

Характеристика качественного состава комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба в перспективе использования его при оценке формирования поствакцинального противочумного иммунитета

С.Е.Гостищева, Н.В.Абзаева, Д.А.Ковалев, А.В.Костроминов, А.М.Жиров, Е.Л.Ракитина,
М.В.Костюченко, О.В.Логвиненко, Д.Г.Пономаренко, Д.В.Русанова, М.А.Иванова, Т.М.Гридина

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация

Для оценки поствакцинального противочумного иммунитета используют клеточные тесты *in vitro* с применением проточной цитометрии, которая предусматривает использование различных комплексов растворимых антигенов в качестве специфических активаторов иммунных клеток.

Цель исследования. Изучить качественный состав комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба для стандартизации свойств препарата и применения его при оценке формирования поствакцинального противочумного иммунитета методом проточной цитометрии.

В работе был изучен комплекс водорастворимых антигенов чумного микроба на основе вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ. Спектрофотометрию всех серий образцов водного раствора осуществляли в 10 повторях на спектрофотометре NanoDrop 2000C. Исследование белкового состава проводили методом капиллярного электрофореза. Хроматографический анализ делали в обращенно-фазовом режиме с применением стандартных образцов моносахаридов, для каждой серии получали 5 хроматограмм. Количественное определение белков и нуклеиновых кислот проводили методом специфической флуориметрии. Для оценки поствакцинального противочумного иммунитета определяли экспрессию рецепторов (CD25) на поверхности лимфоцитов при антигенспецифической стимуляции *in vitro*.

Результаты и выводы. В ходе исследования препарата были получены характерные хроматографические профили, показавшие наличие полисахарида, мономерами которого являются глюкоза, рибоза и глюкозамин. Изучены спектры поглощения комплекса водорастворимого антигена, охарактеризован состав входящих в него белковых фракций. Показана стабильность характеристик препарата разных серий, что свидетельствует о стандартности технологического процесса получения и позволяет использовать его для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета в клеточных тестах *in vitro* в качестве специфического антигена при активации лимфоцитов.

Ключевые слова: комплекс водорастворимых антигенов, противочумный иммунитет, иммунизация, спектрофотометрия, проточная цитофлуориметрия, хроматографический анализ

Для цитирования: Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Ковалев Д.А., Костроминов А.В., Жиров А.М., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Логвиненко О.В., Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Иванова М.А., Гридина Т.М. Характеристика качественного состава комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба в перспективе использования его при оценке формирования поствакцинального противочумного иммунитета. Бактериология. 2025; 10(2): 15–21. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-15-21

Characteristic of the quality composition of the water-soluble antigen complex of the plague microbe. Prospects for using the water-soluble antigenic complex in evaluating the formation of post-vaccinal anti-plague immunity

S.E.Gostischeva, N.V.Abzaeva, D.A.Kovalev, A.V.Kostrominov, A.M.Zhirov, E.L.Rakitina,
M.V.Kostuchenko, O.V.Logvinenko, D.G.Ponomarenko, D.V.Rusanova, M.A.Ivanova, T.M.Gridina

Stavropol Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Stavropol, Russian Federation

Для корреспонденции:

Гостищева Светлана Евгеньевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15

Тел./факс: (8652) 33-52-30 доб. 347.

ORCID: 0000-0001-9891-3665

Статья поступила 31.10.2024, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Svetlana E. Gostischeva, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of scientific and production laboratory of plague vaccines, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor

Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation

Phone: (8652)33-52-30 add. 347

ORCID: 0000-0001-9891-3665

The article was received 31.10.2024, accepted for publication 30.06.2025

In vitro cellular tests using the flow cytometry method, in which different soluble antigen complexes are used as specific activators of immune cells are used to assess post-vaccinal plague immunity.

Objective of the research is studying the qualitative composition of the complex of water-soluble antigens of the plague microbe in order to standardise the properties of the preparation and to use it to assess the formation of post-vaccinal anti-plague immunity by flow cytometry. We studied the plague microbe water-soluble antigen complex based on the vaccine strain *Yersinia pestis* EV of the NIEG line. We performed spectrophotometry of all aqueous solution sample series in 10 repeats on a spectrophotometer using a NanoDrop 2000C. We investigated the protein composition by capillary electrophoresis. We performed reversed-phase chromatographic analysis using standard monosaccharide samples, and 5 chromatograms were obtained for each series. We performed reversed-phase chromatographic analysis using standard monosaccharide samples. We obtained 5 chromatograms for each series. We measured receptor (CD25) expression on the surface of lymphocytes during antigen-specific stimulation *in vitro* to assess post-vaccinal plague immunity.

Results and discussion. Our team analysed chromatographic profiles indicating the presence of a polysaccharide (the glucose as a monomer), ribose and glucosamine. We studied the absorption spectra of the water-soluble antigen complex and characterised the composition of the protein fractions. We confirmed the stability of the preparation of different series, which indicates the standardisation of the technological process. We studied the possibility of using it as a specific antigen during lymphocyte activation to assess the formation of post-vaccinal plague immunity in cellular tests *in vitro*.

