%$ ).

Анализ динамики изучаемых интерлейкинов после введения RibH1 показал наличие статистически значимых изменений концентрации IL-2 на 7-е и 21-е сутки наблюдения. Так, в указанные сроки у биомоделей 1-й группы медианные значения IL-2 были в 2 раза выше контрольных данных, составив 15,86 пг/мл ( $Me - 7,67$  пг/мл) и 13,3 пг/мл ( $Me - 9,96$  пг/мл) соответственно. Значения уровней IL-4, IL-10 у иммунизированных животных во все сроки наблюдения не имели статистически значимой разницы.

### Обсуждение и выводы

Таким образом, по результатам иммунологических исследований было установлено, что внутримышечное введение 100 мкг субъединичного антигена RibH1 белым лабораторным мышам вызывает у иммунизированных биомоделей выраженную иммунологическую реакцию, которая проявляется активизацией лимфоцитопозза с поляризацией в сторону пролиферации Т-клеток, усилением метаболической активности (бактерицидного потенциала) фагоцитов.

Повышение значений НСТ-теста, с одной стороны, может указывать на интенсивность иммуновоспалительного процесса, с другой – отражает потенцирование врожденного антибактериального иммунитета, в частности стимуляцию выработки активных форм кислорода фагоцитами. Анализ динамики иммунорегуляторного индекса указывает на повышение доли пула цитотоксических Т-лимфоцитов ( $CD3^+CD8$ ), что отражает активацию Th1-клеток, связанных с формированием адаптивных специфических реакций. Кроме того, на фоне увеличения содержания Т-клеточного пула отмечается некоторое снижение доли В-лимфоцитов, однако абсолютное количество  $CD19$ -клеток ( $1,9 \cdot 10^9/\text{л}$ ) оставалось почти в 2 раза выше контрольных значений.

Важно отметить, что уже на 7-е сутки после иммунизации у всех опытных биомоделей регистрировали статистически значимое повышение антигенреактивности Т-клеток (*in vitro*), при этом медианные значения RibH1-позитивных Т-лимфоцитов находились в диапазоне значений 56,3–76,9% (по интенсивности индуцированной экспрессии Т-клетками маркеров ранней активации  $CD25$ ,  $CD69$ ). Относительно высокие значения антигенреактивности Т-клеток (коэффициент стимуляции  $CD3$ -клеток антигеном RibH1  $>50\%$ ) сохранялись до конца наблюдения (21 сутки).

По результатам изучения динамики интерлейкинов было установлено повышение цитокина IL-2 (более чем двукратное увеличение на 7-е и 21-е сутки после иммунизации), который, как известно, в каскаде иммунологических реакций на антигены способствует ко-стимуляции клеточного иммунного ответа за счет активации роста (пролиферации и дифференцировки) пула  $CD3$ -субпопуляций, в т.ч. Treg-лимфоцитов.

Считаем важным отметить, что динамика медианных значений концентрации содержания противовоспалительных

цитокинов IL-4, IL-10 у опытных животных во все сроки наблюдения не имели статистически значимой разницы. Учитывая функции изученных интерлейкинов (снижение активности Th1-иммунного ответа, индукция аллергических реакций, ингибирование продукции TNF- $\alpha$  и интерферона- $\gamma$ , презентация антигенов MHC-II и активация субпопуляций  $CD3^+CD4^+$ ) эффект после иммунизации RibH1 можно считать положительным.

Вместе с тем обращает на себя внимание увеличение у биомоделей на 21-е сутки после иммунизации RibH1 экспрессии моноцитами (макрофагами) рецептора CD86 (маркер активных антигенпрезентирующих клеток), что также ассоциировано с активацией Т-клеточного иммунного ответа и формированием пула «клеток иммунологической памяти» [23].

