

ИЗУЧЕНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНОГО ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ БРУЦЕЛЛЕЗА В ЛИМФОЦИТАРНЫХ ТЕСТАХ *IN VITRO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНТИГЕННОГО КОМПЛЕКСА

**Костюченко М.В., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г.,
Логвиненко О.В., Курчева С.А., Бердникова Т.В., Русанова Д.В.,
Куличенко А.Н.**

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Резюме. Нормативно-методическая база, регламентирующая проведение оценки иммунологической эффективности вакцинации против бруцеллеза и выраженности иммунологической поствакцинальной перестройки не разработана. Учитывая ведущую роль клеточного иммунитета в формировании иммунологической защиты от бруцеллеза, оценку клеточной реакции в ответ на антигенную стимуляцию можно считать наиболее информативным и объективным подходом для анализа иммунологической перестройки организма при вакцинации. Для разработки наиболее диагностически информативных методик постановки антиген-стимулированных клеточных тестов *in vitro* необходим тщательный подбор стимулирующего агента (антигена), обладающего достаточным активирующим потенциалом и обеспечивающим специфичность реакции в условиях *in vitro*. Цель исследования – изучить в условиях *in vitro* специфическую активность белково-полисахаридного антигенного комплекса из штамма *Brucella abortus* 19 ВА (БрАг) и возможность его применения для оценки формирования поствакцинального клеточного иммунитета против бруцеллеза.

Объект исследования – белые лабораторные мыши ($n = 50$), иммунизированные штаммом *Brucella abortus* 19 ВА. Контрольную группу ($n = 50$) составили лабораторные мыши, которым введен стерильный физиологический раствор в объеме 0,5 мл. Взятие крови у иммунизированных и контрольных биомоделей осуществляли до вакцинации и на 7, 14, 21 и 30 сутки после иммунизации. При цитометрическом исследовании определяли активационные молекулы CD25, CD69, МНС II и CD95, экспрессированные на Т-лимфоцитах (CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD95⁺, CD3⁺МНС⁺). Для оценки формирования иммунитета уровень интенсивности экспрессии маркеров активации Т-лимфоцитов рассчитывали с использованием коэффициента стимуляции. Для специфической стимуляции Т-лимфоцитов *in vitro* применяли БрАг. В качестве антигена для сравнения при изучении возмож-

Адрес для переписки:

Пономаренко Дмитрий Григорьевич
ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт»
Роспотребнадзора
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15.
Тел.: 8 (8652) 26-03-37.
Тел./факс: 8 (8652) 26-03-12.
E-mail: ponomarenko.dg@gmail.com

Address for correspondence:

Ponomarenko Dmitriy G.
Stavropol Anti-Plague Institute
355035, Russian Federation, Stavropol,
Sovetskaya str., 13-15.
Phone: 7 (8652) 26-03-37.
Phone/Fax: 7 (8652) 26-03-12.
E-mail: ponomarenko.dg@gmail.com

Образец цитирования:

М.В. Костюченко, Е.Л. Ракитина, Д.Г. Пономаренко, О.В. Логвиненко, С.А. Курчева, Т.В. Бердникова, Д.В. Русанова, А.Н. Куличенко «Изучение формирования клеточного поствакцинального иммунитета против бруцеллеза в лимфоцитарных тестах *in vitro* с использованием экспериментального антигенного комплекса» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 547-554.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-547-554

© Костюченко М.В. и соавт., 2019

For citation:

M.V. Kostyuchenko, E.L. Rakitina, D.G. Ponomarenko, O.V. Logvinenko, S.A. Kurcheva, T.V. Berdnikova, D.V. Rusanova, A.N. Kulichenko “Studying development of post-vaccinal cellular immunity against brucellosis by means of lymphocyte *in vitro* tests using an experimental antigenic complex”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 547-554.
doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-547-554

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-547-554

ности применения БрАг для оценки формирования поствакцинального иммунитета использовали аллерген бруцеллезный жидкий – бруцеллин.

Анализ результатов исследования показал, что БрАг обладает выраженной специфической активностью, не вызывает неспецифических реакций (активации) Т-лимфоцитов в условиях *in vitro*, что дает возможность использования его в качестве тест-антигена при постановке реакции антигенспецифической активации Т-лимфоцитов для оценки формирования адаптивного вакцинального иммунитета против бруцелл.