Key words: water-soluble antigen complex, plague immunity, immunization, spectrophotometry, flow cytometry, chromatographic analysis

For citation: Gostischeva S.E., Abzaeva N.V., Kovalev D.A., Kostrominov A.V., Zhirov A.M., Rakitina E.L., Kostuchenko M.V., Logvinenko O.V., Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Ivanova M.A., Gridina T.M. Characteristic of the quality composition of the water-soluble antigen complex of the plague microbe. Prospects for using the water-soluble antigenic complex in evaluating the formation of post-vaccinal anti-plague immunity. Bacteriology. 2025; 10(2): 15–21. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-15-21

В России для специфической иммунопрофилактики чумы применяется вакцина чумная живая из штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ отечественного производства, вызывающая формирование иммунного ответа длительностью до одного года. Вакцинация сопровождается выраженными изменениями иммунного статуса и затрагивает практически все звенья иммуногенеза [1, 2].

В развитии иммунного ответа на введение чумной вакцины участвуют три клеточные системы: макрофаги, Т- и В-лимфоциты, т.е. в формировании противочумного иммунитета клеточное звено является основным [3, 4].

В последние годы напряженность иммунитета и специфическая чувствительность к антигену все чаще оцениваются *in vitro* с использованием технологии проточно-цитометрического анализа [5, 6]. В данном методе для получения надежных и воспроизводимых результатов важно правильно подобрать специфические антигены для реакции и их дозировку, так как некоторые из них способны неспецифически взаимодействовать с лимфоцитами [7].

К уникальным свойствам антигенов можно отнести способность избирательно (специфически) связываться с лимфоцитами и активировать их. Активация лимфоцитов – сложный процесс перехода клетки из фазы G0 («фаза покоя») в фазу G1, который состоит из каскада реакций: активация фосфолипазы C, расщепляющей фосфатидилинозитолдифосфат на два медиатора – диацилглицерол и инозитолтрифосфат; увеличение концентрации Ca^{2+} в клетке, способствующее активации различных ферментативных систем, что приводит к стимуляции синтеза РНК, белка и интерлейкина-2. Эти процессы завершаются экспрессией различных генов и их рецепторов на поверхности клетки. В ходе активационного (дифференцированного) механизма на поверхности лимфоцитов последовательно экспрессируются молекулы активации.

В настоящее время наиболее полно изучены антигены чумного микроба: Caf1, «мышинный» токсин, липополисахарид, основной соматический антиген, активатор плазмидогена, мембранные белки. На их основе выпускаются различные диагностические препараты и тест-системы, а также

ведутся исследовательские работы по конструированию чумных вакцин нового поколения [8–13].

При всем многообразии способов извлечения специфических антигенов из микробных клеток необходим комплекс последовательных манипуляций, который позволил бы изолировать полноценные в антигенном отношении фракции для проведения исследований методом проточной цитометрии. Авторы остановили свой выбор на водно-солевых экстрактах, которые обладают сложным макромолекулярным составом и включают в себя большинство выявляемых у бактерий антигенов. Водорастворимый антиген изолировали комплексным методом: водно-солевой экстракцией с последующей ультразвуковой дезинтеграцией и осаждением белковых фракций сульфатом аммония [14, 15]. Выход белковых фракций составлял не менее 5 мг/мл.

Полученный из биомассы чумного микроба водорастворимый антигенный комплекс (Чум-Аг) использовался в качестве специфического антигена при проведении исследований иммуногенной активности вакцины чумной живой методом проточной цитометрии. Было экспериментально показано, что комплекс обладает выраженной специфической активностью в условиях *in vitro* и не вызывает неспецифических клеточных реакций у иммунных мышей. Изучение динамики интенсивности экспрессии маркеров ранней активации лимфоцитов показало возможность и перспективу применения полученного антигена для лабораторной оценки формирования поствакцинального иммунитета у вакцинированных на ранних сроках после вакцинации [16, 17].

Учитывая вышеизложенное, **цель** настоящей работы – изучить качественный состав комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба для стандартизации свойств препарата и применения его при оценке формирования поствакцинального противочумного иммунитета методом проточной цитометрии.

Материалы и методы

Комплекс водорастворимых антигенов чумного микроба, состоящий из трех фракций, получали на основе вакцинного

штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, выращенного при температуре $27 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 72 ± 2 ч. Для обеззараживания полученной биомассы использовали охлажденный до $-38 \pm 2^\circ\text{C}$ двойной объем ацетона, далее помещали в холодильник на 48 ± 2 ч при температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$ и высушивали в вытяжном шкафу при температуре $22 \pm 4^\circ\text{C}$ в течение 12–18 ч.