Регрессионный анализ зависимости динамики общего относительного количества Т-лимфоцитов, популяций  $CD4$ - и  $CD8$ -клеток и пула RibH1-позитивных Т-клеток указал на весьма высокую (функциональную) степень корреляции (по шкале Чеддока). Так, величина коэффициента множественной корреляции изменения уровня  $CD3$ -лимфоцитов и антигенреактивных  $CD3^+CD25^+$ -клеток составила 0,955,  $CD3^+CD69^+$  – 0,806,  $CD4$ -лимфоцитов – 0,921 и 0,723,  $CD8$  – 0,845 и 0,668 соответственно. Данные корреляционного анализа указывают на высокий уровень вовлеченности Т-клеточных иммунологических реакций, индуцированных введением рекомбинантного антигена RibH1. При этом важно отметить, что корреляционный анализ по Пирсону показал сильную преимущественно обратно пропорциональную зависимость динамики Т-лимфоцитов (и субпопуляций) в периферической крови и их антигенной реактивности *in vitro*, что может свидетельствовать об активной миграции праймированных Т-клеток в периферические органы иммуногенеза для формирования барьерной тканевой ниши [24].

Результаты изучения иммунологической активности субъединичного белка RibH1 указывают на его достаточно высокий иммуногенный потенциал, способность активировать Th1-клетки. Особенно важно отметить, что у биомоделей отмечается формирование пула Т-лимфоцитов, реактивных в отношении исследуемого антигена бруцелл, уже на ранних сроках (7-е сутки) после иммунизации, что свидетельствует о развитии адаптивных иммунологических реакций и может способствовать формированию активного Т-клеточного иммунитета против бруцеллезной инфекции. В качестве перспектив дальнейших исследований можно рассматривать получение и изучение иммунологической активности коктейля субъединичных антигенов бруцелл.

### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

### Financial support

The work was carried out within the framework of the sectoral program of Rosпотребнадзор.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

