

## Характеристика показателей клеточного иммунитета у вакцинированных против чумы лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы

А. Л. Кравцов, В. А. Кожевников\*, С. Н. Ключева, О. М. Кудрявцева, Т. Н. Щуковская, Н. И. Микшис, С. А. Бугоркова

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

### Резюме

**Цель** – сравнительный анализ с помощью проточной цитометрии клеточных показателей иммунного статуса у лиц, проживающих на территории Прикаспийского природного очага чумы и привитых вакциной чумной живой по эпидемическим показаниям.

**Материалы и методы.** Лейкоциты в цельной крови 120 человек исследовали на проточном цитометре с использованием двух четырёхцветных реагентов меченых моноклональных антител (Cyto-Stat CD45-FITC, CD4-PE, CD8-ECD, CD3-PC5 и Cyto-Stat CD45-FITC, CD56-PE, CD19-ECD, CD3-PC5), а также реагента CD95-FITC. Результаты учитывали до вакцинации, через 1 месяц и 6 месяцев после прививки. Определяли относительное содержание в крови лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов, лейкоцитов, несущих маркер раннего апоптоза CD95, Т и В- лимфоцитов, NK-клеток, а также Т-лимфоцитов хелперов (Th) и цитотоксических Т-лимфоцитов (Tcyt) для вычисления иммунорегуляторного индекса (ИРИ). **Результаты и обсуждение.** У 14 человек (11,7%) до вакцинации против чумы были выявлены характерные для иммунодефицитного состояния аномально низкие значения иммун регуляторного индекса ( $ИРИ < 1$ ) и отмечали менее интенсивную и менее длительную реакцию клеток иммунной системы в ответ на противочумную вакцинацию. У остальных обследованных лиц регистрировали ИРИ в диапазоне 1,4–1,5 до вакцинации и плавное его нарастание через месяц после вакцинации, при сохранении установленного интервала ИРИ в диапазоне 1,6–1,8 спустя 6 месяцев после прививки. **Заключение.** Для оценки эффективности противочумной вакцинации в рамках мониторинга качества проводимых мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения, проживающего на территории природных очагов чумы, важен своевременный контроль иммунного статуса у лиц из групп риска по заражению чумой (охотники, чабаны, работники сельского хозяйства, медицинские работники).

**Ключевые слова:** природный очаг, вакцинация, чума, иммунный статус, иммунорегуляторный индекс, проточная цитометрия

**Конфликт интересов не заявлен.**

**Для цитирования:** Кравцов А. Л., Кожевников В. А., Ключева С. Н. и др. Характеристика показателей клеточного иммунитета у вакцинированных против чумы лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2019; 18 (3): 67–74. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-4-67-74>.

### Cellular Immune Status Indicators of Anti-Plague Vaccinated Persons, Living on the Caspian Sandy Natural Plague Focus Territory

A.L. Kravtsov, V.A. Kozhevnikov\*\*, S.N. Klyueva, O.M. Kudryavtseva, T.N. Schukovskaya, N.I. Mikshis, S.A. Bugorkova

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

### Abstract

**Aim.** To compare by flow cytometry the cellular immune status indicators in persons, living on the territory of the Caspian sandy natural plague focus for epidemic indications. **Materials and methods.** Whole blood leukocytes of 120 people were examined by flow cytometry with using the two four-color labeled monoclonal antibody reagents (Cyto-Stat CD45-FITC, CD4-PE, CD8-ECD, CD3-PC5 and Cyto-Stat CD45-FITC, CD56-PE, CD19-ECD, CD3-PC5) and by means of CD95-FITC reagent. The results were taken into account before and in a month and 6 months after vaccination. We were determined in the blood the relative content of lymphocytes, monocytes, granulocytes, leukocytes carrying an early apoptosis marker (CD95), T and B- lymphocytes, NK cells as well T – lymphocyte helpers (Th) and cytotoxic T-lymphocytes (Tcyt) for immunoregulatory index (IRI) calculation. **Results.** Before anti-plague vaccination in 14 people (11,7%) were found abnormally low immunoregulatory index values characterized the immunodeficiency state ( $IRI < 1$ ) and noted less intensive and

\* Для переписки: Кожевников Виталий Александрович, м.н.с. отдела иммунологии Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», 410005, Россия, Саратов, ул. Университетская, 46. +7 9279198442, 787868@mail.ru. ©Кравцов А. Л. и др.

\*\* For correspondence: Kozhevnikov Vitaly A., junior researcher of department of immunology of Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Universitetskaya str., 46 Saratov 410005, Russian Federation/ +79279198442, 787868@mail.ru. ©Kravtsov AL et al.

less prolonged immune system cell reaction in response to anti-plague vaccination. In the other surveyed persons IRI were registered before vaccination in the range 1,4-1,5 with a smooth increase in it a month after vaccination and with preservation of the established IRI interval in a range 1,6-1,8 later 6 months after an inoculation. **Conclusion.** To estimate the effectiveness of anti plague vaccination within the framework of the ongoing measures quality monitoring to ensure sanitary and epidemiological welfare of the population, living on territory of the natural plague foci, the timely immune status monitoring is important in persons at risk for plague infection (hunters, shepherds, agricultural workers, medical workers).

**Key words:** natural focus, vaccination, plague, immune status, immuno regulatory index, flow cytometry

**No conflict of interest to declare.**

**For citation:** Kravtsov AL, Kozhevnikov VA, Klyueva SN et al. Cellular Immune Status Indicators of Anti-Plague Vaccinated Persons, Living on the Caspian Sandy Natural Plague Focus Territory. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2019; 18 (3): 67–74. (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-4-67-74>.

## Введение

Прикаспийский песчаный природный очаг чумы площадью 71 950 кв. км отличается частыми периодами высокой эпизоотической активности. Его территория охватывает часть Астраханской области и Ставропольского края, Республики Калмыкия, Дагестан, Чечня. Эпидемические осложнения в границах данного очага неоднократно возникали в период с 1923 г. по 1979 г.

