

<https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-5-58-63>

Активация *in vitro* Т-хелперов под влиянием антигенов *Yersinia pestis* у людей, вакцинированных против чумы

В. А. Кожевников*, А. Л. Кравцов, О. М. Кудрявцева,
Т. Н. Каштанова, С. А. Бугоркова

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»,
Россия

Резюме

Актуальность. Поиск информативных маркеров для оценки иммунологической эффективности вакцины живой чумной (ВЧЖ) остается актуальной научной задачей. **Цель.** Провести сравнительную оценку уровня активации Т-лимфоцитов хелперов привитых против чумы людей по маркерам CD69 и HLA-DR в тесте *in vitro* с использованием в качестве специфического стимулятора ультразвукового дезинтеграта клеток *Y. pestis*, выращенных при температуре 28°C (УЗДК). **Материалы и методы.** Проведен цитофлуориметрический анализ образцов крови 45 лиц, привитых против чумы. Выявлена зависимость результата цитологического анализа по двум исследуемым клеточным маркерам от показателя иммунорегуляторного индекса у вакцинируемого донора на момент прививки. **Результаты.** Установлено, что для впервые вакцинированных лиц характерна более интенсивная и длительная специфическая активация Т-хелперов по маркеру ранней активации, в то время как у ревакцинированных с иммунорегуляторным индексом на момент прививки выше 1,5 более интенсивная клеточная реакция была по маркеру поздней активации. **Выводы.** Подтверждена возможность количественной оценки иммунологической эффективности вакцинации против чумы, основанной на выявлении маркеров активации лимфоцитов при стимуляции специфическим антигеном.

Ключевые слова: вакцина чумная живая, иммунологическая эффективность, проточная цитофлуориметрия
Конфликт интересов не заявлен.

Для цитирования: Кожевников В. А., Кравцов А. Л., Кудрявцева О. М. и др. Активация *in vitro* Т-хелперов под влиянием антигенов *Yersinia pestis* у людей, вакцинированных против чумы. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2022;21(5): 58–63. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-5-58-63>

Activation of T-helper *in vitro* under the Influence of *Yersinia pestis* Antigens in People Vaccinated against the Plague

VA Kozhevnikov, AL Kravtsov, OM Kudryavtseva, TN Kashtanova, SA Bugorkova
Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Russia

Abstract

Relevance. The search for informative markers for assessing the immunological efficacy of a live plague vaccine remains an urgent scientific task. The goal of the study **Aims** was to make a comparative assessment of the level helper T-cells activation by CD69 and HLA-DR markers, in people, vaccinated against plague, in an *in vitro* test, using the disintegrated by ultrasonic *Y. pestis* cells, grown at temperature 28 °C as a specific stimulator. **Materials & Methods.** A cytofluorimetric analysis of blood samples of 45 individuals vaccinated against the plague was carried out. The dependence of the result of cytological analysis of the two studied cell markers on the immunoregulatory index (IRI) of the vaccinated donor at the time of vaccination was revealed. **Results.** It was found that for newly vaccinated individuals, the T-helpers were more intensive and prolonged by the early activation marker, while for those revaccinated with the immunoregulatory index, at the time of vaccination more than 1.5, the more intense cellular response was by the late activation marker. **Conclusions.** Thus, the possibility of quantitative evaluation of the immunological efficacy of vaccination against plague, based on the identification of lymphocyte activation markers when stimulated with a specific antigen, is confirmed.

Keywords: plague live vaccine, immunological efficacy, flow cytofluorimetry
No conflict of interest to declare.

For citation: Kozhevnikov VA**, Kravtsov AL, Kudryavtseva OM et al. Activation of T-helper *in vitro* under the Influence of *Yersinia pestis* Antigens in People Vaccinated against the Plague. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(5): 58–63 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-5-58-63>

* Для переписки: Кожевников Виталий Александрович, младший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46. +7 (927) 919-84-42, 787868@mail.ru. ©Кожевников В. А. и др.