Анализ применения экспериментального бруцеллезного антигена, для постановки антигенстимулированных клеточных реакций *in vitro*, с целью оценки формирования поствакцинального иммунитета против бруцеллеза показал, что использование БрАг способствует повышению диагностической чувствительности (в эксперименте) клеточных реакций *in vitro*. Полученный экспериментальный антиген имеет реальную перспективу применения при разработке алгоритмов лабораторной диагностики бруцеллеза и оценки фактической привитости контингентов риска после вакцинации против бруцеллеза.

Ключевые слова: бруцеллез, поствакцинальный иммунитет, антигенный комплекс, активация лимфоцитов *in vitro*, маркеры активации, проточная цитометрия

STUDYING DEVELOPMENT OF POST-VACCINAL CELLULAR IMMUNITY AGAINST BRUCELLOSIS BY MEANS OF LYMPHOCYTE *IN VITRO* TESTS USING AN EXPERIMENTAL ANTIGENIC COMPLEX

Kostyuchenko M.V., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G.,
Logvinenko O.V., Kurcheva S.A., Berdnikova T.V., Rusanova D.V.,
Kulichenko A.N.

Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. Regulatory framework and methodological approaches to evaluation of immunological effects of vaccination against brucellosis are not established, and the degree of immunological post-vaccinal rearrangement is not yet developed. Due to leading role of cellular immunity in formation of immune protection against brucellosis, evaluation the cellular response in response to antigenic stimulation may be considered the most informative and objective approach to analysis of immune changes in the body during vaccination. In order to develop the most diagnostically informative methods for design of antigen-stimulation cell tests *in vitro*, a careful selection of a stimulating agent (antigen) is required, which should have a sufficient activating potential, thus providing specificity of reaction under *in vitro* conditions. The aim of the present study is to study the *in vitro* specific activity of a protein-polysaccharide antigenic complex from the *Brucella abortus* 19 BA strain (BrAg), and an opportunity of its application in order to assess the formation of post-vaccinal cellular immunity against brucellosis.

The study was performed with white laboratory mice (n = 50) immunized with the *Brucella abortus* 19 BA strain. The control group (n = 50) consisted of laboratory mice that received a sterile saline solution in a volume of 0.5 ml. Blood samples were taken from immunized and control animals before vaccination, and 7, 14, 21, and 30 days after immunization. By means of flow cytometry, the activation molecules CD25, CD69, MHC II and CD95, expressed on T lymphocytes (CD3⁺CD69⁺, CD3⁺ CD25⁺, CD3⁺CD95⁺, CD3⁺MHC⁺) were determined. To observe the development of immunity, the intensity of expression of T lymphocyte activation markers was calculated using the stimulation quotient. BrAg was used for specific *in vitro* stimulation of T lymphocytes. The liquid brucellosis allergen (brucellin) was used as an antigen for comparison, when studying opportunity of BrAg usage for assessing the postvaccinal immunity development.

The following results were obtained: BrAg has pronounced specific activity, it did not cause non-specific *in vitro* reactions (activation) of T lymphocytes, thus enabling its application as a test antigen when evaluating development of adaptive vaccine immunity against brucella.

Experimental testing of brucellosis antigen for carrying out the *in vitro* antigen-stimulated cellular reactions, aiming for evaluation of post-vaccinal immunity development against brucellosis, showed that the usage of BrAg promotes increase in diagnostic sensitivity of cellular reactions under *in vitro* experimental conditions. The applied experimental antigen is a quite promising tool for development of laboratory algorithms for brucellosis diagnostics, and assessment of actual vaccination efficiency in cohorts previously vaccinated against brucellosis.

Keywords: brucellosis, postvaccinal immunity, antigenic complex, in vitro lymphocyte activation, activation markers, flow cytometry

Введение

Эффективность вакцинации против бруцеллеза во многом зависит от правильного определения показаний к ее проведению, полноты отбора подлежащих иммунизации профессиональных групп, в том числе временного персонала, соблюдения сроков вакцинации и ревакцинации. Согласно санитарно-эпидемиологическим правилам СП 3.1.7.2613-10 «Профилактика бруцеллеза» перед вакцинацией/ревакцинацией контингентов риска, проводится медицинский осмотр с обязательным серологическим и аллергологическим обследованием, основанном на выявлении специфических антител (реакция агглютинации, ИФА) и кожной реакции с бруцеллином (проба Бюрне) [7].

