

Изучение в эксперименте иммунологической активности вакцины чумной живой, подвергнутой воздействию экстремальной температуры

Д.А. Будыка (chumnpl@yandex.ru), А.А. Фисун, Е.Л. Ракитина, Н.В. Абзаева

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзора

Резюме

В исследовании проведена сравнительная оценка иммунологической активности препаратов вакцины чумной живой (ВЧЖ) при оптимальном режиме хранения и после воздействия экстремальной температуры $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 6 суток с последующим хранением при $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Полученные в ходе исследования данные свидетельствуют, что образец ВЧЖ, подвергнутый термовоздействию, не снизил способности проявлять иммунологическую активность в течение трехлетнего хранения (срок годности препарата) и при вакцинации животных быстрее вызывал увеличение общего количества Т-лимфоцитов и проявление признаков гуморального иммунитета.

Вывод: можно прогнозировать более лабильные условия по транспортированию живой бактериальной вакцины без ущерба ее качественным характеристикам.

Ключевые слова: иммунизация, вакцина чумная живая, лабораторные животные, микробная клетка *Y. pestis* EV, метод проточной цитометрии, моноклональные антитела, субпопуляционный состав лимфоцитов, иммунологическая память

Experimental Study of Immunological Activity of Live Plague Vaccine Subjected to Extreme Temperature

D.A. Budyka (chumnpl@yandex.ru), A.A. Fisun, E.L. Rakitina, N.V. Abzayeva

Federal State Institution of Public Health «Stavropol Plague Control Research Institute» of the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing

Abstract

The study has resulted in the comparative estimate of the immunological activity of the preparations (LPV) with optimal storage mode and after exposure to extreme temperature ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) for 6 days, followed by storage at ($4 \pm 2^\circ\text{C}$). Data obtained during the study indicate an identical immune response. After-heat LPV sample did not reduce the ability to exercise immunological activity during the three-year storage (shelf-life of the drug). When the animals vaccination in this group, total number of T-lymphocytes are increased and signs of humoral immunity are shown earlier. Thus, we can predict more labile conditions on the transportation of live bacterial vaccine without compromising its characteristics.

Key words: Immunization, live plague vaccine, laboratory animals, microbial cell *Y. pestis* EV, flow cytometry, monoclonal antibodies, subpopulations of lymphocytes, immunological memory

Введение

Профилактическая эффективность вакцины чумной живой (ВЧЖ) доказана многолетним опытом ее применения [1]. Функциональным началом препарата является живая микробная клетка.

Ключевую роль в вакцинном препарате выполняют клетки производственного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ [2]. По мере накопления знаний об иммунобиологических свойствах *Y. pestis* EV и внедрении современных технологий отечественными исследователями была доказана полная безопасность штамма при вакцинации людей [3].

Определяющее значение в создании противочумного иммунитета принадлежит клеточным факторам. Изменения клеточного состава лимфоидных фолликулов селезенки и лимфоузлов (увеличение бластоцитарной и плазмочитарной активности, гиперплазия ретикулярной ткани, лимфоидная гипер-

плазия) свидетельствуют об усилении иммуноцито-позитических функций органов иммунной системы, что является важным показателем перестройки организма при иммунизации вакцинным препаратом [4].

Для характеристики свойств иммуностимулирующих препаратов важна оценка интенсивности дегрануляции нейтрофилов – процесс, определяющий высвобождение медиаторов, регулирующий активность клеточных рецепторов, а также активность продуцируемых различными клетками цитокинов [5].

Оценка цитоэнзимохимических показателей полиморфно-ядерных лейкоцитов при различных типах инфекционно-вакцинального процесса по активности миелопероксидазы (МПО) и содержанию неферментных катионных белков (НКБ) может служить основанием для характеристики иммунной

активности организма в течение инфекционного процесса, а также позволяет оценить иммунную реакцию на введение вакцинного штамма [6].

Для характеристики отдельных звеньев иммунной системы применяются методы проточной цитометрии (МПЦ). Определение числа зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺) и их субпопуляций – хелперов (CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺) – играет важную роль в понимании механизмов защиты от опасной инфекции [7].