** For correspondence: Kozhevnikov Vitaly A., junior researcher Department of Immunology Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russia. +7 (927) 919-84-42, 787868@mail.ru. ©Kozhevnikov VA, et al.

Введение

Задача оценки иммунологической эффективности вакцины живой чумной (ВЧЖ), используемой для специфической профилактики чумы, до конца не решена, так как клеточные механизмы антибактериальной защиты при этой инфекции недостаточно изучены [1,2] и нормативная база, регламентирующая определение уровня клеточного противочумного иммунитета у людей, на сегодняшний день отсутствует [2–5]. Успешность решения данной задачи во многом зависит от автоматизации и стандартизации цитологических исследований [6,7], направленных на выявление ключевых параметров реактивности клеток иммунной системы привитых против чумы лиц в условиях *in vitro* [5,8].

Для оценки клеточного противочумного иммунитета у людей предложен проточно-цитофлуориметрический метод *in vitro*, основанный на выявлении маркера ранней клеточной активации CD69 на поверхности CD4⁺ Т-хелперов, стимулированных в крови капсульным антигеном чумного микроба [9]. В других исследованиях [2] интенсивность специфической антигенреактивности Т-лимфоцитов крови человека оценивали методом проточной цитометрии в клеточных тестах *in vitro* по маркерам ранней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации, что позволило установить зависимость результатов анализа от используемого стимулирующего антигена – пестина ПП или комплекса водорастворимых антигенов *Yersinia pestis*. Показана возможность применения антигенного комплекса на основе F1 и клеточных оболочек чумного микроба в антигенспецифических тестах *in vitro*, в которых напряжённость противочумного иммунитета оценивалась по продукции клетками памяти в плазму крови биомаркерных цитокинов [8].

Всё это свидетельствует, что для оценки у людей клеточного противочумного иммунитета в системе *in vitro* продолжается поиск, как новых информативных клеточных маркеров, так и более эффективных специфических стимуляторов иммунного ответа. В случае применения в качестве стимулятора ультразвукового дезинтеграта клеток *Y. pestis*, выращенных при температуре 28 °С (общая фракция антигенов чумного микроба), метод проточной цитометрии регистрировал в тестах *in vitro* более интенсивную специфическую активацию Т-клеток памяти иммунных лабораторных животных, чем при использовании очищенного препарата капсульного антигена [10]. Однако с клетками крови человека такие исследования не проводились.

Цель настоящей работы – оценка уровня активации Т-хелперов привитых против чумы людей по маркерам CD69 и HLA-DR в тесте *in vitro* с использованием в качестве специфического стимулятора иммунного ответа ультразвукового дезинтеграта клеток *Y. pestis*, выращенных при температуре 28 °С.

Материалы и методы

Исследованы образцы крови 45 человек, привитых наочно ВЧЖ из штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Среди обследуемых лиц было 5 человек, впервые вакцинированных ВЧЖ (группа I), 40 человек ревакцинированных (группа II) через 12 месяцев после первичной прививки. Результаты исследования учитывали в различные сроки: до вакцинации и через 1, 6 и 12 месяцев после прививки.

Имунофенотипирование лимфоцитов в образцах цельной крови проводили по Lyse/NoWash протоколу проточно-цитофлуориметрических исследований, разработанному фирмой BD Biosciences (USA) [11], чтобы максимально стандартизировать процедуру пробоподготовки для цитометрического анализа, повысить её производительность и полностью исключить клеточные потери [12]. Для окраски клеток крови применяли четырёхцветный реагент меченых моноклональных антител Cyto-Stat CD45-FITC, CD4-PE, CD8-ECD, CD3-PC5 (Becton Dickinson, USA), с помощью которого в крови определяли относительное содержание Т-хелперов (CD45⁺CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических Т-клеток (CD45⁺CD3⁺CD8⁺) для вычисления индивидуальных значений иммунорегуляторных индексов (ИРИ) [4]. В тесте *in vitro* со специфическим стимулятором интенсивность активации Т-хелперов оценивали через 24 ч инкубации [9].