Особенностью последнего десятилетия было сокращение применения для неспецифической профилактики чумы на территориях природных очагов этой инфекции высокотоксичных химических средств, предназначенных для дератизации и дезинсекции [1], что обусловлено возрастанием внимания к проблеме экологической чистоты окружающей среды и контроля здоровья населения, постоянно проживающего на таких территориях.

Иммунный статус человека является ключевым параметром, контролируемым при наблюдениях за здоровьем населения на территориях с высоким риском заражения возбудителями инфекционных заболеваний, поскольку люди с врожденными и приобретенными иммунодефицитами более восприимчивы к инфекциям [2,3]. Среди вероятных причин истощения возможностей иммунной системы выделяют факторы, связанные с изменением общей экологической обстановки на конкретной территории, с возрастанием антигенной нагрузки за счет широкого применения вакцин для профилактики различных инфекционных заболеваний [4]. В этих условиях контроль состояния клеточных показателей иммунного статуса у лиц, постоянно проживающих на территориях природных очагов чумы, приобретает особую важность.

Имеющий место случай заболевания чумой ранее привитого вакциной чумной живой (ВЧЖ) человека, зарегистрированный на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага этой инфекции в 2015 г. [5], способствовал активизации исследований по оценке иммунологической эффективности вакцины. Для этого необходим сравнительный анализ состояния клеточных показателей иммунного статуса до и после противочумной вакцинации у лиц из групп риска по заражению

чумой. Однако для больших групп населения, проживающего в природных очагах чумы Российской Федерации, такие исследования с использованием современных методов цитологического анализа не проводились.

В мировой практике для адекватной оценки клеточных показателей иммунного статуса у пациентов принято использовать проточную цитометрию [2,3,6]. В последнее десятилетие этот метод всё чаще применяется для определения у людей характера и интенсивности индивидуальной поствакцинальной иммунологической перестройки на клеточном уровне [7], для изучения механизмов клеточного иммунитета при чуме [8–11].

**Цель настоящей работы** – сравнительный анализ с помощью проточной цитометрии клеточных показателей иммунного статуса лиц, проживающих на территории Прикаспийского природного очага чумы и привитых вакциной чумной живой по эпидемическим показаниям.

## Материалы и методы

Исследовали лейкоциты цельной крови 120 человек в возрасте от 24 до 53 лет (средний возраст 43,3 года), проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы. Из них 80 человек – жители Лаганского (г. Лагань) и Черноземельского (п. Артезиан) районов Республики Калмыкия, а 40 – сотрудники ФКУЗ «Астраханская противочумная станция». Всего было изучено 360 образцов крови, поскольку для каждого из обследуемых результаты учитывались как до, так и после вакцинации (через 1 месяц и 6 месяцев). В условиях длительного обострения эпизоотической активности в природном очаге, регистрируемой с 2014 г., в Республике Калмыкия проводилась специфическая профилактика ВЧЖ на протяжении 3-х последних лет, а персонал ФКУЗ «Астраханская ПЧС», в соответствии с инструкцией по применению препарата, ежегодно вакцинируется против чумы. Среди обследованных 20 человек были три раза вакцинированы против чумы, 95 – более 3-х раз, 5 – впервые вакцинированы ВЧЖ.

От каждого участвующего в исследовании предварительно было получено письменное

согласие на его проведение. Работа одобрена этическим комитетом Саратовского государственного медицинского университета (протокол № 5 от 02.02.2016 г.). В работе использовали ВЧЖ производства ФКУЗ «Ставропольский НИПЧИ» (серия №1-15, 12.03.2015-12.03.2018), представляющую собой лиофилизированную живую культуру вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis* EV НИИЭГ со стабилизатором. Вакцинация ВЖЧ проводилась накожным способом персоналом больниц Астраханской области и районов Калмыкии. Забор крови из локтевой вены осуществляли в пробирки с антикоагулянтом (гепарином). Иммунофенотипирование лейкоцитов проводили с использованием двух четырёхцветных реагентов меченых флуорохромами моноклональных антител (Cyto-Stat CD45-FITC, CD4-PE, CD8-ECD, CD3-PC5 и Cyto-Stat CD45-FITC, CD56-PE, CD19-ECD, CD3-PC5), разработанных фирмой Backman Coulter (США) для быстрой оценки основных показателей, характеризующих состояния иммунной системы людей на клеточном уровне [12]. С помощью этих реагентов и параметров светорассеяния мы определяли в микрообъёмах цельной крови относительное содержание лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов (клеток с фенотипом CD45+), а также относительное количество в суммарных популяциях лимфоцитов Т-клеток (CD3+), В-клеток (CD19+), натуральных киллеров (NK-клеток, CD56+), Т-лимфоцитов хелперов (Th, CD4+) и цитотоксических Т-лимфоцитов (Tcyt, CD8+). Иммунорегуляторный индекс (ИРИ) вычисляли как отношение Th к Tcyt [3]. Для определения в крови относительного количества лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов, несущих поверхностный фенотипический маркер раннего апоптоза, применяли одноцветный реагент CD95-FITC (Backman Coulter, США) [10].

В 100 мкл цельной крови вносили 10 мкл препарата меченых моноклональных антител, перемешивали на Вортекс V-3 и через 20 мин экспозиции образца в темноте при комнатной температуре к нему добавляли 2 мл реагента (BD FACS Lysing Solution), созданного фирмой BD Biosciences (США) для эффективного лизиса эритроцитов крови человека в условиях, одновременно обеспечивающих фиксацию и обеззараживание исследуемого материала. Реагент готовили согласно инструкции по его применению. Для исключения потерь клеток на этапе подготовки исследуемых образцов центрифугирование не использовали. Обработанные лизирующим и фиксирующим реагентом окрашенные образцы крови хранили в темноте при  $4 \pm 0,5$  °C до 3-х суток, времени необходимого для доставки образца с территории природного очага в специализированную лабораторию. Выбранный режим подготовки проб обеспечивал качественные результаты цитометрического анализа.