Эффективность ВЧЖ определяет уровень ее иммунологической активности. Мы изучали изменение иммунобиологических показателей крови у белых мышей, вакцинированных ВЧЖ, подвергнутой термовоздействию. Выбор продолжительности температурного воздействия 37 ± 1 °C продиктован требованиями Фармакопейной статьи (ФСП) к производству ВЧЖ (термостабильность не может быть менее 4-х суток) и поиском возможности более лабильных условий транспортировки вакцинного препарата, не снижающих его качества [8]. Поэтому срок температурного воздействия 37 ± 1 °C в нашем эксперименте увеличен до 6 суток. При этом принималось во внимание, что к транспортировке и хранению живых бактериальных вакцин предъявляются требования «холодовой цепи» [9].

Цель работы – изучение в динамике субпопуляционного состава лимфоцитов в крови белых мышей, иммунизированных ВЧЖ, хранившейся с соблюдением холодовой цепи, и ВЧЖ, подвергшейся воздействию высоких температур в течение 6-ти суток.

Материалы и методы

В качестве биомодели для проведения экспериментального исследования применялись нелинейные лабораторные мыши весом 18 – 20 г, выделенные в две группы по 48 особей в каждой. Животные иммунизировались подкожно в дозе 100 тыс. микробных клеток коммерческим препаратом ВЧЖ (серия 5 – 10, 2010 г. выпуска), хранившимся при температуре 4 ± 2 °C в условиях холодовой цепи в течение всего срока годности (EV) и его аналогом (EV6), подвергнутым воздействию температуры 37 ± 1 °C в течение 6 суток с последующим хранением до 3-х лет при температуре 4 ± 2 °C. Забор крови проводился на 7-е, 14-е, 21-е, 25-е, 30-е, 45-е, 60-е и 90-е сутки у 6 животных из обеих групп с последующим анализом на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с помощью универсальной программы Cell Quest.

Для изучения клеточного звена иммунитета определяли субпопуляционный состав лимфоцитов с использованием моноклональных антител к антигенам лимфоцитов мыши: CD3⁺ (Т-лимфоциты), CD4⁺ (Т-хелперы), CD8⁺ (Т-цитотоксические), CD19⁺ (В-лимфоциты), CD44⁺ (клетки памяти) фирмы Invitrogen (США).

Фагоцитарную активность клеток периферической крови выявляли с помощью теста, осно-

ванного на регистрации поглощения объектов фагоцитоза. Оценивалась активность всех типов фагоцитирующих клеток, потенциально способных к фагоцитозу: нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов. В качестве объекта фагоцитоза использовали взвесь пекарских дрожжей в концентрации (10 x 8 клеток в мл). Приготовленные мазки фиксировали метанолом и окрашивали по Романовскому-Гимзе. Результат оценивали подсчетом 200 клеток, способных к фагоцитозу.

В основе реакции НСТ-теста лежит восстановление в цитоплазме нейтрофилов нитросинего тетразолия до диформаза под влиянием супероксидного аниона. Диформазан имеет вид черных гранул, количество которых меняется в зависимости от степени активации клетки. Окраску мазков проводили азуром-2 после фиксации их метанолом. Подсчет вели в 200 нейтрофилах крови.

При изучении уровня миелопероксидазы мазки крови фиксировали в спирт-формалиновом реактиве. В качестве субстрата использовали бензидин. Содержание миелопероксидазной активности в нейтрофильных гранулоцитах определяли также полуколичественным методом, рассчитывая средний цитохимический коэффициент по формуле, предложенной В.Е. Пигаревским [10].

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Результаты выражали в виде средней выборочной $\bar{X}$ и ошибки средней m . Достоверность различий средних величин оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (для независимых выборок). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Долговременная (до 45 суток) сравнительная оценка иммунного ответа мышей на введение EV и EV6 (1 год хранения) не выявила принципиальных отличий [11, 12]. Результаты дальнейшего длительного (90 суток) изучения действия вакцинных препаратов (EV и EV6) через 2 года хранения в оптимальных условиях при 4 ± 2 °C приведены в таблице 1.

Представленные результаты МПЦ наглядно демонстрируют значительное количество В-лимфоцитов в крови белых мышей, иммунизированных EV6, – $47,5 \pm 0,5\%$ по сравнению с группой мышей, привитых EV. Общее количество Т-лимфоцитов (CD3) у привитых EV6 ниже по сравнению с двумя другими анализируемыми группами, уровень Т-цитотоксических (CD8) выше в группе, вакцинированных EV – $23,4 \pm 2,6\%$. Экспериментальный вакцинный препарат (EV6) проявляет преимущественно признаки развития иммунитета по гуморальному типу.