В качестве специфического стимулятора применяли ультразвуковой дезинтегратор клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ (УЗДК) в 0,9% изотоническом растворе натрия хлорида. Бактерии выращивали на агаре Хоттингера (pH 7,2) в течение 48 часов при температуре 28 °С и инактивировали нагреванием при 60 °С в течение 80 мин. В опытные и контрольные образцы крови (100 мкл) добавляли соответственно по 10 мкл УЗДК или стерильного 0,9% изотонического раствора натрия хлорида для выявления возможной спонтанной активации лимфоцитов [10].

Для определения относительного содержания в опытных и контрольных образцах активированных Т-хелперов с фенотипами CD45⁺CD4⁺CD69⁺ и CD45⁺CD4⁺HLA-DR⁺ применяли четырёхцветный коктейль конъюгированных с флуорохромами моноклональных антител CD45-FITC, HLA-DR – ECD, CD4-PC5, CD69-PC7 (Becton Dickinson, USA). Взвеси меченых моноклональными антителами лейкоцитов исследовали на лазерном проточном цитофлуориметре DakoCytomation (Дания), используя для визуализации, анализа и статистической обработки экспериментальных данных программное обеспечение Summit v. 4.3 Built 2445 (Dako). Коэффициент стимуляции (КС) лимфоцитов крови в условиях *in vitro* рассчитывали по формуле [2]: $КС = (C - D) / C \times 100$ (в %), где С и D – относительный (абсолютный) уровень содержания популяций (субпопуляций) лимфоцитов крови в опытной

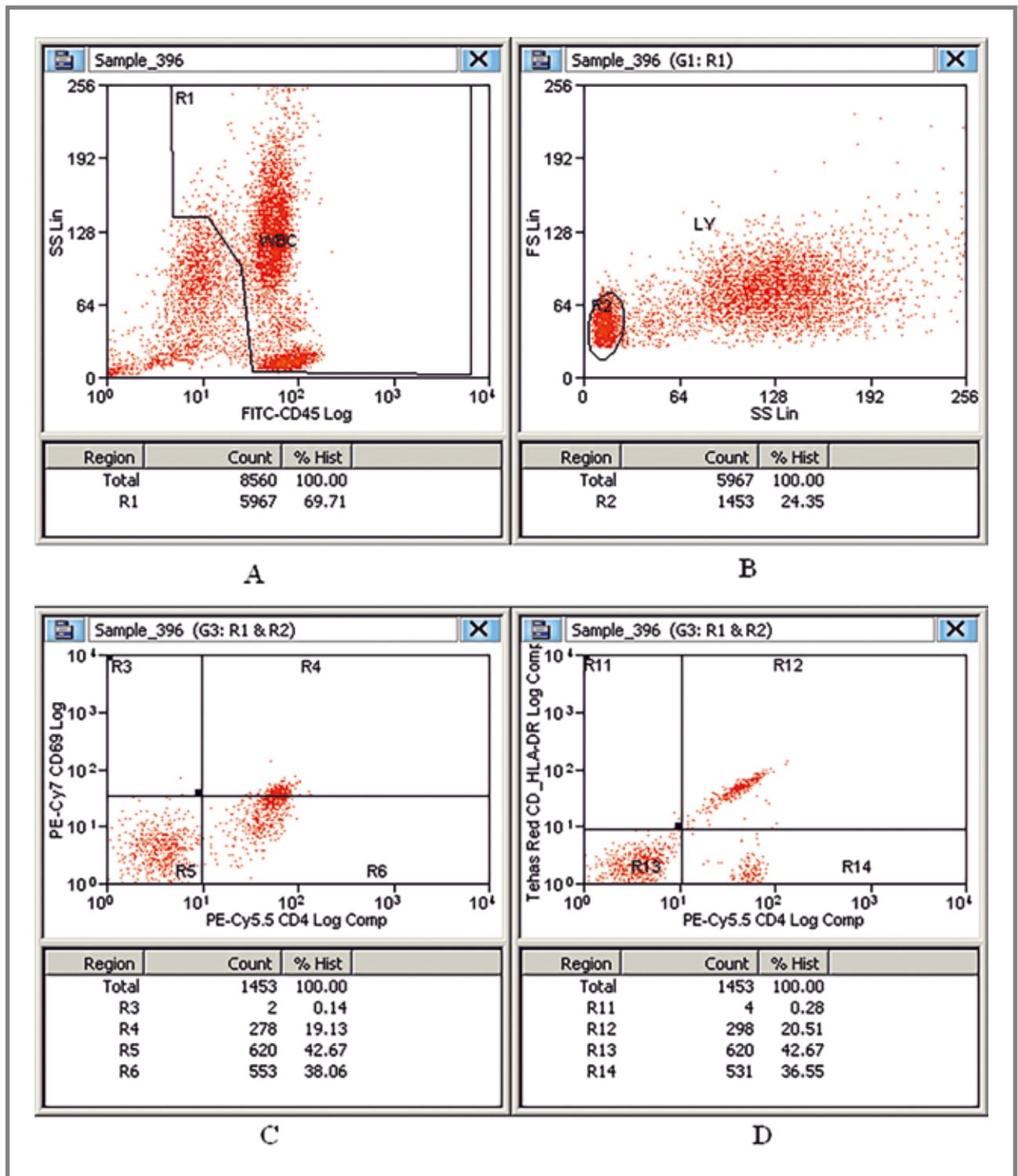
и контрольной пробе соответственно. Для определения статистической значимости различий результатов анализа по исследуемым показателям применяли t-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены характерные цитогаммы, полученные при использовании нами протокола цитометрического анализа, позволяющего идентифицировать CD4⁺ Т-хелперы в общей