Лейкоциты исследовали на лазерном проточном цитометре CyAn ADP DakoCytomation (Дания), который готовили к работе с образцами цельной

периферической крови человека согласно рекомендациям [12]. Для визуализации, анализа и статистической обработки цитометрических данных применяли программное обеспечение Summit v. 4.3 Built 2445 (Dako).

Для определения продукции цитокино в развели венозную кровь с антикоагулянтом в соотношении 1:4 средой RPMI 1640, содержащей 100 мкг/мл гентамицина. В качестве индуктора продукции цитокино в использовали стандартный Т-клеточный митоген конканавалин А (ПанЭко, Россия) в концентрации 15 мкг/мл. Контролем служили клетки крови, культивируемые только в среде RPMI-1640. Опытные и контрольные образцы инкубировали в течение 24 часо в при температуре 37 °C. Затем клеточную суспензию осаждали центрифугированием при 400 g в течение 15 мин, полученные образцы замораживали и хранили до использования при температуре  $-20 \pm 0,5$  °C [13].

Индуктированную конканавалином А продукцию цитокино в определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) с помощью коммерческих наборов в для определения IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) и IL-17A (eBioscience, Австрия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе «LAZURIT» (Dynex Technologies, США) при длине волны 450 нм.

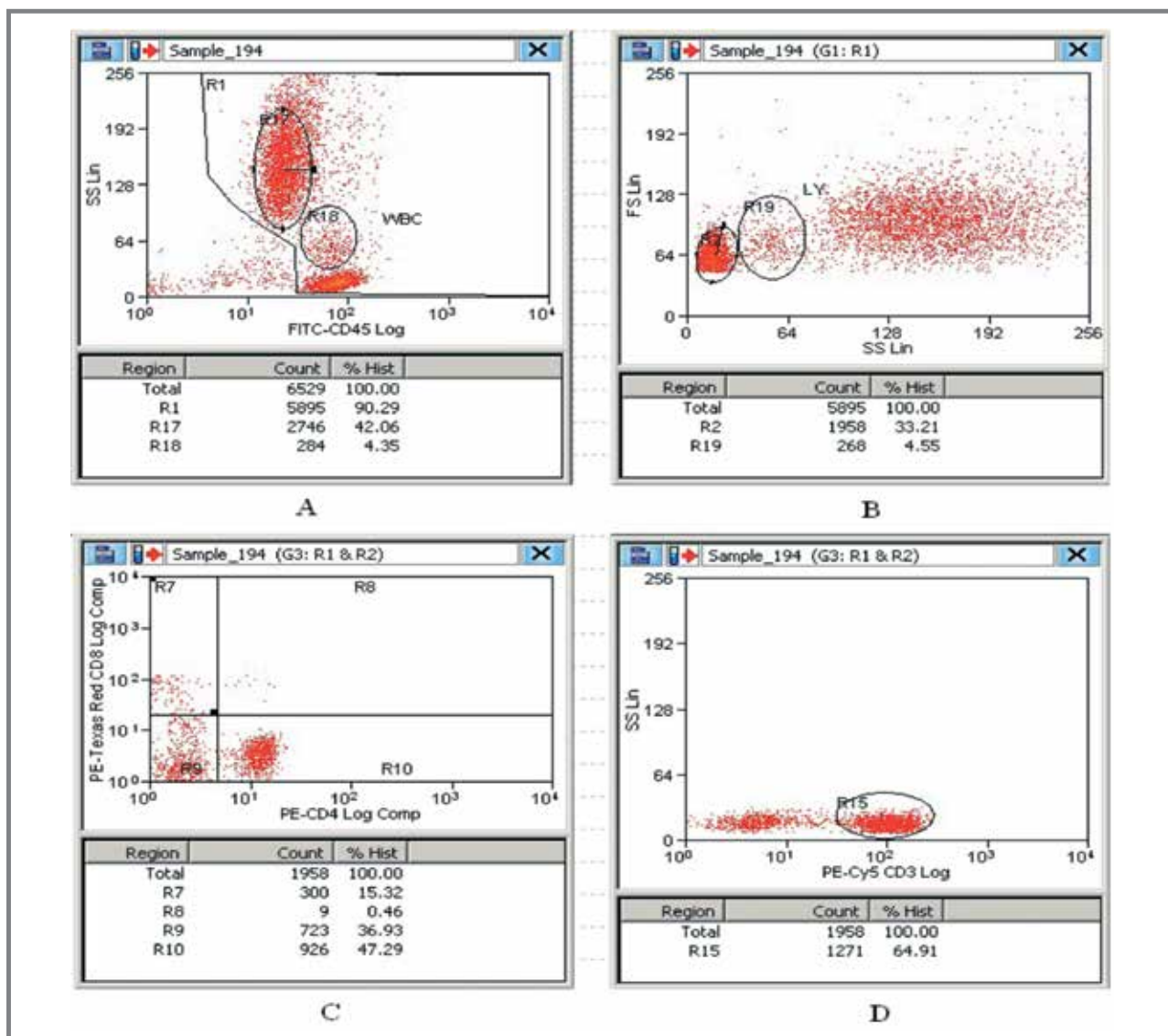
Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартных статистических программ, определяя среднее значение анализируемого показателя (M) и ошибку средней арифметической (m). Достоверность различий показателей в исследуемых группах оценивали по t-критерию Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Стандартный протокол цитометрического анализа для быстрого определения в крови человека относительного количества лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов, а также количества Т-лимфоцитов в хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов в и общего числа Т-клеток, представлен в виде наглядных цитограмм на рисунке 1. Цитограмма на рисунке 1А свидетельствует, что целые неповреждённые CD45+лейкоциты обладают, в отличие от клеточного дебриса, интенсивной иммунофлуоресценцией после взаимодействия с мечеными FITC моноклональными антителами и дифференцируются в область R1. Чтобы исключить дебрис, локализованный вне зоны R1, и обеспечить этим адекватное определение лейкоцитарной формулы по параметрам светорассеяния (рис. 1B), проводили по R1 автоматическое гейтирование. По степени внутриклеточной гранулярности на основании оценки параметра SS (см. рис.1 B) обеспечивалось чёткое дифференцирование лимфоцитов в (область R2) и моноцитов в (R19) от гранулоцитов. Относительное содержание трёх типов клеток иммунной системы в суммарной лейкоцитарной

