

## ИСПЫТАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ БРУЦЕЛЛЕЗНЫХ АНТИГЕНОВ В СТИМУЛИРОВАННОМ КЛЕТОЧНОМ ТЕСТЕ С НИТРОСИНИМ ТЕТРАЗОЛИЕМ

**О.О. Манакова**, аспирант, младший научный сотрудник

**Т.А. Янченко**, кандидат биологических наук

**В.С. Власенко**, доктор биологических наук

*Омский аграрный научный центр, Омск, Россия*

**E-mail:** golovachcheva@mail.ru

**Ключевые слова:** бруцеллы, антигены, НСТ-тест, нейтрофилы, иммунный ответ.

**Реферат.** Представлены результаты испытания экспериментальных образцов бруцеллезных антигенов в качестве активатора при постановке стимулированного клеточного теста с нитросиним тетразолием *in vitro*. В лабораторных условиях изготовлены экспериментальные образцы бруцеллезных препаратов из штаммов бруцелл с разной антигенной структурой. Экспериментальные исследования проведены на иммунизированных R-штаммом бруцелл морских свинок. Определены активность и специфичность исследуемых образцов, а также оптимальная концентрация, обладающая достаточным активирующим потенциалом на нейтрофилы крови иммунизированных морских свинок. На первом этапе исследований отмечено, что дезинтеграта бруцелл и корпускулярные антигены в концентрациях соответственно 50 и 100 мкг/мл обеспечивали специфичность реакции и не вызывали неспецифической активации нейтрофильных гранулоцитов в НСТ-тесте с кровью интактных животных. В дальнейшем была изучена динамика иммунного ответа иммунизированных морских свинок в НСТ-тесте с применением экспериментальных образцов бруцеллезных антигенов в оптимальных концентрациях. Отбор биоматериала для исследований осуществляли до иммунизации и на 7-, 14-, 21-, 28-, 42-, 55-, 69, 125-е сутки после иммунизации. Рассчитан коэффициент стимуляции как отношение индуцированного уровня клеточной активности к спонтанному. Установлено, что максимальный уровень специфической активации нейтрофилов в НСТ-тесте отмечается преимущественно на 28-е сутки, что совпадает с пиком синтеза агглютинирующих и комплементсвязывающих антител в серологических реакциях. Полученные в результате эксперимента данные позволяют сделать вывод о возможности применения экспериментальных образцов бруцеллезных антигенов в качестве стимулятора при постановке НСТ-теста с целью проведения достоверного контроля клеточной перестройки организма в период формирования иммунного ответа.

## TESTING OF EXPERIMENTAL BRUCELLOSIS ANTIGENS IN A STIMULATED CELL TEST WITH NITROBLUE TETRAZOLIUM

**O.O. Manakova**, PhD student, Junior Researcher

**T.A. Yanchenko**, PhD in Biological Sciences

**V.S. Vlasenko**, Doctor of Biological Sciences

*Omsk Agricultural Research Center, Omsk, Russia*

**E-mail:** golovachcheva@mail.ru

**Keywords:** Brucella, antigens, NBT test, neutrophils, immune response.

**Abstract.** The results of testing experimental samples of brucellosis antigens as an operator when performing a stimulated activated cell test with nitroblue tetrazolium *in vitro* are presented. Experimental samples of brucellosis preparations from Brucella strains with different antigenic structures were used in laboratory conditions. Experimental studies were carried out on guinea pigs immunized with Brucella's R-strain. The activity and specificity of additional samples and the optimal concentration providing the stimulating potential of neutrophils in the blood of immunized guinea pigs were determined. At the first stages of the study, it was noted that Brucella disintegrates. Corpuscular antigens in concentrations were 50 and 100 µg/ml, and this did not cause nonspecific activation of neutrophil granulocytes in the NBT test with the blood of intact animals. Subsequently, we studied the immune response dynamics of immunized guinea pigs in the NBT test using experimental samples of brucellosis antigens in optimal concentrations. The biomaterial selection for research was carried out before immunization

