

Оценка иммунологической эффективности вакцинации против чумы в активном природном очаге.

Сообщение 1.

Цитокиновый и иммуноглобулиновый статус

К.М. Корытов¹, В.В. Войткова¹, В.И. Дубровина¹ (dubrovina-valya@mail.ru),
А.К. Носков¹, А.И. Мищенко², С.В. Балахонov¹

¹ ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзора (adm@chumin.irkutsk.ru), Иркутск

² ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора, Горно-Алтайск

Резюме

В работе представлены данные комплексного исследования иммунного статуса людей, вакцинированных живой чумной вакциной ЕВ, постоянно проживающих и осуществляющих свою трудовую деятельность на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы, который в настоящее время проявляет высокую эпидемическую активность. Показано, что у 93% вакцинированных развивалась положительная сероконверсия через 1 месяц после проведения иммунизации, но уже через 6 месяцев защитные титры антител значительно снижались и не превышали диагностического уровня. При этом выявленные изменения концентраций основных классов иммуноглобулинов варьировали в пределах физиологической нормы. Кроме того, установлено повышение продукции TNF- и IFN- клетками крови через 1 месяц после вакцинации, что может свидетельствовать о развитии у иммунизированных против чумы людей клеточного иммунного ответа и подтверждает превалирующую роль клеточных реакций над гуморальными.

Ключевые слова: эпидемический очаг, вакцинация, чума, иммуноглобулины, цитокины.

Immunological Efficiency of Plague Vaccination in the Active Natural Focus. Report 1. Cytokine and immunoglobulin status

K.M. Korytov¹, V.V. Voitkova¹, V.I. Dubrovina¹ (dubrovina-valya@mail.ru),
A.K. Noskov¹, A.I. Mishchenko², S.V. Balakhonov¹

¹ Federal Budgetary Institution of Public Health «Irkutsk Antiplague Research Institute» of Federal Service of Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (adm@chumin.irkutsk.ru)

² Federal Budgetary Institution of Public Health «Altai Antiplague Station Federal Service of Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing», Gorno-Altai

Abstract

Some data of the complex immune status study of humans vaccinated with live plague vaccine EV are represented. These people constantly reside and work at the territory of Gorno-Altai high-mountain natural plague focus that today demonstrates high epidemic activity. It was shown that 93% of the vaccinated humans developed positive seroconversion in 1 month after immunization, but after 6 months the protective antibody titers significantly decreased and did not exceed the diagnostic level. At the same time the revealed changes of the main immunoglobulin concentrations ranged within the physiological norm. Furthermore, increased production of TNF- and IFN- in blood cells in 1 month after vaccination may indicate the development of cellular immune response in humans immunized against plague and confirms the predominant role of cellular response in comparison with humoral reactions.

Key words: epidemic focus, vaccination, plague, immunoglobulin, cytokine.

Чума – природно-очаговое особо опасное инфекционное заболевание, возбудителем которого является *Yersinia pestis*. На территории Российской Федерации зарегистрировано 11 природных очагов чумы. В настоящее время Горно-Алтайский высокогорный природный очаг, расположенный на территории Кош-Агачского района Республики Алтай, является одним из наиболее активных. Повышение эпидемического потенциала этого очага связывают с появлением штамма

возбудителя чумы основного подвида *Y. pestis* ssp. *pestis* с высокой вирулентностью. За последние три года в Кош-Агачском районе Республики Алтай зарегистрировано три спорадических случая заболевания местных жителей бубонной чумой [1, 2]. Данное обстоятельство послужило причиной проведения комплекса противоэпидемических мероприятий, включающих массовый охват населения, проживающего на данной территории, профилактической иммунизацией согласно Федеральному закону

от 17.09.1998 № 157 ФЗ «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней» и Приказу Минздравсоцразвития Российской Федерации от 31.01.2011 № 51н «О национальном календаре профилактических прививок и календаре профилактических прививок по эпидемическим показаниям».

В России для специфической профилактики чумы применяется живая сухая чумная вакцина ЕВ НИИЭГ отечественного производства (ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Россия), имеющая государственную регистрацию и вызывающая развитие иммунитета длительностью до года [3].

Поскольку в настоящее время отсутствуют утвержденные стандарты для оценки уровня поствакцинального иммунитета у людей, вакцинированных чумной вакциной, актуальным направлением исследований является изучение истинного состояния их иммунитета и поиск маркеров [4], свидетельствующих о его напряженности.