## Литература

1. Пономаренко ДГ, Матвиенко АД, Хачатурова АА, Жаринова ИВ, Скударева ОН, Транквилевский ДВ, и др. Анализ ситуации по бруцеллезу в мире и Российской Федерации. Проблемы особо опасных инфекций. 2024;2:36-50. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-36-50
2. Liu Z, Gao L, Wang M, Yuan M, Li Z. Long ignored but making a comeback: a worldwide epidemiological evolution of human brucellosis. Emerg. Microbes Infect. 2024;13(1):2290839. DOI: 10.1080/22221751.2023.2290839
3. Wen J, Li Z, Lv Y, Ding S, Zhu Y, Yang J, et al. A subunit vaccine based on *Brucella* rBP26 induces Th1 immune responses and M1 macrophage activation. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2024 Jun 25;56(6):879-891. DOI: 10.3724/abbs.2024023
4. Zhang J, Baigued H, Chen S, Borigen H, Tana T, Quan F, et al. Bioinformatics analysis of the antigenic epitopes of L7/L12 protein in the B- and T-cells active against *Brucella melitensis*. Access Microbiol. 2024 Oct 11;6(10):000786.v3. DOI: 10.1099/acmi.0.000786.v3
5. Yin D, Li L, Song D, Liu Y, Ju W, Song X, et al. A novel recombinant multi-epitope protein against *Brucella melitensis* infection. Immunol Lett. 2016;175:1-7. DOI: 10.1016/j.imlet.2016.04.016
6. Liu L, Yu C, Wang C, Shao M, Yan Z, Jiang X, et al. Immuno-enhancement of Taishan *Pinus massoniana* pollen polysaccharides on recombinant *Bordetella avium ompA* expressed in *Pichia pastoris*. Microb Pathog. 2016;95:54-61. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.03.002
7. Shim S, Soh SH, Im YB, Park HE, Cho CS, Kim S, et al. Elicitation of Th1/Th2 related responses in mice by chitosan nanoparticles loaded with *Brucella abortus* malate dehydrogenase, outer membrane proteins 10 and 19. Int J Med Microbiol. 2020 Jan;310(1):151362. DOI: 10.1016/j.ijmm.2019.151362
8. Huy TXN, Nguyen TT, Reyes AWB, Vu SH, Min W, Lee HJ, et al. Immunization with a Combination of Four Recombinant *Brucella abortus* Proteins Omp16, Omp19, Omp28, and L7/L12 Induces T Helper 1 Immune Response Against Virulent *B. abortus* 544 Infection in BALB/c Mice. Front Vet Sci. 2021 Jan 20;7:577026. DOI: 10.3389/fvets.2020.577026
9. Li Z, Wang S, Wei S, Yang G, Zhang C, Xi L, et al. Immunization with a combination of recombinant *Brucella abortus* proteins induces T helper immune response and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice. Microb Biotechnol. 2022 Jun;15(6):1811-1823. DOI: 10.1111/1751-7915.14015
10. Bonomi HR, Marchesini MI, Klinken S, Ugalde JE, Zylberman V, Ugalde RA, et al. An atypical riboflavin pathway is essential for *Brucella abortus* virulence. PLoS One. 2010 Feb 25;5(2):e9435. DOI: 10.1371/journal.pone.0009435
11. Constantinides MG, Link VM, Tamoutounour S, Wong AC, Perez-Chaparro PJ, Han SJ, et al. MAIT cells are imprinted by the microbiota in early life and promote tissue repair. Science. 2019 Oct 25;366(6464):eaax6624. DOI: 10.1126/science.aax6624
12. Chen Z, Wang H, D'Souza C, Sun S, Kostenko L, Eckle SB, et al. Mucosal-associated invariant T-cell activation and accumulation after *in vivo* infection depends on microbial riboflavin synthesis and co-stimulatory signals. Mucosal Immunol. 2017 Jan;10(1):58-68. DOI: 10.1038/mi.2016.39
13. Wang H, D'Souza C, Lim XY, Kostenko L, Pediongco TJ, Eckle SBG, et al. MAIT cells protect against pulmonary *Legionella longbeachae* infection. Nat Commun. 2018 Aug 22;9(1):3350. DOI: 10.1038/s41467-018-05202-8
14. Kurioka A, Ussher JE, Cosgrove C, Clough C, Fergusson JR, Smith K, et al. MAIT cells are licensed through granzyme exchange to kill bacterially sensitized targets. Mucosal Immunol. 2015 Mar;8(2):429-40. DOI: 10.1038/mi.2014.81
15. Sakala IG, Kjer-Nielsen L, Eickhoff CS, Wang X, Blazevic A, Liu L, et al. Functional Heterogeneity and Antimycobacterial Effects of Mouse Mucosal-Associated Invariant T Cells Specific for Riboflavin Metabolites. J Immunol. 2015 Jul 15;195(2):587-601. DOI: 10.4049/jimmunol.1402545
16. Дятлова ВИ. Конструирование мультиэпитопной субъединичной вакцины против бруцеллеза с помощью методов обратной вакцинологии. Бактериология. 2023;8(4):14-27. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-14-27
17. Lei J, Xin C, Xiao W, Chen W, Song Z. The promise of endogenous and exogenous riboflavin in anti-infection. Virulence. 2021 Dec;12(1):2314-2326. DOI: 10.1080/21505594.2021.1963909
18. Li X, Zheng Y, Hu J, Zheng J, Wang Z, He Y. Vax LLM: Leveraging Fine-tuned Large Language Model for automated annotation of *Brucella* Vaccines. bioRxiv [Preprint]. 2024 Nov 26:2024.11.25.625209. DOI: 10.1101/2024.11.25.625209
19. Положение о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментальных клиник (вивариев) (утв. Российской Академией медицинских наук и Министерством здравоохранения РФ 21-22 апреля 2003 г.).
20. Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 г. №33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными животными при проведении доклинических (неклинических) исследований».
21. Ягода АВ, Локтев НА. Клиническая цитохимия. Ставрополь, 2005.
22. МР 3.1.0207-20 «Цитометрический анализ антигенреактивности лейкоцитов *in vitro* для диагностики и оценки эффективности иммунопрофилактики бруцеллеза у людей».
23. Kennedy A, Waters E, Rowshanravan B, Hinze C, Williams C, Janman D, et al. Differences in CD80 and CD86 transendocytosis reveal CD86 as a key target for CTLA-4 immune regulation. Nat Immunol. 2022 Sep;23(9):1365-1378. DOI: 10.1038/s41590-022-01289-w
24. Ciabattini A, Pettini E, Medagliani D. CD4(+) T Cell Priming as Biomarker to Study Immune Response to Preventive Vaccines. Front Immunol. 2013 Dec 4;4:421. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00421