*and on the 7th, 14th, 21st, 28th, 42nd, 55th, 69th, and 125th day after vaccination. The stimulation coefficient was calculated as the ratio of the induced level of cellular activity to the spontaneous one. It was found that the maximum level of specific activation of neutrophils in the NBT test is characteristic exclusively on the 28th day, corresponding to the peak synthesis of agglutinating and complement-fixing antibodies in serological reactions. The data obtained from the experiment allow us to conclude that it is possible to use experimental samples of brucellosis antigens as a stimulant when performing an NBT test with the Foundation for determining the immune control of cellular restructuring of the body during the formation of the response.*

Бруцеллез – наиболее распространенный бактериальный зооноз во всем мире. По данным Россельхознадзора, более половины случаев бруцеллеза в мире регистрируется в странах Восточного Средиземноморья. Неблагополучие по бруцеллезу сохраняется на территории Африканского континента, государств Восточной Европы и Центральной Азии, Китая, Индии, Бангладеша, Пакистана, Европейского союза, Центральной и Южной Америки, Соединенных Штатов Америки. В Российской Федерации бруцеллез широко распространен на юге европейской части. В последние годы наметилась тенденция к снижению количества ежегодно выявляемых эпизоотических очагов бруцеллеза, однако риск распространения бруцеллеза среди животных в стране остается высоким [1–4].

Широкое распространение и несвоевременная постановка диагноза связаны с этиопатологической особенностью бруцеллеза, которая обуславливается способностью возбудителя инфекции «уклоняться» от иммунного ответа хозяина, что приводит к хроническому течению заболевания с длительной персистенцией патогена в организме хозяина [5–8].

В последние годы в ветеринарную лабораторную практику активно внедряются диагностические тесты, основанные на клеточных реакциях *in vitro* с антигенной нагрузкой, позволяющие выявить изменения в структуре иммунокомпетентных клеток. Однако для полноценной оценки клеточного иммунитета при различных заболеваниях необходимы специфические антигены [9–11].

Для разработки диагностически информативных методик постановки антиген-стимулированных клеточных тестов *in vitro* необходим тщательный подбор специфического стимулирующего антигена, обеспечивающего специфичность реакции и обладающего достаточным активизирующим потенциалом [12, 13].

В доступной литературе имеются сообщения об изучении функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов у животных, иммунизированных бруцеллами, с применением в качестве антигенной нагрузки (стимулятора) корпускулярных антигенов, изготовленных из вакцинных штаммов бруцелл, но информации о концентрации, специфичности и активности данных антигенов нами обнаружено не было [14, 15]. На базе ВНИИБТЖ изготовлены экспериментальные образцы бруцеллезных антигенов для постановки клеточных тестов *in vitro* с использованием вакцинных штаммов бруцелл с разной антигенной структурой.

Цель исследований – определить активность и специфичность нескольких экспериментальных образцов бруцеллезных антигенов и оценить возможность их использования при оценке функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов у морских свинок, иммунизированных R–штаммом бруцелл.

## ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В лабораторных условиях изготовлены четыре экспериментальных образца бруцеллезных антигенов ( $D_R$ ,  $D_S$ ,  $C_R$ ,  $C_S$ ) на основе S– и R–вакцинных штаммов бруцелл из биоресурсной коллекции отдела ветеринарии (ВНИИБТЖ) ФГБНУ «Омский АНЦ». Антигены  $D_R$  и  $D_S$  получены методом ультразвуковой дезинтеграции,  $C_R$  и  $C_S$  – корпускулярные антигены.

Стандартизацию концентрации антигенов осуществляли по содержанию белка с помощью полуавтоматического биохимического ветеринарного анализатора EMP–168 Vet (производитель Emperog, Китай) с использованием набора реагентов для определения белка HOSPITEX DIAGNOSTICS.

Активность и специфичность изготовленных экспериментальных образцов бруцеллезных антигенов оценивали в реакции агглютинации (РА) и реакции связывания комплемента

(РСК) с применением сыворотки негативной сухой, сыворотки бруцеллезной сухой производства ФКП «Щелковский биокombинат» и экспериментальными сериями R–бруцеллезной сыворотки.

Исследования выполняли на самцах морских свинок линии агути (масса 400–450 г, возраст 4–5 месяцев) в соответствии с законодательством РФ и Директивой европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях.