Понять эти механизмы предстояло в расширенном опыте с различными сроками исследования после иммунизации вакцинными образцами в заключительный третий год хранения. Наблюдения

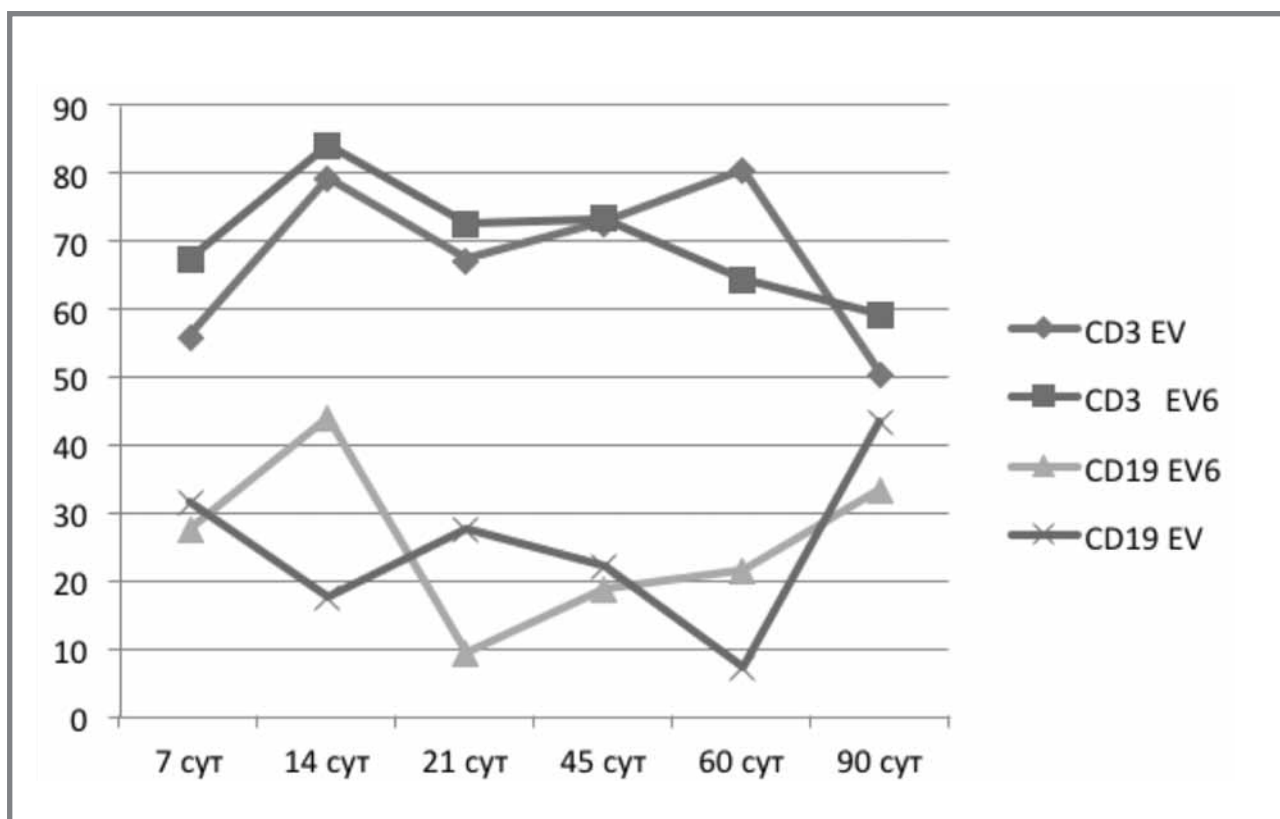
Таблица 1.

Динамика содержания Т- и В-лимфоцитов в крови белых мышей в процессе иммунного ответа на EV и EV6 через 2 года их хранения

Лимфоциты	Сравнительные образцы исследования	
	после воздействия $t 37 \pm 1^\circ \text{C}$ (EV6), %	хранение при $t 4 \pm 2^\circ \text{C}$ (EV), %
CD3	$49,0 \pm 0,0$	$58,5 \pm 3,9$
CD4	$30,5 \pm 4,5$	$31,4 \pm 3,0$
CD8	$15,5 \pm 2,5$	$23,4 \pm 2,6$
CD19	$47,5 \pm 0,5$	$28,4 \pm 2,8$

Рисунок 1.

Динамика CD3 и CD19 в процессе иммунного ответа у белых мышей при вакцинации вариантами EV и EV6



также осуществлялись в течение 3-х месяцев после иммунизации (рис. 1).