Высушенную биомассу экстрагировали в 2,5%-м растворе хлорида натрия в холодильнике в течение 24 ± 2 ч, затем центрифугировали при $20\,000 \pm 200$ об./мин в течение 30 ± 5 мин. Получали надосадочную жидкость – антиген №1. Для получения второй фракции осадок, оставшийся после получения первой фракции, растворяли в 2,5%-м растворе натрия хлорида в соотношении 1:1 и помещали в ультразвуковой дезинтегратор, где разрушали при частоте 44 кГц в течение 30 ± 5 мин. Затем центрифугировали при $12\,000 \pm 500$ об./мин в течение 40 ± 5 мин. Получали надосадочную жидкость – антиген №2. Для получения третьей фракции осадок, оставшийся после получения второй фракции, экстрагировали в 2,5%-м растворе натрия хлорида в холодильнике в течение 24 ± 2 ч. Далее центрифугировали при $20\,000 \pm 200$ об./мин в течение 30 ± 5 мин. Получали надосадок – антиген №3. Полученные три порции водорастворимых антигенов (антигены №№ 1, 2 и 3) объединяли, помещали в вязкие мешки и проводили диализ против дистиллированной воды в холодильной камере при температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$ со сменой воды через 24 ± 4 ч в течение 48 ч. О завершении диализа судили по отсутствию в диализной воде солей натрия хлорида, которые определяли качественной реакцией с помощью 0,06 М раствора азотнокислого серебра. Проводили контроль специфической активности и специфичности антигена в реакции иммунодиффузии (РИД). Концентрацию белка Чум-Аг определяли согласно ОФС.1.2.3.0012.15 спектрофотометрическим методом при длине волны 280 нм.

Специфическая активность водорастворимого антигенного комплекса (Чум-Аг) составила 1:16. Специфичность – Чум-Аг не давал в РИД положительных результатов с гетерологичными сыворотками, т.е. зоны преципитата отсутствовали.

В работе использовали 7 экспериментальных серий полученного антигена.

Исследовали интактные водные растворы водорастворимых антигенов чумного микроба (1 мг/мл), кислотные гидролизаты и дериваты образцов. Для проведения анализов применялись реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США): дансил-гидразин, трифторуксусная кислота >99,00%, D-глюкоза, N-ацетил-D-галактозамин, D-галактозамин, D-рибоза, ацетонитрил >99,93%, ацетат аммония >98,00%, фосфатно-солевой буфер, pH 7,4.

Гидролиз проводили 2М трифторуксусной кислотой при температуре 99°C с последующим испарением кислоты при пониженном давлении и температуре 30°C [18]. Для дериватизации 9 мкл 1%-го раствора дансилгидразина в этаноле смешивали с 1 мкл 10 мМ фосфатно-солевого буфера pH 7,4 и 10 мкл 10 мМ раствора моно/олигосахарида или гидролизата и инкубировали при 65°C в течение 20 мин [19].

Спектрофотометрию всех серий водного раствора антигенов осуществляли в 10 повторах при диапазоне 180–800 нм

на спектрофотометре NanoDrop 2000C (ThermoScientific, США).

Исследование белкового состава каждой серии препарата проводили методом капиллярного электрофореза на чипе для анализа ДНК с помощью автоматической системы Experion System (Bio-Rad, США). Обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения Experion Software, Version 3.2.

Хроматографический анализ делали в обращенно-фазовом режиме с применением стандартных образцов моносахаридов (D-рибоза, D-глюкоза, N-ацетил-D-галактозамин, D-галактозамин). Для каждой серии получали 5 хроматограмм. Использовали следующее оборудование: высокоэффективный жидкостной хроматограф Ultimate 3000 (DionexCorp., США); колонка Reprosil-PurC18-Aq длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, размер частиц 5 мкм, и предколонка Acclaim® 120 C18 длиной 10 мм и внутренним диаметром 2 мм, размер частиц 5 мкм (Dr.Maisch, Германия). Регистрацию сигнала осуществляли с помощью флуоресцентного детектора FLD-3100 при длине волны возбуждения и эмиссии 336 и 530 нм соответственно. Элюирование вели в градиентном режиме с применением двух подвижных фаз. Фаза А – 0,1 М ацетат аммония в воде pH 6,8, фаза В – ацетонитрил. Градиент: 0–1 мин – 85% А; 1–8 мин – 85–60% А; 8–11 мин – 60% А; 11–12 мин – 60–85% А; 12–15 мин – 85% А. Скорость потока 1,0 мл/мин, объем вводимого образца 5 мкл, температура колонки 30°C . Формирование и обработку хроматограмм проводилось в программе Chromeleon v. 6.80 (DionexCorp., США).

Количественное определение белков и нуклеиновых кислот проводили методом специфической флуориметрии на приборе Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, США) с использованием наборов реактивов Qubitds DNA HS Assay Kit (Invitrogen, США), Qubit RNA HS Assay Kit (Invitrogen, США) и Qubit Protein Assay Kit (Invitrogen, США).

В качестве биомодели использовали белых лабораторных мышей: 4 группы по 30 особей в каждой. Иммунизировали экспериментальным препаратом «Вакцина чумная живая», полученным методом глубинного культивирования, в дозах – $8 \cdot 10^2$, $4 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^4$ и $1 \cdot 10^5$ живых микробных клеток (ж.м.к.) – подкожно в объеме 0,2 мл.

Кровь для исследования брали из сердца в объеме 1,0–1,5 мл до вакцинации у интактных животных (контрольная группа), а также на 7, 14 и 21-е сутки после иммунизации (у 6 животных из каждой группы). Опыты проведены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕС) и одобренных комитетом по биомедицинской этике НИИ физиологии СО РАМН.