Были сформированы две группы животных, опытную группу (5 голов) иммунизировали *B. abortus* 16/4 в дозе 1 млрд КОЕ/мл подкожно, контрольные животные (5 голов) – интактные. У всех особей до иммунизации и на 7-, 14-, 21-, 28-, 42-, 55-, 69-, 125-е сутки после иммунизации производили отбор периферической крови для постановки НСТ-теста (спонтанного и стимулированного), а также серологических реакций.

Функциональное состояние нейтрофилов крови у опытных морских свинок в разные сроки после иммунизации оценивали с помощью фотометрического способа постановки теста с нитросиним тетразолием (НСТ) без обработки антигеном (спонтанный вариант) и с обработкой экспериментальными бруцеллезными препаратами (стимулированный вариант) с последующим расчетом в соответствии со стандартной методикой коэффициента стимуляции (КС). Фиксацию результатов осуществляли с помощью многоканального иммунохимического анализатора FluorofotSTDLess-486-M при длине волны 492 нм и учитывали в условных единицах оптической плотности (у. ед. оп. пл.).

Для характеристики функционального резерва нейтрофилов был рассчитан коэффициент стимуляции как отношение индуцированного уровня клеточной активности к спонтанному.

Сыворотку крови морских свинок исследовали согласно ГОСТ 34105–2017 Животные. Лабораторная диагностика бруцеллеза. Серологические методы и Наставлению по диагностике бруцеллеза животных № 13-5-02/0850 от 29.09.2003 с экспериментальными образцами R–бруцеллезных антигенов.

Статистическую обработку цифрового материала проводили с помощью программы Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе исследований с целью определения специфического титра экспериментальных образцов бруцеллезных антигенов нами была осуществлена проверка их агглютинирующей и комплементсвязывающей активности, которая составила для РА 1 : 100, а для РСК – 1 : 75. Затем нами была проанализирована возможность использования полученных образцов в качестве антиген-стимулированной клеточной реакции *in vitro* для оценки формирования противобруцеллезного иммунитета.

Для решения поставленной задачи были приготовлены разные концентрации (25, 50, 100 и 200 мкг/мл) экспериментальных образцов  $D_R$ ,  $D_S$ ,  $C_R$ ,  $C_S$  антигенов и определена их специфическая активность *in vitro* в НСТ–тесте с кровью морских свинок, иммунизированных *Brucella abortus* 16/4.

Проведенные исследования показали, что наиболее выраженная специфическая активация после иммунизации морских свинок для дезинтегратов бруцелл отмечалась при стимуляции клеточной взвеси нейтрофилов антигеном в концентрации 50 мкг/мл, тогда как для корпускулярных – 100 мкг/мл (таблица). Дальнейшее увеличение их концентрации, напротив, способствовало снижению стимулированной НСТ–активности.

Следует отметить, что при идентичном исследовании проб крови от интактных морских свинок с использованием оптимальных концентраций антигенов мы не наблюдали усиления кислород-продуцирующей активности нейтрофилов в НСТ-тесте при стимуляции как корпускулярными антигенами, так и дезинтегратами бруцелл. Так, спонтанная НСТ активность у таких животных составила в среднем  $0,304 \pm 0,062$ , индуцированная  $D_R$  и  $D_S$  –  $0,314 \pm 0,034$ ;  $0,319 \pm 0,069$ . и  $C_R$  и  $C_S$  –  $0,299 \pm 0,066$  и  $0,294 \pm 0,048$  соответственно. Следовательно, сконструированные нами экспериментальные образцы при использовании в качестве антиген-стимулированной клеточной реакции *in vitro* не проявляли неспецифического активирования нейтрофильных гранулоцитов.

**Влияние разных концентраций экспериментальных серий антигенов на функциональную активность нейтрофилов в НСТ–тесте у морских свинок, иммунизированных *Brucella abortus* 16/4 (M±m)**  
**The influence of different concentrations of experimental series of antigens on the functional activity of neutrophils in the NBT test in guinea pigs immunized with *Brucella abortus* 16/4 (M±m)**

Антиген	Стимулированный НСТ–тест, у.ед. оп.пл.			
	Концентрация стимулятора, мкг/мл			
	25	50	100	200
D <sub>R</sub>	0,557±0,140	0,732±0,179	0,634±0,106	0,535±0,105
D <sub>S</sub>	0,416±0,025	0,633±0,151	0,563±0,093	0,541±0,086
C <sub>R</sub>	0,431±0,084	0,618±0,092	0,708±0,092	0,557±0,140
C <sub>S</sub>	0,405±0,069	0,561±0,114	0,672±0,111	0,548±0,076

Примечание. D – дезинтеграт бруцелл; C – корпускулярный антиген.