Нормативно-методическая база, регламентирующая проведение оценки иммунологической эффективности вакцинации против бруцеллеза (фактической привитости) и выраженности иммунологической поствакцинальной перестройки, не разработана.

Существующие принципы обеспечения правильности и полноты отбора контингентов риска инфицирования возбудителем бруцеллеза, подлежащих иммунизации, предполагают комплексное применение различных методов, ориентированных на выявление специфических мишеней (маркеров). К иммунологическим маркерам, отражающим наличие и напряженность специфического иммунитета, относятся серопозитивность в отношении возбудителя инфекции и способность факторов адаптивного клеточного иммунитета (премированные лимфоциты, Т-клетки иммунологической памяти) к активации при контакте со специфическим антигеном.

Учитывая ведущую роль клеточного иммунитета в формировании иммунологической защиты от бруцеллеза, оценку клеточной реакции в ответ на антигенную стимуляцию можно считать наиболее информативным и объективным подходом при анализе иммунологической перестройки организма при вакцинации [1].

Для оценки специфического клеточно-опосредованного иммунитета против возбудителя бруцеллеза предложена кожная аллергологическая реакция с бруцеллином, принцип которой

основан на выявлении гиперчувствительности замедленного типа, осуществляемой антиген-компетентными Т-лимфоцитами в кооперации с макрофагами против антигенов клеточных мембран [5]. Проба Бюрне в настоящее время применяется достаточно редко, в связи с высоким риском развития общих и местных побочных реакций в виде повышения температуры, озноба, головной боли, воспалительной реакции на месте введения, лимфангита, артралгии и др.

В настоящее время ведутся исследования по разработке антигенспецифических методов, позволяющих оценить напряженность иммунитета к инфекционным заболеваниям. Продемонстрирована высокая эффективность применения методов антигенной активации лейкоцитов *in vitro* с использованием технологии проточной цитометрии для изучения формирования поствакцинального иммунитета [2, 3, 6]. По данным ряда авторов, перспективными показателями специфической клеточной антигенреактивности могут выступать следующие маркеры (рецепторы) активации лимфоцитов: CD25, CD69 – ранние активационные маркеры и молекулы МСН II и CD95, представляющие маркеры поздней и длительной активации лимфоцитов [4, 8, 11, 12].

Для разработки наиболее диагностически информативных методик постановки антиген-стимулированных клеточных тестов *in vitro* необходим тщательный подбор стимулирующего агента (антигена), обладающего достаточным активирующим потенциалом и обеспечивающим специфичность реакции в условиях *in vitro*.

В настоящее время нет коммерчески доступного бруцеллезного антигена для клеточных тестов *in vitro*. На базе ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора разработан белково-полисахаридный антигенный комплекс из штамма *Brucella abortus* 19 ВА (BrAg) с концентрацией белка 10 мг/мл, предназначенный для применения в антигенспецифических клеточных реакциях *in vitro*.

Цель исследования – изучить в условиях *in vitro* специфическую активность BrAg и возможность его применения для оценки формирования поствакцинального клеточного иммунитета против бруцеллеза.

Материалы и методы

Объект исследования – белые лабораторные мыши ($n = 50$), иммунизированные вакциной против бруцеллеза на основе штамма *Brucella abortus* 19 ВА (НПО «Микроген» Минздрава России) в дозе $3,4 \times 10^8 - 4,6 \times 10^8$ живых микробных клеток в 0,5 мл физиологического раствора [9]. Контрольную группу ($n = 50$) составили лабораторные мыши, которым вводили стерильный физиологический раствор в объеме 0,5 мл. Взятие крови у иммунизированных и контрольных биомоделей осуществляли до вакцинации и на 7, 14, 21 и 30 сутки после иммунизации. С целью специфической стимуляции Т-лимфоцитов *in vitro* использовали экспериментальный бруцеллезный антиген – белково-полисахаридный комплекс из штамма *Brucella abortus* 19-ВА. В качестве антигена для сравнения при изучении возможности применения БрАг при оценке формирования поствакцинального иммунитета использовали аллерген бруцеллезный жидкий – бруцеллин® (НПО «Микроген» Минздрава России).