Представленные данные наглядно демонстрируют, что процент лимфоцитов, экспрессирующих CD3 в процессе развития иммунного ответа, поднимается в обеих группах вакцинированных животных, особенно в группе EV6, где пик значения наблюдается уже на 14-е сутки – $84,2 \pm 7,0\%$. В группе EV максимальный подъем регистрируется в более поздний период (60 суток) и составляет – $80,4 \pm 4,3\%$.

Информативными оказались данные по количеству В-лимфоцитов (CD19) – абсолютный подъем содержания их в крови отмечался уже на 14 сутки у привитых EV6 – $44,1 \pm 2,3\%$ против – $17,6 \pm 2,3\%$ у иммунизированных EV; на 60-е сутки произошло статистически значимое снижение – до $7,3 \pm 1,2\%$

в группе привитых EV и у EV6 – до $21,5 \pm 2,9\%$, которое сменилось подъемом на 90-е сутки соответственно до $43,4 \pm 5,8\%$ и $33,5 \pm 3,8\%$ (рис. 2).

На рисунке 2 виден статистически значимый подъем уровня экспрессии CD8 на 21-е сутки в группе привитых EV6 – $47,9 \pm 3,7\%$, EV – $19,8 \pm 1,2\%$, и в дальнейшем экспрессия выше в группе привитых EV6, чем в группе привитых EV.

Уровень CD4 в группе мышей, привитых EV, более высок по сравнению с группой привитых EV6 начиная с 14-х суток исследования и до его окончания, однако статистически значимых отличий между двумя анализируемыми группами не выявлено на всем протяжении исследования.

Анализ течения отдаленных этапов поствакцинального периода свидетельствует о том, что количество лимфоцитов, экспрессирующих

Рисунок 2.

Динамика CD8 в процессе иммунного ответа у белых мышей при вакцинации EV и EV6

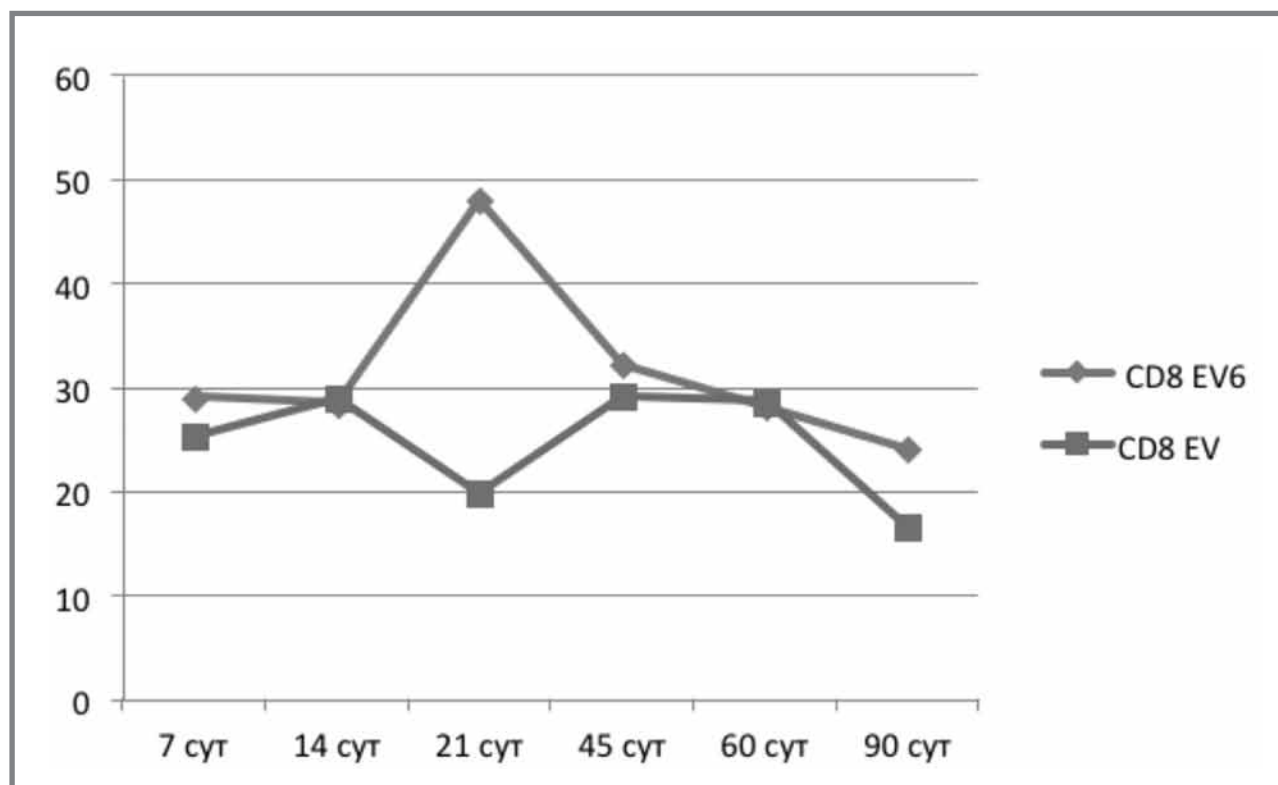


Рисунок 3.