Интенсивность антигенреактивности лимфоцитов определяли в клеточных тестах *in vitro*, анализируя количество CD45⁺CD3⁺CD25⁺-лимфоцитов с использованием конъюгированных с флуорохромами моноклональных антител (Beckman Coulter, США). В качестве специфического антигена использовали комплекс водорастворимых антигенов чумного микроба. В контрольной пробе с целью выявления возможной спонтанной активации лимфоцитов клетки обрабатывали стерильным 0,9%-м изотоническим раствором натрия хлорида, pH 7,2. Натрий хлористый (ГОСТ 4233-77, хч, чда) служит для поддержания изотоничности среды и

окислительно-восстановительного потенциала, натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный (ГОСТ 4172-76, чда) используется как регулятор кислотности и стабилизатор.

Учет результатов производили с помощью проточного цитометра FACS Calibur с программным обеспечением CellQuest Pro (Becton Dickinson, США).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартных статистических программ: определяли среднее значение анализируемого показателя (M), ошибку средней арифметической (m). Достоверность уровня различий сравниваемых величин оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Для каждой серии интактного образца комплекса водорастворимых антигенов были получены характерные спектры поглощения, которые содержали два максимума при 230 и 260 нм и локальный минимум при 232–238 нм, повторяющиеся от серии к серии (рис. 1). Все это указывает на соблюдение технологии и идентичность состава получаемых образцов.

Оценивая соотношения значений поглощений при 260/280 нм и 260/230 нм, можно судить о присутствии в анализируемых образцах белка и примесей нуклеиновых кислот. Значения их для раствора Чум-Аг составляют $A_{260/280}$ $1,6 \pm 0,05$ и $A_{260/230}$ $0,6 \pm 0,05$, что свидетельствует о большом количестве белка в образцах и подтверждается данными специфичной флуориметрии: концентрация белка – $0,216 \pm 0,00002$ мг/мл. Количество примесей нуклеиновых кислот по сравнению с белками незначительно и составляет: ДНК – $0,00441 \pm 0,00002$ мг/мл, РНК – $0,00328 \pm 0,00002$ мг/мл, что указывает на относительную чистоту получаемого образца. На наш взгляд, именно с этим связано отсутствие спонтанной активации лимфоцитов.

Состав белковых фракций препарата охарактеризовали на основании данных капиллярного электрофореза. Установлено, что исследуемые образцы включают белки в диапазоне молекулярных масс от 9 до 73 кДа. Выявлены основные фракции со средней молекулярной массой $9,11 \pm 0,25$; $14,71 \pm 0,07$; $23,58 \pm 0,05$ и $30,25 \pm 0,22$ кДа. Следует отметить, что наибольший вклад в содержание веществ белковой природы в образцах (до 38%) вносит фракция с наименьшей средней массой (~9 кДа). При исследовании водных растворов образцов, не содержащих восстановителя, электрофореграммы дополнительно включали пики слабой интенсивности с молекулярной массой >96 кДа, что связано с восстановлением дисульфидных связей в соответствующих высокомолекулярных белках в присутствии 2-меркаптоэтанола.

При высокоэффективной жидкостной хроматографии анализ образцов проводили с использованием флуоресцентной метки, поскольку детекция нативных углеводов оптическими методами имеет низкую чувствительность и недостаточную селективность вследствие отсутствия хромофорных групп. Введение флуоресцентных заместителей на функциональные группы молекул сахаров является одним из наиболее эффективных способов как повышения чув-

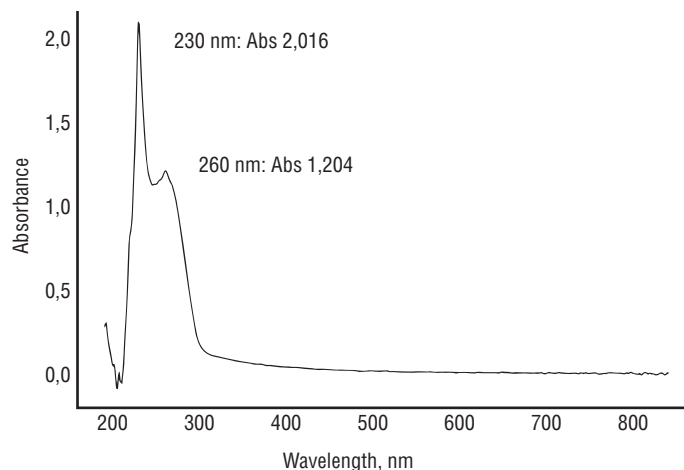


Рис. 1. Спектр УФ-поглощения водорастворимого антигена.
Fig. 1. UV absorption spectrum of water-soluble antigen.

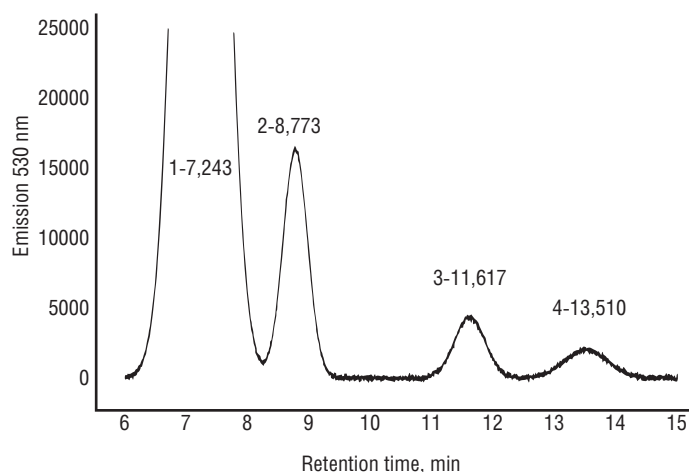


Рис. 2. Фрагмент хроматограммы водорастворимого антигена.
Fig. 2. The fragment of chromatogram of water-soluble antigen.