Исследования проводили на проточном цитометре FACS Calibur (Becton Dickinson, США), используя моноклональные антитела (МКАТ) к поверхностным антигенам Т-лимфоцитов мыши. Определяли активационные молекулы CD25, CD69, МНС II и CD95, экспрессированные на Т-лимфоцитах. Популяцию лимфоцитов идентифицировали при помощи гейтирования в координатах FSC-SSC на графике Dot Plot (программное обеспечение BD Cell Quest™). События, попавшие в регион лимфоцитов, анализировали на предмет экспрессии CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD95⁺, CD3⁺МНС⁺ рецепторов. Используемые МКАТ (Invitrogen, США) были мечены FITC (флуоресцеин изотиоцианат) и PE (фикоэритрин).

Для определения фоновых значений маркеров активации стимуляцию лимфоцитов осуществляли стерильным физиологическим раствором. Реакцию активации учитывали через 24 часа после инкубации с БрАг в условиях *in vitro*.

При изучении возможности использования БрАг для оценки формирования иммунитета уровень интенсивности экспрессии маркеров активации Т-лимфоцитов рассчитывали с использованием коэффициента стимуляции (КС) по формуле: $КС = (C - D) / C \times 100$ в %, где C – относительный уровень содержания в крови активированных Т-лимфоцитов в опытной пробе (после инкубации с антигеном); D – относительный уровень в крови активированных Т-лимфоцитов в контрольной пробе (после инкубации с физ. раствором) [2].

Математическую и статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel 2010. С учетом малой выборки ($n < 30$) для выявления статистической значимости различий результатов использовали t-критерий при уровне надежности $P \geq 0,95$ [10].

Для оценки специфичности разработанного антигенного комплекса – БрАг – изучено влияние БрАг в условиях *in vitro* на Т-лимфоциты у неиммунных к возбудителю бруцеллезу экспериментальных животных (контрольная группа $n = 50$). Проведенные исследования показали, что интенсивность экспрессии маркеров активации Т-лимфоцитов в контрольной группе при стимуляции физиологическим раствором и экспериментальным бруцеллезным антигеном не имела статистически значимой разницы во все сроки исследования. Это указывает на то, что БрАг не вызывают неспецифической реакции лимфоцитов *in vitro*. Так, уровень экспрессии маркера CD25 при стимуляции стерильным изотоническим раствором составил в среднем $2,47 \pm 0,46\%$, МНС – $20,32 \pm 1,63$ и $20,45 \pm 1,30\%$, CD69 – $10,22 \pm 2,23$ и $11,97 \pm 2,48\%$, CD95 – $2,12 \pm 0,44$ и $2,38 \pm 0,37\%$ соответственно.

Исследования интенсивности экспрессии «ранних» активационных молекул после вакцинации показали, что на 7 сутки уровень экспрессии Т-лимфоцитами CD25 при стимуляции БрАг увеличился в сравнении с фоновыми значениями ($3,93 \pm 0,91\%$) в 2,7 раза и составил в среднем $10,49 \pm 1,57\%$. На 14 сутки после иммунизации фоновые значения не имели статистически значимой разницы – $3,73 \pm 0,40\%$, после инкубации с антигенным комплексом уровень экспрессии рецептора к IL-2 увеличился в 2,8 раза, составив в среднем $8,65 \pm 1,85\%$. Активация БрАг Т-лимфоцитов у биомоделей через 21 сутки после вакцинации инициировала статистически значимое повышение экспрессии рецептора интерлейкина 2 до $8,32 \pm 1,0\%$, что выше фоновых значений ($2,32 \pm 0,50\%$) в 3,6 раза. На 30 сутки после иммунизации значения уровней антиген-индуцированной ($3,65 \pm 0,99\%$) и фоновой ($3,14 \pm 1,29\%$) экспрессии Т-лимфоцитами CD25 не имели статистически значимой разницы.

Анализ специфической активности БрАг по маркеру ранней пролиферации лимфоцитов – CD69 – показал, что на 7 сутки после иммунизации антигенный комплекс способствовал увеличению, в сравнении с фоновыми значениями ($20,54 \pm 3,66\%$), интенсивности экспонирования CD69 от 1,8 до 2 раз – $41,21 \pm 6,07\%$. Аналогичная тенденция сохранилась на 14, 21 и 30 сутки после иммунизации: $46,81 \pm 4,53\%$ (фон – $23,07 \pm 1,87\%$),

25,20±2,65% (фон – 10,70±1,20%) и 23,60±3,82% (13,23±2,40%).