Содержание CD44-клеток памяти в отдаленные сроки после иммунизации EV и EV6

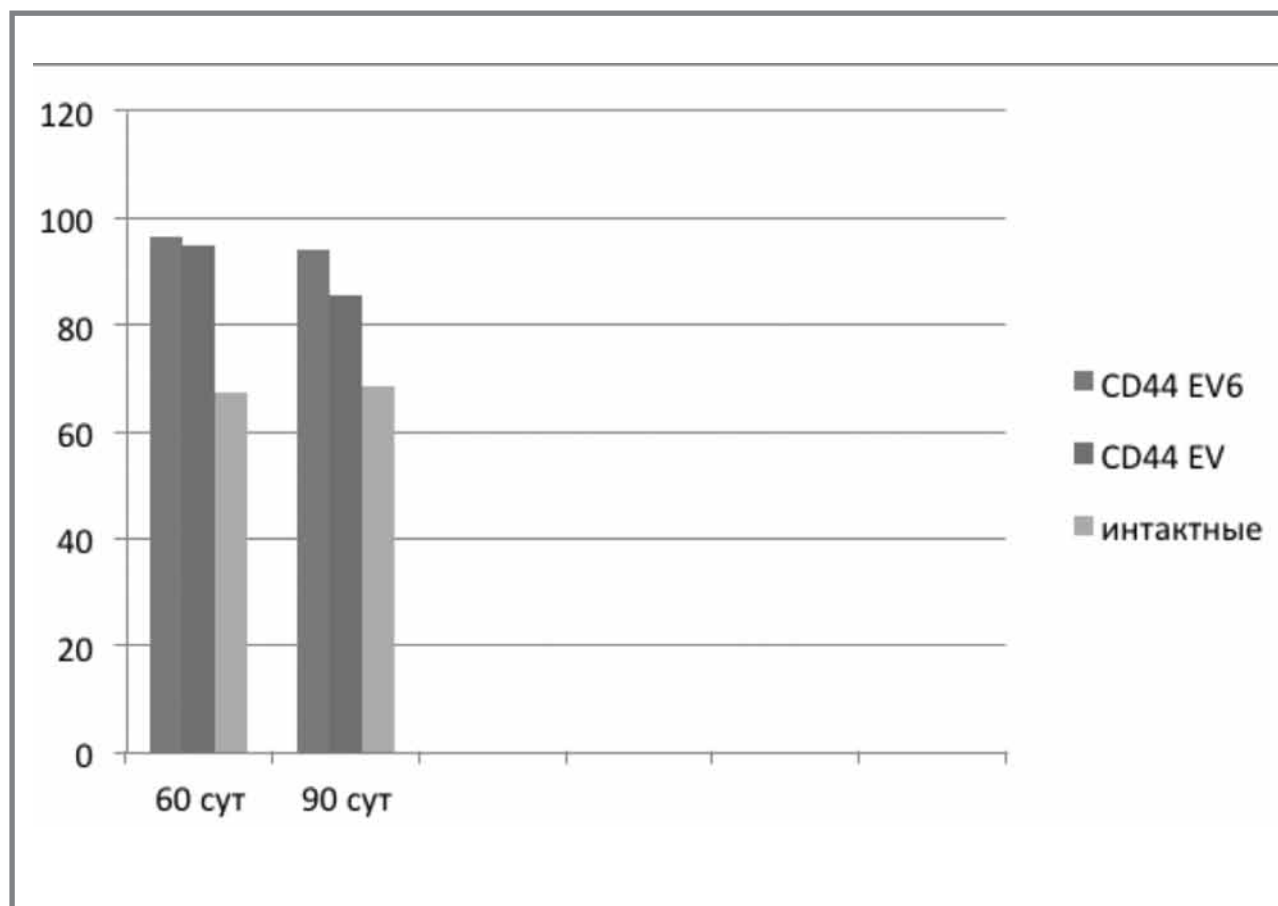
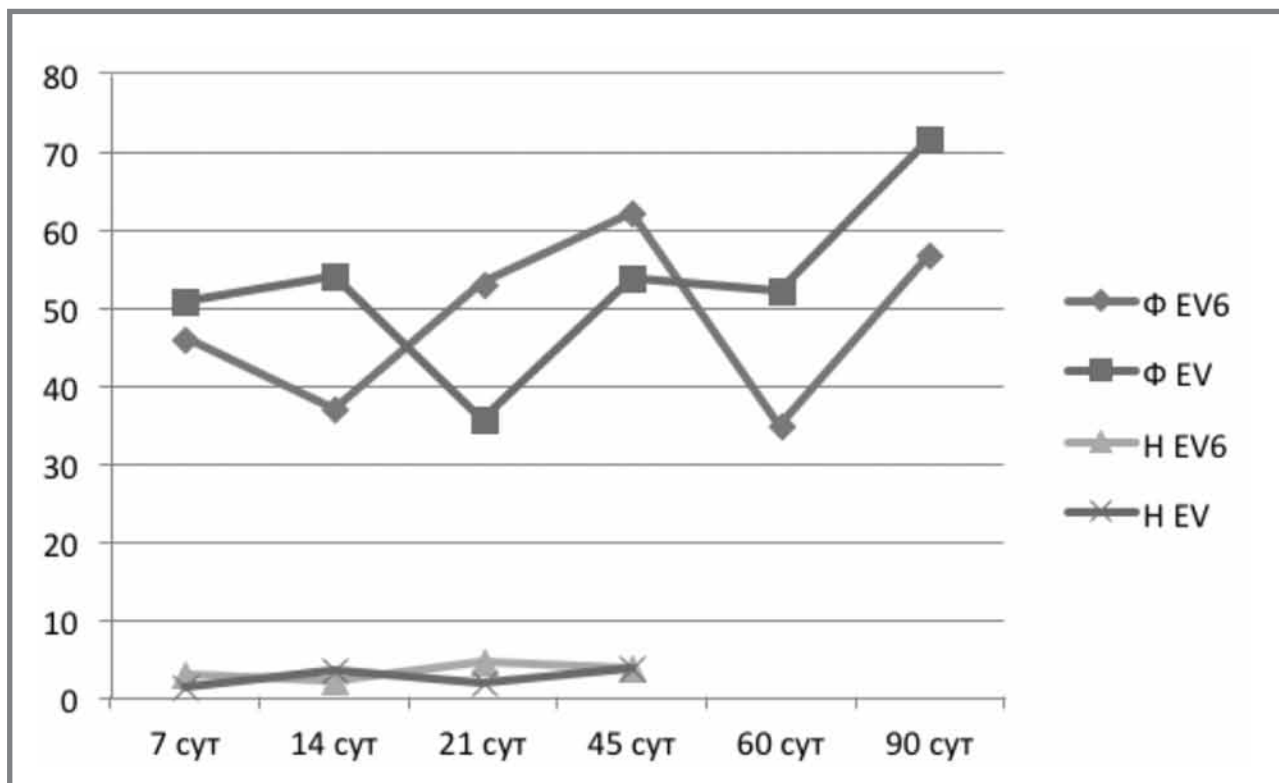