**Рисунок 1. Протокол экспресс-анализа лейкоцита в микрообъёме цельной крови человека с использованием четырёхцветного реагента CYTO-STAT CD45-FITC, CD4-PE, CD8-ECD, CD3-PC5**

**Figure 1. Protocol for the rapid analysis of leukocytes in the microvolume of human whole blood using the four-color reagent CYTO-STAT CD45-FITC, CD4-PE, CD8-ECD, CD3-PC5**



Примечание: А – дифференцирование от клеточного дебриса CD45+ лейкоцитов (WBC – white blood cells), регистрируемых в области R1; В – дискриминация дебриса из зоны анализа путём гейтирования по области R1 (G1:R1) при дифференциальном подсчёте лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов; подсчёт Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток (С), а также общего числа Т-лимфоцитов (D) после выбора зоны, соответствующей лимфоцитам (R2), и гейтирования по R1 и R2 (G3:R1 & R2).

Note: A – differentiation from cell debris of CD45+ white blood cells (WBC – white blood cells) recorded in the R1 region; B – discrimination of debris from the analysis zone by gating in the R1 (G1: R1) region with differential counting of lymphocytes, monocytes and granulocytes; counting T-helpers and cytotoxic T-cells (C), as well as the total strength of T-lymphocytes (D) after selecting the area corresponding to lymphocytes (R2) and gating according to R1 and R2 (G3: R1 & R2).

популяции приводится в данном случае для каждой из областей анализа под цитогаммой и составляет соответственно 33,2, 4,6 и 62,2% – нормальная лейкоцитарная формула у людей [2].

Цитогамма на рисунке 1 С – это результат анализа образца крови по таким параметрам, как относительное содержание в нём CD4+ Т-лимфоцита в хелперо в (47,29% в области R10) и CD8+ цитотоксических Т-лимфоцита в (15,32% в области R7). Значение ИРИ в данном случае это отношение  $47,29/15,32 = 3,14$ . На характерной цитогамме (рис. 1 D) представлен результат определения в том же образце крови общего числа CD3+ Т-лимфоцита в (64,91% в области R15).

Впервые на территории Прикаспийского природного очага чумы проводили оценку иммунного статуса лиц, привитых проти в чумы. Это позволило выявить группу людей, в организме которых процессы Т-клеточной иммунорегуляции существенно отличались от нормы. В таблице 1 представлено относительное содержание популяций лимфоцита в и субпопуляций Т-клеток у вакцинированных ВЧЖ. Так, у 14 человек (11,7%) из 120 обследованных лиц (группа II, n = 14) по данным проточной цитометрии регистрировали аномально низкие исходные значения ИРИ (ИРИ < 1). В основном среди этих людей были лица ранее многократно вакцинированные ВЧЖ. Самые низкие значения ИРИ (0,56 и 0,63) были



**Таблица 1. Относительное содержание популяций лимфоцитов и субпопуляций Т-клеток в крови лиц, вакцинированных против чумы****Table 1. The relative content of lymphocyte populations and subpopulations of T cells in the blood of people vaccinated against plague**

Группа Group	Срок после прививки в месяцах Post vaccination period month	Исследуемый показатель, в % (M±m) The studied indicator, in % (M + m)					ИРИ Immunoregulatory index
		Th (CD4+)	Tcyt (CD8+)	Т-клетки (CD3+)	В-клетки (CD19+)	НК-клетки (CD56+)	
I	0	37,3 ± 1,3	27,8 ± 1,1	68,6 ± 1,6	10,5 ± 0,7	14,9 ± 1,0	1,44 ± 0,12
	1	43,3 ± 0,9**	25,5 ± 1,7	71,0 ± 2,5	12,4 ± 0,4	16,7 ± 1,1	1,76 ± 0,09**
	6	35,7 ± 3,6	24,0 ± 1,5	65,7 ± 2,8	9,1 ± 0,9	17,8 ± 1,6	1,63 ± 0,14**
II	0	28,8 ± 1,6 *	37,5 ± 1,3*	73,7 ± 1,8	7,6 ± 1,0	9,9 ± 0,7*	0,84 ± 0,03*
	1	41,2 ± 1,4**	37,3 ± 1,4	78,7 ± 1,1	8,6 ± 0,8	10,7 ± 0,9	1,13 ± 0,07**
	6	30,2 ± 1,0	38,0 ± 1,3	68,0 ± 1,6	9,2 ± 0,7	10,6 ± 1,1	0,81 ± 0,05*
III	0	34,7 ± 0,9	23,7 ± 1,2	66,4 ± 1,6	9,3 ± 0,9	10,9 ± 1,0	1,52 ± 0,08
	1	44,5 ± 1,2**	23,8 ± 1,3	69,5 ± 1,7	10,0 ± 1,2	12,4 ± 0,8	1,89 ± 0,11**
	6	37,2 ± 1,3	24,5 ± 1,0	65,1 ± 1,4	10,1 ± 0,4	14,0 ± 0,9**	1,77 ± 0,09**

Примечание: \*достоверность различий между показателями в группах 1 и 2 ( $p < 0,05$ ); \*\*достоверность различий по отношению к 0 сроку в 1-ой группе ( $p < 0,05$ ).