Интенсивность экспрессии показателя активации лимфоцитов – молекул МНС у иммунных в возбудителю бруцеллеза лабораторных биомоделей, после стимуляции БрАг, имела статистически значимое, в сравнении с фоновыми значениями, увеличение на 7 сутки 33,04±3,98% (фон – 23,40±3,69%) и 30 сутки – 30,21±5,88% (фон – 8,94±2,01) после вакцинации. В остальные сроки исследования уровень экспонирования Т-лимфоцитами антигенов главного комплекса гистосовместимости не имел статистически значимых отличий в сравнении с фоновыми значениями. Так, на 14 сутки интенсивность антиген-стимулированной экспрессии – 16,66±2,63% (фон – 15,63±1,81), на 21 сутки – 18,99±4,08% (фон – 12,21±2,86).

Результаты исследования специфической активности БрАг по показателю экспрессии Т-лимфоцитов маркеров индукции апоптоза – CD95 – указывают на высокий активационный потенциал антигенного комплекса. Антиген-индуцированная экспрессия Т-лимфоцитами CD95 на 7 сутки после вакцинации составила 42,54±3,07% (фон – 34,73±3,02%), 14 сутки – 19,87±2,82% (фон – 12,66±1,42%), 21 сутки – 17,14±1,91% (фон – 8,84±1,55%). На 30 сутки после иммунизации значения интенсивности БрАг-индуцированного экспонирования Т-лимфоцитами маркеров апоптоза не имели статистически значимой разницы, составив в среднем 6,57±1,14% (фон – 6,28±2,37%).

Анализ результатов исследования показал, что белково-полисахаридный антигенный комплекс, полученный из штамма *Brucella abortus* 19 ВА по модифицированной методике, обладает выраженной специфической активностью в условиях *in vitro*. БрАг не вызывает неспецифических реакций (активации) Т-лимфоцитов *in vitro*, что дает возможность использования его в качестве тест-антигена при постановке реакции антиген-специфической активации Т-лимфоцитов *in vitro* для оценки формирования адаптивного вакцинального иммунитета против бруцелл.

Проведенные экспериментальные исследования по изучению возможности применения БрАг для оценки формирования поствакцинального иммунитета против бруцеллеза показали, что уровень экспрессии исследуемых маркеров активации у биомоделей контрольной группы во все сроки исследования не имел статистически значимых изменений (колебаний) значений, составив в среднем: CD69 – 7,78±0,24%, CD25 – 3,46±0,33%, МНС II – 0,96±0,09% и CD95 – 3,43±0,25%.

При использовании бруцеллина в качестве антигена для клеточных тестов *in vitro* интенсивность экспрессии лимфоцитами маркеров активации у вакцинированных животных на 7, 14, 21 и 30 сутки после иммунизации уровень антиген-стимулированной экспрессии CD69 Т-лимфоцитами не имел статистически значимой разницы, составив в среднем 6,01±1,28, 9,77±2,18, 6,31±2,81 и 11,04±3,78% соответственно. При использовании БрАг уровень активации Т-лимфоцитов по показателю CD69 многократно превышал данные контрольной группы и при использовании бруцеллина, составив в среднем на 7 сутки – 51,61±3,51%, 14 сутки – 49,59±2,71%, 21 сутки – 60,38±7,75% и 30 – 52,32±5,54% соответственно.

Экспонирование Т-лимфоцитами CD25 указывает на их раннюю активацию. Синтез молекул CD25 производится преимущественно активированными Т-лимфоцитами, в меньшей степени В-клетками. Анализ динамики экспонирования маркера ранней активации лимфоцитов – рецептора интерлейкина II – в процессе развития вакцинального иммунного ответа позволил установить, что при стимуляции Т-клеток бруцеллином интенсивность экспрессии CD25, рассчитанная по КС, имела достаточно низкие уровни: на 7 сутки – 13,7±3,69%, 14 сутки – 10,2±3,5%, на 21 сутки уменьшилась до контрольных значений – 8,9±1,78% и к 30 суткам составила в среднем 9,66±3,67%. Активность синтеза IL-2га Т-лимфоцитами у иммунизированных животных при стимуляции экспериментальным бруцеллезным антигеном существенно отличалась от данных контрольных биомоделей и при использовании бруцеллезного аллергена. Так, на 7 сутки после иммунизации количество CD25-позитивных Т-лимфоцитов после активации БрАг увеличилось в среднем до 36,47±14,15%, 14 сутки – 59,97±4,42%, 21 сутки – 53,93±13,47%, 30 сутки – 53,26±6,13% соответственно (рис. 1).