Рисунок 4.

Фагоцитарная и функциональная активность нейтрофилов в крови белых мышей в процессе иммунного ответа на введение EV и EV6



CD44-рецепторы, имеет статистически значимое повышение уровня у иммунизированных особей обеих групп по сравнению с контролем. Количественные показатели несколько выше у привитых EV6 – $94,1 \pm 1,8\%$, чем у привитых EV – $85,4 \pm 4,1\%$ (рис. 3).

Фагоцитарная и функциональная активность нейтрофилов у первой и второй групп представлена на рисунке 4.

На 21-е сутки наблюдается статистически значимое увеличение фагоцитарной активности нейтрофилов в группе привитых EV6 – $53,0 \pm 2,1\%$ по сравнению с группой привитых EV – $35,5 \pm 1,5\%$, но на заключительном этапе исследования эти значения в группах меняются местами – соответственно $56,7 \pm 3,8\%$ и $71,5 \pm 0,5\%$.

Сравнительная оценка функциональной активности нейтрофилов на 21 сутки эксперимента показала статистически значимое повышение активности в группе иммунизированных EV6 ($4,5 \pm 0,5\%$) по сравнению с группой привитых EV ($1,7 \pm 0,3\%$). При исследовании показателей МПО и НКБ во все сроки наблюдения статистически значимых разли-

чий между группами животных, вакцинированных EV и EV6, не выявлено.

Выводы

1. Иммунобиологические показатели крови белых мышей свидетельствуют о том, что у EV6, несмотря на 6-ти суточное нарушение холодовой цепи, не снизилась способность проявлять иммунологическую активность в течение трехлетнего хранения (срок годности препарата).
2. У вакцинированных EV6 животных раньше увеличивается общее количество Т-лимфоцитов и быстрее проявляются признаки гуморального иммунитета, отмечается увеличение количества моноцитов, нейтрофилов на начальной стадии поствакцинального процесса по сравнению с мышами, привитыми EV.
3. Превышение при хранении и транспортировке ВЧЖ нижнего уровня термостабильности в 1,5 раза в течение 6 суток не снизило ее иммунологической активности, что дает возможность для расширения условий транспортирования вакцинного препарата без ущерба его качеству. ■

Литература

1. Бугоркова С.А., Девдариани З.Л., Шуковская Т.Н., Кутырев В.В. Исторические и современные представления о проблеме специфической профилактики чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2013; 3: 63 – 69.
2. Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба: методические рекомендации. Москва: Федеральный центр госэпиднадзора Минздрава РФ; 2002.
3. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Виноградова Н.А. Сравнительная генетическая характеристика вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV и его предполагаемых «вирулентных производных». Микробиология, эпидемиология и иммунобиология. 2009; 3: 50 – 59.
4. Витязева С.А., Старовойтова Т.П., Дубровин В.И., Голубинский Е.П. Методические рекомендации по использованию показателей клеточного состава иммунокомпетентных органов экспериментальных животных для оценки иммунной перестройки организма в процессе формирования иммунитета к чуме. Иркутск; 2007.

5. Кравцов А.Л., Шмелькова Т.П. Секреторная дегрануляция нейтрофилов как: триггер воспаления и регулятор иммунного ответа: роль серийных лейкоцитарных протеаз и протеолитически активных рецепторов. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011; 1: 79 – 87.
6. Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Руднев С.М., Иванова Г.Ф., Фисун А.А., Гостищева С.Е. и др. Бактерицидная активность полиморфно-ядерных лейкоцитов крови белых мышей привитых против чумы и в различных схемах инфицирования чумной инфекцией. Проблемы особо опасных инфекций. 2009; 100 (2): 56 – 60.
7. Philipovskiy A.V., Smiley S.T. Vaccination with live *Yersinia pestis* primes CD4 and CD8 cells that synergistically protect against lethal pulmonary *Y. pestis* infection. Infection and Immunity. 2007; 75 (2): 878 – 885.
8. Фармакопейная статья предприятия 42-8654-07 «Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, подкожного скарификационного нанесения и ингаляций». Ставрополь; 2007.
9. Антипов О.Н., Михеева И.В., Мельникова А.А. Проблемы организации непрерывного контроля температурного режима при хранении и транспортировании вакцин. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2009; 4: 70 – 72.
10. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. Методы гематологических исследований. В кн.: Лабораторные методы исследования в клинике. Москва: Медицина; 1987: 134.
11. Будыка Д.А., Фисун А.А., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Руднев С.М., Абзаева Н.В. и др. Влияние иммунизации чумной вакциной на факторы неспецифической резистентности периферической крови белых мышей. Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных». Ставрополь; 2012: 184 – 185.
12. Фисун А.А., Будыка Д.А., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф. и др. Оценка иммунного ответа у белых мышей на введение вакцины чумной живой методом проточной цитометрии. Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных». Ставрополь; 2012: 142.