## References

1. Ponomarenko DG, Matvienko AD, Khachaturova AA, Zharinova IV, Skudareva ON, Trankvilevsky DV, et al. Analysis of the situation on brucellosis around the world and in the Russian Federation. Problemy osobo opasnykh infektsii. 2024;2:36-50. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-36-50 (In Russian).
2. Liu Z, Gao L, Wang M, Yuan M, Li Z. Long ignored but making a comeback: a worldwide epidemiological evolution of human brucellosis. Emerg. Microbes Infect. 2024;13(1):2290839. DOI: 10.1080/22221751.2023.2290839
3. Wen J, Li Z, Lv Y, Ding S, Zhu Y, Yang J, et al. A subunit vaccine based on *Brucella* rBP26 induces Th1 immune responses and M1 macrophage activation. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2024 Jun 25;56(6):879-891. DOI: 10.3724/abbs.2024023
4. Zhang J, Baigued H, Chen S, Borigen H, Tana T, Quan F, et al. Bioinformatics analysis of the antigenic epitopes of L7/L12 protein in the B- and T-cells active against *Brucella melitensis*. Access Microbiol. 2024 Oct 11;6(10):000786.v3. DOI: 10.1099/acmi.0.000786.v3
5. Yin D, Li L, Song D, Liu Y, Ju W, Song X, et al. A novel recombinant multi-epitope protein against *Brucella melitensis* infection. Immunol Lett. 2016;175:1-7. DOI: 10.1016/j.imlet.2016.04.016
6. Liu L, Yu C, Wang C, Shao M, Yan Z, Jiang X, et al. Immuno-enhancement of Taishan *Pinus massoniana* pollen polysaccharides on recombinant *Bordetella avium ompA* expressed in *Pichia pastoris*. Microb Pathog. 2016;95:54-61. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.03.002
7. Shim S, Soh SH, Im YB, Park HE, Cho CS, Kim S, et al. Elicitation of Th1/Th2 related responses in mice by chitosan nanoparticles loaded with *Brucella abortus* malate dehydrogenase, outer membrane proteins 10 and 19. Int J Med Microbiol. 2020 Jan;310(1):151362. DOI: 10.1016/j.ijmm.2019.151362
8. Huy TXN, Nguyen TT, Reyes AWB, Vu SH, Min W, Lee HJ, et al. Immunization with a Combination of Four Recombinant *Brucella abortus* Proteins Omp16, Omp19, Omp28, and L7/L12 Induces T Helper 1 Immune Response Against Virulent *B. abortus* 544 Infection in BALB/c Mice. Front Vet Sci. 2021 Jan 20;7:577026. DOI: 10.3389/fvets.2020.577026