Note: \*significance of differences between indicators in groups 1 and 2 ( $p < 0.05$ ); \*\*significance of differences with respect to the 0th term in the 1st group ( $p < 0.05$ ).

зарегистрированы при исследовании лейкоцитов в крови двух человек, имеющих на момент обследования соответственно 20-ю и 11-ю прививку ВЧЖ.

В отличие от многократно вакцинированных, для людей, ранее не прививавшихся ВЧЖ (группа I,  $n = 5$ ), а также для большинства лиц, вакцинированных против чумы неоднократно (группа III,  $n = 101$ ), регистрировали перед очередной вакцинацией нормальные значения ИРИ (см. табл. 1), которые, как известно, должны быть больше единицы [3].

Причиной низких значений ИРИ у лиц группы II являлось повышенное содержание в их крови цитотоксических Т-лимфоцитов при одновременно сниженном количестве Т-лимфоцитов в хелперов (см. табл. 1). Истощение пула Т-хелперов, обладающих уникальными распознающими рецепторами, является признаком иммунодефицитного состояния, при котором из-за нарушения Т-клеточной иммунорегуляции резко снижается эффективность распознавания новых антигенов и формирование адекватного специфического иммунного ответа [4,15]. Поскольку люди с таким состоянием иммунной системы обладают повышенной восприимчивостью к инфекциям и попадают в группу риска, например, по туберкулезу [3], возможно, для лиц, проживающих на территориях природных очагов чумы и входящих в группу риска по заболеванию этой инфекцией (охотники, чабаны, жители сельской местности, медицинские работники), имеет смысл выделять группы повышенного риска по заражению чумой с учетом исходных показателей их иммунного статуса.

Кроме того, среди лиц, отнесенных к группе II, регистрировали методом проточной цитометрии снижение

относительного количества натуральных киллеров при повышенном содержании общего числа лимфоцитов. Доля гранулоцитов в крови лиц группы II была ниже, чем в крови лиц, ранее не прививавшихся ВЧЖ. При этом, сниженное количество клеток врожденного иммунитета, играющих ключевую роль в антибактериальной защите [14], регистрировали на фоне повышения в крови относительного числа гранулоцитов, несущих поверхностный фенотипический маркер раннего апоптоза CD95 (рис. 2, табл. 2).

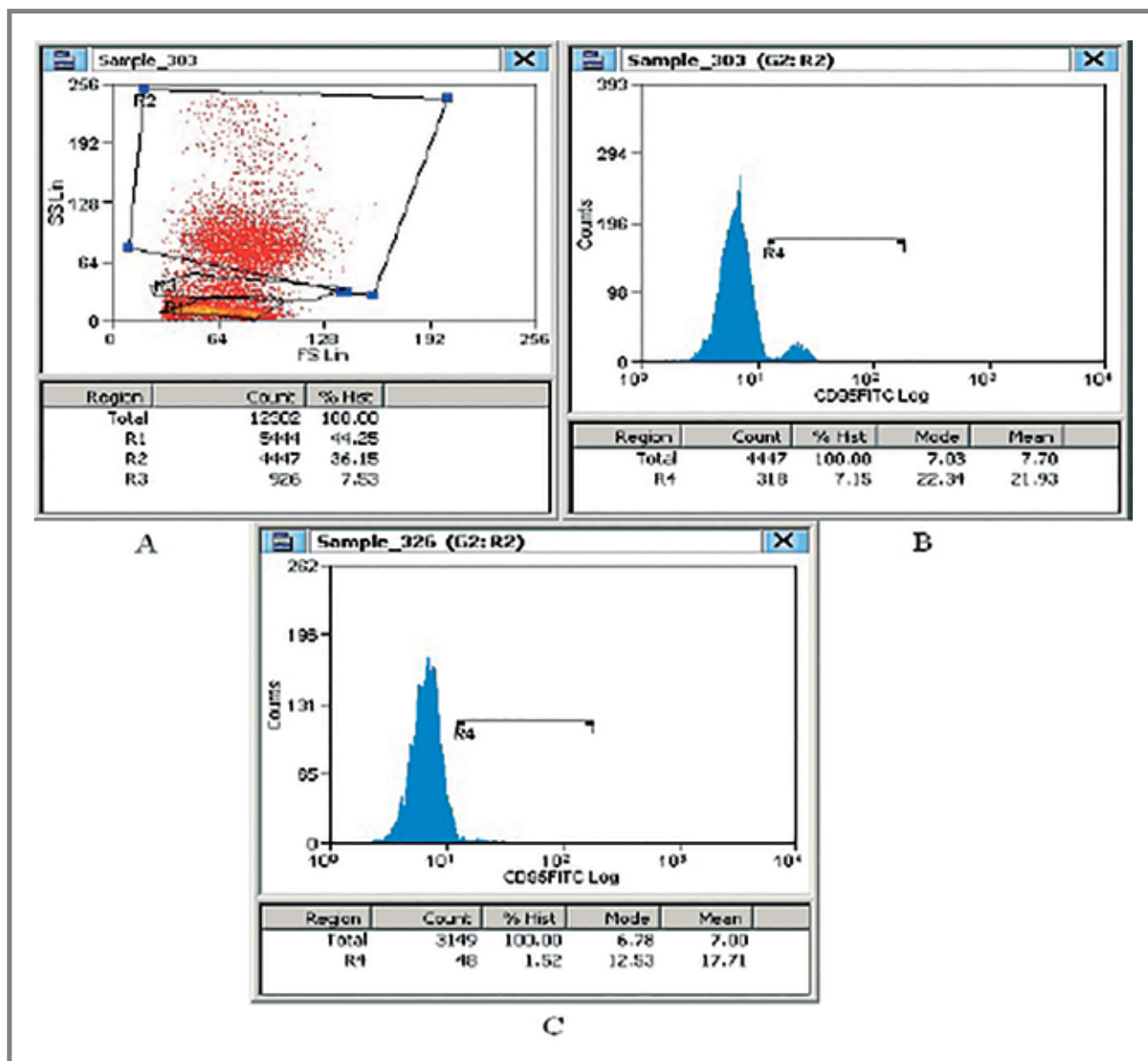
В таблице 3 представлены данные по продукции цитокинов клетками крови лиц, вакцинированных ВЧЖ. Во всех выделенных группах встречались лица, отличающиеся по продукции некоторых цитокинов (IL-2 и IL-17), индуцируемых в крови активатором Т-клеточной пролиферации, что, возможно, свидетельствовало о различном (индивидуальном) исходном функциональном состоянии Т-клеточного звена иммунитета среди людей.

