DOI: 10.17117/na.2016.07.02.047

<http://ucom.ru/doc/na.2016.07.02.047.pdf>

Поступила (Received): 01.07.2016

**Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Пономаренко Д.Г.,
Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Катунина Л.С.
Оценка иммунно-аллергической перестройки организма
при формировании поствакцинального иммунитета
против чумы с помощью антиген-стимулированных
клеточных тестов in vitro**

**Gostischeva S.E., Abzaeva N.V., Ponomarenko D.G.,
Rakitina E.L., Kostuchenko M.V., Katunina L.S.
Evaluation of immune- allergic restructuring the body in
formation of post-vaccination immunity against the plague
by using antigen- stimulated cell tests in vitro**

Показана возможность и перспективность применения реакций активации базофилов и лимфоцитов, в условиях in vitro, со специфическим аллергеном (пестин ПП) для выявления повышенной чувствительности организма к возбудителю чумы и фактической привитости контингента, подлежащего вакцинации против чумы по эпидемическим показаниям

Ключевые слова: чума, вакцинация, иммунитет, клеточные тесты in vitro, базофилы, лимфоциты

Possibility and prospect of using the basophils and lymphocytes activation test in vitro with a specific allergen (pestin PP) for detecting hypersensitivity to the causative agent of and the actual graft contingent to vaccinated anti plague on epidemic indications

Key words: plague, vaccination, immunity, in vitro cell tests, basophils, lymphocytes

Гостищева Светлана Евгеньевна

Научный сотрудник

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15

Gostischeva Svetlana Evgenievna

Researcher

Stavropol plague control research institute

Stavropol, Sovetskaya st., 13-15

Абзаева Наталья Вячеславовна

Кандидат биологических наук, зав. лабораторией

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15

Abzaeva Natalija Vyacheslavovna

Candidate of Biological Sciences, Head of Laboratory

Stavropol plague control research institute

Stavropol, Sovetskaya st., 13-15

Пonomarenko Дмитрий Григорьевич

Кандидат биологических наук, зав. лабораторией

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15

Ponomarenko Dmitryi Grigorievich

Candidate of Biological Sciences, Head of Laboratory

Stavropol plague control research institute

Stavropol, Sovetskaya st., 13-15

Ракитина Екатерина Львовна

Кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15

Rakitina Ekaterina Lvovna

Candidate of Medical Sciences, Leading Researcher

Stavropol plague control research institute

Stavropol, Sovetskaya st., 13-15

Костюченко Марина Владимировна

Научный сотрудник

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15

Kostuchenko Marina Vladimirovna

Researcher

Stavropol plague control research institute

Stavropol, Sovetskaya st., 13-15

Катунина Людмила Семеновна

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15

Katunina Ludmila Semenovna

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher

Stavropol plague control research institute

Stavropol, Sovetskaya st., 13-15

Формирование инфекционного и поствакцинального иммунитета сопровождается специфической сенсibilизацией организма. Для выявления наличия и интенсивности сенсibilизации, с целью оценки напряженности клеточно-опосредованного иммунитета после вакцинации и диагностики инфекций, применяют кожные аллергологические тесты со специфическим аллергеном.

Е.И. Коробковой было показано, что после перенесенной чумной инфекции, так же, как и после профилактической вакцинации, возникает иммуноаллергическая перестройка организма, которая может быть выявлена с помощью внутрикожной пробы с различными аллергенами чумного микроба [3].

Для постановки внутрикожной пробы чаще всего используют экстракт убитой культуры – пестин безмикробный. В 70-е годы многие исследователи считали, что кожно-аллергическая реакция на пестин может служить хорошим показателем устойчивости организма к чуме [5, 7]. Однако, метод внутрикожных аллергических проб широкого внедрения так и не получил, в связи с возникновением побочных реакций на антигенную нагрузку (ухудшение общего состояния, развитие некроза на месте введения аллергена).

В последнее время проводятся исследования по разработке тестов выявления специфической сенсibilизации при бактериальных инфекциях, основанные на антигенной (аллергенной) активации лейкоцитов *in vitro*. Один из наиболее перспективных – цитометрический вариант теста активации базофилов специфическими аллергенами, основанный на технологии CAST® [4, 8, 9]. Оценку специфической иммунологической перестройки при инфекции и после вакцинации ряд исследователей рекомендуют проводить с использованием антиген-стимулированных клеточных реакций *in vitro*, с детекцией маркеров активации иммунокомпетентных клеток в цитометрическом анализе [1, 2].

Цель исследования – оценить интенсивность иммуно-аллергической перестройки организма в динамике формирования поствакцинального иммунитета против чумы.

Объект исследования – 17 человек, иммунизированных вакциной чумной живой из штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Взятие крови для постановки антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* осуществляли до вакцинации, на 7, 20 и 90 сут после введения вакцины. Аллергическую перестройку организма испытуемых определяли путем оценки интенсивности экспрессии базофилами CD63 при аллергенной стимуляции *in vitro*. Метод основан на технологии проточно-цитометрического анализа, которая позволяет количественно учесть степень повышенной чувствительности организма к возбудителю чумы. Постановку аллергической пробы проводили набором для *in vitro* алергодиагностики FlowCAST® (Buhlmann laboratories, Швейцария). Динамику формирования адаптивного клеточно-опосредованного иммунитета выявляли в клеточных тестах *in vitro*, исследовали маркеры ранней (CD25⁺) и поздней (HLA-DR⁺) активации лимфоцитов, используя моноклональные антитела (Beckman Coulter, США). Учет реакции проводили с помощью проточного цитофлуориметра FACS Calibur (BD, США). В качестве аллергена (антигена) использовали пестин ПП, полученный по методике предложенной Тараненко Т.М. [6], в нашей модификации. В качестве контроля и с целью выявления возможной спонтанной активации лимфоцитов, клетки активировали стерильным 0,9 % изотоническим раствором натрия хлорида.