9. Li Z, Wang S, Wei S, Yang G, Zhang C, Xi L, et al. Immunization with a combination of recombinant *Brucella abortus* proteins induces T helper immune response and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice. *Microb Biotechnol*. 2022 Jun;15(6):1811-1823. DOI: 10.1111/1751-7915.14015
10. Bonomi HR, Marchesini MI, Klinke S, Ugalde JE, Zylberman V, Ugalde RA, et al. An atypical riboflavin pathway is essential for *Brucella abortus* virulence. *PLoS One*. 2010 Feb 25;5(2):e9435. DOI: 10.1371/journal.pone.0009435
11. Constantinides MG, Link VM, Tamoutounour S, Wong AC, Perez-Chaparro PJ, Han SJ, et al. MAIT cells are imprinted by the microbiota in early life and promote tissue repair. *Science*. 2019 Oct 25;366(6464):eaax6624. DOI: 10.1126/science. aax6624
12. Chen Z, Wang H, D'Souza C, Sun S, Kostenko L, Eckle SB, et al. Mucosal-associated invariant T-cell activation and accumulation after *in vivo* infection depends on microbial riboflavin synthesis and co-stimulatory signals. *Mucosal Immunol*. 2017 Jan;10(1):58-68. DOI: 10.1038/mi.2016.39
13. Wang H, D'Souza C, Lim XY, Kostenko L, Pediongo TJ, Eckle SBG, et al. MAIT cells protect against pulmonary *Legionella longbeachae* infection. *Nat Commun*. 2018 Aug 22;9(1):3350. DOI: 10.1038/s41467-018-05202-8
14. Kurioka A, Ussher JE, Cosgrove C, Clough C, Fergusson JR, Smith K, et al. MAIT cells are licensed through granzyme exchange to kill bacterially sensitized targets. *Mucosal Immunol*. 2015 Mar;8(2):429-40. DOI: 10.1038/mi.2014.81
15. Sakala IG, Kjer-Nielsen L, Eickhoff CS, Wang X, Blazevic A, Liu L, et al. Functional Heterogeneity and Antimycobacterial Effects of Mouse Mucosal-Associated Invariant T Cells Specific for Riboflavin Metabolites. *J Immunol*. 2015 Jul 15;195(2):587-601. DOI: 10.4049/jimmunol.1402545
16. Dyatlova VI. Construction of multiepitope subunit vaccine against brucellosis using reverse vaccinology methods. *Bacteriology*. 2023;8(4):14-27. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-4-14-27 (In Russian).
17. Lei J, Xin C, Xiao W, Chen W, Song Z. The promise of endogenous and exogenous riboflavin in anti-infection. *Virulence*. 2021 Dec;12(1):2314-2326. DOI: 10.1080/21505594.2021.1963909
18. Li X, Zheng Y, Hu J, Zheng J, Wang Z, He Y. Vax LLM: Leveraging Fine-tuned Large Language Model for automated annotation of *Brucella* Vaccines. *bioRxiv [Preprint]*. 2024 Nov 26:2024.11.25.625209. DOI: 10.1101/2024.11.25.625209
19. Regulations on quality control of laboratory animals, nurseries and experimental clinics (vivariums) (approved by the Russian Academy of Medical Sciences and the Ministry of Health of the Russian Federation on April 21-22, 2003. (In Russian).
20. Recommendations of the Board of the Eurasian Economic Commission dated November 14, 2023 No 33 "On the Guidelines for Working with Laboratory (Experimental) Animals during Preclinical (Non-Clinical) Studies. (In Russian).
21. Yagoda AV, Loktev NA. *Clinical cytochemistry*. Stavropol, 2005. (In Russian).
22. MR 3.1.0207-20 "Cytometric analysis of leukocyte antigen reactivity *in vitro* for diagnosis and evaluation of the effectiveness of immunoprophylaxis of brucellosis in humans". (In Russian).
23. Kennedy A, Waters E, Rowshanravan B, Hinze C, Williams C, Janman D, et al. Differences in CD80 and CD86 transendocytosis reveal CD86 as a key target for CTLA-4 immune regulation. *Nat Immunol*. 2022 Sep;23(9):1365-1378. DOI: 10.1038/s41590-022-01289-w
24. Ciabattini A, Pettini E, Medagliani D. CD4(+) T Cell Priming as Biomarker to Study Immune Response to Preventive Vaccines. *Front Immunol*. 2013 Dec 4;4:421. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00421
- Логвиненко Ольга Васильевна, кандидат биологических наук, заведующая сектором иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0003-1054-8937
- Костюченко Марина Владимировна, научный сотрудник сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0001-6068-6655
- Ковалёв Дмитрий Анатольевич, кандидат химических наук, заведующий лабораторией биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0002-9366-5647
- Волынкина Анна Сергеевна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией диагностики вирусных инфекций ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0001-5554-5882
- Василенко Екатерина Игоревна, младший научный сотрудник лаборатории диагностики вирусных инфекций ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0001-7054-1302
- Хачатурова Анна Андреевна, научный сотрудник лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0002-7459-7204
- Кондратьева Юлия Викторовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0009-0004-6497-2420
- Тембай Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0009-0000-7545-2464
- Деригуз Татьяна Владиславовна, лаборант-исследователь лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0009-0007-9330-8256
- Брянцева Елена Петровна, лаборант-исследователь лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0009-0002-9283-0484
- Толмачева Анастасия Сергеевна, лаборант-исследователь лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0009-0005-1725-1695
- Кузнецова Ирина Владимировна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0001-9513-0761
- Харина Елена Ивановна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»  
ORCID: 0000-0002-1105-8502
- Куличенко Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0002-9362-3949

#### Information about co-authors:

Andrey M. Zhiron, Researcher of biochemistry laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosptrebnadzor  
ORCID: 0000-0002-7698-7361

Ekaterina L. Rakitina, PhD, MD, doctor clinical laboratory diagnostics sector of immunology and pathomorphology especially dangerous infectious diseases in brucellosis, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosptrebnadzor  
ORCID: 0000-0001-6073-6544

Olga V. Logvinenko, PhD in Biological Sciences, head of sector immunology and pathomorphology especially dangerous infectious diseases in brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosptrebnadzor  
ORCID: 0000-0003-1054-8937

Marina V. Kostyuchenko, Researcher of sector immunology and pathomorphology of especially dangerous infectious diseases in brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rosptrebnadzor  
ORCID: 0000-0001-6068-6655