Цель работы – оценить состояние показателей цитокинового и иммуноглобулинового статуса у вакцинированных живой чумной вакциной людей, постоянно проживающих и осуществляющих

свою трудовую деятельность на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы.

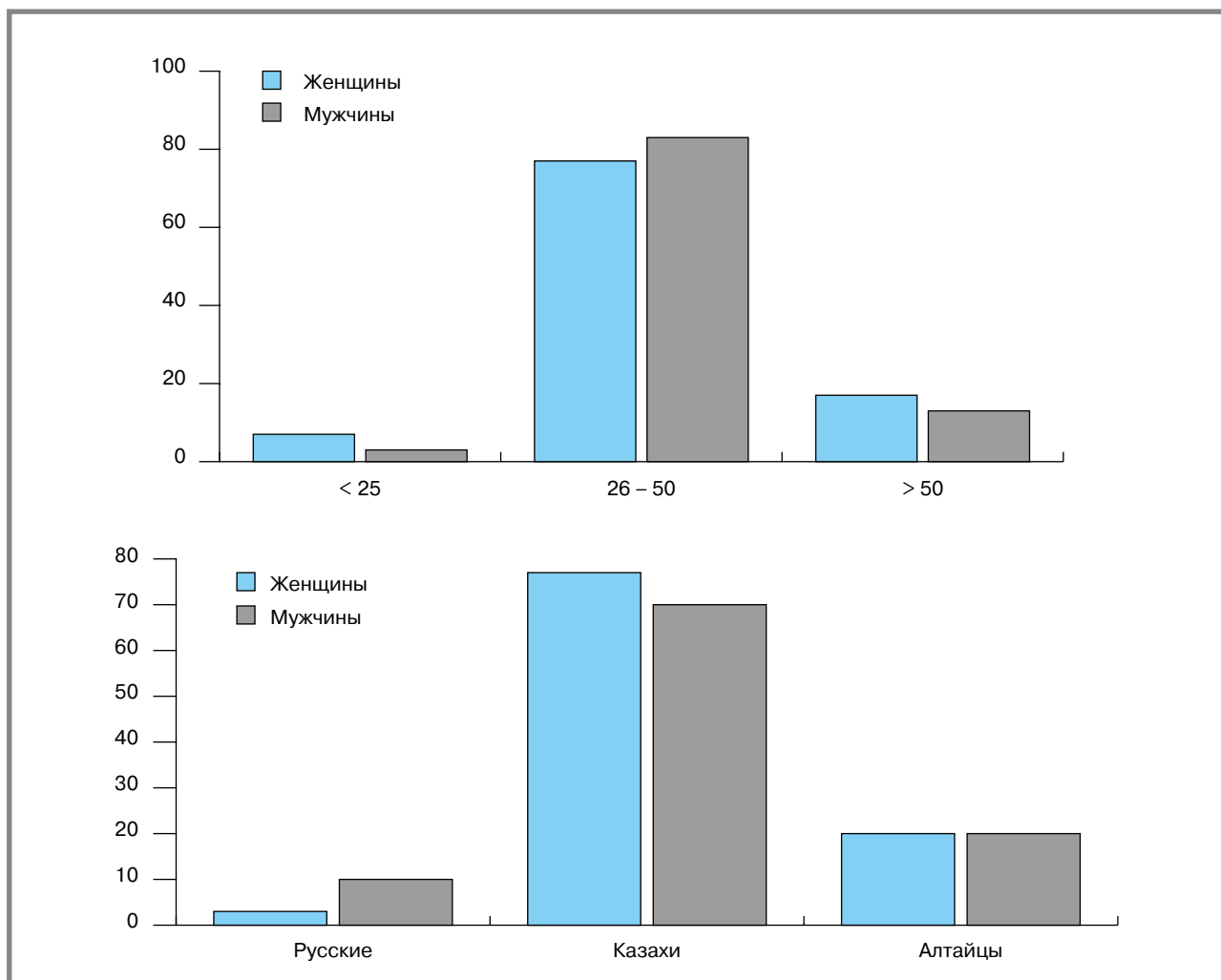
Материалы и методы

В работе изучены показатели иммунитета у 60 добровольцев, ранее не вакцинированных против чумы, проживающих в с. Кош-Агач (Кош-Агачский район, Республика Алтай, Россия) и давших согласие для участия в исследовании.

Основная часть исследуемой группы людей по национальному признаку представлена казахами (73%), в меньшей степени – алтайцами (20%) и русскими (7%). При этом из всей группы 77% женщин и 83% мужчин входили во вторую зрелую возрастную группу – от 25 до 50 лет (рис. 1).