Рисунок 1. Протокол экспресс анализа лейкоцитов крови человека с мечеными моноклональными антителами CD45 – FITC, CD4 – PC7, CD69 – PC5.5, HLA-DR – PE для определения степени активации Т-лимфоцитов хелперов по маркерам CD69 и HLA-DR

Figure 1. Protocol for express analysis of human blood leukocytes with labeled monoclonal antibodies CD45 – FITC, CD4 – PC7, CD69 – PC5.5, HLA-DR – PE to determine the degree of activation of T- helper lymphocytes by CD69 and HLA-DR markers



популяции лейкоцитов цельной крови человека и проводить быстрое определение относительно числа клеток этой субпопуляции, положительных по двум исследуемым маркерам активации. Дифференцированные по степени гранулярности цитоплазмы (по боковому светорассеянию, SS – side scatter) неповреждённые лимфоциты, моноциты и гранулоциты отделяли по интенсивной флуоресценции маркера CD45 (CD45⁺ «bright» cells) от слабо флуоресцирующих повреждённых лейкоцитов и клеточного дебриса (CD45⁺ «dim» cells) в область R1 цитограммы (рис. 1 А).

Это позволяло путём гейтирования по R1 – G1:R1 (см. рис. 1. В) автоматически исключать фракцию повреждённых и лизированных клеток из последующего цитометрического анализа. Затем по параметрам светорассеяния на цитограмме выделяли характерную для лимфоцитов крови область R2 и за счёт дополнительного гейтирования по R2 (G3:R1&R2) из анализа исключали моноциты и гранулоциты. В суммарной лимфоцитарной популяции по маркеру CD4 идентифицировали CD4⁺ Т-хелперы и подсчитывали (в %) активированные Т-хелперы, позитивные по маркерам ранней и поздней активации, как клетки с фенотипами CD45⁺CD4⁺CD69⁺ (рис. 1. С) и CD45⁺CD4⁺HLA-DR⁺ (рис. 1. D) соответственно.

По литературным данным известно, что реактивность организма на антигенную стимуляцию зависит от содержания в крови Т-хелперов и, как следствие, от значения ИРИ, определяемого по соотношению CD4⁺/CD8⁺ [13]. Среди обследованных лиц в группе II нами было выделено две подгруппы: А – лица со значениями ИРИ >1,5 (2,1 ± 0,09) и В – с ИРИ < 1,5 (1,3 ± 0,13).