Экспрессия лимфоцитами антигенов главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex) – МНС класса II – ассоциирована не только с поздней, но и длительной активацией лимфоцитов. При *in vitro* стимуляции Т-лимфоцитов бруцеллином интенсивность экспрессии молекул МНС II, рассчитанная по КС, составила в среднем на 7 сутки – 6,59±2,05%, 14 сутки – 5,32±1,07%, 21 сутки – 8,18±2,95% и 30 сутки – 7,72±2,73%. При использовании БрАг в антиген-стимулированном клеточном тесте *in vitro* установлено, что на 7 сутки активность экспонирования Т-лимфоцитами антигенов МНС II увеличилась до 31,97±3,25% на 14, 21 и 30 сутки составила, соответственно, 23,7±1,73, 16,40±1,91 и 61,84±4,37% (рис. 2).

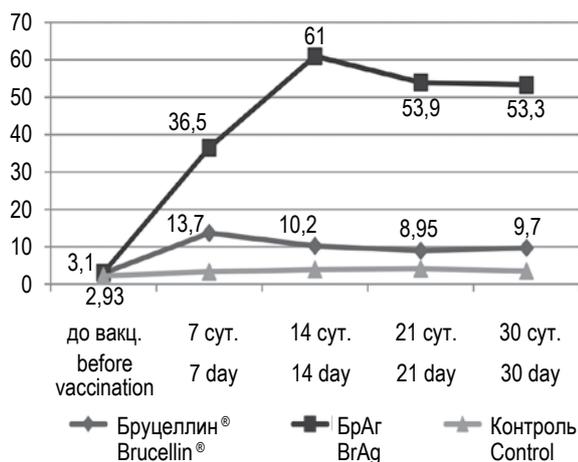


Рисунок 1. Значения интенсивности (коэффициент стимуляции) экспрессии Т-лимфоцитами рецепторов CD25 в группах сравнения до вакцинации и на 7-30 сутки после иммунизации

Figure 1. Intensity values (stimulation factor) of CD25 T lymphocyte expression in comparison groups before vaccination and 7-30 days after immunization

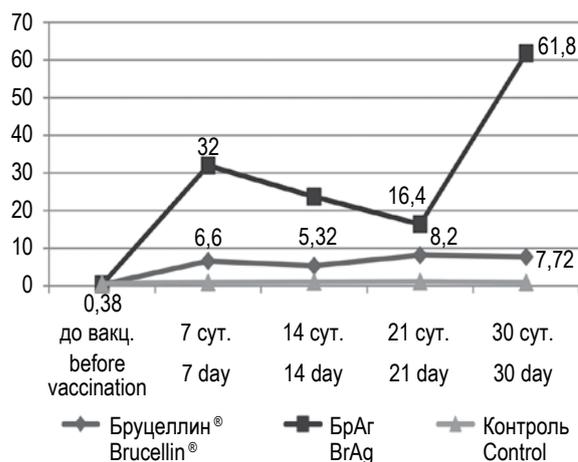


Рисунок 2. Значения интенсивности (коэффициент стимуляции) экспрессии Т-лимфоцитами рецепторов МНС II в группах сравнения до вакцинации и на 7-30 сутки после иммунизации

Figure 2. Intensity values (stimulation factor) of T lymphocyte expression of MHC II receptors in comparison groups before vaccination and 7-30 days after immunization