Note. D – *Brucella disintegrate*; C – corpuscular antigen.

На следующем этапе для изучения динамики иммунного ответа у иммунизированных морских свинок была проведена оценка функционального состояния нейтрофилов в НСТ–тесте. В качестве индукторов (стимуляторов) использовали экспериментальные образцы бруцеллезных антигенов в концентрациях, которые по результатам предыдущего эксперимента вызывали наиболее выраженную специфическую активацию.

Перед иммунизацией, как отмечено выше, спонтанная тетразолиевая активность в среднем по группе составила 0,304, индуцированная – от 0,294 до 0,319 в зависимости от внесенного стимулятора, при этом КС варьировал от 0,97 до 1,05.

На 7-е сутки после иммунизации функционально-метаболическая деятельность нейтрофилов без антигенной нагрузки существенно усиливалась относительно показателей интактных морских свинок (соответственно 0,531±0,022 и 0,304±0,062; p<0,01). Помимо этого, параметры спонтанного НСТ–теста в значительной степени были выше стимулированного экспериментальными бруцеллезными препаратами. Так, наиболее низкий уровень индуцированной тетразолиевой активности мы наблюдали при использовании в реакции корпускулярных антигенов C<sub>R</sub> и C<sub>S</sub>: 0,158±0,019 и 0,160±0,018, при этом КС в среднем составил 0,29. При внесении дезинтегратов бруцелл D<sub>R</sub> и D<sub>S</sub> кислород–продуцирующая активность нейтрофилов была несколько выше: 0,407±0,114; 0,456±0,034 и, как следствие, более высоким

также был коэффициент стимуляции – 0,40 и 0,45 соответственно.

Дальнейшее усиление спонтанной НСТ–теста активности происходило на 14-е сутки – до 0,862±0,133 против 0,304±0,062 (p<0,01) до сенсibilизации. В отличие от более ранних сроков исследований мы наблюдали также интенсификацию показателей НСТ–теста, индуцированного экспериментальными специфическими антигенами. Так, относительно интактных животных происходило увеличение кислород–продуцирующей деятельности нейтрофилов при обработке клеточной взвеси антигенами C<sub>R</sub> в среднем до 0,708±0,092 против 0,299±0,066 (p<0,05) и C<sub>S</sub> – до 0,672±0,111 против 0,294±0,048 (p<0,05), а также D<sub>R</sub> до 0,732±0,179 против 0,314±0,034 (p<0,05) и D<sub>S</sub> – до 0,633±0,151 против 0,319±0,069. Наиболее высокий КС зарегистрирован при стимуляции антигенами, изготовленными из R–штаммов: D<sub>R</sub> – 0,849 и C<sub>R</sub> – 0,821.

Несмотря на тенденцию к снижению уровня функционального состояния нейтрофилов на 21-е сутки после иммунизации по сравнению с 14-ми сутками, генерация окислительного взрыва фагоцитами по-прежнему оставалась на более высоком уровне относительно интактных морских свинок, о чем свидетельствовало повышение показателей тетразолиевой активности, особенно при постановке НСТ–теста в спонтанном варианте (соответственно 0,446±0,021 и 0,304±0,062; p<0,05).

На 28–е сутки после введения *B. abortus* 16/4 вновь отмечена выраженная активизация