Проведённые исследования показали (табл. 1, 2), что во все сроки обследования Т-хелперы не подвергались *in vitro* спонтанной активации по маркерам CD69 и HLA-DR. Различия по относительному количеству CD45⁺ CD4⁺ CD69⁺ и CD45⁺CD4⁺HLA-DR⁺ лимфоцитов до и после вакцинации (ревакцинации) для контрольных образцов в исследуемых группах были статистически не достоверны.

В опытных образцах крови с добавленным УЗДК до ревакцинации (группа II) регистрировали сравнительно слабую активацию лимфоцитов по исследуемым маркерам, но для подгруппы А этот показатель был выше. Вероятно, у лиц с ИРИ >1,5 к году после прививки ещё сохранялся приобретённый клеточный противочумный иммунитет в отличие от подгруппы В.

Через месяц после вакцинации (группа I) в ответ на стимуляцию лимфоцитов УЗДК отмечали

Таблица 1. Количество активированных *in vitro* Т-хелперов (в %) по маркеру CD69
Table 1. The number of T-helpers activated *in vitro* (in%) for the CD69 marker

Срок обследования Examination period	Группа group		ИРИ immunoregulatory index	Образец		КС, stimulation factor, %
				Опыт (специфическая активация) Experience (specific activation)	Контроль (спонтанная активация) Control (spontaneous activation)	
До вакцинации (ревакцинации) Before vaccination (revaccination)	I		1,8 ± 0,12	3,6 ± 0,62	3,0 ± 0,78	16,7
	II	A	2,1 ± 0,09	6,0 ± 0,35*	4,4 ± 0,47	26,7
		B	1,3 ± 0,13	5,5 ± 0,70	5,0 ± 0,89	9,1
Через 1 месяц после прививки 1 month after vaccination	I		1,9 ± 0,31	16,6 ± 1,80*	5,3 ± 1,65	68,1
	II	A	2,3 ± 0,23	9,6 ± 1,14*	3,3 ± 0,61	65,6
		B	1,1 ± 0,07	7,5 ± 1,72	5,4 ± 1,57	28,0
Через 6 месяцев после прививки 6 months after vaccination	I		2,0 ± 0,14	14,5 ± 2,32*	7,4 ± 1,40	48,9
	II	A	2,2 ± 0,10	9,7 ± 1,91	6,4 ± 1,53	34,0
		B	1,2 ± 0,25	7,9 ± 2,23	6,1 ± 2,07	22,8
Через 1 год после прививки 1 year after vaccination	I		1,8 ± 0,16	8,4 ± 1,14*	4,6 ± 0,52	45,2
	II	A	2,0 ± 0,21	10,8 ± 1,11*	4,1 ± 0,94	62,0
		B	1,1 ± 0,15	9,1 ± 2,77	4,9 ± 1,63	46,2

Примечание: *достоверность различия опыта и контроля ($p < 0,05$).
Note: *significance of differences between experiment and control ($p < 0,05$).

Таблица 2. Количество активированных *in vitro* Т-хелперов (в %) по маркеру HLA-DR
 Table 2. The number of T-helpers activated *in vitro* (in %) for the HLA-DR marker

Срок обследования Examination period	Группа group	ИРИ immuno- regulatory index	Образец		КС,% stimulation factor,%
			Опыт (специфическая активация) Experience (specific activation)	Контроль (спонтанная активация) Control (spontaneous activation)	
До вакцинации (ревакцинации) Before vaccination (revaccination)	I	>1,5	10,7 ± 0,46	10,2 ± 0,35	4,7
	II	A	11,3 ± 0,41*	9,8 ± 0,32	13,3
		B	<1,5	11,5 ± 0,93	11,0 ± 1,10
Через 1 месяц после прививки 1 month after vaccination	I	>1,5	10,5 ± 1,53	11,9 ± 2,08	- 13,3
	II	A	12,0 ± 1,04	11,7 ± 0,53	2,5
		B	<1,5	11,2 ± 1,07	11,8 ± 0,87
Через 6 месяцев после прививки 6 months after vaccination	I	>1,5	9,9 ± 1,47	11,1 ± 1,69	- 12,1
	II	A	13,0 ± 1,11*	10,3 ± 0,86	20,8
		B	<1,5	12,2 ± 0,94	12,8 ± 1,02
Через 1 год после прививки 1 year after vaccination	I	>1,5	10,9 ± 1,40	8,9 ± 1,16	18,3
	II	A	12,8 ± 0,71	10,3 ± 0,55	19,5
		B	<1,5	11,1 ± 0,68	10,0 ± 0,78