ствительности, так и одновременного улучшения селективности разделения.

Полученные хроматограммы образцов разных серий Чум-Аг показали идентичность полисахаридного состава и содержали общий пик с временем удерживания $8,77 \pm 0,13$ мин (рис. 2).

Данный пик принадлежит полисахаридам, входящим в белковый комплекс антигена. Этот вывод был сделан после получения пик-листов соответствующих гидролизатов. На хроматограммах присутствовали пик глюкозы (время удерживания $9,29 \pm 0,15$ мин) и минорные сигналы с большим временем удерживания ($12,66 \pm 0,1$ и $13,52 \pm 0,12$ мин), принадлежащие рибозе и глюкозамину (рис. 3).

Отсутствие пика с временем удерживания $8,77 \pm 0,13$ мин связано с гидролизом входящих в состав полисахаридов на соответствующие мономеры. При этом побочные продукты дериватизации элюировались через $7,22 \pm 0,02$ мин и $11,56 \pm 0,1$ мин на всех хроматограммах. Воспроизводимость хроматографических профилей образцов разных серий Чум-Аг составила $98,0 \pm 0,5\%$, что свидетельствует о стандартности технологического процесса и получаемых продуктов.

Таким образом, экспериментальные серии водорастворимого антигена были исследованы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлено, что в состав полисахаридного комплекса входят глюкоза, рибоза

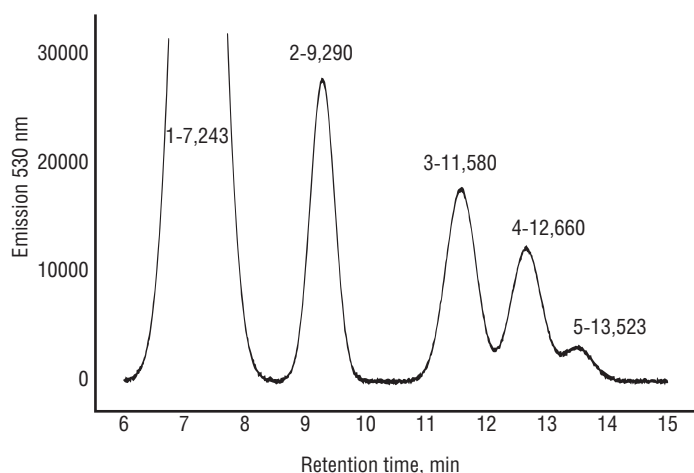


Рис. 3. Фрагмент гидролизованного водорастворимого антигена.
Fig. 3. The fragment of hydrolyzed water-soluble antigen.

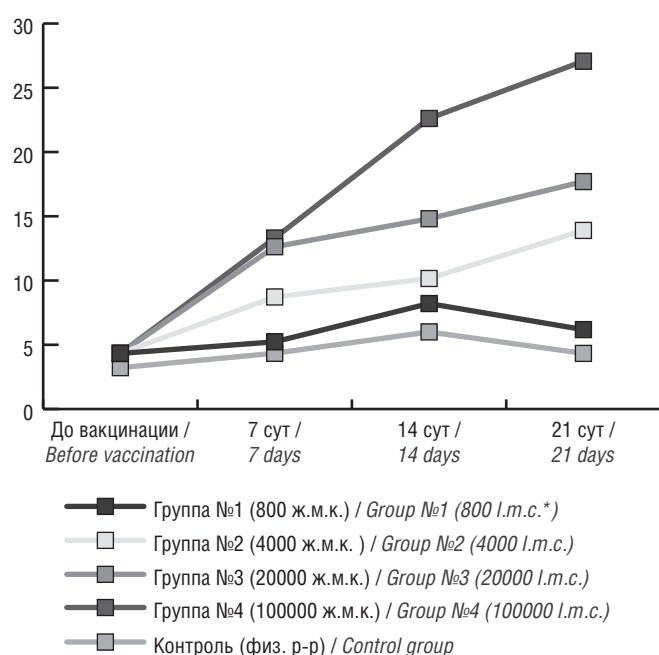


Рис. 4. Динамика количества специфически активированных лимфоцитов (CD25-позитивных) в крови у животных из групп сравнения.

Fig. 4. Dynamics of the number of specifically activated lymphocytes (CD25-positive) in the blood of animals from the comparison groups. (i.m.c.* – living microbial cells).

и глюкозамин. Описаны основные параметры спектров поглощения и состав белковых фракций комплекса водорастворимых антигенов. Показана стабильность характеристик всех полученных экспериментальных серий.

Стандартизация препарата по качественному составу основных показателей позволяет эффективно использовать его для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета в клеточных тестах *in vitro* в качестве специфического антигена при активации лимфоцитов.

На следующем этапе работы проведено исследование по оценке иммуногенной активности на белых мышах методом проточной цитометрии.