Забор крови проводили до вакцинации живой чумной вакциной ЕВ НИИЭГ и через 1 и 6 месяцев после нее. Из крови выделяли сыворотку по стандартной методике. Исследование полученного клинического материала включало определение спонтанной и митогениндуцированной продукции биомаркерных цитокинов (IFN- γ , IL-4, TNF- α) в супернатантах культуры клеток крови, титров специфических IgG к капсульному антигену F1 чумного

Рисунок 1.
Характеристика исследуемой группы людей по возрасту и национальности



микроба и концентраций основных классов иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgA и IgE).

Количественное определение уровня цитокинов в спонтанной/индуцированной Т-клеточным митогеном конканавалином А пробах и основных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) согласно инструкциям производителя. Концентрацию цитокинов выражали в пг/мл, а иммуноглобулинов – в мг/мл (классы М, G и A) и МЕ/мл (класс E). Для оценки титра специфических антител к капсульному антигену F1 чумного микроба использовали иммуноферментную тест-систему «ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов). Учет оптической плотности осуществляли на автоматическом ридере ELx 808 IU (Biotek Instruments Inc, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA» версия 6.1 непараметрическими критериями Манна-Уитни для независимых и Уилкоксона для зависимых переменных. Полученные данные выражали в виде медианы (Me) и диапазона квартильных отклонений (Q25; Q75). При этом различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В процессе исследования сывороток крови нами было показано, что через 1 месяц после прививки живой чумной вакциной процент положительной сероконверсии не достигает 100%. По нашим результатам, сероконверсия отмечалась в 93% случаев, при этом средний титр был равен 1:302,2. Тем не менее, только у 49% вакцинированных зафиксирован уровень специфических антител к F1 чумного микроба, превышающий диагностический титр 1:80. Однако уже через 6 месяцев лишь в 4% случаев титр специфических IgG к фракции 1 чумного микроба соответствовал уровню диагностического.

При анализе концентрации основных классов иммуноглобулинов установлено статистически значимое повышение значений IgE, IgM и IgA через 1 месяц после вакцинации в сравнении с довакцинальными,

при этом медиана возрастала в 2,7, 1,1 и 1,3 раза соответственно ($p < 0,05$). Однако через 6 месяцев нами было зарегистрировано достоверное снижение уровня всех классов иммуноглобулинов в сыворотке крови в среднем на 38 – 50% (табл. 1). При этом все изменения концентраций основных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови варьировали в пределах референтных значений, проводимых в инструкциях из наборов реагентов [5]. Тем не менее, у 10% вакцинированных был отмечен повышенный синтез IgE (> 100 МЕ/мл), что может свидетельствовать о риске развития или наличии у этих людей atopических заболеваний.

Обнаружены значительные изменения и в системе цитокинового статуса. Установлено, что у 56% обследованных лиц происходит повышение концентрации TNF- через 1 месяц после вакцинации в 1,2 раза в спонтанной и индуцированной пробах (рис. 2 А). Следует отметить, что у всех обследованных лиц митогенная стимуляция вызывала достоверное повышение выработки TNF- α клетками периферической крови в среднем в 2,0 раза по сравнению со спонтанной их продукцией во все исследованные сроки ($p < 0,0001$).

Подобная тенденция была характерна и для IFN- γ : статистически значимое повышение медианы в спонтанных пробах у 65% обследованных лиц через 1 месяц после вакцинации в 1,8 раза ($p < 0,05$) и достоверно высокие значения в индуцированных пробах по отношению к спонтанным (рис. 2 В). Обращает на себя внимание снижение концентрации IFN- в митоген-индуцированной пробе в сравнении с аналогичным показателем до вакцинации.

Кроме этого, иммуноферментный анализ показал, что в случае с IL-4 (рис. 2 С) имеет место статистически значимое снижение концентрации лимфокина через 1 и 6 месяцев после вакцинации живой чумной вакциной в сравнении с аналогичным показателем до вакцинации как в спонтанной (3,4 и 1,5 раза соответственно), так и в индуцированной пробах (4,5 и 1,9 раза соответственно).