Анализ результатов показал, что количество активированных пестином базофилов (экспрессирующих антиген CD63) у обследуемых до иммунизации в среднем составляло $5,87 \pm 0,39$ %, на 7 сут после вакцинации – $14,63 \pm 1,27$ %, на 20 сут – $7,45 \pm 1,84$ %. При этом у двух вакцинированных (28 %) интенсивность активации базофилов оставалась на достаточно высоком уровне – 14,97 % и 10,64 %. Через 3 месяца после введения вакцины, количество CD63-позитивных базофилов, находилось на уровне исследуемого показателя до вакцинации, составив в среднем $6,33 \pm 1,02$ %, однако у одного обследуемого (5,8 %) выявлены достоверно высокие значения уровня активации базофилов – $12,31 \pm 1,22$ %.

При исследовании активационных молекул лимфоцитов выявлено, что на 7 сут после иммунизации количество лимфоцитов, экспрессирующих антиген CD25, при стимуляции изотоническим раствором (контроль) составляло $13,25 \pm 1,50$ %, при активации пестином наблюдалось резкое статистически значимое увеличение до $17,42 \pm 0,72$ % ($p < 0,05$). На 20 и 90 сут после иммунизации интенсивность специфической активации базофилов снизилась до $11,96 \pm 1,57$ % и $14,36 \pm 1,46$ % соответственно, контрольные значения в эти сроки исследования составили $12,17 \pm 1,38$ % и $14,15 \pm 1,37$ %.

Лимфоциты, экспрессирующие маркеры поздней активации HLA-DR, на 7, 20 и 90 сут исследования при изучении спонтанной активации составили $16,99 \pm 0,91$ %, $29,05 \pm 2,81$ % и $33,97 \pm 3,21$ %. Специфическая активация пестином в те же сроки не выявила значимого повышения лимфоцитов, экспрессирующих антиген HLA-DR и равнялась $18,88 \pm 4,31$ %, $31,01 \pm 2,81$ % и $33,48 \pm 2,28$ % соответственно.

Таким образом, тест активации базофилов с пестином ПП *in vitro* можно использовать для оценки интенсивности IgE-опосредованной сенсibilизации в качестве маркера повышенной чувствительности организма к возбудителю

чумы и фактической привитости контингента, подлежащего вакцинации по эпидемическим показаниям, с целью оценки иммунологической эффективности проводимых профилактических мероприятий.

Список используемых источников:

1. Зенин В.В., Аксенов Н. Д., Шатрова Л. Н., Марахова И. И. Динамика экспрессии CD 25 в лимфоцитах периферической крови человека, стимулированных фитогемагглютинином или интерлейкином-2 // Цитология. 2009. Т. 51, № 6. С. 506-510.
2. Кашкин К.П., Бехало В.А. Стратегия иммунологических исследований в клинике инфекционных болезней // Клиническая лабораторная диагностика. 2004. № 3. С.23-34.
3. Коробкова Е.И. Живая противочумная вакцина. М.: Медгиз, 1956. 205 с.
4. Куличенко А. Н., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Рязанова А.Г. Использование теста активации базофилов с антраксином для лабораторной (in vitro) диагностики сибирской язвы // Проблемы особо опасных инфекций. 2012. Вып. 3 (113). С. 86-88.
5. Павлова Л.П. Внутривенная аллергическая реакция на пестин как показатель иммунитета к чуме. Автореферат диссертации. Саратов, 1964. 16 с.
6. Тараненко Т.М., Бахрах Е.Э. Получение очищенного аллергена пестина ПП // Материалы межинститутской научной конференции памяти Л.А. Тарасевича. Москва, 1967. С. 249-250.
7. Тараненко Т.М. Характеристика некоторых аллергенов, предложенных для выявления иммунитета при чуме. Автореферат диссертации. Саратов, 1968. 15 с.
8. De Weck A. L., Sanz M.L., Gamboa P.M., Aberer W., Bienvenu J., Blanca M., Demoly P., Ebo D.G., Mayorga L., Monneret G., Sainte Laudy J. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls II. Technical Issues // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 2008. Vol. 18(3). P. 143-155.
9. Lund G., Jacobi H., Skov P.S., Holm J., Lund K. Effect on cell surface markers following allergen-induced desensitization of human whole-blood basophils // J. Allergy Immunol. 2010. Vol. 153. P. 323-334.

© 2016, Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Катунина Л.С.
Оценка иммунно-аллергической перестройки организма при формировании поствакцинального иммунитета против чумы с помощью антиген-стимулированных клеточных тестов in

© 2016, Gostischeva S.E., Abzaeva N.V., Ponomarenko D.G., Rakitina E.L., Kostuchenko M.V., Katunina L.S.
Evaluation of immune- allergic restructuring the body in formation of post-vaccination immunity against the plague by using antigen- stimulated cell tests in v