Через месяц после применения ВЧЖ результаты оценки изменений клеточных показателей иммунного статуса у лиц, относящихся к трем группам, подтвердили экспериментальные данные, ранее полученные нами с помощью проточной цитометрии у вакцинированных против чумы сотрудников в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» [10]. В этот срок, независимо от исследуемой группы, под влиянием ВЧЖ в крови достоверно повышалось относительное количество моноцитов и Т-лимфоцитов в хелперов. Особенностью реакции клеток иммунной системы у лиц группы II было более высокое общее число CD3+ Т-клеток на ранней стадии иммунологической перестройки (см. табл. 1, 2).

## Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

**Рисунок 2. Алгоритм анализа образца в крови на наличие гранулоцитов, положительных по фенотипическому маркеру раннего апоптоза (CD95)**

*Figure 2. Algorithm for analysis of blood samples for the presence of granulocytes positive for the phenotypic marker of early apoptosis (CD95)*



Примечание: А – выбор зоны анализа, соответствующей гранулоцитам по параметрам светорассеяния (R2); Гистограммы В и С иллюстрируют различное содержание CD95+ гранулоцита в (область R4) в образцах крови лиц, относящихся, соответственно, к группам II (7,15%) и III (1,52%).

Note: A - selection of the analysis zone corresponding to granulocytes according to light scattering parameters (R2); Histograms B and C illustrate the different contents of CD95 + granulocytes (region R4) in blood samples of individuals belonging, respectively, to groups II (7.15%) and III (1.52%).

О влиянии противочумной вакцинации на функциональную активность Т-клеточного звена иммунитета у людей свидетельствовали данные сравнительной оценки митоген-индуцируемой продукции цитокинов, особенно через 6 месяце в после прививки (табл. 3). Однако метод проточной цитометрии позволил получить важную информацию об изменениях относительного содержания в крови Т-клеток, ответственных за иммунорегуляцию на субпопуляционном уровне. Значения ИРИ через месяц после вакцинации за счёт повышения доли Т-хелперо в суммарном пуле лимфоцито в достоверно увеличивались во всех трёх группах,

но через полгода эти изменения сохранялись на том же уровне только в группах I и III. В группе II регистрируемые методом проточной цитометрии индивидуальные значения ИРИ возвращались через 6 месяце в к своим исходно низким значениям (ИРИ < 1). То есть, интенсивность клеточного иммунного ответа у людей на ВЧЖ зависела от индивидуальных клеточных показателей иммунного статуса организма (см. табл. 1) до начала проведения мероприятий по специфической профилактике, что согласуется с полученными ранее данными при обследовании персонала противочумных учреждений [15].

**Таблица 2. Влияние противочумной вакцинации на лейкоцитарную формулу, на экспрессию маркера раннего апоптоза на поверхности лимфоцита в крови и клеток врождённого иммунитета****Table 2. The effect of anti-plague vaccination on the leukocyte formula, on the expression of a marker of early apoptosis on the surface of blood lymphocytes and cells of innate immunity**

Группы	Срок после прививки в месяцах Post vaccination period month	Исследуемый параметр The investigated parameter					
		Л, % L, %	М, % M, %	Г, % G, %	Л <sub>95</sub> , % L <sub>95</sub> , %	М <sub>95</sub> , % M <sub>95</sub> , %	Г <sub>95</sub> , % G <sub>95</sub> , %
Группа I Group I (n = 5)	0	32,7 ± 1,2	4,6 ± 0,4	62,8 ± 1,5	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,1	1,7 ± 0,6
	1	30,0 ± 1,0	7,1 ± 0,7*	63,0 ± 1,3	–	–	–
	6	28,4 ± 2,1	3,9 ± 0,6	67,7 ± 1,7	,1 ± 0,03	1,4 ± 0,7**	5,4 ± 0,3**
Группа II Group II (n = 14)	0	38,5 ± 1,1*	5,6 ± 0,3	54,0 ± 1,3*	0,2 ± 0,06	0,3 ± 0,16	4,5 ± 0,2*
	1	33,2 ± 1,6	8,2 ± 0,5**	59,3 ± 2,3	–	–	–
	6	29,1 ± 1,8**	4,9 ± 0,4	61,2 ± 2,0	0,2 ± 0,05	0,3 ± 0,1	7,0 ± 1,1**
Группа III Group III (n = 101)	0	35,1 ± 1,0	4,8 ± 0,3	59,1 ± 1,3	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,1	6,3 ± 0,9*
	1	37,8 ± 1,3	8,5 ± 0,3**	58,6 ± 1,2	–	–	–
	6	26,8 ± 1,4**	4,6 ± 0,2	64,5 ± 1,5	0,1 ± 0,02	0,8 ± 0,2**	6,2 ± 0,7

Примечание: оценивали относительное содержание в крови лимфоцита в (Л), моноцита в (М) и гранулоцита в (Г). Л<sub>95</sub>, М<sub>95</sub> и Г<sub>95</sub> – это клетки, экспрессирующие на поверхности CD95. Группы и обозначения достоверных различий в группах как в таблице 1.