References

1. Bugorkova S.A., Devdariani Z.L., Schukovskaya T.N., Kutyrev V.V. Historical and modern ideas about the problem of specific prophylaxis of plague. Problems especially dangerous infections. 2013; 3: 63 – 69 (in Russian).
2. Basic requirements for vaccine strains of the plague microbe: guidelines. Moscow: Federal Center for epidemiology and bioterrorism; 2002 (in Russian).
3. Kutyrev V.V., Yeroshenko G.A., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Vinogradov N.A. Comparative genetic characterization of vaccine strain of *Yersinia pestis* EV and his alleged «virulent derivatives». Microbiology, epidemiology and immunobiology. 2009; 3: 50 – 59 (in Russian).
4. Vityazeva S.A., Starovojtova T.P., Dubrovin V.I., Golubinsky E.P. Guidelines on the use of cellular composition of immune organs of experimental animals to evaluate the immune adjustment of the organism in the process of formation of immunity to the plague. Irkutsk; 2007 (in Russian).
5. Kravtsov A.L., Shmelkova T.P. Secretory degranulation of neutrophils as a trigger of inflammation and control of the immune response: the role of serial leukocyte proteases and proteolytic activity of receptors. Epidemiology and vaccination. 2011; 1: 79 – 87 (in Russian).
6. Budyka D.A., Abzaeva N.V., Rudnev S.M., Ivanova G.F., Fison A.A., Gostisheva S.E. et al. The bactericidal activity of polymorphonuclear leukocytes white mice vaccinated against distemper and in various schemes infection plague infection. Problems especially dangerous infections. 2009; 100 (2): 56 – 60 (in Russian).
7. Philipovskiy A.V., Smiley S.T. Vaccination with live *Yersinia pestis* primes CD4 and CD8 cells that synergistically protect against lethal pulmonary *Y. pestis* infection. Infection and Immunity. 2007; 75(2): 878 – 885.
8. Pharmacopoeial article Enterprise 42-8654-07 «Plague vaccine live, lyophilisate for suspension for injection, dermal and inhalation scarification application». Stavropol; 2007 (in Russian).
9. Antipov O.N., Mikheev I.V., Melnikov A.A. Problems organization continuous temperature control during storage and transportation of vaccines. Epidemiology and vaccination. 2009; 4: 70 – 72 (in Russian).
10. Men'shikov V.V., Delektorskaya L.N., Zolotnitskaya R.P. Methods of hematological studies. In: Laboratory Methods in the clinic. Moscow: Medicine; 1987: 134 (in Russian).
11. Budyka D.A., Fison A.A., Rakitina E.L., Logvinenko O.V., Rudnev S.M., Abzaeva N.V. Effect of immunization and other plague vaccine on factors of nonspecific resistance of peripheral blood white mice. All-Russian scientific-practical conference «Actual problems of the diseases common to humans and animals». Stavropol; 2012: 184 – 185 (in Russian).
12. Fison A.A., Budyka D.A., Rakitina E.L., Logvinenko O.V., Abzaeva N.V., Ivanova G.F. et al. Evaluation of the immune response in albino mice to the vaccine plague live by flow cytometry. All-Russian scientific-practical conference «Actual problems of the diseases common to humans and animals». Stavropol; 2012: 142 (in Russian).

ИНФОРМАЦИЯ ВОЗ

Постлицензионный опыт применения пероральной противохолерной вакцины: плановый обзор

Резюме статьи S. Martin, A.-L. Lopez, A. Bellos, J. Deen, M. Ali, K. Alberti et al. «Post-licensure deployment of oral cholera vaccines: a systematic review»

Цель. Описать и проанализировать особенности кампаний по проведению пероральной вакцинации против холеры, включая места проведения, целевые группы населения, логистику, охват вакцинацией и стоимость доставки вакцины.

Методы. Поиск был осуществлен в базах данных PubMed, на сайте ВОЗ и в Кокрановской без каких-либо ограничений по датам или языку. Были проведены беседы с сотрудниками органов здравоохранения, экспертами в данной области и в министерствах здравоохранения, а также проведен целенаправленный поиск через поисковые системы в Интернете.

Результаты. Всего было проанализировано 33 документа. В одной стране, во Вьетнаме, пероральная вакцинация против холеры является частью программы здравоохранения и с 1997 по 2012 год там было введено приблизительно 10,9 млн доз вакцины.

Кроме того, более 3 млн доз двух пероральных противохолерных вакцин, получивших положительную оценку ВОЗ, было введено в ходе более 16 кампаний по всему миру с 1997 по 2014 год. Эти кампании носили либо превентивный, либо реактивный характер и проводились в разных условиях, например в лагерях беженцев или в местах природных катастроф. По приблизительным подсчетам, по две дозы получили 46 – 88% лиц целевых групп. Приблизительная стоимость доставки в расчете на одного прошедшего полную иммунизацию человека варьировалась в пределах от 0,11 до 3,99 доллара США.

Вывод. Опыт проведения кампаний пероральной вакцинации против холеры продолжает накапливаться, и официальные лица органов здравоохранения имеют возможность им воспользоваться.

Источник: *Bull World Health Organ* 2014;92: 881–893. Doi: 10.2471/BLT.14.139949