Примечание: * достоверность различия опыта и контроля ($p < 0,05$).

Note: *significance of differences between experiment and control ($p < 0.05$).

статистически достоверное увеличение в образцах крови содержания клеток с фенотипом CD45⁺ CD4⁺ CD69⁺ (в 3 раза выше, чем до прививки) и значимое ($p < 0,001$) увеличение КС. У добровольцев из группы II также регистрировали интенсивную активацию Т-хелперов по маркеру CD69, но преимущественно в подгруппе А. В подгруппе В, несмотря на увеличение КС в 3 раза, различие по количеству активных Т-хелперов CD69 в ответ на специфическую стимуляцию до и через 1 месяц после ревакцинации было недостоверным.

Через 6 и 12 месяцев после прививки (группа I) сохранялся достоверный сдвиг в сторону активации Т-хелперов по CD69. В группе II также наблюдали, но только через 12 месяцев после ревакцинации, активацию Т-хелперов по маркеру CD69, причем значительную в подгруппе А. В подгруппе В, несмотря на тенденцию некоторого увеличения доли Т-хелперов CD69 в ответ на специфическую стимуляцию, достоверного отличия показателей в опыте и контроле не наблюдали.

Экспрессия лимфоцитами антигена DR главного комплекса гистосовместимости II класса ассоциирована с их поздней и длительной активацией. Считается, что усиление экспрессии рецептора HLA-DR на поверхности Т-хелперов вакцинированных против чумы доноров под влиянием антигенов *Y. pestis* свидетельствует о наличии циркулирующих

в крови Т-клеток памяти, способных эффективно распознавать антигены чумного микроба и стремительно активироваться [5]. В наших исследованиях, при использовании в качестве специфического антигена УЗДК, достоверное увеличение доли клеток с фенотипом CD45⁺CD4⁺HLA-DR⁺ было зарегистрировано до ревакцинации и через 6 месяцев после прививки только в подгруппе А.

Заключение

Таким образом, комплекс антигенов, входящих в состав ультразвуковых дезинтеграторов клеток чумного микроба, обладает стимулирующим потенциалом *in vitro* в отношении Т-хелперов вакцинированных против чумы доноров. Максимумы антигенспецифической активности по маркерам CD69 и HLA-DR приходятся соответственно на 1-й и 6-й месяцы после прививки, что согласуется с результатами, ранее полученными в опытах с капсульным антигеном чумного микроба [9] и комплексом водорастворимых антигенов *Y. pestis* [2]. Установлена зависимость результата цитологического анализа по двум исследуемым клеточным маркерам от показателя ИРИ у вакцинируемого донора на момент прививки. Для лиц, впервые вакцинированных, была характерна более интенсивная и длительная активация Т-хелперов по маркеру ранней активации,

в то время как у ревакцинированных (подгруппа А) более интенсивной клеточная реакция была по маркеру поздней активации.

Полученные в работе экспериментальные данные подтверждают возможность количественной

оценки иммунологической эффективности вакцинации против чумы по эпидемическим основаниям, основанной на выявлении маркеров активации лимфоцитов при стимуляции специфическим антигеном.