Необходимо также отметить снижение концентраций всех цитокинов в митогениндуцированных Т-клеточным митогеном конканавалином А пробах

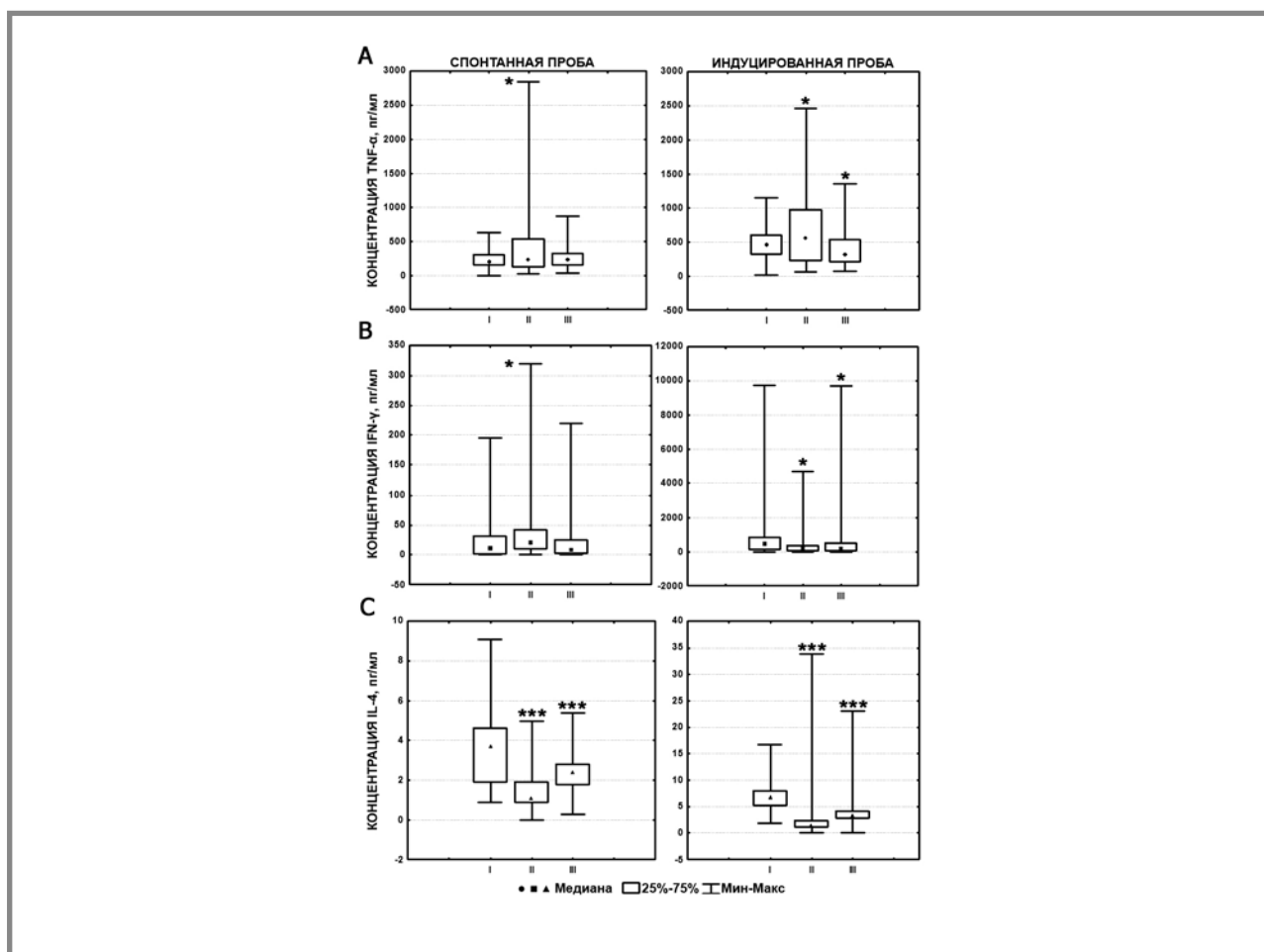
Таблица 1.
Основные классы иммуноглобулинов, Me (Q25; Q75)

Показатель	Сроки забора крови и выделение сыворотки		
	До вакцинации	После вакцинации	
		1 месяц	6 месяцев
IgE общ. (МЕ/мл)	7,5 (3,0; 18,5)	20,5 (3,0; 50,0)*	10,5 (3,5; 37,0)*
IgM (мг/мл)	2,1 (1,7; 2,5)	2,2 (1,6; 3,4)*	1,5 (1,0; 2,1)**
IgA (мг/мл)	1,8 (1,2; 2,6)	2,4 (1,5; 3,5)*	1,2 (0,7; 1,9)**
IgG (мг/мл)	15,7 (9,8; 24,2)	14,2 (10,6; 23,4)	9,5 (5,7; 14,7)***

Примечание: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$

Рисунок 2.