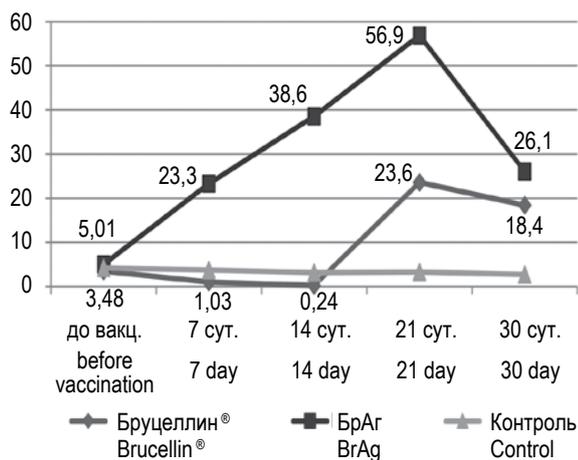


Рисунок 3. Значения интенсивности (коэффициент стимуляции) экспрессии Т-лимфоцитами рецепторов CD95 в группах сравнения до вакцинации и на 7-30 сутки после иммунизации

Figure 3. Intensity values (stimulation factor) of CD95 T lymphocyte expression in comparison groups before vaccination and 7-30 days after immunization

Анализ экспрессии Т-лимфоцитами рецептора индукции апоптоза – CD95, маркера «поздней» и «негативной» активации клеток, показал, что при использовании аллергена бруцеллина для *in vitro* активации значения экспрессии Т-лимфоцитами CD95 на 7 и 14 сутки после иммунизации были ниже уровня контрольных данных – $1,03 \pm 0,30$ и $0,24 \pm 0,06\%$ соответственно, на 21 и 30 сутки после иммунизации – соответственно, $23,59 \pm 2,54$ и $18,44 \pm 2,87\%$. При исполь-

зовании БрАг в качестве специфического антигена бруцелл интенсивность экспонирования Т-лимфоцитами молекул индукции апоптоза составила на 7 сутки $23,26 \pm 3,55\%$, 14 сутки – $38,59 \pm 4,18\%$, 21 сутки – $56,87 \pm 2,81\%$ и 30 сутки – $26,13 \pm 6,89\%$. Поскольку апоптоз при этом выступает в качестве процесса, альтернативного пролиферации, их соотношение может служить мерой результативности ответа клеток на активизирующие сигналы (негативная активации) (рис. 3).

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что разработанный в ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора белково-полисахаридный антигенный комплекс на основе штамма *Brucella abortus* 19 VA не вызывает неспецифических реакций (неспецифической активации) Т-лимфоцитов *in vitro*, обладает выраженной специфической активностью в условиях *in vitro*.

Анализ применения экспериментального бруцеллезного антигена, для постановки антиген-стимулированных клеточных реакций *in vitro*, с целью оценки формирования поствакцинального иммунитета против бруцеллеза показал, что использование БрАг способствует повышению чувствительности (в эксперименте) клеточных реакций *in vitro*. Полученный экспериментальный антиген имеет реальную перспективу применения при разработке алгоритмов лабораторной диагностики бруцеллеза и оценки фактической привитости контингентов риска после вакцинации против бруцеллеза.