Литература

1. Silva M.T., Restana N.T. The in vivo life of facultative intracellular bacterial parasites: role in pathogenesis. *Immunobiology* 2013; 218(3):325–337. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.05.0112>.
2. Куличенко А. Н., Абзаева Н. В., Гостищева С. Е. и др. Использование антигенспецифических клеточных тестов in vitro для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(2): 203–8. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-2-203-208
3. Богачёва Н. В., Крючков А. В., Дармов И. В. и др. Экспериментальная оценка методом проточной цитофлуориметрии уровня клеточной иммунологической памяти у лиц, вакцинированных против чумы и сибирской язвы. *Клин. лаб. Диагностика*. 2013; 1:48–53.
4. Бугоркова С. А., Шуковская Т. Н., Микшис Н. И. и др. Комплексное иммунологическое исследование вакцинированных живой чумной вакциной лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного очага чумы в Республике Калмыкия. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(3):38–50. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-3-38-50
5. Дятлов И. И., Фирстова В. В., Бондаренко Н. Л. и др. Стратегия оценки поствакцинального иммунитета против чумы и туляремии. *Аллергология и иммунология*. 2016; 17(2):112–4.
6. Bolton D., Roederer M. Flow cytometry and the future of vaccine development. *Expert Rev. Vaccines*. 2009; 8(6):779–789.
7. Кравцов А. Л., Шмелькова Т. П., Ключева С. Н., Смолькова Е. А. Применение проточной цитометрии при разработке вакцин против особо опасных инфекций: современные достижения и перспективы. *Эпидемиол. и Вакцинопрофил.*, 2011; 4(59):53–60.
8. Дубровина В. И., Корытов К. М., Пятидесятникова А. Б. и др. Опыт применения комплексного антигенноопроба для оценки выраженности специфического противочумного ответа. *Acta biomedica scientifica*. 2021; 6(2):41–46. doi: 10.29413/ABS.2021-6.2.4
9. Firstova V.V., Tyurin E.A., Kravchenko T.B., et al. The in vitro evaluation of anti-plague cellular immunity by quantitative analysis of IFN- α synthesis and the appearance of activation molecules on the surface of T-helper cells. In: Almeida A.M.P. and Leal N.C., editors. *Advances in Yersinia Research. Advances in Experimental Medicine and Biology* 954. Springer Science + Business Media New York; 2012. P. 173–7. DOI 10.1007/978-1-4614-3561-7_22
10. Leal E.A., Moreira J.D., Nunes F.F., et al. Humoral and cellular immune response of mice challenged with *Yersinia pestis* antigenic preparations. *Braz. J. Infect. Diseases*. 2017; 21(6):620–6. DOI: 10.1016/j.bjid.2017.09.001
11. Direct Immunofluorescence Staining of Whole Blood using a Lyse/No-Wash Procedure. *BD Bioscience Resources and Tools*. Доступно на: <https://www.bdbioscience.com/en-us/resources/protocols/stain-lyse-no-wash>.
12. Vera E.J., Chew Y.V., Nicholson L., et al. Standardization of flow cytometry for whole blood immunophenotyping of islet transplant and transplant clinical trial recipients. *PLoS ONE*. 2019; 22; 14(5):e0217163. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217163>.
13. Макарова В. Г., Устинова О. Ю., Долгих О. В., Зазумённых А. Д. Иммунологический профиль и состояние поствакцинального иммунитета к инфекциям, управляемым средствами иммунопрофилактики у детей в условиях комбинированной аэрогенной экспозиции химическими веществами техногенного происхождения. *Здоровье населения и среда обитания*. 2013; 11(248):27–29.