В ходе эксперимента у интактных животных (контрольная группа) количество лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации, при воздействии комплекса водорастворимых антигенов составило $4,33 \pm 0,48\%$, при воздействии 0,9%-м раствором натрия хлорида – $3,22 \pm 0,36\%$.

Во все периоды обследования спонтанной активации лимфоцитов не зафиксировано. У вакцинированных животных средний фоновый уровень количества лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации, при воздействии 0,9%-м раствором натрия хлорида на 7, 14 и 21-е сутки после иммунизации составил $5,19 \pm 1,04\%$ (рис. 4).

На 7, 14 и 21-е сутки у животных, иммунизированных дозой $8 \cdot 10^2$ ж.м.к., содержание лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD25, оставалось на уровне контрольных значений.

У мышей, иммунизированных дозой $4 \cdot 10^3$ ж.м.к., на 21-е сутки содержание лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации, после стимуляции антигеном повышалось и составляло $13,9 \pm 2,72\%$. Количество антигенстимулированных клеток у животных, иммунизированных дозой $2 \cdot 10^4$ ж.м.к., на 14-е сутки составляло $14,81 \pm 3,15\%$, на 21-е сутки – $17,7 \pm 0,93\%$.

При иммунизации дозой $1 \cdot 10^5$ ж.м.к. увеличение количества лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD25 в условиях стимуляции водорастворимым антигеном, отмечалось на 7, 14 и 21-е сутки: до $13,31 \pm 2,3\%$; $22,61 \pm 1,62\%$ и $27,07 \pm 1,96\%$, что статистически выше контрольных значений ($p > 0,05$).

Анализ результатов исследования показал, что у животных групп №2, 3, 4 наивысший уровень экспрессии лимфоцитами маркера активации при антигенной стимуляции *in vitro* регистрировался на 21-е сутки после иммунизации, при этом количество CD25-позитивных лимфоцитов было выше, чем в контрольной группе, на $9,57$ – $22,74\%$, что дает возможность судить об иммунном ответе в ранние сроки после вакцинации против чумы.

Выводы

В результате проведенных исследований показана возможность использования комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба в качестве специфического активатора иммунных клеток при оценке формирования поствакцинального противочумного иммунитета.

Полученные данные легли в основу оформления нормативной документации на «Антигенный водорастворимый комплекс из штамма *Yersinia pestis* EV лиофилизированный для клеточных тестов *in vitro* (Чум-Аг)» (Технические условия, Пусковой регламент, Инструкция по применению, проект маркировки первичной и вторичной упаковки).

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Financial support

The work was carried out within the framework of budget funding.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Кутырев ВВ, Бывалов АА. Современное состояние проблемы совершенствования средств вакцинопрофилактики чумы. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011;2:97-104.
2. Фирстова ВВ, Дятлов ИА, Караулов АВ. Иммунологические аспекты чумы. Иммунология. 2016;37(1):61-63.
3. Литвинова ЛС, Гуцол АА, Сохоневич НА, Кофанова КА, Хазиахматова ОГ, Шуплецова ВВ, и др. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов. Медицинская иммунология. 2014;1:7-29.
4. Holling TM, Schooten E, van Den Elsen PJ. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. Hum Immunol. 2004 Apr;65(4):282-90. DOI: 10.1016/j.humimm.2004.01.005
5. Богачева НВ, Крючков АВ, Дармов ИВ, Воробьев КА, Печенкин ДВ, Елагин ГД, и др. Экспериментальная оценка методом проточной цитофлуориметрии уровня клеточной иммунологической памяти у лиц, вакцинированных против чумы и сибирской язвы. Клиническая лабораторная диагностика. 2013;11:48-53.
6. Трусов ГА, Чапленко АА, Семенова ИС, Мельникова ЕВ, Олефир ЮВ. Применение проточной цитометрии для оценки качества биомедицинских клеточных продуктов. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018;18(1):16-24. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-16-244
7. Киреев МН, Громова ОВ, Борисова СВ, Воробьева СА, Вольников ВР, Салихов РР, и др. Биотехнологический потенциал антигенов возбудителей чумы, холеры, туляремии и сибирской язвы, полученных в институте «Микроб». Проблемы особо опасных инфекций. 2024;(2):15-19. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-15-19
8. Фирстова ВВ, Калмантаева ОВ, Горбатов АА, Кравченко ТБ, Тюрин ЕА, Бондаренко НЛ, и др. Оценка специфического гуморального и клеточного иммунитета у людей периодически вакцинирующихся против чумы. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2015;3:62-68.
9. Дубровина ВИ, Корытов КМ, Пятидесятникова АБ, Киселева НО, Войткова ВВ, Брюхова ДД, и др. Опыт применения комплексного антигенного препарата чумного микроба для оценки выраженности специфического противочумного ответа. Acta Biomedica Scientifica. 2021;6(2):41-46. DOI: 10.29413/ABS.2021-6.2.4
10. Фирстова ВВ, Бахтеева ИВ, Титарева ГМ, Зырина ЕВ, Иванов СА, Киселева НВ, и др. Определение экспрессии маркера ранней активации CD69 на лимфоцитах иммунных мышей после стимуляции их антигенами чумного микроба. Проблемы особо опасных инфекций. 2010;1(103):56-59. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-1(103)-56-59
11. Сомов АН, Дубровский АВ, Дунайцев ИА, Иванов СА, Комбарова И, Кочеткова ОЮ, и др. Иммуногенные свойства полиэлектролитных микрокапсул, нагруженных антигенами *Francisella tularensis* или *Yersinia pestis*. Иммунология. 2019;40(5):52-61. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15006
12. Уткин ДВ, Киреев МН, Гусева НП, Каплун ГА, Куклев ВЕ, Осина НА. Разработка биологического микрочипа для выявления антител к антигенам возбудителя чумы. Инфекция и иммунитет. 2019;9(2):393-398.
13. Девдариани ЗЛ, Терешкина НЕ, Тараненко ТМ, Киреев МН, Терехова ИВ, Григорьева ГВ, и др. Результаты модельных экспериментов по конструированию тест-системы иммуноферментной для выявления антител к Ф1 чумного микроба (ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*). Проблемы особо опасных инфекций. 2013;1:74-77. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-74-77
14. Афанасьев ЕН, Тюменцева ИС, Коготкова ОИ, Ляпустина ЛВ, Жарникова ИВ, Савельева ИВ, и др. Разработка новых подходов к получению гипериммунных сывороток для производства медицинских иммунобиологических препаратов. Проблемы особо опасных инфекций. 2010;103:67-69.
15. Афанасьев ЕН, Таран ИФ, Тюменцева ИС. Антигенная структура бруцелл. Сообщ. I. Сравнительная оценка методов выделения водорастворимых антигенов бруцелл. Ставрополь. 1986; 16 с. Деп. в ВНИИТИ, №6635-886.
16. Гостищева СЕ, Абзаева НВ, Ракитина ЕЛ, Пономаренко ДГ, Костюченко МВ, Логвиненко ОВ, и др. Перспективный подход к оценке качества вакцины чумной живой по показателю иммуногенности. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2019;1:50-54.
17. Гостищева СЕ, Абзаева НВ, Ракитина ЕЛ, Пономаренко ДГ, Костюченко МВ, Катунина ЛС, и др. Сравнительный анализ иммуногенной активности чумной вакцины в зависимости от среды выращивания. Проблемы особо опасных инфекций. 2021;2:148-151. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-148-151
18. Yuan X, Zeng Y, Nie K, Luo D, Wang Z. Extraction Optimization, Characterization and Bioactivities of a Major Polysaccharide from *Sargassum thunbergii*. PLoS One. 2015 Dec 9;10(12):e0144773. DOI: 10.1371/journal.pone.0144773
19. Alpenfels WF. A rapid and sensitive method for the determination of monosaccharides as their dansyl hydrazones by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem. 1981 Jun;114(1):153-7. DOI: 10.1016/0003-2697(81)90466-8