#### Информация о соавторах:

Жиров Андрей Михайлович, научный сотрудник лаборатории биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0002-7698-7361

Ракитина Екатерина Львовна, кандидат медицинских наук, врач клинической лабораторной диагностики сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
ORCID: 0000-0001-6073-6544

Dmitry A. Kovalev, PhD in Chemical Sciences, head of biochemistry laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0002-9366-5647

Anna S. Volynkina, PhD in Biological Sciences, head of laboratory for diagnostics viral infections Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0001-5554-5882

Ekaterina I. Vasilenko, Junior Researcher of laboratory for diagnostics viral infections Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0001-7054-1302

Anna A. Khachaturova, Researcher of brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0002-7459-7204

Yulia V. Kondratieva, PhD in Biological Sciences, researcher of brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0002-7459-7204

Tatyana V. Tembaj, PhD in Biological Sciences, researcher of sector immunology and pathomorphology especially dangerous infectious diseases in brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0009-0000-7545-2464

Tatyana V. Deriguz, Laboratory Research assistant brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0009-0007-9330-8256

Elena P. Bryantseva, Laboratory Research assistant brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0009-0002-9283-0484

Anastasia S. Tolmacheva, Laboratory Research assistant brucellosis laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0009-0005-1725-1695

Irina V. Kuznetsova, PhD, MD, Senior Researcher of biochemistry laboratory, Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0001-9513-0761

Elena I. Kharina, PhD in Biological Sciences, Associate Professor of Department of Microbiology «North Caucasian Federal University»  
ORCID: 0000-0002-1105-8502

Alexandr N. Kulichenko, MD, PhD, DSc, professor, academician RAS, director Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor  
ORCID: 0000-0002-9362-394

## Древняя ДНК показала, что армия Наполеона в 1812 году страдала от паратифа и возвратного тифа

Осенью 2001 года в Вильнюсе во время строительных работ было обнаружено массовое захоронение. Предварительные наблюдения привели к выводу, что в этом массовом захоронении находилась часть Великой армии Наполеона I, и что оно было создано во время отступления из России (декабрь 1812 года). В марте 2002 года в рамках франко-литовского сотрудничества были проведены обширные раскопки первой части массового захоронения, которые были завершены повторными раскопками еще одной траншеи в сентябре 2002 года.



Лабораторное исследование всех костных останков завершилось в октябре 2002 года.

Во время отступления Наполеона из России в 1812 г. бесчисленное количество солдат французской армии стали жертвами инфекционных заболеваний, но ответственный патоген или патогены остаются предметом споров. Исследователи извлекли и секвенировали древнюю ДНК из зубов 13 солдат, которые, основываясь на исторических записях, вероятно, умерли от инфекционных заболеваний, с целью идентифицировать патогены, ответственные за их смерть. Эти результаты подтвердили наличие *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, принадлежащей к линии *Paratyphi C*, возбудителя паратифа; и *Borrelia recurrentis*, вызывающая возвратный тиф, передаваемый платяными вшами. Не удалось обнаружить *Rickettsia prowazekii* (возбудителя сыпного тифа) и *Bartonella quintana* (возбудителя окопной лихорадки), которые ранее связывали с этим смертельным событием, основываясь на результатах ПЦР и исторических описаниях симптомов. Присутствие этих ранее не подозреваемых патогенов у этих солдат показывает, что они могли способствовать разгрому Великой армии Наполеона во время ее катастрофического отступления в 1812 году.

Signoli M., et al. Discovery of a mass grave of Napoleonic period in Lithuania (1812, Vilnius).  
*Comptes Rendus Palevol.* 2004;3(3):219-227.

Raoult D, Dutour O, Houhamdi L, Jankauskas R, Fournier PE, Ardagna Y, et al.  
Evidence for louse-transmitted diseases in soldiers of Napoleon's Grand Army in Vilnius.  
*J Infect Dis.* 2006 Jan 1;193(1):112-20. DOI: 10.1086/498534

Barbieri R, Fumey J, Kabral H, Scheib CL, Signoli M, Costedoat C, et al.  
Paratyphoid fever and relapsing fever in 1812 Napoleon's devastated army.  
*Curr Biol.* 2025 Nov 3;35(21):5384-5391.e4. DOI: 10.1016/j.cub.2025.09.047