Цитокиновый статус (TNF-, IFN-, IL-4) у людей до и после вакцинации против чумы



Примечание: Сроки забора крови и выделения сыворотки: I – до вакцинации, II – 1 месяц после вакцинации, III – 6 месяцев после вакцинации. линия – число КОЕ в крови мышей при заражении менингококком серогруппы B; пунктирная линия – уровень антител в крови иммунизированных животных; столбики – мол. масса препаратов.

у обследованных лиц через 6 месяцев после иммунизации, что может свидетельствовать о понижении потенциальной резервной способности иммунных клеток.

Для характеристики направленности иммунного ответа у вакцинированных чумной вакциной людей оценивали соотношение двух функционально антагонистических цитокинов – IFN-γ, продуцирующийся Т-хелперами 1 типа (Th1), к IL-4, отвечающего за дифференцировку Т-хелперов 2 типа (Th2) из наивных Т-хелперов [4, 6]. Динамическое равновесие функций Th1 и Th2 обеспечивает гибкость и адекватность иммунного ответа, так Th1 опосредуют реакции клеточного иммунитета, а Th2 – реакции гуморального [7]. Расчет показал, что у 96% обследованных через 1 месяц после вакцинации установлено повышение активности Th1, что сопровождалось увеличением концентрации IFN-γ и соотношения IFN-γ/IL-4. В тоже время в 4% случаев наблюдалось смещение в сторону функциональной активности Th2 и снижение показателя соотношения IFN-γ/IL-4, что может говорить о сдвиге развития в сторону гуморального иммунитета.

Однако через 6 месяцев после проведения вакцинации преобладание реакций гуморального звена фиксировалось уже в 27% случаев.

Заключение

Таким образом, наличие через 1 месяц после иммунизации положительной сероконверсии у подавляющего большинства людей, принявших участие в исследовании, свидетельствует об адекватной иммунной перестройке организма и выработке специфических защитных антител в ответ на введение живой чумной вакцины. А увеличение продукции TNF-α и IFN-γ после вакцинации говорит о повышении активности Th1-клеток и развитии у людей клеточного иммунного ответа.

Тем не менее, как показал дальнейший анализ, уже через полгода статистически значимо снижается уровень не только специфических к капсульному антигену *Y. pestis* антител, но и всех классов иммуноглобулинов, при этом оставаясь в пределах диапазона физиологической нормы. Также происходит снижение концентраций цитокинов в митогениндуцированных конканавалином А пробах

у обследованных лиц, что может свидетельствовать о понижении потенциальной резервной способности клеток и расценивать как следствие вакцинации.

Необходимо отметить, что в статье представлены результаты отдельных этапов комплексного исследования. Дальнейшее изучение изменения

клеточного состава значимых популяций крови, а также молекулярно-генетические исследования особенностей фенотипа главного комплекса гистосовместимости позволят более полноценно охарактеризовать иммунологическую реактивность людей, вакцинированных живой чумной вакциной.

Литература

1. Балахонов С.В., Попова А.Ю., Мищенко А.И., Михайлов Е.П., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В. и др. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 1. Клинико-эпидемиологические и эпизоотологические аспекты. Проблемы особо опасных инфекций. 2016; 1: 55 – 60.
2. Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Шестопалов М.Ю., Остяк А.С., Витязева С.А., Корзун В.М. и др. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *pestis* в Алтайском горном при родном очаге чумы. Сообщение 1. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята. Проблемы особо опасных инфекций. 2013; 1: 60 – 65.
3. Зверев В.В., Семенов Б.Ф., Хайтов Р.М., ред. Вакцины и вакцинация: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011.
4. Шуковская Т.Н., Смолькова Е.А., Шмелькова Т.П., Ключева С.Н., Бугоркова С.А. Индуцированная продукция IFN-у и IL-4 как показатель функциональной активности Th1- и Th2-клеток у вакцинированных против чумы людей. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011; 6: 78 – 83.
5. Тотоян А.А. Современные подходы к диагностике иммунопатологических состояний. Медицинская иммунология. 1999; 1: 75 – 108.
6. Ключева С.Н., Бугоркова С.А., Шуковская Т.Н., Санджиев Д.Н., Конушева С.В., Савченко С.П. и др. Оценка иммунореактивности организма лиц, вакцинируемых против чумы и проживающих на территории Прикаспийского природного очага чумы. Материалы XIII международной научно-практической конференции. Саратов; 2016: 112 – 113.
7. Кожамбетова Д.К., Маукаева С.Б., Куанышева А.Г. и др. Цитокиновый профиль как критерий эффективности терапии больных хроническим декомпенсированным бруцеллезом. Сборник статей по материалам XXX международной научно-практической конференции «Современная медицина: актуальные вопросы». Новосибирск; 2014: 62 – 69.