Note: the relative blood levels of lymphocytes (L), monocytes (M) and granulocytes (G) were evaluated. L<sub>95</sub>, M<sub>95</sub> and G<sub>95</sub> are cells expressing on the surface CD95. Groups and designations of significant differences in groups as in table 1.

**Таблица 3. Митоген-индуцированная продукция цитокинов ex vivo в крови ревакцинированных лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы****Table 3. Mitogen-induced ex vivo cytokine production in the blood of revaccinated individuals living in the Caspian sandy natural plague focus**

Цитокины Cytokines	Митоген-индуцированная продукция, пг/мл (M ± m) Mitogen-induced production, pg / ml (M ± m)								
	До вакцинации Before vaccination			1 месяц после вакцинации 1 month after vaccination			6 месяцев после вакцинации 6 month after vaccination		
	I группа I group	II группа II group	III группа III group	I группа I group	II группа II group	III группа III group	I группа I group	II группа II group	III группа III group
IFN-γ	8,9 ± 1,8	7,7 ± 1,7	7,5 ± 0,5	12,6 ± 3,5	13,5 ± 3,5	11,6 ± 0,9	660,6 ± 107,2*	476,9 ± 72,8**	443,7 ± 18,9**
IL-1β	207,8 ± 27,5	222,9 ± 16,3	189,2 ± 9,3	17,1 ± 11,8**	11,7 ± 3,4**	16,2 ± 3,2**	269,9 ± 58,2	109,6 ± 30,7*	112,2 ± 10,9*
IL-2	0,08 ± 0,1	0,3 ± 0,1*	0,3 ± 0,03*	0,1 ± 0,04	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,05	65,9 ± 33,6**	71,4 ± 19,4**	89,1 ± 6,4**
IL-6	175,4 ± 57,7	115,6 ± 14,5	92,01 ± 7,8	1,1 ± 0,7**	1,8 ± 0,5**	4,3 ± 1,2**	370,4 ± 8,9	630,0 ± 168,5**	708,5 ± 117,1**
IL-17	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,3	1,5 ± 0,2	0,7 ± 0,2	1,9 ± 0,6**	2,5 ± 0,7**	108,2 ± 24,7**	83,3 ± 14,**	145,7 ± 11,3**

Примечание: \*достоверность различий между показателями в группах I и II (p < 0,05); \*\*достоверность различий по отношению к 0 сроку (до вакцинации) в I группе (p < 0,05).

Note: \*significance of differences between indicators in groups I and II (p < 0.05); \*\*significance of differences in relation to the 0th term (before vaccination) in group I (p < 0.05).

Автоматизация и стандартизация цитологических исследований на основе технологии импульсной проточной цитометрии существенно повышает информативность, достоверность и производительность оценки клеточных показателей иммунного статуса при обследовании больших групп населения [2,3] и может быть использована для своевременного выявления лиц с иммунодефицитами среди населения, проживающего на территории природного очага в чумы и входящих в группы риска по заражению этой инфекцией.

## Выводы

1. Применение метода проточной цитометрии при мониторингировании состояния иммунного статуса у лиц, проживающих на территориях природных очагов в чумы, позволяет эффективно выявлять лиц с низким значением ИРИ для выделения групп повышенного риска по заболеванию чумой и слабым формированием защитных реакций на специфическую профилактику этой инфекции.
2. Установлено, что исходные показатели иммунного статуса влияют на интенсивность

## Practical Aspects of Epidemiology and Vaccine Prevention

последующей клеточной иммунологической перестройки у людей в ответ на вакцинацию ВЧЖ. Для группы риска с аномальными значениями ИРИ характерна менее интенсивная и менее длительная ответная клеточная реакция, свидетельствующая об относительном истощении возможностей иммунной системы.

3. Проведение иммунологического мониторинга среди лиц, проживающих на территориях природных очагов чумы и подвергающихся вакцинации ВЧЖ по эпидемическим показаниям, расширяет возможности для принятия управленческих решений, направленных на сбалансированное применение метода в специфической и неспецифической профилактики этой особо опасной инфекции.

## Литература

1. Матросов А.Н., Лопатин А.А., Попов Н.В. и др. Неспецифическая профилактика чумы в Прикаспийском песчаном природном очаге // Здоровье населения и среда обитания. 2015. Т. 262, № 1. С. 30–32.
2. Козинцев Г.И., Высоцкий В.В., Погорелов В.М. и др. Кровь и инфекция. М.: Триада-Фарм; 2001.
3. Васильева Е.В., Кудрявцев В.В., Максимов Г.В. и др. Влияние ВИЧ-инфекции и туберкулеза на степень дифференцировки Т-лимфоцитов в периферической крови // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2. С. 151–161.
4. Макарова В.Г., Устинова О.Ю., Долгих О.В., Загумённых 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. Т. 11, № 248. С. 27–29.
5. Балахонов В.С., Попова А.Ю., Мищенко А.И. 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. С. 55–60.
6. Кудрявцев В.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметра в иммунного статуса с использованием шестичетверного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 1. С. 19–26.
7. Bolton D., Roederer M. Flow cytometry and the future of vaccine development // Expert Rev Vaccines. 2009. Vol. 8, N 6. P. 779–789.
8. Saikh K., Kissner T., Dyas B. Human cytolytic T cell recognition of *Yersinia pestis* virulence proteins that target innate immune response // J Infectious Diseases. 2006. N 194. P. 1753–1760.
9. Бозачева Н.В., Крючко А.В., Дармо И.В. и др. Экспериментальная оценка методом проточной цитофлуориметрии уровня клеточной иммунологической памяти у лиц, вакцинированных против чумы и сибирской язвы // Клиническая лабораторная диагностика. 2013. № 11. С. 48–53.
10. Кравцов А.Л., Ключева С.Н., Шуковская Т.Н., Бугоркова С.А. Проточно-цитофлуориметрическое исследование влияния противочумной вакцинации на популяционный состав лейкоцитов в крови человека и экспрессию на клеточной поверхности медиатора апоптоза // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9, № 4. С. 435–445.
11. 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. Т. 7, № 2. С. 203–208.
12. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолан А.А. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 3. С. 225–268.
13. Ключева С.Н., Шмелькова Т.П., Шуковская Т.Н. Влияние олигонуклеотидов CpG ODN 2006 на продукцию цитокинов в клетках крови людей, вакцинированных против чумы // Медицинская иммунология. 2014. Т. 16, № 6. С. 531–538.
14. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А. и др. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 219–230.
15. Герасимова К.И. Показатели иммунного статуса людей, вакцинированных против чумы: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Саратов; 1990.