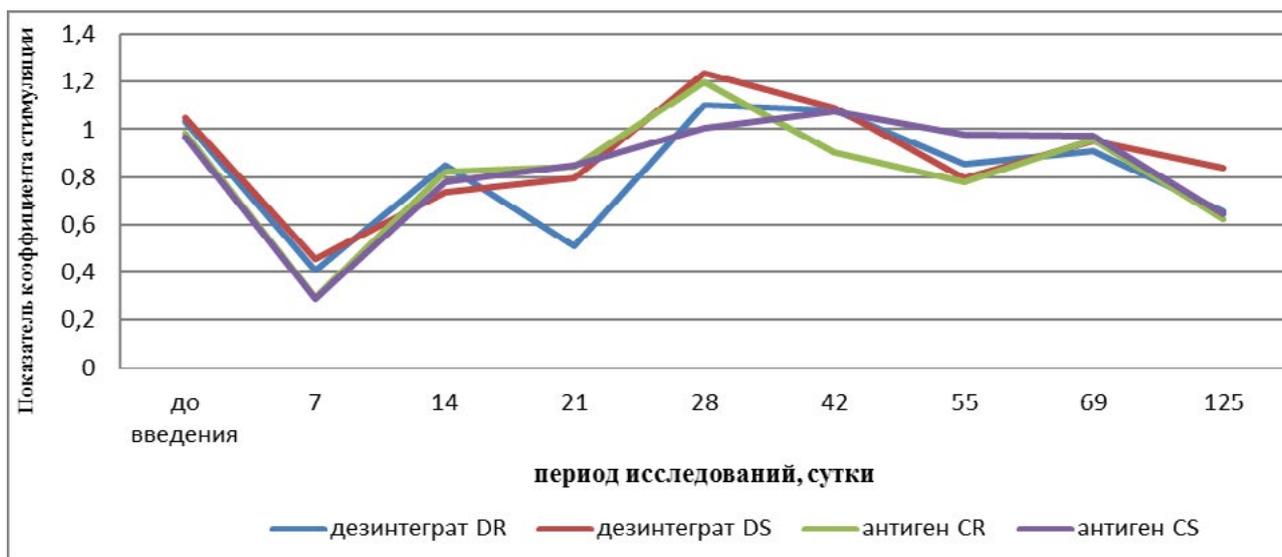
внутриклеточного метаболизма нейтрофилов, которая сопровождалась увеличением как спонтанной – в 2,19 раза ( $p < 0,01$ ), так и индуцированной антигенами активности –  $D_R$  в 2,35 раза ( $p < 0,001$ ),  $D_S$  – в 2,59 ( $p < 0,05$ ), а также  $C_R$  – в 2,67 ( $p < 0,01$ ) и  $C_S$  – в 2,28 раза ( $p < 0,05$ ). В отличие от исследований, проведенных на 7–21-е сутки после иммунизации, уровень генерации кислородных радикалов в нейтрофилах после их обработки экспериментальными специфическими антигенами был выше, чем в клетках, не инкубированных с изучаемыми препаратами. Самые минимальные значения КС составили  $1,004 \pm 0,125$  при использовании в качестве стимулятора  $C_S$ .

В последующем, на 42-е, 55-е и особенно на 69-е сутки наблюдения, сохранился более высокий уровень спонтанной и индуцированной тетразолиевой активности нейтрофилов по сравнению с интактными морскими свинками. Если КС на 42-е сутки в среднем по группам варьировал от 0,90 до 1,09, то к 69-м суткам

снижался при использовании в качестве стимуляторов  $D_R$ ,  $D_S$ , а также  $C_S$  антигенов.

На 125-е сутки от начала эксперимента индивидуальные значения спонтанной активности нейтрофилов у морских свинок варьировали в широких пределах (от 0,289 до 0,779) и в среднем составили  $0,534 \pm 0,102$  против  $0,304 \pm 0,062$  у интактных животных. Стимулированная тетразолиевая активность нейтрофилов, напротив, недостоверно уменьшалась, за исключением случая, когда в качестве стимулятора использовали дезинтеграт  $D_R$ , при внесении которого наблюдали некоторую тенденцию к усилению генерации кислородных радикалов. Вследствие этих изменений также происходило снижение КС в 1,25–1,57 раза по сравнению с неиммунизированными особями.

Анализ КС в динамике, представленный на рисунке, отчетливо показывает, что пик специфической активации нейтрофилов в НСТ–тесте наблюдается преимущественно на 28-е сутки.



Динамика изменений коэффициентов стимуляции в НСТ–тесте в разные сроки после иммунизации морских свинок

Dynamics of changes in stimulation coefficients in the NBT test at different times after immunization of guinea pigs

Необходимо отметить, что иммунный ответ на введение штамма *B. abortus* 16/4 также сопровождался выработкой специфических агглютинирующих и комплементсвязывающих антител с 14-х по 69-е сутки после иммунизации, при этом максимум их синтеза в РА наблюдали на 21–28-е сутки, в РСК – на 28-е

сутки, что совпадало с пиком специфической активации нейтрофилов.