References

1. Silva M.T., Restana N.T. The in vivo life of facultative intracellular bacterial parasites: role in pathogenesis. *Immunobiology* 2013; 218(3):325–337. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.05.011>.
2. Kulichenko A.N., Abzaeva N.V., Gostishcheva S.E., et al. The use of antigen-specific in vitro cell tests to assess the formation of post-vaccination anti-plague immunity. *Infection and immunity*. 2017; 7(2): 203–8 (In Russ.). DOI: 10.15789/2220-7619-2017-2-203-208
3. Bogacheva N.V., Kryuchkov A.V., Darmov I.V., et al. Experimental evaluation of the level of cellular immunological memory by flow cytometry in individuals vaccinated against plague and anthrax. *Wedg. lab. diagnostics* 2013; 11:48–53 (In Russ.).
4. Bugorkova S. A., Shchukovskaya T. N., Mikshis N. I., et al. Comprehensive immunological study of persons vaccinated with a live plague vaccine, living in the territory of the Caspian sandy focus of plague in the Republic of Kalmykia. *Epidemiology and vaccination*. 2018; 17(3):38–50 (In Russ.). DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-3-38-50.
5. Dyatlov I.I., Firstova V.V., Bondarenko N.L., Karaulov A.V. Strategy for assessing post-vaccination immunity against plague and tularemia. *Allergology and Immunology*. 2016; 17(2):112–4 (In Russ.).
6. Volton D., Roederer M. Flow cytometry and the future of vaccine development. *Expert Rev. Vaccines*. 2009; 8(6): 779–789.
7. Kravtsov A.L., Shmelkova T.P., Klyueva S.N., Smolkova E.A. The use of flow cytometry in the development of vaccines against especially dangerous infections: current achievements and prospects. *Epidemiol. and Vaccinoprofil.* 2011; 4(59):53–60 (In Russ.).
8. Dubrovina, Korytov, Pyatidesyatnikova A.B., et al. Experience in the use of complex antigenic preparation of a plague microbe to assess the severity of a specific anti-plague response. *Acta biomedica scientifica*. 2021; 6(2):41–46 (In Russ.). doi: 10.29413/ABS.2021-6.2.49
9. Firstova V.V., Tyurin E.A., Kravchenko T.B., et al. The in vitro evaluation of anti-plague cellular immunity by quantitative analysis of IFN- α synthesis and the appearance of activation molecules on the surface of T-helper cells. In: Almeida A.M.P. and Leal N.C., editors. *Advances in Yersinia Research. Advances in Experimental Medicine and Biology* 954, DOI 10.1007/978-1-4614-3561-7_22, Springer Science + Business Media New York; 2012. P. 173–7.
10. Leal E.A., Moreira J.D., Nunes F.F., et al. Humoral and cellular immune response of mice challenged with *Yersinia pestis* antigenic preparations. *Braz. J. Infect. diseases*. 2017; 21(6):620–6. DOI: 10.1016/j.bjid.2017.09.001
11. Direct Immunofluorescence Staining of Whole Blood using a Lyse/No-Wash Procedure. *BD Bioscience Resources and Tools*. Available at: <https://www.bdbioscience.com/en-us/resources/protocols/stain-lyse-no-wash>.
12. Vera E.J., Chew Y.V., Nicholson L., et al. Standardization of flow cytometry for whole blood immunophenotyping of islet transplant and transplant clinical trial recipients. *PLoS ONE*. 2019; 22; 14(5):e0217163. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217163>.
13. Makarova V.G., Ustinova O.Yu., Dolgikh O.V., Zagumenykh A.D. Immunological profile and the state of post-vaccination immunity to infections controlled by means of immunoprophylaxis in children under conditions of combined aerogenic exposure to chemicals of technogenic origin. *Population health and habitat*. 2013; 11(248):27–29 (In Russ.).

Об авторах

- **Виталий Александрович Кожевников** – младший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46.
- **Александр Леонидович Кравцов** – д. б. н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46.
- **Ольга Михайловна Кудрявцева** – к. б. н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46.
- **Татьяна Николаевна Каштанова** – младший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46.
- **Светлана Александровна Бугоркова** – д. м. н., заведующая отделом иммунологии ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46.

Поступила: 20.04.2022. Принята к печати: 20.09.2022.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

About the Authors

- **Vitaliy A. Kozhevnikov** – Junior Researcher, Immunology Department, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russia.
- **Alexander L. Kravtsov** – Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russia.
- **Olga M. Kudryavtseva** – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russia.
- **Tatyana N. Kashtanova** – Junior Researcher, Immunology Department, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russia.
- **Svetlana A. Bugorkova** – Dr. Sci. (Med.), head of the department of immunology of Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russia.

Received: 20.04.2022. Accepted: 20.09.2022.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.