## References

1. Matrosov AN, Lopatin AA, Popov NV, et al. Non-specific prophylaxis of plague in the natural sandy focus of the Caspian sea region. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya* [Health and Habitat]. 2015;1(262):30–32. (In Russ.)
2. Kozinets GI, Vysotsky VV, Pogorelov VM, et al. Blood and infection. M.: Triada-Farm; 2001. (In Russ.)
3. Vasileva EV, Kudryavtsev IV, Maximov GV, et al. Impact of HIV infection and tuberculosis on the peripheral blood T-cell differentiation. *Infektsiya i immunitet* [Russian Journal of Infection and Immunity]. 2017;7(2):151–161. (In Russ.)
4. Makarova VG, Ustinova OU, Dolgikh OV, Zagumennyy AD. Immune profile and postvaccinal immune status for infections, controlled by the immunoprophylaxis implements for children under the combined aerogenic explosion by chemical anthropogenic substances. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya* [Health and Habitat]. 2013;11(248):27–29. (In Russ.)
5. Balakhonov SV, Popova AYU, Mishchenko AI, 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 epidemiological aspects. *Probl Osobo Opasn Infek* [Problems especially dangerous infections]. 2016;1:55–60. (In Russ.)
6. Kudryavtsev IV, Subbotovskaya AI. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya* [Medical Immunology]. 2015;17(1):19–26. (In Russ.)
7. Bolton D, Roederer M. Flow cytometry and the future of vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2009;8(6):779–789.
8. Saikh K, Kissner T, Dyas B. Human cytolytic T cell recognition of *Yersinia pestis* virulence proteins that target innate immune response. *J Infectious Diseases*. 2006;194:1753–1760.
9. Bogacheva NV, Kryuchkov AV, Darmov IV, et al. Experimental evaluation using flow cytometry level of cell immunological memory in individuals vaccinated against plague and anthrax. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* [Clinical Laboratory Diagnostics]. 2013;11:48–53. (In Russ.)
10. Kravtsov AL, Klyueva SN, Schukovskaya TN, Bugorkova SA. Flow cytometric assay of anti-plague vaccination influence on the human blood leukocyte population structure and apoptosis mediator expression on the cell surface. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal* [Russian Journal of Immunology]. 2015;9(4):435–445. (In Russ.)
11. Kulichenko AN, Abzaeva NV, Gostischeva SE, et al. The antigen-specific cell *in vitro* tests for post-vaccination anti-plague immunity formation. *Infektsiya i immunitet* [Russian Journal of Infection and Immunity]. 2017;7(2):203–208. (In Russ.)
12. Khaydukov SV, Baidun LA, Zurochka AV, Totolian AA. Methods. *Meditsinskaya immunologiya* [Medical Immunology]. 2012;14(3):225–268. (In Russ.)
13. Klyueva SN, Shmelkova TP, Schukovskaya TN. Influence of CpG ODN 2006 oligodeoxynucleotide on cytokine production by blood cells of humans vaccinated against plague. *Meditsinskaya immunologiya* [Medical Immunology]. 2014;16(6):531–538. (In Russ.)
14. Nesterova IV, Kolesnikova NV, Chudilova GA, et al. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 1. *Infektsiya i immunitet* [Russian Journal of Infection and Immunity]. 2017;7(3):219–230. (In Russ.)
15. Gerasimova KI. Immune status indicators of the vaccinated against plague people. Doctorate of med. sci. diss. Saratov; 1990. (In Russ.)

## Об авторах

- **Александр Леонидович Кравцов** – д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», 410005, Россия, Саратов, ул. Университетская, 46.
- **Виталий Александрович Кожевников** – м.н.с., отдела иммунологии Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», 410005, Россия, Саратов, ул. Университетская, 46. +7 9279198442, 787868@mail.ru.
- **Светлана Николаевна Ключева** – к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», 410005, Россия, Саратов, ул. Университетская, 46.
- **Ольга Михайловна Кудрявцева** – к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», 410005, Россия, Саратов, ул. Университетская, 46.
- **Татьяна Николаевна Шуковская** – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела иммунологии Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», 410005, Россия, Саратов, ул. Университетская, 46.

Поступила: 23.05.2019. Принята к печати: 22.07.2019.  
Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

## About the Authors

- **Alexander L. Kravtsov** – Dr. Sci. (Biol.), leading researcher of department of immunology of Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation.
- **Vitaliy A. Kozhevnikov** – junior researcher of department of immunology of Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya str., Saratov 410005, Russian Federation. +79279198442, 787868@mail.ru.
- **Svetlana N. Klyueva** – Cand. Sci. (Med.), researcher, of department of immunology of Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation.
- **Olga M. Kudryavtseva** – Cand. Sci. (Med.), senior researcher, of department of immunology of Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation.
- **Tat'yana N. Shchukovskaya** – Dr. Sci. (Med.), professor, of department of immunology of Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation.

Received: 23.05.2019. Accepted: 22.07.2019.  
Creative Commons Attribution CC BY 4.0.