References

1. Kutyrev VV, Byvalov AA. The current state of the problem of improving the means of plague vaccination. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2011;2:97-104. (In Russian).
2. Firstova VV, Dyatlov IA, Karaulov AV. Immunological aspects of the plague. Immunology. 2016;37(1):61-63. (In Russian).
3. Litvinova LS, Gutsol AA, Sokhnevich NA, Kofanova KA, Khaziakhmatova OG, Shupletsova VV, et al. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. Medical Immunology (Russia). 2014;16(1):7-26. DOI: 10.15789/1563-0625-2014-1-7-26 (In Russian).
4. Holling TM, Schooten E, van Den Elsen PJ. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. Hum Immunol. 2004 Apr;65(4):282-90. DOI: 10.1016/j.humimm.2004.01.005
5. Bogacheva NV, Kryuchkov AV, Darmov IV, Vorobiev KA, Petchenkin DV, Elagin GD, et al. Experimental evaluation using flow cytofluorometry level cell immunological memory in individuals vaccinated against plague and anthrax. Clinical Laboratory diagnostika. 2013;11:48-53. (In Russian).
6. Trusov GA, Chaplenko AA, Semenova IS, Melnikova EV, Olefir YuV. Use of Flow Cytometry for Quality Evaluation of Biomedical Cell Products. BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2018;18(1):16-24. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-16-24 (In Russian).
7. Kireev MN, Gromova OV, Borisova SV, Vorob'eva SA, Vol'nikov VR, Salikhov RR, et al. Biotechnological Potential of Antigens of Plague, Cholera, Tularemia and Anthrax Pathogens, Obtained at the Russian Research Institute "Microbe". Problems of Particularly Dangerous Infections. 2024;(2):15-19. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-15-19 (In Russian).
8. Firstova VV, Kalmantaeva OV, Gorbatoov AA, Kravchenko TB, Tyurin EA, Bondarenko NL, et al. Evaluation of specific humoral and cellular immunity in people periodically vaccinated against plague. Immunopathology, Allergology, Infectology. 2015;3:62-68. (In Russian).
9. Dubrovina VI, Korytov KM, Petyatetsnikova AB, Kiseleva NO, Voitkova VV, Bryukhova DD, et al. Experience of Using a Complex Antigenic Preparation of the Plague Microbe to Assess the Severity of a Specific Anti-Plague Response. Acta Biomedica Scientifica. 2021;6(2):41-46. DOI: 10.29413/ABS.2021-6.2.4 (In Russian).
10. Firstova VV, Bakhteeva IV, Titareva GM, Zyryna EV, Ivanov SA, Kisseleva NV, et al. Determination of the Expression of CD69 Marker of Early Activation in the Immune Mice Lymphocytes after their Stimulation with Plague Agent Antigens. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2010;1(103):56-59. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-1(103)-56-59 (In Russian).
11. Somov AN, Dubrovsky AV, Dunaytsev IA, Ivanov SA, Kombarova TI, Kochetkova OYu, et al. Immunogenic properties of polyelectrolyte microcapsules loaded with