## ВЫВОДЫ

1. Изготовленные экспериментальные образцы дезинтегратов бруцелл обладают выраженной стимуляцией взвеси нейтрофилов

в тесте с нитросиним тетразолием в концентрации 50 мкг/мл, корпускулярные антигены – 100 мкг/мл.

2. Анализ полученных результатов позволяет заключить, что экспериментальные об-

разцы бруцеллезных антигенов способствуют проведению достоверного контроля клеточной перестройки организма в период формирования иммунного ответа.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Обзор* эпидемиологической и эпизоотологической ситуации по бруцеллезу в мире в 2022 году и прогноз на 2023 год в Российской Федерации / Россельхознадзор [Электронный ресурс]. – URL: <https://fsvps.gov.ru/ru/fsvps/news/212515.html> (дата обращения: 30.05.2023).
2. *The Development of Diagnostic and Vaccine Strategies for Early Detection and Control of Human Brucellosis, Particularly in Endemic Areas* / A. Elbehiry [et al.] // *Vaccines*. – 2023. – N 11. – P. 1–20.
3. *Diagnostic significance of hematological parameters in brucellosis* / M. Çelik [et al.] // *Journal of Clinical Medicine of Kazakhstan*. – 2023. – N 1. – P. 50–55.
4. *Ecological bases of the epizootic process of brucellosis and its control in small ruminants* / P.K. Arakelyan, A.S. Dimova, S.K. Dimov [et al.] // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. «Ensuring sustainable development in the context of agriculture, green energy, ecology and earth science». – 2021. – P. 1–7. – Scopus ID 45703365, DOI:10.1088/1755-1315/723/4/042015
5. *Dendritic cells and Brucella spp. interaction: the sentinel host and the stealthy pathogen*. / E.D. Avila-Calderon [et al.] // *Folia Microbiologica*. – 2020. – N 65. – P. 1–16.
6. *Значение* клеточных факторов иммунитета при применении экологически безопасной сплит-конъюгированной противобруцеллезной вакцины в сочетании с иммуномодуляторами / Д. Абдессемед, В.А. Агольцов, С. Ю. Веселовский [и др.] // *Теоретическая и прикладная экология*. – 2020. – № 2. – С. 172–179.
7. *Immunological response to Brucella abortus strain 19 vaccination of cattle in a communal area in South Africa* / G.J.G. Simpson, T. Marcotty, E. Rouille [et al.] // *Journal of the South African Veterinary Association*. – 2018. – N 89 (0). – a1527. – <https://doi.org/10.4102/jsava.v89i0.1527>.
8. *Манакова О.О.* Изучение клеточного иммунного ответа при бруцеллезе животных // *Современные научные подходы к решению проблемы бруцеллеза: сб. материалов конф., Омск, 11 октября 2020 г.* – Омск: ИП Машкеевой Е.А., 2020. – С. 68–72.
9. *Immune response and recent advances in diagnosis and control of brucellosis* / A. Elrashedy [et al.] // *German Journal of Veterinary Research*. – 2022. – N 2 (1). – P. 10–24.
10. *Сабанчиева Ж.Х.* Состояние фагоцитарной системы крови в НСТ–тесте у больных ВИЧ–инфекцией // *Успехи современного естествознания*. – 2006. – № 3. – С. 44–45.
11. *Дегтяренко Л.В., Власенко В.С., Бронников В.С.* Оценка механизмов иммуногенеза у морских свинок, сенсibilизированных бруцеллами // *Вестник ветеринарии*. – 2015. – № 2 (73). – С. 42–46.
12. *Власенко В.С., Дегтяренко Л.В., Иванов А.И.* Оценка функциональной активности нейтрофилов крови морских свинок, инфицированных R–формой бруцелл // *Теоретические и практические аспекты развития современной ветеринарной науки: Тр. КазНИВИ*. – 2012. – Т. 58. – С. 67–72.
13. *Кошкин И.Н., Власенко В.С., Бажин М.А.* Функциональная активность нейтрофилов у морских свинок, иммунизированных конъюгатами на основе антигенов БЦЖ с бетулином и его производными // *Вестник КрасГАУ*. – 2021. – № 5(170). – С. 116–121.
14. *Алимов А.М., Закирова Л.А.* Показатели клеточного иммунитета у морских свинок при вакцинации и экспериментальной бруцеллезной инфекции // *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана*. – 2016. – Т. 227, № 3. – С. 4–6.
15. *Методы* иммунологической оценки животных, сенсibilизированных измененными формами бруцелл: метод. пособие / Л.В. Дегтяренко, Л.Н. Гордиенко, В.С. Власенко [и др.]. – М.; Омск: Литера, 2017. – 30 с.

### REFERENCES

1. *Obzor e`pidemiologicheskoy i e`pizootologicheskoy situacii po brucellezu v mire v 2022 godu i prognoz na 2023 god v Rossijskoj Federacii*: <https://fsvps.gov.ru/ru/fsvps/news/212515.html>. (In Russ.)

2. Elbehiry A. [et al.], The Development of Diagnostic and Vaccine Strategies for Early Detection and Control of Human Brucellosis, Particularly in Endemic Areas, *Vaccines*, 2023, No. 11, pp. 1–20.
3. Çelik M. [et al.], Diagnostic significance of hematological parameters in brucellosis, *Journal of Clinical Medicine of Kazakhstan*, 2023, No. 1, pp. 50–55.
4. Arakelyan P.K., Dimova A.S., Dimov S.K., Rudenko A.V., Yanchenko T.A., Orobets V.A., Ecological bases of the epizootic process of brucellosis and its control in small ruminants, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. «Ensuring sustainable development in the context of agriculture, green energy, ecology and earth science», 2021 pp. 1–7 Scopus ID 45703365, DOI:10.1088/1755-1315/723/4/042015.
5. Avila-Calderon E.D. [et al.], Dendritic cells and *Brucella* spp. interaction: the sentinel host and the stealthy pathogen, *Folia Microbiologica*, 2020, No. 65, pp. 1–16.
6. Abdessemed D., Agol'czov V.A., Veselovskij S.Yu. [i dr.], *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*, 2020, No. 2, pp. 172–179. (In Russ.)
7. Simpson G.J.G., Marcotty T., Rouille E., Chilundo A., Letteson J.-J., Godfroid J., Immunological response to *Brucella abortus* strain 19 vaccination of cattle in a communal area in South Africa, *Journal of the South African Veterinary Association*, 2018, Vol. 89 (0), a1527, <https://doi.org/10.4102/jsava.v89i0.1527>.
8. Manakova O.O., *Sovremennyye nauchnyye podkhody k resheniyu problemy brucelleza* (Modern scientific approaches to solving the problem of brucellosis), Proceedings of the Conference Title, Omsk, 2020, pp. 68–72. (In Russ.)
9. AlyaaElrashedy [et al.], Immune response and recent advances in diagnosis and control of brucellosis, *German Journal of Veterinary Research*, 2022, No. 2 (1), pp. 10–24.
10. Sabanchieva Zh. X., *Uspexi sovremennogo estestvoznaniya*, 2006, No. 3, pp. 44–45. (In Russ.)
11. Degtyarenko L.V., Vlasenko V.S., Bronnikov V.S., *Vestnik veterinarii*, 2015, No. 2 (73), pp. 42–46. (In Russ.)
12. Vlasenko V.S., Degtyarenko L.V., Ivanov A.I., *Teoreticheskie i prakticheskie aspekty razvitiya sovremennoj veterinarnoj nauki: Tr. KazNIVI*, 2012, T. 58, pp. 67–72. (In Russ.)
13. Koshkin I.N., Vlasenko V.S., Bazhin M.A., *Vestnik KrasGAU*, 2021, No. 5 (170), pp. 116–121. (In Russ.)
14. Alimov A.M., Zakirova L.A., *Uchenyye zapiski Kazanskoj gosudarstvennoj akademii veterinarnoj mediciny im. N.E. Baubana*, 2016, T. 227, No. 3, pp. 4–6. (In Russ.)
15. Degtyarenko L.V., Gordienko L.N., Vlasenko V.S. [i dr.], *Metody immunologicheskoy ocenki zivotnykh, sensibilizirovannykh izmenennymi formami brucell* (Methods for immunological assessment of animals sensitized with altered forms of *Brucella*), Moscow; Omsk: Litera, 2017, 30 p.