References

1. Balakhonov S.V., Popova A.Yu., Mishchenko A.I., Mikhailov E.P., Ezhlova E.B., Demina Yu.V. et al. A Case of Human Infection with Plague in the Kosh-Agach Region of the Republic of Altai in 2015. Communication 1. Clinical-Epidemiological and Epizootological Aspects. Probl. Osobo Opasn. Infek. [Problems especially dangerous infections]. 2016; 1: 55 – 60 (in Russian).
2. Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Shestopalov M.Yu., Ostyak A.S., Vityazeva S.A., Korzun V.M. et al. The First Case of *Yersinia Pestis* Subsp. *Pestis* Isolation in the Territory of Altai Mountain Natural Plague Focus. Communication 1. Microbiological Characteristics, Molecular-Genetic and Mass-Spectrometric Identification of the Isolate. Probl. Osobo Opasn. Infek. [Problems especially dangerous infections]. 2013; 1: 60 – 65 (in Russian).
3. Zverev V.V., Semenov B.F., Khaitov R.M. Vaccine and vaccinal prevention: national guide. Moscow: GEOTAR-Media; 2011 (in Russian).
4. Shchukovskaya T.N., Smolkova E.A., Shmelkova T.P., Klueva S.N., Bugorkova S.A. Induced Production of IFN- and IL-4 as an Indicator of Functional Activity Human Th1 and Th2 Cells After Plague Vaccination. Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]. 2011; 6: 78 – 83 (in Russian).
5. Totolian A.A. Modern approaches to diagnosis of immunopathological conditions. Meditsinskaya immunologiya [Medical Immunology]. 1999; 1: 75 – 108 (in Russian).
6. Klyuyeva S.N., Bugorkova S.A., Schukovskaya T.N., Sandzhiev D.N., Konusheva S.V., Savchenko S.P. et al. Immunoreactivity evaluation of human vaccinated against plague and residing in the territory of the Caspian natural focus of plague. Materialy XIII mezhdunarodnoy nauno-prakticheskoy konferentsii [Proceedings of XIII International scientific-practical conference]. Saratov; 2016: 112 – 113 (in Russian).
7. Kozhakhmetova D.K., Maukayeva S.B., Kuanysheva A.G., Kudaibergenova N.K. et al. Cytokine profile as criterion of treatment efficiency of patients with chronic decompensated brucellosis. Sbornik statey «Sovremennaya meditsina: aktual'nyye voprosy» po materialam XXX mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii [Proceedings of XXX International scientific-practical conference]. Novosibirsk; 2014: 62 – 69 (in Russian).

ИНФОРМАЦИЯ ЕРБ ВОЗ

Вакцинация защищает здоровье на каждом этапе жизни

С 24 по 30 апреля 2017 года, в Европейском регионе отмечается Европейская неделя иммунизации (ЕНИ), ежегодная инициатива, которая повышает уровень осведомленности о важности иммунизации для здоровья людей и их благополучия. В этом году под лозунгом «Вакцины работают», заинтересованные стороны во всех странах будут сосредоточены на важности и преимуществах иммунизации на каждом этапе жизни человека.

Защита с помощью вакцинации, по-прежнему будет играть важную роль в достижении других целей в области здравоохранения: контроль вирусного гепатита; сдерживание устойчивости к противомикробным препаратам, а также искоренение нищеты и обеспечение качественного образования, гендерного равенства и экономического роста. Достигнут значительный прогресс, в том числе в усилиях по ликвидации кори и краснухи

в Европейском регионе, но ключевые проблемы остаются нерешенными. Пробелов в охвате вакцинацией привели к вспышкам предотвратимой заболеваемости в Европейском регионе, затрагивая людей всех возрастов.

Медицинским работникам, в частности, рекомендуется быть полностью привитыми и сообщать о преимуществах вакцинации родителям и воспитателям. Медицинские работники подвергаются повышенному риску заражения инфекционными заболеваниями и передачи их своим пациентам. Поэтому ВОЗ рекомендует медработникам прививаться. Отношение медработников к вакцинации оказывает существенное влияние на принятие решения пациентами и родителями относительно прививок.

Источник: <http://www.euro.who.int/en/>