Список литературы / References

1. Вершилова П.А., Чернышева М.И., Князева Э.Н. Патогенез и иммунология бруцеллеза. М.: Медицина, 1974. 272 с. [Vershilova P.A., Chernysheva M.I., Knyazeva E.N. Pathogenesis and immunology of brucellosis]. Moscow: Medicine, 1974. 272 p.
2. Дармов И.В., Елагин Г.Д., Богачева Н.В., Крючков А.В., Тихвинская О.В. Современные лабораторные методы оценки эффективности проведения иммунизации против опасных и особо опасных инфекций // Клиническая лабораторная диагностика, 2011. № 6. С. 39-42. [Darmov I.V., Elagin G.D., Bogacheva N.V., Kryuchkov A.V., Tikhvinskaya O.V. Modern laboratory methods for assessing the effectiveness of immunization against dangerous and especially dangerous infections. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2011, no. 6, pp. 39-42. (In Russ.)]
3. Куличенко А.Н., Абзаева Н.В., Гостищева С.Е., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Костюченко М.В. Использование антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета // Инфекция и иммунитет, 2017. Т. 7, № 2. С. 203-208. [Kulichenko A.N., Abzaeva N.V., Gostischeva S.E., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Kostuchenko M.V. The antigen-specific cell *in vitro* tests for post-vaccination antiplague immunity formation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, Vol. 7, no. 2, pp. 203-208. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-203-208.
4. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Кайгородова Е.В., Гончаров А.Г. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 1. С. 7-26. [Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sokhonevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Kaigorodova E.V., Goncharov A.G. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 7-26. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-1-7-26.
5. Паттерсон Р., Греммер Л., Гринбергер П. Аллергические болезни. Москва, ГЭОТАР-Медицина, 2000. 768 с. [Patterson R., Gremmer L., Grinberger P. Allergic diseases]. Moscow: GEOTAR-Medicine, 2000. 768 p.
6. Пономаренко Д.Г. Новый подход к комплексной оценке иммуно-биологической реактивности контингента, подлежащего вакцинации (ревакцинации) против бруцеллеза // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы, 2015. № 3. С. 28-31. [Ponomarenko D.G. A new approach to a comprehensive assessment of the immuno-biological reactivity of a contingent subject to vaccination (revaccination) against brucellosis. *Epidemiologiya i infektionnye bolezni. Aktualnye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Topical Issues*, 2015, no. 3, pp. 28-31. (In Russ.)]
7. Профилактика бруцеллеза. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.7.2613-10. [Prevention of brucellosis. Sanitary-epidemiological rules of the joint venture 3.1.7.2613-10].
8. Сомова Л.М., Беседина Н.Н., Плехова Н.Г. Апоптоз и инфекционные болезни // Инфекция и иммунитет, 2014. Т. 4, № 4. С. 303-318. [Somova L.M., Besednova N.N., Plekhova N.G. Apoptosis and infectious diseases. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, Vol. 4, no. 4, pp. 303-318. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2014-4-303-318.
9. Таран И.Ф., Лямкин Г.И. Бруцеллез (микробиология, иммунология, эпидемиология, профилактика). Ставрополь, 1996. 173 с. [Taran I.F., Lyamkin G.I. Brucellosis (microbiology, immunology, epidemiology, prevention)]. Stavropol, 1996. 173 p.
10. Урбах В.Ю. Биометрические методы. М.: Наука, 1964. 410 с. [Urbach V.Yu. Biometric methods]. Moscow: Science, 1964. 410 p.
11. Фирстова В.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Зырина Е.В., Иванов С.А., Киселева Н.В., Копылов П.Х., Анисимов А.П., Дятлов И.А. Определение экспрессии маркера ранней активации CD69 на лимфоцитах иммунных мышей после стимуляции их антигенами чумного микроба // Проблемы особо опасных инфекций, 2010. № 103. С. 56-59. [Firstova V.V., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Zyrina E.V., Ivanov S.A., Kiseleva N.V., Kopylov P.Kh., Anisimov A.P., Dyatlov I.A. Determination of the expression of the marker of early activation of CD69 on the lymphocytes of immune mice after stimulation with antigens of the plague microbe. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Especially Dangerous Infections*, 2010, no. 103, pp. 56-59. (In Russ.)]
12. Shipkova M., Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica Chimica Acta*, 2012, Vol. 413, pp. 1338-1349.

Авторы:

Костюченко М.В. — биолог сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекций лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Ракитина Е.Л. — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекций лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Authors:

Kostyuchenko M.V., Biologist, Sector of Immunology and Pathomorphology of Highly Dangerous Infections, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Rakitina E.L., PhD (Medicine), Doctor for Clinical Laboratory Diagnostics, Sector of Immunology and Pathomorphology of Highly Dangerous Infections, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Пономаренко Д.Г. — к.б.н., заведующий лабораторией бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Логвиненко О.В. — к.б.н., заведующая сектором иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекций лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Курчева С.А. — к.б.н., заведующая научно-производственной лабораторией препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Бердникова Т.В. — биолог лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Русанова Д.В. — к.м.н., врач-бактериолог лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Куличенко А.Н. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Ponomarenko D.G., PhD (Biology), Head, Laboratory of Brucellosis, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Logvinenko O.V., PhD (Biology), Head, Sector of Immunology and Pathomorphology of Highly Dangerous Infections, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Kurcheva S.A., PhD (Biology), Head, Research and Production Laboratory of Diagnostic Preparations for Highly Dangerous and other infections, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Berdnikova T.V., Biologist, Brucellosis Laboratory, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Rusanova D.V., PhD (Medicine), Bacteriologist, Brucellosis Laboratory, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Kulichenko A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Поступила 31.08.2018

Отправлена на доработку 19.09.2018

Принята к печати 12.10.2018

Received 31.08.2018

Revision received 19.09.2018

Accepted 12.10.2018