- Francisella tularensis* antigens or *Yersinia pestis*. Immunology. 2019;40(5):52-61. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-15006 (In Russian).
12. Utkin DV, Kireev MN, Guseva NP, Kaplun GA, Kuklev VE, Osina NA. Development of a biological microchip for the detection of antibodies to antigens of the causative agent of plague. Infection and Immunity. 2019;9(2):393-398. (In Russian).
13. Devdariani ZL, Tereshkina NE, Taranenko TM, Kireev MN, Terekhova IV, Grigor'Eva GV, et al. Results of Modeling Experiments in Designing Immuno-Enzyme Test-System for the Detection of Antibodies to *Yersinia pestis* F1 (ELISA-Ab-F1 *Yersinia pestis*). Problems of Particularly Dangerous Infections. 2013;1:74-77. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-74-77 (In Russian).
14. Afanasyev EN, Tyumentseva IS, Kogotkova OI, Lyapustina LV, Zharnikova IV, Savelieva IV, et al. Development of new approaches to the production of hyperimmune sera for the production of medical immunobiological preparations. Probl. osobo opasn. infek. 2010;103:67-69. (In Russian).
15. Afanasiev EN, Taran IF, Tyumentseva IS. Antigenic structure of *Brucella*. Messaging. I. Comparative evaluation of methods for the isolation of water-soluble antigens brutsell. Stavropol. 1986;16 P. Dep. VINITI, number 6635-B86. (In Russian).
16. Gostischeva SE, Abzaeva NV, Rakitina EL, Ponomarenko DG, Kostyuchenko MV, Logvinenko OV, et al. A promising approach to assessing the quality of live plague vaccine in terms of immunogenicity. Epidemiology and Vaccine Prevention. 2019;1:50-54. (In Russian).
17. Gostischeva SE, Abzaeva NV, Rakitina EL, Ponomarenko DG, Kostyuchenko MV, Katunina LS, et al. Comparative Analysis of the Immunogenic Activity of the Plague Vaccine Depending on the Growing Medium. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2021;2:148-151. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-148-151 (In Russian).
18. Yuan X, Zeng Y, Nie K, Luo D, Wang Z. Extraction Optimization, Characterization and Bioactivities of a Major Polysaccharide from *Sargassum thunbergii*. PLoS One. 2015 Dec 9;10(12):e0144773. DOI: 10.1371/journal.pone.0144773
19. Alpenfels WF. A rapid and sensitive method for the determination of monosaccharides as their dansyl hydrazones by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem. 1981 Jun;114(1):153-7. DOI: 10.1016/0003-2697(81)90466-8
-
- Информация о соавторах:**
- Абзаева Наталья Вячеславовна, кандидат биологических наук, заведующая научно-производственной лабораторией чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-7418-9673
- Ковалев Дмитрий Анатольевич, кандидат химических наук, заведующий лабораторией биохимии ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-9366-5647
- Костроминов Артём Валерьевич, научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-2228-5038
- 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
- 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
- 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
- Пономаренко Дмитрий Григорьевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-0422-6755
- Русанова Диана Владимировна, кандидат медицинских наук, заведующая научно-производственной лабораторией препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-2229-6570
- Иванова Марина Алексеевна, лаборант-исследователь научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-9199-3885
- Гридина Татьяна Михайловна, научный сотрудник лаборатории биологического и технологического контроля ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора
-
- Information about co-authors:**
- Natalia V. Abzaeva, PhD in Biological Sciences, head of the production laboratory of plague vaccine research and production, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-7418-9673
- Dmitry A. Kovalev, PhD in Chemical Sciences, head of the laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-9366-5647
- Artem V. Kostrominov, Researcher of the research and production laboratory of plague vaccines, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-2228-5038
- Andrey M. Zhironov, Researcher at the Laboratory of Biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-7698-7361
- Ekaterina L. Rakitina, PhD, MD, doctor of clinical laboratory diagnostics, sector of immunology and pathomorphology of especially dangerous infectious diseases, brucellosis laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-6073-6544
- Marina V. Kostuchenko, Researcher at the sector of immunology and pathomorphology of especially dangerous infectious diseases, brucellosis laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-6068-6655
- Olga V. Logvinenko, PhD in Biological Sciences, head of sector of immunology and pathomorphology of especially dangerous infectious diseases, brucellosis laboratory, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-1054-8937
- Dmitry G. Ponomarenko, PhD in Biological Sciences, head of the laboratory of brucellosis, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-0422-6755
- Diana V. Rusanova, PhD, MD, Head of the scientific and production laboratory of drugs for the diagnosis of especially dangerous and other infections, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-2229-6570
- Marina A. Ivanova, laboratory research assistant at the research and production laboratory of plague vaccines, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-9199-3885
- Tatyana M. Gridina, Researcher at the laboratory of biological and technological control, Stavropol Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor